

## جداسازی، شناسایی و ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اکتینوماست‌ها از رسوبات دریایی خلیج فارس در محدوده استان هرمزگان

محسن گذری\*<sup>۱</sup>، محمد صدیق مرتضوی<sup>۱</sup>، رامین کریم زاده<sup>۱</sup>، محمود ابراهیمی<sup>۱</sup>، رضا دهقانی<sup>۱</sup>

\*M\_gozari@yahoo.com

۱- پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۸۹

تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۴

### چکیده

اکتینوماست‌ها باکتریهای گرم مثبت، رشته ای و مولد بخش عمده ترکیبات زیست فعال می باشند. این پژوهش با هدف جداسازی و شناسایی اکتینوماست‌های مولد آنتی بیوتیک از رسوبات دریایی خلیج فارس در محدوده استان هرمزگان انجام شد. از میان ۳ محیط کشت منتخب محیط کشت M۱ با جداسازی ۳۲ ایزوله بیشترین کارایی را نشان داد. تیمار حرارتی ۱۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ دقیقه با جداسازی ۲۶ ایزوله بهترین نتیجه را ارائه نمود. در کل حدود ۶۰ ایزوله اکتینوماست از ۱۰ نمونه رسوب جداسازی شد. بررسی فعالیت ضد میکروبی ایزوله های بدست آمده نشان داد بترتیب ۳۳،۲۰ و ۳۰ درصد ایزوله ها در مقابل *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli* و *Candida albicans* فعالیت ضد میکروبی ارائه نمودند. مطالعات شناسایی مورفولوژیک، بیوشیمیایی، فیزیولوژیک و کموتاکسونومیک روی ایزوله های منتخب شامل Ifro ۱۲، Ifro 33 و Ifro ۴۷ بیانگر تعلق آنها به جنس *Streptomyces* بود. مطالعات ژنتیک ملکولی بر اساس آنالیز ژن ۱۶ rRNA s نشان داد ایزوله های Ifro ۱۲، Ifro 33 و Ifro ۴۷ دارای ۹۹ درصد تشابه بترتیب با سویه های *S. olivaceus*، *S. cacaoi* و *S. variabilis* بودند. آنالیز فیلوژنتیک بیانگر اشتقاق ایزوله های Ifro ۱۲ و Ifro 47 از یک جد مشترک بود. نتایج این مطالعه نشان داد ایزوله های منتخب می توانند کاندیدای نویدبخشی برای تحقیقات اکتشاف آنتی بیوتیک های جدید باشند.

**کلمات کلیدی:** اکتینوماست‌های دریایی، فعالیت ضد میکروبی، رسوبات دریایی، خلیج فارس

\*نویسنده مسئول

## مقدمه

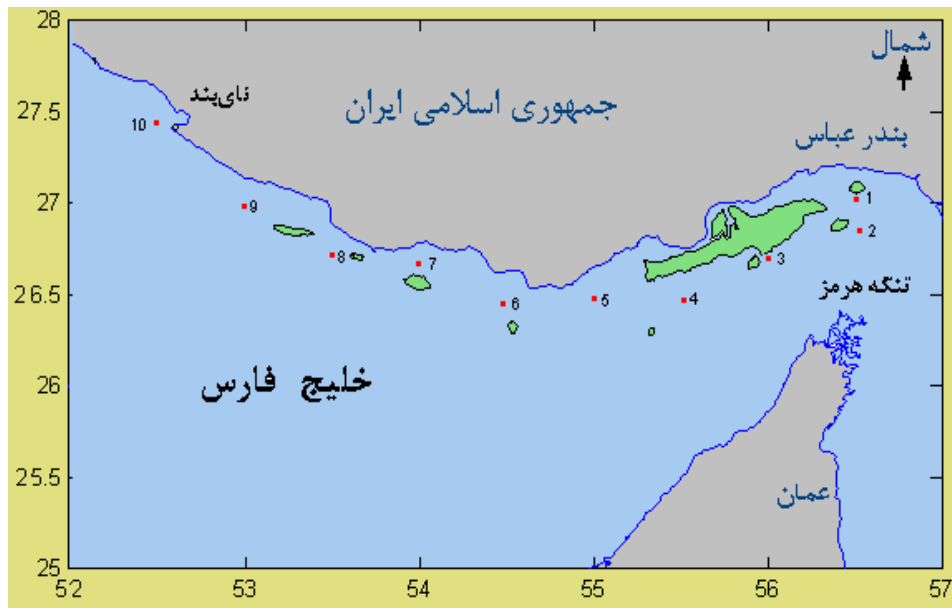
اکتینومایست‌ها گروهی از باکتریهای گرم مثبت می باشند که در میان پروکاریوت ها دارای جایگاه متمایزی بوده و کاربردهای منحصر به فردی در زیست فناوری دارند. این باکتریها با تولید متابولیت های مختلف تنوع فیزیولوژیک بالایی را ارائه می نمایند (Dworkin *et al.*, 2006). تقریباً نیمی از متابولیت های زیست فعال کشف شده، به ویژه آنتی بیوتیک ها، عوامل ضد تومور، عوامل تعدیل کننده سیستم ایمنی و آنزیم ها توسط اکتینومایست‌ها تولید شده اند (Manivasagan *et al.*, 2013). جنس های *Streptomyces*، *Amycolatopsis*، *Saccharopolyspora*، *Micromonospora* و *Actinoplanes* تولید کنندگان عمده ملکولهای زیستی مهم تجاری می باشند (Solanki *et al.*, 2008). سالیانه تنها از فروش آنتی بیوتیک های بدست آمده از استرپتومایسس ها ۲۵/۳ میلیارد دلار سود نصیب شرکتهای داروسازی می شود (Hranueli *et al.*, 2005). با کاهش قابل ملاحظه در سیر اکتشاف ترکیبات زیست فعال مهم از اکتینومایست‌ها خاکزی لزوم گسترش مطالعات در زمینه جداسازی از سایر منابع از جمله دریاها احساس گردید (Zotchev, 2012). دریاها حدود ۷۰ درصد سطح کره زمین را پوشانده و با توجه به پیچیدگی و تنوع بالای زیستگاه ها و شرایط محیطی متفاوت از جمله فشار، شوری، دما، pH، مواد مغذی و نورخوشید منابع بکری برای ارگانیسیم های مولد داروهای جدید می باشند. سطح بالای تنوع زیستی ارگانیسیم های دریایی و سازش شیمیایی با شرایط محیطی باعث ایجاد تنوع ژنتیک و متابولیک از جمله ایجاد مسیرهای بیوسنتزی جدید و تولید متابولیت های ثانویه با ساختارهای منحصر به فرد گردیده است (Molinski *et al.*, 2009). بنابراین

برآورد می شود که اکتینومایست‌های دریایی نیز با ویژگیهای متفاوت از انواع خاکزی خود انواع متنوعی از ترکیبات زیست فعال را تولید نمایند. علیرغم این تنوع زیستی در محیط دریایی تحقیق در زمینه فراورده های طبیعی دریایی هنوز در مرحله ابتدایی خویش قرار دارد و در مقایسه با زیستگاه های موجود در خشکی بررسی نشده باقی مانده است (Jensen *et al.*, 2005). با توجه به شیوع میکروارگانیسیم های بیماریزای مقاوم به آنتی بیوتیک اکتشاف آنتی بیوتیک های جدید بیش از همیشه ضروری می نماید (Payne *et al.*, 2006). این پژوهش با هدف دستیابی به سویه های اکتینومایست مولد ترکیبات ضد میکروبی از رسوبات خلیج فارس در محدوده استان هرمزگان و ارزیابی پتانسیل فعالیت ضد میکروبی جوامع اکتینومایست‌ها این منطقه انجام گردید.

## مواد و روش کار

### نمونه برداری و آماده سازی رسوبات دریایی

نمونه های رسوبات دریایی در بهمن ماه ۱۳۸۸ از ۱۰ ایستگاه تعیین شده در خلیج فارس در قلمرو آبهای استان هرمزگان جمع آوری شد (جدول ۱). جهت نمونه برداری از یک دستگاه نمونه بردار رسوبات سطحی (Grab Van Veen sampler) ساخت شرکت هیدروبیوس آلمان با سطح مقطع ۰/۱ متر مربع استفاده گردید. در کلیه ایستگاه ها پس از اتمام عملیات نمونه برداری بلافاصله محتویات رسوب داخل Grab به درون بطری های شیشه ای استریل منتقل و سپس در داخل یخچال با دمای حدود ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید و پس از اتمام گشت دریایی کلیه نمونه‌ها جهت بررسی به آزمایشگاه انتقال داده شد.



شکل ۱: موقعیت جغرافیایی ایستگاه های نمونه برداری شده در خلیج فارس

#### ارزیابی فعالیت ضد میکروبی ایزوله های اکتینومایست

اثر ایزوله های خالص شده اکتینومایست در مقابل سویه های *Escherichia coli* PTCC 1276، *Candida albicans* PTCC 1112، *Staphylococcus aureus* PTCC 5027 با استفاده از روش های آگار دولایه (Fguira et al., 2005) و انتشار از چاهک (Magaldi et al., 2004) مورد ارزیابی قرار گرفت و قطر هاله ممانعت از رشد پس از انجام ۳ تکرار ثبت شد.

#### شناسایی ایزوله های مولد ترکیب ضد میکروبی

ویژگی های مورفولوژیک ایزوله های مولد شامل شکل میسلیوم ها، رنگ میسلیوم رویشی و هوایی، میزان رشد و تشکیل اسپور در محیط های (ISP) International Streptomyces project مورد ارزیابی قرار گرفت. خصوصیات بیوشیمیایی ایزوله های منتخب شامل مصرف منابع کربن مختلف انجام شد. همچنین ویژگیهای فیزیولوژیک شامل تولید پیگمان و رشد در دماهای مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. شناسایی نوع ایزومر دی آمینو پایمیلیک اسید (DAP) دیواره سلولی با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک انجام شد (Whitman et

#### پیش تیمارهای حرارتی

نمونه های رسوب در شرایط سترون در پلیت های شیشه ای ریخته شد و در دماهای ۱۰۰، ۱۱۰ و ۱۲۰ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ دقیقه قرار داده شد (Bredholdt, 2008).

#### جداسازی اکتینومایست ها

بدنبال رقیق سازی ۰/۲ میلی لیتر از هر نمونه در محیط های نوترینت آگار،  $M_1$  حاوی (۱٪ نشاسته، ۰/۱٪ کازئین، ۰/۰۱٪ عناصر کمیاب، ۱/۶٪ آگار اضافه شده به ۷۵٪ آب دریا فیلتر شده و ۲۵٪ آب مقطر) و  $M_2$  حاوی (۰/۲۵٪ نشاسته، ۰/۱٪ پپتون، ۰/۰۵٪ عصاره مخمر، ۰/۰۱٪ گلیسروفسفات، ۱/۶٪ آگار اضافه شده به ۷۵٪ آب دریا فیلتر شده و ۲۵٪ آب مقطر) کشت داده شد محیط های کشت تا چهار هفته در دمای ۲۸ °C گرماگذاری شدند (Jensen et al., 1991).

NCBI بوسیله نرم افزار Megablast مورد مقایسه قرار گرفت (Zhang *et al.*, 2000). آنالیز فیلوژنتیک ایزوله های منتخب با استفاده از نرم افزار MEGA6 انجام شد و درخت فیلوژنتیک بر اساس روش neighbor-joining رسم گردید (Tamura *et al.*, 2013).

### نتایج

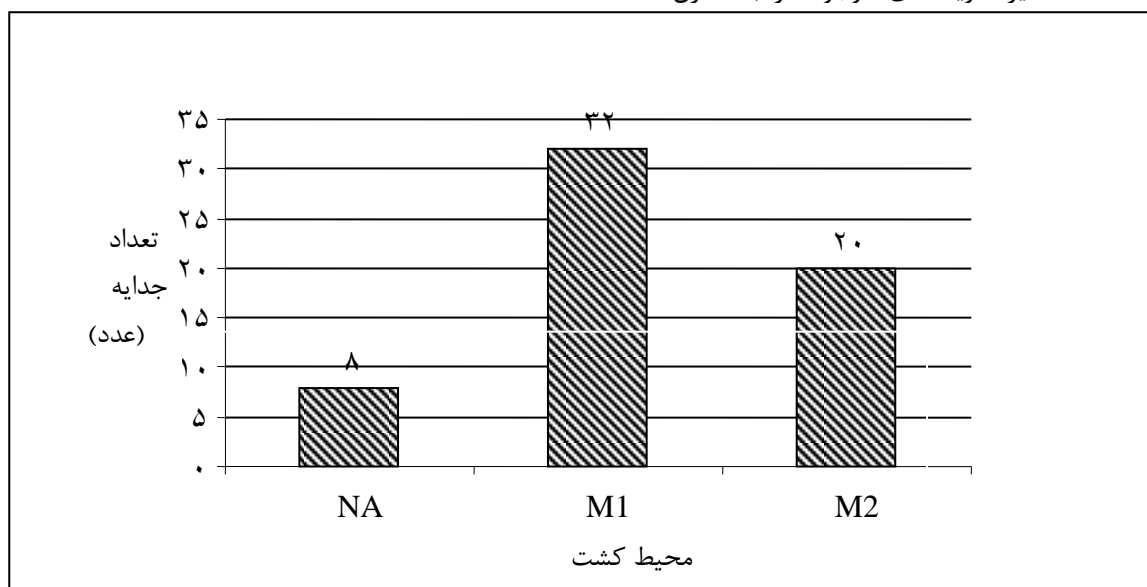
#### جداسازی اکتینومایست‌ها

نتایج نشان داد محیط کشت M<sub>1</sub> با جداسازی ۳۲ ایزوله بیشترین کارایی را ارائه نمود پس از آن محیط‌های کشت M<sub>۲</sub> و نوترینت آگار بیشترین تعداد ایزوله را جداسازی نمودند (شکل ۲)

(al., 2012). شناسایی ژنتیکی ایزوله های مولد بر اساس آنالیز توالی ژن 16s rRNA صورت گرفت. بدین منظور DNA ژنومی نمونه های مورد نظر با استفاده از روش Ezaki استخراج گردید (Ezaki *et al.*, 1990). بدنبال آن ژن 16s rRNA توسط واکنش PCR تکثیر گردید. تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن 16s rRNA ایزوله‌های موردنظر با روش Sanger انجام شد.

#### آنالیز فیلوژنتیک ایزوله های منتخب

به منظور ارزیابی کیفیت توالی ژن 16s rRNA سویه‌های منتخب از نرم افزار DNA Baser Sequence Assembler 4.10 استفاده شد. سپس توالی های بدست آمده در مقابل توالی‌های ژن 16s rRNA سایر سویه های موجود در بانک ژن

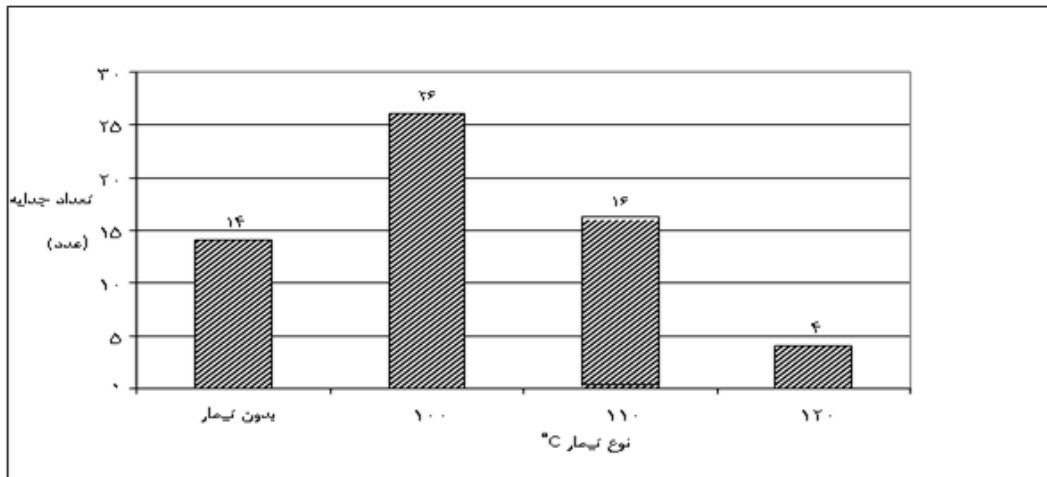


شکل ۲: میزان جداسازی اکتینومایست‌ها در محیط کشت های مختلف

۱۲۰ بترتیب با جدا نمودن ۱۶ و ۴ ایزوله در مرتبه بعدی قرار گرفتند (شکل ۳).

#### بررسی اثر چند تیمار حرارتی بر جداسازی اکتینومایست‌ها

نتایج بیانگر بیشترین تاثیر تیمار ۱۰۰° C با جداسازی ۲۶ ایزوله اکتینومایست بود. تیمار حرارتی ۱۱۰° C و ۱۰۰° C



شکل ۳: ارزیابی تاثیر تیمارهای فیزیکی بر جداسازی اکتینومایست‌ها

و ایزوله ۱۲ Ifro در مقابل *C.albicans* هاله ممانعت از رشد با قطر بیش از ۳۰ mm تولید کرد در حالیکه ایزوله های ۳۳ Ifro و ۴۷ Ifro در مقابل *C.albicans* هاله ممانعت از رشد بین ۲۰-۳۰ میلی متر ایجاد نمودند (جدول ۲). سنجش فعالیت ضد میکروبی ایزوله های مولد با روش انتشار از آگار بیانگر تولید و ترشح متابولیت های ثانویه ضد میکروبی توسط اکثر سویه های مولد بود (جدول ۳).

### ارزیابی فعالیت ضد میکروبی ایزوله های اکتینومایست

پس از غربالگری ۶۰ ایزوله اکتینومایست جداسازی شده ۲۰ ایزوله در مقابل *S.aureus*، ۱۲ ایزوله در مقابل *E.coli* و ۱۸ ایزوله در مقابل *C.albicans* فعالیت ضد میکروبی نشان دادند. از این میان ایزوله های ۱۲ Ifro، ۳۳ Ifro و ۴۷ Ifro هاله های ممانعت از رشد با قطر بیش از ۳۰ mm در مقابل *S.aureus* و هاله ممانعت از رشد بین ۲۰-۳۰ میلی متر در مقابل *E.coli* ایجاد کردند

جدول ۲: فعالیت ضد میکروبی ایزوله های اکتینومایست استفاده از روش آگار دو لایه

قطر هاله ممانعت از رشد			نام ایزوله
<i>C.albicans</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	
+	-	+	Ifro 1
+	+	+	Ifro 3
++	++	+++	Ifro 7
++	++	++	Ifro 10
++++	+++	++++	Ifro 12
++	-	++	Ifro 13
++	++	++	Ifro 14
++	++	+++	Ifro 22
+	-	+	Ifro 24
-	-	++	Ifro 28
++	-	++	Ifro 30
+++	+++	++++	Ifro 33
++	+	++	Ifro 39
++	+	++	Ifro 42
+++	+++	++++	Ifro 47
-	-	+	Ifro 49
+	-	-	Ifro 50
++	++	++	Ifro 51
++	+	++	Ifro 54
+	-	+	Ifro 55

قطر هاله ممانعت از رشد: + > ۱۰ mm, ++ > ۲۰-۳۰ mm, +++ > ۳۰-۴۰ mm, ++++ > ۳۰ mm

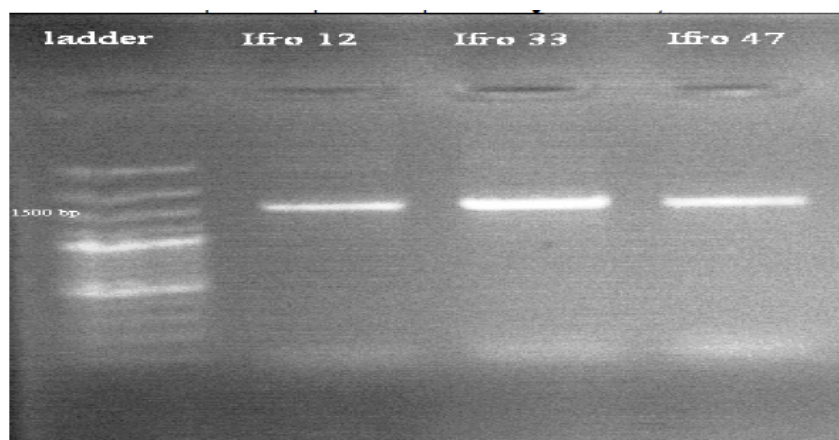
جدول ۳: فعالیت ضد میکروبی ایزوله‌های اکتینومایست با استفاده از روش انتشار از چاهک

نام ایزوله	قطر هاله ممانعت از رشد (mm)		
	<i>C.albicans</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>
Ifro 7	12	10	15
Ifro 10	12	9	15
Ifro 12	27	20	32
Ifro 14	13	10	16
Ifro 22	10	11	14
Ifro 28	0	0	16
Ifro 30	10	0	11
Ifro 33	30	17	35
Ifro 39	12	0	16
Ifro 42	15	0	13
Ifro 47	24	15	31
Ifro 51	12	12	16
Ifro 54	13	0	14

شناسایی ژنتیکی ایزوله‌های مولد پس از استخراج DNA و انجام واکنش PCR منجر به تکثیر ژن 16s rRNA با طول ۱۵۰۰ جفت باز گردید (شکل ۴). نتایج حاصل از تطابق ژن 16s rRNA ایزوله‌های مولد با نمونه‌های موجود در بانک ژن NCBI بیانگر بیشترین تشابه ایزوله‌های Ifro 12، Ifro 33 و Ifro 47 با *Streptomyces olivaceus* strain NBRC 12805، *Streptomyces cacaoi* strain NBRC 12748 و *Streptomyces variabilis* strain NRRL B-3984 به میزان ۹۹ درصد بود (جدول ۵).

#### شناسایی ایزوله‌های مولد

با توجه به میزان فعالیت ضد میکروبی ایزوله‌های Ifro 12، Ifro 33 و Ifro 47 جهت شناسایی اولیه انتخاب شدند. مطالعات مورفولوژیک نشان داد هر سه ایزوله دارای میسلیوم هوایی منشعب بودند. آرایش میسلیوم هوایی در ایزوله‌های Ifro 12 و Ifro 33 بصورت فنری و در ایزوله Ifro 47 بصورت حلقوی باز بود. خصوصیات رشدی ایزوله‌ها روی محیط‌های ISP و برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک، بیوشیمیایی در جدول ۴ ارائه گردید. بررسی کموتاکسونومیک نوع ایزومر دی آمینو پامپیلیک اسید دیواره سلولی هر سه ایزوله را از نوع LL تعیین نمود.

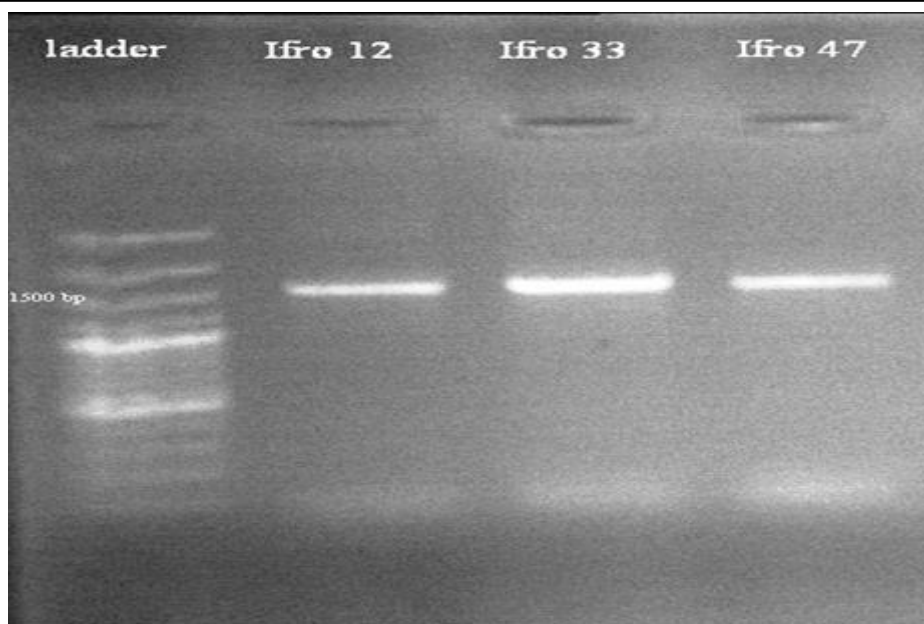


شکل ۴: ژن 16s rRNA سویه‌های مولد منتخب تکثیر شده با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

جدول ۴: ویژگی های مورفولوژیک، فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و کموتاکسونومیک ایزوله های مولد منتخب

Ifro 47	Ifro 33	Ifro 12	مشخصه	
W	GR	C	هوایی	بررسی رنگ
W	GR	C	رویشی	میسیلیوم
G	G	G	ISP II	رشد و تولید اسپور در محیط های
G	G	G	ISP III	
G	L	G	ISP IV	
G	G	G	ISP V	
G	L	G	ISP VI	
L	G	G	ISP VII	
L	L	L	CDA	
L	G	L	BA	
G	G	G	NA	
+	+	+	گلوکز	مصرف منابع کربن
+	+	+	فروکتوز	
+	+	+	زایلوز	
+	+	+	آرابینوز	
+	-	+	رامنوز	
-	-	-	سوکروز	
-	-	-	رافینوز	
+	+	-	تولید پیگمان ملانوتیدی	
-	+	-	تولید پیگمان غیر ملانوتیدی	
-	-	-	۴	محدوده ده ای رشد
+	+	+	۲۰	
+	+	+	۳۰	
+	+	+	۳۵	
+	-	-	۴۵	
L L	L L	L L	L L	نوع ایزومر DAP

رشد و تولید اسپور: خوب: G کم: L رنگ کلونی: کرم: C خاکستری: GR سفید: W



شکل ۴: ژن 16s rRNA سویه های مولد منتخب تکثیر شده با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)

جدول ۵: تطابق توالی ژن 16s rRNA سویه های مولد منتخب با نزدیک ترین سویه های موجود در بانک ژن NCBI

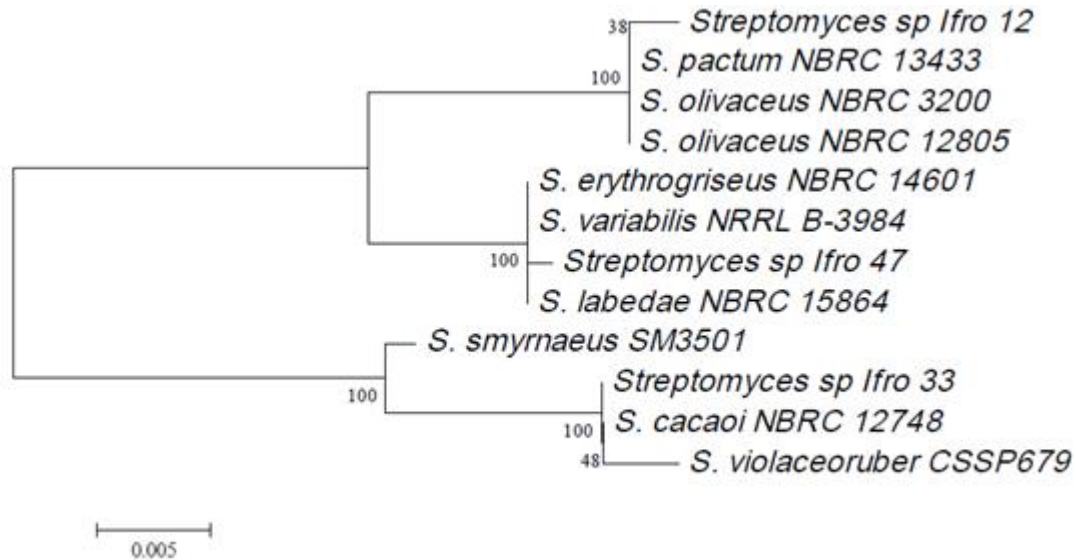
Isolate	closest strains	Max score	Total score	Query coverage	E value	Ident	Accession
Ifro 12	<i>Streptomyces olivaceus</i> strain NBRC 12805	1707	1707	100%	0.0	99%	NR_112581.1
	<i>Streptomyces olivaceus</i> strain NBRC 3200	1707	1707	100%	0.0	99%	NR_041202.1
	<i>Streptomyces pactum</i> strain NBRC 13433	1707	1707	100%	0.0	99%	NR_041134.1
Ifro 33	<i>Streptomyces cacaoi</i> strain NBRC 12748	1788	1788	100%	0.0	99%	NR_041061.1
	<i>Streptomyces violaceoruber</i> strain CSSP679	1759	1759	100%	0.0	99%	NR_115407.1
	<i>Streptomyces smyrnaeus</i> strain SM3501	1727	1727	99%	0.0	99%	NR_134201.1
Ifro 47	<i>Streptomyces variabilis</i> strain NRRL B-3984	1821	1821	99%	0.0	99%	NR_043840.1
	<i>Streptomyces labedae</i> strain NBRC 15864	1821	1821	99%	0.0	99%	NR_041192.1
	<i>Streptomyces erythrogriseus</i> strain NBRC 14601	1821	1821	99%	0.0	99%	NR_112438.1

بطوریکه در سه کلاستر متفاوت قرار گرفتند. بررسی درخت فیلوژنتیک بیانگر اشتقاق ایزوله های Ifro 12 و Ifro 47 از یک جد مشترک بود در صورتیکه ایزوله Ifro 33 به دودمان جداگانه ای تعلق داشت (شکل ۵).

#### آنالیز فیلوژنتیک ایزوله های منتخب

آنالیز فیلوژنتیک ایزوله های مولد منتخب با نزدیک ترین سویه ها بر اساس روش Neighbor-joining نشان داد اختلاف تکاملی بین ایزوله های منتخب مولد وجود دارد





شکل ۵: درخت فیلوژنتیک رسم شده بر اساس آنالیز ژن 16s rRNA بدست آمده از فاصله تکاملی ایزوله های منتخب با نزدیکترین سویه ها بر اساس روش Neighbour-joining.

## بحث

دریابی در محیط های کشت با محتوای پایین مواد آلی را تایید کرده اند (Koch 2001). از میان تیمارهای حرارتی مورد استفاده تیمار  $100^{\circ}\text{C}$  به مدت ۶۰ دقیقه بیشترین کارایی را در جداسازی اکتینومایست ها نشان داد. تیمار حرارتی با مهار عوامل مختل کننده از جمله رشد سایر باکتریهای غیر مرتبط و قارچهای موجود در نمونه رسوب میزان جداسازی اکتینومایست ها را ارتقا بخشید (Hames Kocabas & Uzel., 2012). در تیمارهای با دمای بالاتر از تعداد کلونی های اکتینومایست کاسته شد که می تواند به دلیل حضور اندک اکتینومایست های ترموفیل در نمونه های رسوب باشد. حضور اکتینومایست های ترموفیل به عنوان شاخص حضور گونه های خاکزی محسوب می شود (Pathom-aree et al., 2006). این گونه ها احتمالاً با جریان های ورودی مانند رودخانه ها به خلیج فارس وارد شده اند. بطور کلی میزان فعالیت ضد میکروبی ایزوله های بدست آمده در مقابل گونه های *S. aureus*، *E. coli* و *C. albicans* با استفاده از روش آگار دولایه بترتیب ۳۳، ۲۰ و ۳۰ درصد ثبت گردید. این نتیجه با توجه به نفوذ پذیری بالاتر دیواره سلولی باکتریهای گرم مثبت نسبت به ترکیبات ضد میکروبی در مقایسه با

با توجه به توسعه روشهای بیولوژی ملکولی و ژنومیکس مطالعات اکتشاف ترکیبات طبیعی با منشاء میکروبی از زیستگاههای دریایی هنوز در ابتدای مسیر خود قرار دارد. برای اولین بار در این تحقیق رسوبات خلیج فارس به عنوان منبع جداسازی اکتینومایست ها مورد بررسی قرار گرفت. انتخاب محیط کشت نقش مهمی در جداسازی اکتینومایست ها ایفا نموده و می تواند بصورت انتخابی یا غیر انتخابی باشد (Zucchi et al., 2011). به منظور بالا بردن میزان جداسازی و افزایش تنوع از ۳ محیط کشت جداسازی غیر انتخابی استفاده شد که از میان آنها محیط کشت  $M_1$  قابلیت بالاتری نسبت به دو محیط کشت دیگر در جداسازی اکتینومایست ها ارائه نمود. توانایی بهتر این محیط کشت در جداسازی اکتینومایست ها می تواند به دلیل وجود عناصر معدنی و حداقل میزان ترکیبات آلی در این محیط کشت باشد که با نزدیکی به شرایط فیزیوشیمیایی دریا امکان رشد باکتریهای سریع الرشد که باعث تداخل در فرایند جداسازی می شوند را کاهش داده است (Gartner et al., 2011). سایر مطالعات نیز افزایش کارایی جداسازی اکتینوماست های

ایزوله 33 Ifro با *Streptomyces cacaoi* strain NBRC 12748 مولد آنتی بیوتیک های Polyoxins و 47 Ifro با *Streptomyces erythrogriseus* strain NBRC 14601 مولد آنتی بیوتیک Erygrisin در یک کلاستر قرار گرفتند (Shunji *et al.*, 1976). نزدیکی ایزوله های جدا شده در مطالعه حاضر با سویه های مولد آنتی بیوتیک های تجاری می تواند بیانگر پتانسیل بالای رسوبات منطقه مورد بررسی در خلیج فارس باشد. بنابر نتایج بدست آمده از این پژوهش می توان نتیجه گیری نمود که رسوبات دریایی خلیج فارس منبع با ارزشی برای اکتشاف فرآورده های طبیعی دریایی می باشند. همچنین ایزوله های مولد 12 Ifro ، 33 Ifro و 47 Ifro می توانند به عنوان کاندیدای مناسبی جهت مطالعات تکمیلی اکتشاف آنتی بیوتیک مطرح گردند.

### تشکر و قدردانی

مقاله حاضر از پروژه مصوب موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور با عنوان "بررسی فعالیت ضد میکروبی اکتینوماست های جدا شده از رسوبات دریایی خلیج فارس در محدوده استان هرمزگان" استخراج گردیده است. این پروژه دارای فروست شماره ۹۰/۵۷۸ از سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی می باشد.

### منابع

- Bredholdt, H., Tjaervik, E., Johnsen, G. and Zotchev, S.B., 2008. Actinomycetes from sediments in the Trondheim fjord, Norway: diversity and biological activity. *Marine Drugs*, 6: 12–24.
- Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, Schleifer., K.H. and Stackebrandt, E., 2006. *The Prokaryotes: Volume 3.* Springer-Verlag, New York, NY.
- Elzaki, T., Hashimoto, Y., Yamamoto, H., Lucida, M.L., Liu, S., Kusunoki, S., Asano, K. and Yabuuchi, E., 1990,

باکتریهای گرم منفی قابل انتظار می باشد (Lambert, 2002) در یک مطالعه فعالیت ضد میکروبی اکتینوماست‌های جدا شده از خلیج بنگال ۲۴ درصد گزارش گردید (Kannabiran, 2009 & Ramesh و Suthindhiran). در تحقیق دیگری Ramesh و همکارانش میزان فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی اکتینوماست‌های جدا شده از خلیج بنگال را بترتیب ۵۳٪ و ۷۲٪ گزارش نمودند (Ramesh *et al.*, 2009). در همین راستا ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اکتینوماست‌های جدا شده از خلیج Otsuchi ۵۹ درصد گزارش شد (Imada *et al.*, 2007). تفاوت میزان ایزوله های مولد در روش آگار دولایه با روش انتشار از آگار می تواند دلیل اعمال سایر مکانیسم های بازدارندگی غیر از تولید آنتی بیوتیک توسط برخی ایزوله های اکتینوماست پیرامون کلونی خود باشد که امکان رشد میکروارگانیسم مورد آزمون را سلب نموده است. شناسایی ایزوله های مولد برتر بر اساس ویژگیهای مورفولوژیک، فیزیولوژیک و کمو تاکسونومیک بیانگر تعلق جدایه ها به جنس *Streptomyces* داشت. مطالعات مختلف حضور غالب جمعیت های *Streptomyces* را در رسوبات متعلق به دریاها کم عمق همچون خلیج فارس تایید نموده اند (Kokare *et al.*, 2004, Fiedler *et al.*, 2005).

با توجه به پیچیدگی و تنوع گسترده جنس *Streptomyces* آنالیز فیلوژنتیک اعضای آن از اهمیت فوق العاده ای برخوردار می باشد (Mitra *et al.*, 2010). آنالیز فیلوژنتیک بر اساس توالی ژن 16S rRNA بیانگر اختلاف تکاملی بین ایزوله های منتخب مولد بود (شکل ۵). بررسی دقیق تر نشان داد اگرچه ایزوله های 12 Ifro و 47 Ifro با نزدیک ترین سویه های خود در یک کلاستر قرار گرفته اند اما قدمت تکاملی نسبتا کمتری دارند. مطالعه پتانسیل بیوتکنولوژیک سویه های موجود در هر کلاستر نشان داد ایزوله 12 Ifro با *Streptomyces pactum* strain NBRC 13433 مولد آنتی بیوتیک Pactamycin و *Streptomyces pactum* strain NBRC 13433 مولد آنتی بیوتیک Elloramycin در یک کلاستر قرار گرفت (Ramos *et al.*, 2008; Hirayama *et al.*, 2013).

- method for rapid identification of *Legionella* species. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease*, 9: 213–217.
- Fguira, L.F.B, Fotso, S, Mehdi, R.B.A., Mellouli, L. and Laatsch, H., 2005.** Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80, *Research in Microbiology*, 156: 341–347.
- Fiedler, H.P., Bruntner, C., Bull, A.T., Ward, A.C., Goodfellow, M., Potterat, O., Puder, C. and Mihm, G., 2005.** Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 87: 37–42.
- Gartner, A., Blumel, M., Wiese, J. and Imhoff, J.F., 2011.** Isolation and characterisation of bacteria from the Eastern Mediterranean deep sea. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 100:421-435.
- Hames-Kocabas, E.E. and Uzel, A., 2012,** Isolation strategies of marine-derived actinomycetes from sponge and sediment samples. *Journal of Microbiological Methods*, 88: 342-347.
- Hirayama, A., Eguchi, T. and Kudo, F., 2013.** A single PLP-dependent enzyme PctV catalyzes the transformation of 3-dehydroshikimate into 3-aminobenzoate in the biosynthesis of pactamycin. *Chembiochem*, 14: 119-203.
- Hranueli, D., Cullum, J., Basrak, B., Goldstein, P. and Long, P.F., 2005.** Plasticity of the *Streptomyces* genome- Evaluation of the microplate hybridization evolution and engineering of new antibiotics. *Current Medicinal Chemistry*, 12: 1697-1704.
- Imada, C., Koseki, N., Kamata, M., Kobayashi, T. and Hamada-Sato, N., 2007.** Isolation and characterization of antibacterial substances produced by marine actinomycetes in the presence of seawater. *Actinomycetologica*, 21: 27–31.
- Jensen, P.R., Dwight, R. and Fenical, W., 1991.** Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments, *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 1102–1108.
- Jensen, P.R., Mincer, T.J., Williams, P.G. and Fenical, W., 2005.** Marine actinomycete diversity and natural product discovery, *Antonie van Leeuwenhoek*, 87: 43-48.
- Koch, A.L., 2001.** Oligotrophs versus copiotrophs. *Bioassays*, 23: 657–661.
- Kokare, C.R., Mahadik, K.R., Kadam, S.S. and Chopade, B.A., 2004.** Isolation, characterization and antimicrobial activity of marine halophilic Actinopolyspora species AH1 from the west coast of India., *Current Science*, 86:593–597.
- Lambert, P.A., 2002.** Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 92: 46S-54S.
- Magaldi, S., Mata Essayag, S., Hartung de Capriles, C., Perez, C., Colella, M.T., Olaizola, C. and Ontiveros,**

- Y., 2004. Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *International Journal of Infectious Diseases*, 8(1): 39-45.
- Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K. and Kim, S.K., 2013.** Marine actinobacterial metabolite. Current status and future perspectives. *Microbiological Research*, 168: 311-332.
- Mitra, A., Pramanik, A., Santra, S. C., Sen, P. K. and Mukherjee, J., 2011.** Phylogeny, phenotypic and nutritional characteristics of estuarine soil actinomycetes having broad-spectrum antimicrobial activity derived from an ecologically guided bioprospecting programme. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27: 1679-1688.
- Molinski, T.F., Dalisay, D.S., Lievens, S.L. and Saludes, J.P., 2009.** Drug development from marine natural products. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8: 69-85.
- Pathom-aree, W., Stach, J.E.M., Ward, A.C., Horikoshi, K., Bull, A.T. and Goodfellow, M., 2006.** Diversity of actinomycete isolated from Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench. *Extremophiles*, 10:181-189.
- Payne, D.J., Gwynn, M.N., Holmes, D.J. and Pompliano, D.L., 2006.** Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(1): 29-40.
- Ramos, A., Lombo, F., Brana, A.F., Rohr, J., Mendez, C. and Salas, J.A., 2008.** Biosynthesis of elloramycin in *Streptomyces olivaceus* requires glycosylation by enzymes encoded outside the aglycon cluster. *Microbiology*, 154: 781-8.
- Ramesh, S. and Mathivanan, N., 2009.** Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25: 2103-2111
- Shunji, F. and Kiyoshi, I., 1976.** Biosynthesis of the Polyoxins, Nucleoside Peptide Antibiotics: Formation of 5-Carboxyuracil Nucleosides by *Streptomyces cacaoi*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 40: 1039-1044.
- Solanki, R., Khanna, M. and Lal, R., 2008.** Bioactive compounds from marine actinomycetes. *Indian Journal Microbiology*, 48(4):410-431.
- Suthindhiran, K. and Kannabiran, K., 2010.** Diversity and exploration of bioactive marine actinomycetes in the Bay of Bengal of the Puducherry coast of India. *Indian Journal Microbiology*, 50(1): 76-82.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S., 2013.** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.
- Whitman, W.B., Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.J., Trujillo, M.E., Ludwig, W. and Suzuki, K.I., 2012.** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., vol. 5, parts A and B. Springer-Verlag, New York, NY.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. and Miller, W. 2000.** A greedy algorithm for

aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*, 7(1-2): 203-214.

**Zotchev, S.B., 2012.** Marine actinomycetes as an emerging resource for the drug development pipelines. *Journal of Biotechnology*, 158(4):168–175 23.

**Zucchi, T.D., Guidolin, A.S. and Consoli, F.L., 2011.** Isolation and characterization of actinobacteria ectosymbionts from *Acromyrmex subterraneus brunneus* (Hymenoptera, Formicidae). *Microbiological Research*, 166: 68-76.

## **Isolation, Identification and Evaluation of antimicrobial activity of Actinomycetes from marine sediments of Persian Gulf (Hormozgan Province)**

Gozari M.<sup>1\*</sup>; Mortazavi M.S.<sup>1</sup>; Karim zadeh R.<sup>1</sup>; Ebrahimi M.<sup>1</sup>; Dehghani R.<sup>1</sup>

\* m\_gozari@yahoo.com

1-Persian Gulf and Oman Sea Ecological Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO) -Bandar Abbas- Iran

### **Abstract**

Actinomycetes are gram positive and filamentous bacteria and produce major portion of bioactive compounds. The aim of this study was to isolate and identify antibiotic producing actinomycetes from Persian Gulf marine sediments within Hormozgan province territory. Among 3 selected isolation media the M<sub>1</sub> medium showed highest efficacy by isolation of 32 colonies. Heat treatment of 100 °C for 60 min isolated 26 colonies and showed the best result. Approximately 60 Actinomycete isolates were obtained from 10 sediment samples. Evaluation of antimicrobial activity showed that 33, 20 and 30 % of isolates exhibited antimicrobial activity against *S.aureus*, *E.coli* and *C.albicans* respectively. Morphologic, physiologic and chemotaxonomic studies showed that selected potent isolates consist of Ifro12, Ifro 33 and Ifro 47 belonged to *Streptomyces* genus. Molecular genetic studies based on 16s rRNA gene analysis revealed that Ifro12, Ifro 33 and Ifro 47 exhibited 99 % similarity to *S.olivaceus*, *S.cacaoi* and *S.variabilis* respectively. Phylogenetic analysis showed that Ifro12 and Ifro 47 derived from a common ancestor. The results of present research indicated that these three isolates could be considered as promising candidates for antibiotic discovery researches.

**Keywords:** Marine Actinomycetes, Antimicrobial activity, Marine sediments, Persian Gulf

---

\*Corresponding author