مجله بوم شناسی آبزیان

Journal homepage: http://jae.hormozgan.ac.ir

فعالیت ضدباکتریایی اکتینومیست های جدا شده از اسفنج بومی خلیج فارس (جزیره خارکو) علیه میکروارگانیسم های بیماری زا

ماندانا زارعی[۱*] مرضیه جاهدی[۱]، فاطمه نزهت[۲]

[۱] گروه زیست فناوری دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر

[۲] گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، ایران

نوع مقاله:
پژوهشی

تاریخچه مقاله:
دریافت: ۹۴/۱۲/۰۵
اصلاح: ۹۵/۱۲/۰۴
پذیرش: ۹۵/۱۲/۱۴

کلمات کلیدی:
آنتی بیوتیک
باکتری
پوریفرا
مزوهیل

چکیده

در این مطالعه اکتینومیست های همراه با دو گونه اسفنج با توانایی تولید مواد ضد باکتریایی، جداسازی و مورد بررسی قرار گرفتند. ۲ گونه اسفنج خلیج فارس *Haliclona simulans* و *Dictyonella* sp. با استفاده از غواصی در آبهای اطراف جزیره خارکو جمع آوری شده و بافت مزوهیل آنها برای به دست آوردن اکتینومیست ها مورد استفاده قرار گرفت. به منظور غربالگری اولیه جدایه های تولید کننده آنتی بیوتیک، روش Cross streak استفاده شد. عصاره های کلروفرمی و متانولی از جدایه های فعال استخراج شده و میزان تاثیر آنها با استفاده از روش انتشار از دیسک علیه باکتریهای بیماری زا، مورد بررسی قرار گرفت. همچنین فعالترین جدایه اکتینومیست، شناسایی مولکولی گردید. از بین ۱۲ جدایه اکتینومیست به دست آمده در این تحقیق، در غربالگری اولیه ۷ جدایه توانایی مهار رشد باکتری های بیماری زا را دارا بودند که اکتینومیست mz7 بیشترین و جدایه های mz3 و mz5 کمترین میزان مهارکنندگی را نشان دادند. در آزمون انتشار از دیسک عصاره کلروفرمی mz1 و عصاره متانولی mz7 بیشترین فعالیت ضد باکتریایی را نشان دادند. شناسایی مولکولی اکتینومیست شماره ۷ مشخص نمود که این جدایه ٪۹۷ به جدایه *Micrococcus yunnanensis* strain YIM 65004 شباهت دارد. با توجه به اینکه تعدادی از اکتینومیست های شناسایی شده در این تحقیق، خواص ضدباکتریایی قابل توجهی را از خود نشان دادند به نظر می رسد پتانسیل انجام تحقیقات تکمیلی در این زمینه وجود دارد.

مقدمــه

در سال‌های اخیر، اسفنج‌های دریایی به عنوان منبعی غنی از ترکیبات جدید و مفید برای انسان‌ها معرفی شده‌اند. بیش از ٪۴۰ از کل مواد دارویی استخراج شده از موجودات دریایی از اسفنج‌ها بـه دست آمده است. ترکیباتی با کارایی بالای زیستی شامل آنتی‌میکروب‌ها، آنتی‌تومورها و انـواع آنزیم‌ها و ... از اسـفنج‌ها اسـتخراج شده اند (Fenical *et al.*, 2009). با توجه به این‌که مواد فعال زیستی بـه دسـت آمـده از اسـفنج‌ها، عـلاوه بـر کارایی بسیار بالا فاقد عوارض جانبی داروهای شیمیایی هستند، امید بـه درمان بسیاری از انواع سرطان‌ها، ایدز و بیماری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌های فعلی، به استفاده از داروهایی است که از این موجودات به دست آمده است (Armstrong *et al.*, 1999; Sepcic *et al.*, 2010).

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: zarei.mandana@yahoo.com

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-11-05]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1396.7.1.6.1]

حضور تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌ها درون مزوهیل بسیاری از گونه‌های اسفنج به اثبات رسیده و مشخص شده است که باکتری‌ها و قارچ‌ها حجم قابل توجهی از زیست توده اسفنج‌ها را به خود اختصاص داده‌اند. بر اساس تحقیقات جدید مشخص شده است که عمده توانایی‌های بیوسنتزی اسفنج‌ها به دلیل حضور میکروارگانیسم‌های همراه آن‌هاست به همین دلیل در حال حاضر تلاش‌های بسیاری برای جداسازی میکروارگانیسم‌های همراه اسفنج‌ها و شناسایی خواص مواد تولیدی آنها در حال انجام است (Hentschel *et al.*, 2002). جداسازی میکروارگانیسم‌های همراه موجودات دریایی و از جمله اسفنج‌ها کار ساده‌ای نیست زیرا میکروارگانیسم‌های مذکور بسیار کند رشد بوده و با توجه به محیط خاص زندگی خود، در محیط‌های کشت موجود که عمدتا برای رشد میکروارگانیسم‌های خشکی‌زی طراحی شده‌اند رشد نکرده یا به سختی رشد می کنند (Abdelmohsen *et al.*, 2010). اکتینومیست‌ها حدود ٪۱۰ از جمعیت باکتریایی رسوبات بستر دریا را تشکیل می‌دهند که در سال‌های اخیر مورد توجه خاصی قرار گرفته اند. اکتینومیست‌های خشکی، تولیدکننده مهم و قابل توجه بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها هستند با این وجود منابع دریایی آن‌ها در این زمینه کمتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (Bredholt *et al.*, 2008).

میکروارگانیسم‌های همراه اسفنج را می‌توان به سه دسته‌ی خارجی، داخلی و درون‌سلولی طبقه‌بندی کرد (Fuerst *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2001). از آن‌جا که آب اطراف اسفنج به شدت فیلتر می‌شود، اسفنج‌ها تعدادی از باکتری‌های موجود در جریان آب را در اتاقک های کوانوسیت ها جمع می کنند و این باکتری‌ها بخشی از جامعه میکروبی اسفنج را تشکیل می‌دهند (Kim *et al.*, 2005). اگرچه هنوز چگونگی کسب باکتری‌های هم‌زیست توسط اسفنج ها دقیقا مشخص نیست اما در این رابطه دو فرضیه رایج وجود دارد. اساس فرضیه اول این است که میکروارگانیسم های همراه، از فیلتر کردن آب به‌دست می‌آیند. یعنی باکتری‌هایی که بتوانند در برابر هضم و پاسخ ایمنی اسفنج مقاومت کرده و از سیستم کانال به مزوهیل مهاجرت کنند توانایی زیست به همراه اسفنج ها را به دست می آورند (Friedrich *et al.*, 1999).

فرضیه دوم انتقال عمودی میکروارگانیسم ها، همراه لاروها، تخم‌ها یا جوانه‌هاست. این فرضیه در مورد گروه‌های همراه *alpha-proteobacterium* در اسفنج *Rhopaloeides odorabile* اثبات شده است. میکروارگانیسم‌های همراه *alpha-proteobacterium* در هفت جنس اسفنج از مناطق جغرافیایی دور از هم یافت شده‌اند (Webster and Hill, 2001).

همچنین مطالعه لارو *Mycale laxissima* نشان داد که سویه‌های شبیه به *alpha-proteobacterium* در لارو آن نیز حضور داشتند که شواهدی مبنی بر انتقال عمودی میکروارگانیسم های همراه از اسفنج به لارو است (Enticknap *et al.*, 2006).

با توجه به این‌که تاکنون در مورد جداسازی و شناسایی مولکولی اکتینومیست‌های همراه اسفنج‌های سواحل ایران تحقیقی صورت نگرفته است، در این تحقیق جداسازی و شناسایی اکتینومیست‌های ۲ سویه اسفنج خلیج فارس انجام شد و پتانسیل‌های ضد باکتریایی سویه‌های جداسازی شده مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در دانشگاه خلیج فارس بوشهر در سال ۱۳۹۳ انجام شد. نمونه‌های سالم ۲ گونه اسفنج مطالعه شده در این تحقیق با غواصی در اطراف جزیره خارکو به دست آمدند. نمونه‌ها در ظروف استریل درب دار و محتوی یخ به آزمایشگاه منتقل و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. آماده‌سازی نمونه اسفنج به منظور فعال کردن میکروارگانیسم‌های همزیست و حذف باکتری‌های سطح انجام شد. سپس ۲ سانتی متر مکعب از مزوهیل هموژنیزه گردید (Raczkowski, 2010; Peraud, 2006).

برای خالص سازی و شناسایی مرفولوژیک و بیوشیمیایی اکتینومیست ها، بافت هموژنیزه شده با استفاده از آب دریای استریل، رقیق و نهایتاً در محیط کشت های تغییر یافته مارین آگار، امرسون آگار، نوترینت آگار و اوره آگار کشت داده شدند (Li *et al.*, 1998; Hentschel *et al.*, 2006; Gandhimathi, *et al.*, 2008). پلیت‌های تلقیح شده در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، در گرم‌خانه به مدت ۱۴ روز دماگذاری شدند. پس از رشد کلنی‌های اکتینومیست بر روی پلیت‌ها، با انجام مکرر کشت خطی، انواع مختلف این کلنی‌ها که از نظر مرفولوژی (شکل، اندازه و رنگ) متفاوت بودند از یکدیگر تفکیک شده و خالص سازی گردیدند، به طوری که در هر پلیت تنها یک نوع کلنی رشد نمود. لازم به ذکر است که برای جلوگیری از رشد قارچ ها، به میزان ۲۰ میکروگرم در لیتر نیستاتین به محیط های کشت افزوده شد (Zheng *et al.*, 2000).

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-11-05]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1396.7.1.6.1]

به منظور شناسایی مرفولوژیک و بیوشیمیایی جدایه ها، پس از مشاهدات میکروسکوپی و بررسی ظاهر و رنگ کلنی ها، توانایی تولید رنگدانه، قابلیت رشد در شوری های مختلف و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد مورد مطالعه قرار گرفت و همچنین آزمون های اسیدفست، اوره آز و کاتالاز بر روی آنها انجام شد (Xi *et al.*, 2012; Toth *et al.*, 2013).

غربالگری اولیه

برای شناسایی اکتینومیست‌هایی با خواص ضدباکتریایی از روش Cross streak استفاده شد. در این روش ۱۲ جدایه اکتینومیست به دست آمده از مرحله قبل، به صورت خطی در مرکز پلیت کشت داده شد و به مدت ۷ روز در گرم‌خانه در دمای ۲۸ درجه دماگذاری شدند. پس از رشد اکتینومیست‌ها، باکتری‌های بیماری‌زا به صورت خط‌های عمود بر کلنی اکتینومیست با فاصله یک سانتیمتر از آن کشت داده شدند (فاصله کشت‌های خطی باکتری بیماری‌زا از هم نیز یک سانتیمتر در نظر گرفته شد) و به مدت ۲۴ ساعت در گرم‌خانه با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد دماگذاری شدند. در صورتی که آنتی‌بیوتیک جزیی از مواد بیرون سلولی اکتینومیست باشد رشد باکتری بیماری‌زای کشت شده در اطراف کلنی اکتینومیست متوقف می‌شود. در این روش بررسی قدرت ضد باکتریایی اکتینومیست‌ها بر اساس فاصله رشد باکتری بیماری‌زا تا خط کشت اکتینومیست می باشد (Valli *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012).

در این تحقیق، باکتری‌های بیماریزای *Staphylococcus aureus*، *Enterobacter aerogenes*، *Escherichia coli*، *Klebsiella pneumoniae*، *Salmonella typhi*، *Proteus mirabilis*، *Shigella flexneri* و *Pseudomonas aeruginosa* استفاده شدند.

عصاره گیری

برای تهیه عصاره، اکتینومیست‌ها به محیط کشت تلقیح شدند و پس از رشد کامل، به وسیله کاغذ صافی سلولزی، محیط کشت صاف شده و رسوب موجود در کاغذ صافی در پلیت‌های شیشه‌ای استریل ریخته شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد تا کاملا خشک شود. کلنی‌های خشک شده اکتینومیست‌ها در هاون چینی به طور کامل آسیاب و پودر شدند.

برای تهیه عصاره به پودر آماده شده در فالکون ها، حلال مناسب (کلروفرم یا متانول) با نسبت ۱ به ۱ وزنی/حجمی اضافه شد یعنی به ازای هر گرم رسوب خشک باکتری ۱ میلی‌لیتر حلال اضافه شد. فالکون‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق با استفاده از دستگاه شیکر مخلوط شده و پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول رویی جدا و در دستگاه روتاری با دمای ۳۵ درجه سانتیگراد تغلیظ شد. مایع تغلیظ شده با همان حلال اولیه به حجم ۵ میلی‌لیتر رسید (Tian, 2012; Huang *et al.*, 2008).

روش انتشار از دیسک

در این روش برای تهیه دیسک از کاغذ صافی سلولزی واتمن استفاده شد که با دستگاه پانچ به شکل دیسک های ۶ میلی متری پانچ شده و استریل گردیدند و به مدت ۲۴ ساعت در عصاره های تهیه شده از اکتینومیست ها قرار داده شدند. سپس دیسک‌های آغشته به عصاره مورد نظر در پلیت هایی که در آنها باکتری های بیماری زا به صورت یکنواخت بر روی سطح محیط، کشت شده بودند قرار گرفتند و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت دما گذاری شدند. قدرت ضد باکتریایی اکتینومیست ها با اندازه‌گیری هاله عدم رشد اطراف دیسک ها از جایی که باکتری هیچ گونه رشدی نداشتند، با استفاده از کولیس اندازه گیری و نتایج ثبت گردیدند. در روش انتشار دیسک، عصاره کلروفرمی، متانولی و همچنین آب مقطر به عنوان کنترل منفی استفاده شد (Valli *et al.*, 2012).

استخراج ژنوم و انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز

به منظور شناسایی مولکولی جدایه MZ7 که خواص ضدباکتریایی آن در مقایسه با سایرین بیشتر بود، در ابتدا استخراج ژنوم آن با استفاده از روش TES انجام شد (Sambrook, 2014).

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-11-05]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1396.7.1.6.1]

پس از اطمینان از کیفیت مناسب DNA استخراج شده، برای تکثیر ژن ۱۶S rRNA با استفاده از پرایمر مستقیم با توالی CGC GGC CTA GCT TGT TG و پرایمر معکوس با توالی CCG TAC TCC CCA GGC GGG G واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام شد. حجم و غلظت مواد استفاده شده در واکنش زنجیره ای پلیمراز عبارت بودند از: یک میکرولیتر DNA الگو با غلظت ۵۰ میکروگرم، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR، یک میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای مستقیم و معکوس با غلظت ۲۰ پیکومولار، یک میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی مولار، ۱/۵ میکرولیتر منیزیم کلراید ۵۰ میلی مولار، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم DNA-Taq پلیمراز و ۱۶/۷ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه. برنامه استفاده شده در PCR در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱. برنامه واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)

مرحله	نام مرحله	مدت زمان (ثانیه)	دما (درجه سانتی‌گراد)	تعداد تکرار مرحله
اول	واسرشتی[1] اولیه	۳۰۰	۹۳	۱
دوم	واسرشتی	۳۰	۹۳	۳۵
	اتصال	۶۰	۵۸	
	طویل شدن	۹۰	۷۲	
سوم	طویل شدن نهایی	۳۰۰	۷۲	۱

پس از تعیین توالی محصول PCR توسط شرکت Bioneer کره جنوبی، بازسازی توالی‌های DNA با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیک Chromas و MAFFT انجام شد و با استفاده از Blast در سایت WWW.ncbi.nlm.nih.gov نزدیکترین جدایه به اکتینومیست شناسایی شده در این تحقیق، مشخص گردید. برای رسم درخت فیلوژنی و محاسبه فاصله ژنتیکی از نرم‌افزار MEGA6 و ClustalW استفاده شد.

نتایــج

شناسایی مورفولوژیک و بیوشیمیایی

در این تحقیق جدایه‌های mz1، mz2 و mz3 از اسفنج *Dictyonella* sp. و mz5، mz6، mz7 وmz8 از اسفنج *Haliclona simulans* بررسی شدند. نتایج شناسایی مورفولوژیک و بیوشیمیایی اکتینومیست‌های به دست آمده در جدول ۲ آمده است.

روش Cross streak

نتایج این آزمون نشان داد که از بین ۱۲ اکتینومیست جداسازی شده در این تحقیق، ۷ جدایه دارای فعالیت ضد باکتریایی بودند (جدول ۳). نتایج به دست آمده در ۶ حالت از ۰ تا ۵ توصیف شده است: عدم رشد باکتری بیماری‌زا (۰)، رشد باکتری بیماری‌زا کم‌تر از محدوده تعیین شده ۱ سانتی‌متری (۱)، رشد باکتری بیماری‌زا تا محدوده ۱ سانتی‌متر (۲)، رشد باکتری بیماری‌زا بیش‌تر از محدوده ۱ سانتی‌متر بوده اما به کلنی اکتینومیست نمی‌رسد (۳)، رشد باکتری بیماری‌زا تا کلنی اکتینومیست (۴)، رشد باکتری بیماری‌زا در سرتاسر پلیت (۵).

لازم به ذکر است که با توجه به اینکه سویه شماره ۱ فقط در محیط کشت SDA قادر به رشد بود و باکتری‌های بیماری‌زا نیز قادر به رشد در این محیط کشت نبودند یا رشد ضعیفی در آن داشتند، این آزمون برای سویه شماره ۱ انجام نشد. اما با عصاره‌گیری از این اکتینومیست قدرت ضدمیکروبی آن مورد آزمایش قرار گرفت. در شکل ۱ تصویری از نتایج روش Cross streak آورده شده است. نتایج نشان دادند هیچکدام از ۷ اکتینومیست به دست آمده، پس از گذشت ۱ تا ۲ روز در حالت ۴ یا ۵ قرار نگرفتند. جدایه mz7 قوی‌ترین و جدایه های mz3 وmz5 ضعیف‌ترین نتایج را نشان دادند. همچنین اکتینومسیت mz7 که بهترین نتایج را به خود اختصاص داد به مدت یک هفته مورد بررسی قرار گرفت نتایج این بررسی بیان‌گر این مطلب بود

[1] Denaturation

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-11-05]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1396.7.1.6.1]

که این جدایه پس از ۷ روز همچنان بر روی باکتری *E. aerogenes* اثر بازدارندگی داشته و رشد باکتری *E. aerogenes* در روز هفتم در حالت ۳ قرار می گرفت.

جدول ۲. نتایج شناسایی مورفولوژیک و بیوشیمیایی

نام جدایه / تست‌ها	m z1	M z2	M z3	Mz5	Mz6	Mz7	Mz8
تست اوره‌آز	+	+	+	+	+	+	+
تست اسید فست	+	+	+	+	+	+	+
تست کاتالاز	+	+	+	+	+	+	+
رشد در شوری ٪۰/۷۵	+	+	+	+	+	+	+
رشد در شوری ٪۵	+	+	−	+	+	+	+
رشد در شوری ٪۱۰	+	+	−	+	+	+	+
رشد در ۳۷ درجه	−	+	−	+	+	−	+
رشد در ۲۸ درجه	+	+	+	+	+	+	+
رنگ روی کلنی	گل‌بهی	سفید	سیاه	سفید_خاکستری	کرم_ نارنجی	زرد_سبز	سبز_ سفید
رنگ پشت کلنی	سفید	سفید	سیاه	زرد	سفید	قهوه‌ای	زرد
رنگ کلنی پس از ۲ هفته	گل‌بهی	یشمی	سیاه	یشمی	یشمی	یشمی	یشمی

روش انتشار دیسک

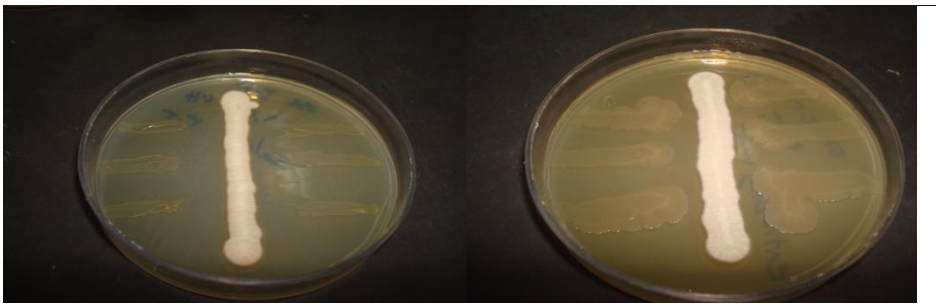
در این روش دیسک های آغشته به عصاره‌های متانولی و کلروفرمی اکتینومیست‌های استخراج شده و هم‌چنین دیسک‌های آغشته به آب مقطر به عنوان کنترل منفی به کار برده شدند. بر اساس قطر هاله عدم رشد ایجاد شده اطراف دیسک‌ها (بر حسب میلی لیتر) قدرت ضد باکتریایی اکتینومیست‌های مورد آزمون، سنجیده شدند (جدول ۴). دیسک‌های کنترل منفی چون هاله عدم رشدی ایجاد نکردند همچنین اکتینومیست های mz3 و mz5 به دلیل نتایج ضعیفی که در این آزمون داشتند در جدول ۴ ذکر نشدند. در شکل ۲ ایجاد هاله عدم رشد در اطراف دیسکها نمایش داده شده است.

جدول ۳. نتایج آزمون Cross streak پس از یک روز

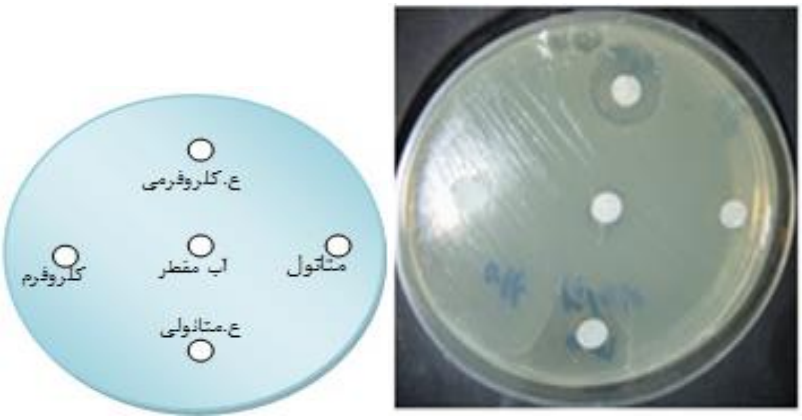
باکتری‌های بیماری‌زا / سویه‌های اکتینومیست	*E.coli*	*S.flexneri*	*S.typhi*	*K.pneumoniae*	*P.aeruginosa*	*P.mirabilis*	*E.aerogenes*	*S.aureus*
Mz2	۱	۱	۲	۱	۳	۲	۲	−
Mz3	۲	۲	۲	۲	۲	۳	۲	−
Mz5	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲
Mz6	۲	۱	۳	۲	۲	۳	۲	۱
Mz7	۰	۰	۰	۲	۱	۱	۲	۱
Mz8	۱	۰	۲	۱	۲	۲	۳	۲

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-11-05]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1396.7.1.6.1]



شکل ۱. تصویر سمت راست اکتینومیست mz7 و باکتری *Enterobacter aerogenes* را پس از یک روز و تصویر سمت چپ پس از ۷ روز را نشان می‌دهد.



شکل ۲. پلیت سمت راست هاله عدم رشد باکتری *Shigella flexneri* در اطراف دیسک های آغشته به عصاره های متانولی و کلروفرمی اکتینومیست mz7 را نشان می دهد و در شکل سمت چپ نحوه قرار گرفتن دیسک ها نمایش داده شده است.

جدول ۴. نتایج آزمون انتشار از دیسک؛ قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر

نمونه‌های اکتینومیست	باکتری بیماری‌زا / نوع عصاره	*E. coli*	*S. flexneri*	*S. typhi*	*K. pneumoniae*	*P. aeruginosa*	*P. mirabilis*	*E. aerogenes*
Mz1	عصاره متانولی	۲۰±۰/۵	-	۱۵±۱/۸	۱۵±۱/۵	۲۲±۰/۵	-	۲۵±۱/۵
	عصاره کلروفرمی	۲۸±۰/۳	-	۳۲±۰/۵	۳۴±۱/۷	۲۰±۱/۲	-	۲۰±۰/۶
Mz2	عصاره متانولی	۱۷±۱/۵	-	۱۵±۱/۲	۲۳±۰/۵	۲۵±۰/۷	-	۲۵±۱/۸
	عصاره کلروفرمی	۱۱±۰/۵	-	۷±۱/۵	۷±۰/۵	۹±۱/۵	-	۸±۰/۵
Mz6	عصاره متانولی	۱۳±۱/۲	۱۸±۰/۵	-	۱۵±۰/۵	-	۱۱±۱/۵	۱۲±۲/۵
	عصاره کلروفرمی	۱۷±۰/۵	۱۸±۱/۴	۱۴±۰/۴	۱۳±۱/۵	۱۳±۱/۵	-	-
Mz7	عصاره متانولی	۱۶±۰/۴	۲۲±۱/۲	۱۹±۳/۵	۲۵±۱/۲	۱۹±۰/۵	۱۵±۰/۳	۲۱±۱/۳
	عصاره کلروفرمی	۱۳±۰/۴	۲۰±۰/۴	۲۶±۱/۲	۱۵±۱/۲	۲۵±۲/۵	-	-
Mz8	عصاره متانولی	۱۵±۱/۲	۱۲±۱/۵	۱۰±۱/۲	۱۲±۰/۳	۱۳±۱/۴	۱۱±۱/۶	۱۵±۱/۹
	عصاره کلروفرمی	۲۲±۰/۳	۲۲±۲/۱	۱۴±۰/۴	۱۲±۰/۴	۱۸±۲/۱	-	-

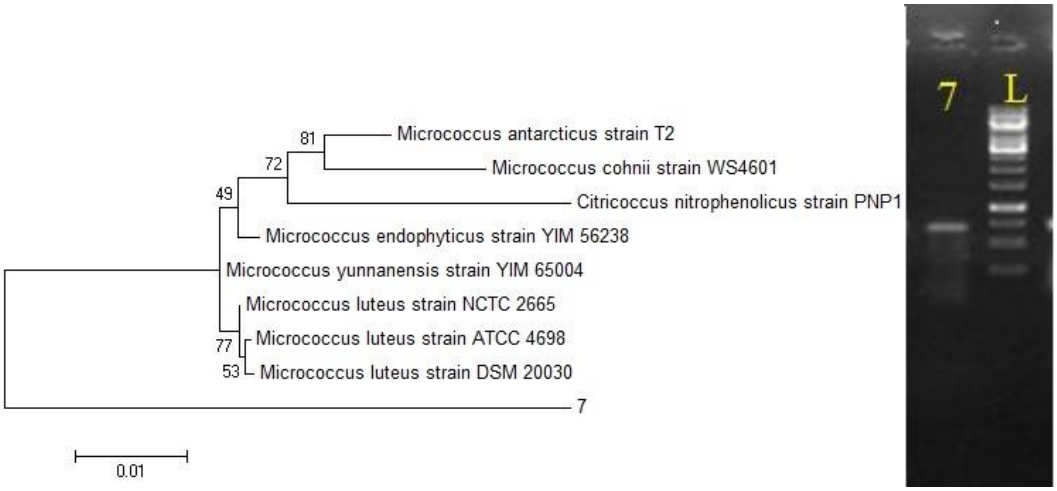
شناسایی مولکولی اکتینومیست mz7

ژنوم استخراج شده بر اساس روش TES دارای کیفیت نسبتاً مناسبی بود و نسبت A260/A280 با استفاده از اسپکتروفوتومتری ۱/۴۸۴ به دست آمد. با توجه به اینکه قطعه DNA تکثیر شده نسبتاً بزرگ بود توالی یابی با دوبار خوانش

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-11-05]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1396.7.1.6.1]

انجام شد. در شکل ۳ تصویر باند تولید شده محصول PCR پس از انجام الکتروفورز آورده شده است. انجام بلاست مشخص نمود که شبیه ترین جدایه به اکتینومیست mz7 به دست آمده در این تحقیق، *Micrococcus yunnanensis strain* YIM 65004 با ٪۹۷ شباهت می باشد. با استفاده از نرم افزار MEGA6 فاصله ژنتیکی این دو جدایه ۰/۰۷ به دست آمد و درخت فیلوژنی بر اساس روش Maximum Like Lihood Tree رسم گردید.



(ب) (الف)

شکل ۳. (الف) تصویر باند محصول PCR اکتینومیست mz7، (ب) درخت فیلوژنی اکتینومیست mz7

بحث

در این تحقیق از روش Cross streak برای مرحله اولیه بررسی خاصیت آنتی‌باکتریال اکتینومیست‌های جداشده استفاده شد با این تفاوت که کشت باکتری‌های بیماری‌زا با فاصله معین از خط کشت اکتینومیست انجام شد و نتایج بر اساس فاصله رشد تا کلنی اکتینومیست در ۶ حالت گزارش گردید. به این ترتیب می‌توان اکتینومیست‌ها را بر اساس قدرت آنتی‌باکتریال دسته-بندی نمود و قوی‌ترین سویه‌ها را برای مراحل بعدی انتخاب کرد.

روش Cross streak یکی از روش‌های مرسوم برای بررسی فعالیت ضدمیکروبی باکتری‌ها و قارچ‌ها می باشد. در مطالعات انجام شده توسط والی و همکاران در ۲۰۱۲ از این روش برای غربال‌گری اولیه قدرت ضدمیکروبی سویه‌های اکتینومیست جداشده از رسوبات دریایی استفاده کردند و نتایج به دست آمده را به صورت مثبت و منفی گزارش نمودند (Valli *et al.*, 2012).

در روش انتشار از دیسک، انتشار خارجی آنتی‌بیوتیک از یک منبع به سطح محیط کشت جامد باعث ایجاد یک هاله بازدارنده رشد می شود، قطر این هاله متناسب با لگاریتم غلظت آنتی بیوتیک است (Salami, 2004). در این مطالعه عصاره‌های متانولی (قطبی) و کلروفرمی (غیرقطبی) از اکتینومیست‌ها تهیه شد و برای انجام روش انتشار از دیسک مورد استفاده قرار گرفت. در مطالعات انجام شده در این زمینه معمولا یکی از عصاره‌های قطبی و غیرقطبی ایجاد هاله رشد می‌نمودند اما جالب توجه است که در این مطالعه هم عصاره متانولی و هم عصاره کلروفرمی هاله عدم رشد ایجاد کردند. در مورد جدایه های مختلف اکتینومیست، قدرت عصاره‌های قطبی و غیرقطبی متفاوت بود که نشان می دهد در عصاره‌های مذکور، هم ترکیبات ضدباکتریایی قطبی و همچنین ترکیبات ضد باکتریایی غیرقطبی وجود داشته است. صحت این مطلب با ۳ مرتبه تکرار آزمایش و عصاره گیری مجدد مشخص گردید. از بین سویه‌های اکتینومیست مورد آزمون، سویه‌های mz1 و mz7 دارای بیشترین قدرت ضد باکتریایی بودند. نتایج مشخص کرد که عصاره کلروفرمی mz1 قوی‌تر از عصاره متانولی آن بوده و عصاره متانولی mz2 قوی‌تر از عصاره کلروفرمی آن می‌باشد. در مورد mz6 نتایج مربوط به دو عصاره بسیار نزدیک به هم بودند. عصاره متانولیmz7 و mz8 نیز قوی‌تر از عصاره کلروفرمی آن بود. در بیشتر نمونه ها عصاره متانولی آنها قوی‌تر از عصاره کلروفرمی

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-11-05]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1396.7.1.6.1]

بود که می تواند به دلیل قوی تر بودن ترکیبات ضدباکتریایی قطبی یا حساسیت بیشتر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای مورد آزمون، نسبت به این ترکیبات باشد.

سلامی و همکاران در سال ۱۳۸۲ اقدام به جداسازی مواد ضدباکتریایی از استرپتومیسس‌های بومی ایران کردند که در این تحقیق به منظور غربالگری از روش انتشار در پلیت برای ۲۳۰ استرپتومیسس جدا شده از قسمت‌های مختلف خاکهای ایران، استفاده کردند. در نهایت سویه ۷۱ که فعالیت بیشتری نسبت به بقیه نشان داد برای جداسازی و شناسائی آنتی‌بیوتیک انتخاب گردید. پس از شناسائی، سویه ۷۱ جزء دسته *Streptomyces diastaticus* طبقه‌بندی گردید. همچنین آنتی‌بیوتیک‌های تولید شده توسط سویه ۷۱ جداسازی و شناسایی شدند و جزو دسته آمینوگلیکوزیدها طبقه بندی گردیدند (Salami, 2004).

راچکوفکسی و همکاران در سال ۲۰۱۰ در تحقیقی مشابه، به مطالعه تنوع زیستی اکتینومیست‌های هم‌زیست اسفنج‌های دریای کارائیب از پورتوریکو و بررسی مشخصات متابولیک آن‌ها پرداختند. در این تحقیق ۱۰ سویه مختلف اسفنج کارائیب و رسوبات از ۴ محل مختلف از آب‌های ساحلی پورتوریکو جمع‌آوری شد. در بررسی تنوع و تولید متابولیت‌های زیست فعال اسفنج‌های کارائیب، در مجموع ۱۸۰ اکتینومیست جداسازی و بر اساس تجزیه و تحلیل توالی ژن ۱۶S rRNA شناسایی شد. نتایج نشان داد تنوع اکتینومیست‌های قابل کشت در نمونه‌های اسفنج نسبت به اکتینومیست‌های رسوبات بالاتر بود. هم‌چنین اکتینومیست‌های هم‌زیست اسفنج تنوع بالاتری در متابولیت‌های ثانویه آنتی‌بیوتیکی نسبت به نمونه‌های رسوبات داشتند. علاوه بر این، ۱۷ ترکیب آنتی‌بیوتیکی از دو سویه استرپتومیسس خالص سازی شدند که ۹ ترکیب آن مشتقات جدیدی از frigocyclinone بودند و ۱ ترکیب نیز قبلا از استرپتومیسس گریسوس از قطب جنوب جدا شده بود (Raczkowski, 2010).

با توجه به این‌که اکتینومیست‌ها، پرکاربردترین میکروارگانیسم‌ها برای تولید آنتی‌بیوتیک‌ها هستند و نظر به این‌که اسفنج‌ها منبع مناسبی برای به دست آوردن اکتینومیست‌های جدید می‌باشند به نظر می رسد جداسازی میکروارگانیسم‌ها به خصوص اکتینومیست‌ها از اسفنج های خلیج فارس، می تواند زمینه کاری مناسب برای یافتن سویه‌های جدید باشد. همچنین خواص ضد باکتریایی قابل توجه برخی از اکتینومیست های به دست آمده در این مطالعه، نشان می دهد پتانسیل انجام تحقیقات بیشتر در این مورد وجود دارد از جمله می توان به مطالعه تاثیر اکتینومیست های به دست آمده بر کنترل بیماریهای قارچی و باکتریایی آبزیان پرورشی و استخراج متابولیت های ثانویه با ارزش دارویی اشاره نمود. از آنجایی که انتخاب محیط کشت مناسب در پروسه جداسازی میکروارگانیسم ها و به ویژه اکتینومیست های همزیست با موجودات دریایی بسیار حائز اهمیت است تلاش در جهت معرفی محیط کشت های جدید در این زمینه مفید خواهد بود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از کارشناسان و اساتید پژوهشکده خلیج فارس کمال تشکر و قدردانی را دارند.

منابــع

Abdelmohsen, U.R., Pimentel-Elardo, S.M., Hanora, A., Radwan, M., Abou-El-Ela, S.H., Ahmed, S., Hentschel, U. 2010. Isolation, phylogenetic analysis and anti-infective activity screening of marine sponge-associated actinomycetes. Marine Drugs. 8(3): 399-412.

Armstrong, E., McKenzie, J.D., Goldsworthy, G.T. 1999. Aquaculture of sponges on scallops for natural products research and antifouling. Journal of Biotechnology. 70(1): 163-174.

Bredholt, H., Fjærvik, E., Johnsen, G., Zotchev, S.B. 2008. Actinomycetes from sediments in the Trondheim fjord, Norway: diversity and biological activity. Marine Drugs. 6(1): 12-24.

Enticknap, J.J., Kelly, M., Peraud, O., Hill, R.T. 2006. Characterization of a culturable alpha proteobacterial symbiont common to many marine sponges and evidence for vertical transmission via sponge larvae. Applied and Environmental Microbiology. 72(5): 3724-3732.

Fenical, W., Jensen, P.R., Palladino, M.A., Lam, K.S., Lloyd, G.K., Potts, B.C. 2009. Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide A (NPI-0052). Bioorganic and Medicinal Chemistry. 17(6): 2175-2180.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-11-05]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1396.7.1.6.1]

Friedrich, A.B., Merkert, H., Fendert, T., Hacker, J., Proksch, P., Hentschel, U. 1999. Microbial diversity in the marine sponge *Aplysina cavernicola* (formerly *Verongia cavernicola*) analyzed by fluorescence in situ hybridization (FISH). Marine Biology. 134(3): 461-470.

Fuerst, J.A., Webb, R.I., Garson, M.J., Hardy, L.L., Reiswig, H.M. 1999. Membrane-bounded nuclear bodies in a diverse range of microbial symbionts of Great Barrier Reef sponges. Memoirs of the Queensland Museum. 44: 193-203.

Gandhimathi, R., Arunkumar, M., Selvin, J., Thangavelu, T., Sivaramakrishnan, S., Kiran, G.S., Shanmughapriya, S., Natarajaseenivasan, K. 2008. Antimicrobial potential of sponge associated marine actinomycetes. Journal of Medical Mycology. 18(1): 16-22.

Hentschel, U., Hopke, J., Horn, M., Friedrich, A.B., Wagner, M., Hacker, J., Moore, B.S. 2002. Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. Applied and Environmental Microbiology. 68(9): 4431-4440.

Hentschel, U., Usher, K.M., Taylor, M.W. 2006. Marine sponges as microbial fermenters. FEMS Microbiology Ecology. 55(2): 167-177.

Huang, H., Lv, J., Hu, Y., Fang, Z., Zhang, K., Bao, S. 2008. Micromonospora *rifamycinica* sp. nov., a novel actinomycete from mangrove sediment. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 58(1): 17-20.

Kim, T.K., Garson, M.J., Fuerst, J.A. 2005. Marine actinomycetes related to the 'Salinospora'group from the Great Barrier Reef sponge *Pseudoceratina clavata*. Environmental Microbiology. 7(4): 509-518.

Lee, Y.K., Lee, J.H., Lee, H.K. 2001. Microbial symbiosis in marine sponges. Journal of Microbiology Seoul. 39(4): 254-264.

Li, C.W., Chen, J.Y., Hua, T.E. 1998. Precambrian sponges with cellular structures. Science. 279(5352): 879-882.

Li, J., Yang, J., Zhu, W.Y., He, J., Tian, X.P., Xie, Q., Zhang, S., Li, W.J. 2012. *Nocardiopsis coralliicola* sp. nov., isolated from the gorgonian coral, *Menella praelonga*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.62(7): 1653-1658.

Peraud, O. 2006. Isolation and characterization of a sponge-associated actinomycete that produces manzamines.PhD thesis. University of Maryland. 231 p.

Raczkowski, J.V. 2010. Biodiversity of actinomycetes associated with Caribbean sponges of Puerto Rico, and their metabolic profiles. MSc. thesis. University of North Carolina. 137 p.

Salami, F. 2004. Isolation and determination of *Streptomyces* that produce antibiotic from soil. Pajoubesh and Sazandegi. 64: 41-47. (in Persian).

Sambrook JaR, D.W. 2014. Molecular cloning: a laboratory manual.4 th edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2028 p.

Sepcic, K., Kauferstein, S., Mebs, D., Turk, T. 2010. Biological activities of aqueous and organic extracts from tropical marine sponges. Marine Drugs. 8(5): 1550-1566.

Tian, X.P., Long, L.J., Wang, F.Z., Xu, Y., Li, J., Zhang, J., Zhang, C.S., Zhang, S., Li, W.J. 2012. *Streptomyces nanhaiensis* sp. nov., a marine streptomycete isolated from a deep-sea sediment. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 62(4): 864-868.

Toth, E., Kenne Borsodi, A., Felföldi, T., Vajna, B., Sipos, R., Márialigeti, K. 2013. Practical Microbiology: based on the Hungarian practical notes entitled "Mikrobiológiai Laboratóriumi Gyakorlatok". 1560 p.

Valli, S., Suvathi, S.S., Aysha, O.S., Nirmala, P., Vinoth, K.P., Reena, A. 2012. Antimicrobial potential of actinomycetes species isolated from marine environment. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2(6): 469-473.

Webster, N.S., Hill, R.T. 2001. The culturable microbial community of the Great Barrier Reef sponge *Rhopaloeides odorabile* is dominated by an α-Proteobacterium. Marine Biology. 138(4): 843-851.

Xi, L., Ruan, J., Huang, Y. 2012. Diversity and biosynthetic potential of culturable actinomycetes associated with marine sponges in the china seas. International Journal of Molecular Sciences. 13(5): 5917-5932.

Zheng, Z., Zeng, W., Huang, Y., Yang, Z., Li, J., Cai, H., Su, W. 2000. Detection of antitumor and antimicrobial activities in marine organism associated actinomycetes isolated from the Taiwan Strait, China. FEMS Microbiology Letters. 188(1): 87-91.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2025-11-05]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1396.7.1.6.1]