



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

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

^۲گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، ایران

نوع مقاله:

چکیده

پژوهشی

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۹۴/۱۲/۰۵

اصلاح: ۹۵/۱۲/۰۴

پذیرش: ۹۵/۱۲/۱۴

کلمات کلیدی:

آنتی بیوتیک

باکتری

پوریفرا

مزوهیل

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 کلروفومی 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 کلروفومی 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.

مقدمه

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 به دست آمده است. ترکیباتی با کارایی بالای زیستی شامل آنتی‌میکروبها، آنتی‌تومورها و انواع آنزیمها و ... از اسفنجها استخراج شده اند (Fenical *et al.*, 2009). با توجه به این که مواد فعال زیستی به دست آمده از اسفنجها، علاوه بر کارایی بسیار بالا فاقد عوارض جانبی داروهای شیمیایی هستند، امید به درمان بسیاری از انواع سرطانها، ایدز و بیماریهای مقاوم به آنتی بیوتیکهای فعلی، به استفاده از داروهای است که از این موجودات به دست آمده است (Armstrong *et al.*, 1999; Sepcic *et al.*, 2010).

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

حضور تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌ها درون مزوهِیل 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 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 عمدتاً برای رشد میکروارگانیسم‌های خشکی‌زی طراحی شده‌اند رشد نکرده یا به سختی رشد می‌کنند (Abdelmohsen et al., 2010). اکتینومیست‌ها حدود ۱۰٪ از جمعیت باکتریایی رسوبات بستر دریا را تشکیل می‌دهند که در سال‌های اخیر مورد توجه خاصی قرار گرفته‌اند. 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 اتاقک‌های کوانوسیت‌ها جمع می‌کنند و این باکتری‌ها بخشی از جامعه میکروبی اسفنج را تشکیل می‌دهند (Kim et al., 2005). اگرچه هنوز چگونگی کسب باکتری‌های هم‌زیست توسط اسفنج‌ها دقیقاً مشخص نیست اما در این رابطه دو فرضیه رایج وجود دارد. اساس فرضیه اول این است که میکروارگانیسم‌های 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 مزوهِیل مهاجرت کنند توانایی زیست به همراه اسفنج‌ها را به دست می‌آورند (Friedrich et al., 1999).

فرضیه دوم انتقال عمودی میکروارگانیسم‌ها، 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 میکروارگانیسم‌های 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 مزوهِیل هموژنیزه گردید (Raczkowski, 2010; Peraud, 2006). برای خالص‌سازی و شناسایی مرفولوژیک و بیوشیمیایی اکتینومیست‌ها، بافت هموژنیزه شده با استفاده از آب دریای استریل، رقیق و نهایتاً در محیط کشت‌های تغییر یافته مارین آگار، امرسون آگار، نوترینت آگار و اوره آگار کشت داده شدند (Li et al., 2008; Hentschel et al., 2006; Gandhimathi, et al., 1998). 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 خالص‌سازی گردیدند، به طوری که در هر پلیت تنها یک نوع کلنی رشد نمود. لازم به ذکر است که برای جلوگیری از رشد قارچ‌ها، به میزان ۲۰ میکروگرم در لیتر نیستاتین به محیط‌های کشت افزوده شد (Zheng et al., 2000).

به منظور شناسایی مرفولوژیک و بیوشیمیایی جدایه‌ها، پس از مشاهدات میکروسکوپی و بررسی ظاهر و رنگ کلنی‌ها، توانایی تولید رنگدانه، قابلیت رشد در شوری‌های مختلف و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد مورد مطالعه قرار گرفت و همچنین آزمون‌های اسیدفست، اوره‌آز 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 جزیبی 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 می‌باشد (Valli et al., 2012; Li et al., 2012).

در این تحقیق، باکتری‌های بیماری‌زای *Klebsiella*، *Escherichia coli*، *Enterobacter aerogenes*، *Staphylococcus aureus*، *Shigella flexneri*، *Proteus mirabilis*، *Salmonella typhi*، *pneumoniae* 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 کاملاً خشک شود. کلنی‌های خشک شده اکتینومیست‌ها در هاون چینی به طور کامل آسیاب و پودر شدند.

برای تهیه عصاره به پودر آماده شده در فالكون‌ها، 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. فالكون‌ها 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 دیسک‌های ۶ میلی‌متری پانچ شده و استریل گردیدند و به مدت ۲۴ ساعت در عصاره‌های تهیه شده از اکتینومیست‌ها قرار داده شدند. سپس دیسک‌های آغشته به عصاره مورد نظر در پلیت‌هایی که در آنها باکتری‌های بیماری‌زا به صورت یکنواخت بر روی سطح محیط، کشت شده بودند قرار گرفتند و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت دماگذاری شدند. قدرت ضد باکتریایی اکتینومیست‌ها با اندازه‌گیری هاله عدم رشد اطراف دیسک‌ها از جایی که باکتری هیچ‌گونه رشدی نداشتند، با استفاده از کولیس اندازه‌گیری 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 پلیمرز

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).

پس از اطمینان از کیفیت مناسب DNA استخراج شده، برای تکثیر ژن rRNA ۱۶S با استفاده از پرایمر مستقیم با توالی CCG TAC TCC CCA GGC GGG G و پرایمر معکوس با توالی CGC GGC CTA GCT TGT TG پلیمرز انجام شد. حجم و غلظت مواد استفاده شده در واکنش زنجیره ای پلیمرز 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 پلیمرز و ۱۶/۷ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه. برنامه استفاده شده در PCR در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱. برنامه واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)

مرحله	نام مرحله	مدت زمان (ثانیه)	دما (درجه سانتی‌گراد)	تعداد تکرار مرحله
اول	واسرشتی ^۱ اولیه	۳۰۰	۹۳	۱
	واسرشتی	۳۰	۹۳	
دوم	اتصال	۶۰	۵۸	۳۵
	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 ClustalW و MEGA6 استفاده شد.

نتایج

شناسایی مورفولوژیک و بیوشیمیایی

در این تحقیق جدایه‌های mz1، mz2 و mz3 از اسفنج *Dictyonella* sp. و mz5، mz6، mz7 و mz8 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 ضد میکروبی 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 جدایه‌های mz3 و mz5 ضعیف‌ترین نتایج را نشان دادند. همچنین اکتینومیست 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

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

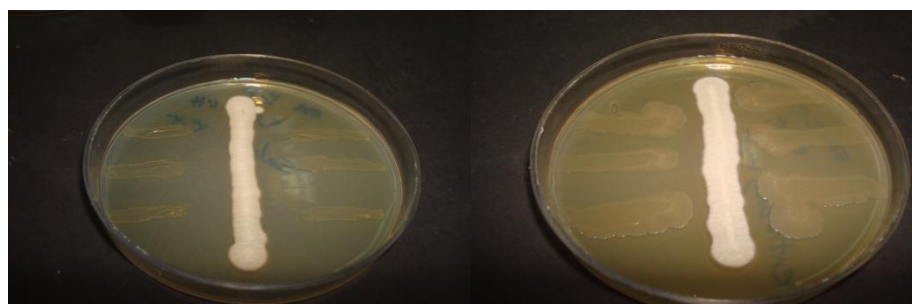
Mz8	Mz7	Mz6	Mz5	Mz3	Mz2	mz1	نام جدایه	تست‌ها
+	+	+	+	+	+	+		تست اوره‌آز
+	+	+	+	+	+	+		تست اسید فست
+	+	+	+	+	+	+		تست کاتالاز
+	+	+	+	+	+	+		رشد در شوری ۰/۷۵٪
+	+	+	+	-	+	+		رشد در شوری ۵٪
+	+	+	+	-	+	+		رشد در شوری ۱۰٪
+	-	+	+	-	+	-		رشد در ۳۷ درجه
+	+	+	+	+	+	+		رشد در ۲۸ درجه
سبز- سفید	زرد- سبز	کرم- نارنجی	سفید- خاکستری	سیاه	سفید	گل‌بهی		رنگ روی کلنی
زرد	قهوه‌ای	سفید	زرد	سیاه	سفید	سفید		رنگ پشت کلنی
یشمی	یشمی	یشمی	یشمی	سیاه	یشمی	گل‌بهی		رنگ کلنی پس از ۲ هفته

روش انتشار دیسک

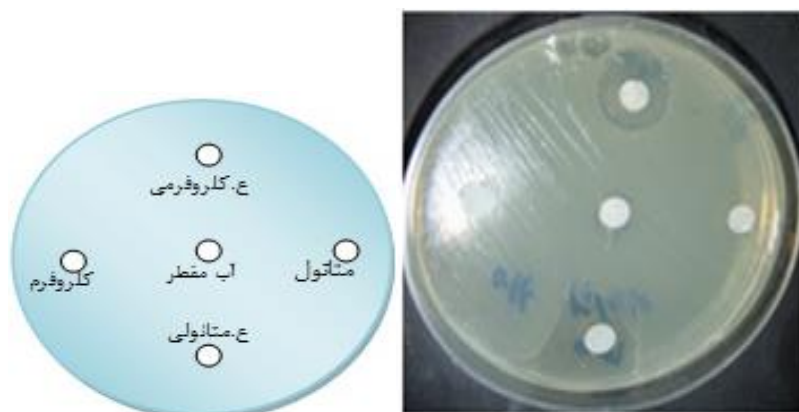
در این روش دیسک‌های آغشته به عصاره‌های متانولی و کلروفرمی اکتینومیسیت‌های استخراج شده و همچنین دیسک‌های آغشته به آب مقطر به عنوان کنترل منفی به کار برده شدند. بر اساس قطر هاله عدم رشد ایجاد شده اطراف دیسک‌ها (بر حسب میلی لیتر) قدرت ضد باکتریایی اکتینومیسیت‌های مورد آزمون، سنجیده شدند (جدول ۴). دیسک‌های کنترل منفی چون هاله عدم رشدی ایجاد نکردند همچنین اکتینومیسیت‌های 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

بakteriye بیماری‌زا سویه‌های اکتینومیسیت	<i>E. coli</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>S. typhi</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>S. aureus</i>
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



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 می دهد.



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

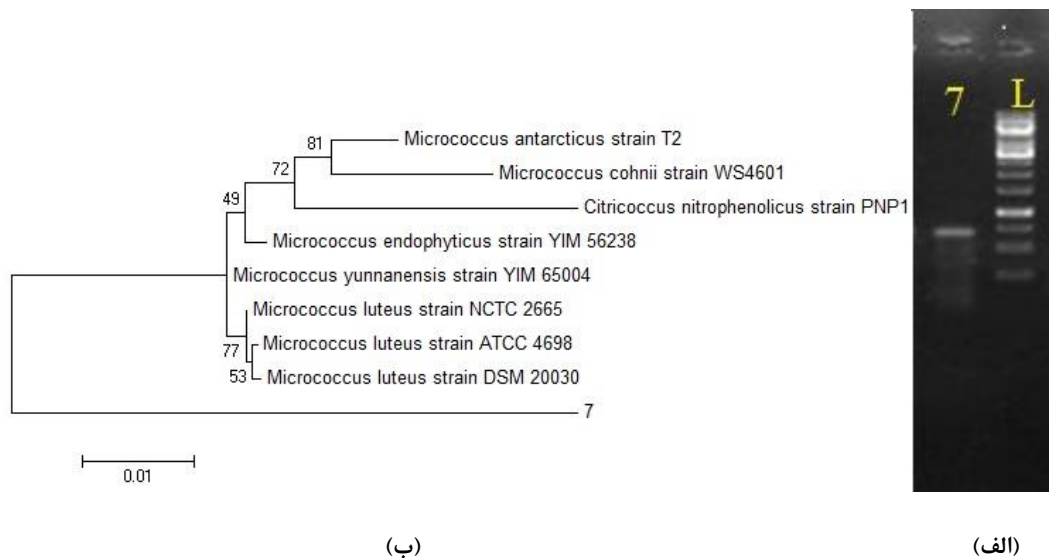
جدول ۴. نتایج آزمون انتشار از دیسک؛ قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی متر

نمونه های اکتینومیست	بakteri بیماری زا		نوع عصاره					
	<i>E. coli</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>S. typhi</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. aerogenes</i>	
Mz1	عصاره متانولی	۲۰±۰/۵	-	۱۵±۱/۸	۱۵±۱/۵	۲۲±۰/۵	-	۲۵±۱/۵
	عصاره کلروفومی	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 کلروفومی	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 کلروفومی	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 کلروفومی	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 کلروفومی	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

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.



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 جدایشده 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 دسته‌بندی نمود و قوی‌ترین سویه‌ها را برای مراحل بعدی انتخاب کرد.

روش Cross streak یکی از روش‌های مرسوم برای بررسی فعالیت ضد میکروبی باکتری‌ها و قارچ‌ها می باشد. در مطالعات انجام شده توسط والی و همکاران در ۲۰۱۲ از این روش برای غربال‌گری اولیه قدرت ضد میکروبی سویه‌های اکتینومیست جدایشده 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 کلروفومی (غیرقطبی) از اکتینومیست‌ها تهیه شد و برای انجام روش انتشار از دیسک مورد استفاده قرار گرفت. در مطالعات انجام شده در این زمینه معمولاً یکی از عصاره‌های قطبی و غیرقطبی ایجاد هاله رشد می‌نمودند اما جالب توجه است که در این مطالعه هم عصاره متانولی و هم عصاره کلروفومی هاله عدم رشد ایجاد کردند. در مورد جدایه‌های 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 عصاره‌گیری مجدد مشخص گردید. از بین سویه‌های اکتینومیست مورد آزمون، سویه‌های mz1 و mz7 دارای بیشترین قدرت ضد باکتریایی بودند. نتایج مشخص کرد که عصاره کلروفومی mz1 قوی‌تر از عصاره متانولی آن بوده و عصاره متانولی mz2 قوی‌تر از عصاره کلروفومی آن می‌باشد. در مورد mz6 نتایج مربوط به دو عصاره بسیار نزدیک به هم بودند. عصاره متانولی mz7 و mz8 نیز قوی‌تر از عصاره کلروفومی آن بود. در بیشتر نمونه‌ها عصاره متانولی آنها قوی‌تر از عصاره کلروفومی

بود که می تواند به دلیل قوی تر بودن ترکیبات ضدباکتریایی قطبی یا حساسیت بیشتر میکروارگانیسم های بیماری زای مورد آزمون، نسبت به این ترکیبات باشد.

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

راچکوفسکی و همکاران در سال ۲۰۱۰ در تحقیقی مشابه، به مطالعه تنوع زیستی اکتینومیست های همزیست اسفنج های دریای کارائیب از پورتوریکو و بررسی مشخصات متابولیک آن ها پرداختند. در این تحقیق ۱۰ سویه مختلف اسفنج کارائیب و رسوبات از ۴ محل مختلف از آب های ساحلی پورتوریکو جمع آوری شد. در بررسی تنوع و تولید متابولیت های زیست فعال اسفنج های کارائیب، در مجموع ۱۸۰ اکتینومیست جداسازی و بر اساس تجزیه و تحلیل توالی ژن ۱۶S rRNA شناسایی شد. نتایج نشان داد تنوع اکتینومیست های قابل کشت در نمونه های اسفنج نسبت به اکتینومیست های رسوبات بالاتر بود. همچنین اکتینومیست های همزیست اسفنج تنوع بالاتری در متابولیت های ثانویه آنتی بیوتیکی نسبت به نمونه های رسوبات داشتند. علاوه بر این، ۱۷ ترکیب آنتی بیوتیکی 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 این که اکتینومیست ها، پرکاربردترین میکروارگانیسم ها برای تولید آنتی بیوتیک ها هستند و نظر به این که اسفنج ها منبع مناسبی برای به دست آوردن اکتینومیست های جدید می باشند به نظر می رسد جداسازی میکروارگانیسم ها به خصوص اکتینومیست ها از اسفنج های خلیج فارس، می تواند زمینه کاری مناسب برای یافتن سویه های 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 بیماری های 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.

منابع

- 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.

- 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. *Nocardiosis 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. 4th edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2028 p.
- Sepecic, K., Kaufenstein, 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.