ORIGINAL ARTICLE

Antifungal Activity of Actinomycetes Isolated from Sediments of the Caspian Sea

Mojtaba Mohseni[1],
Hamed Norouzi[2]

[1] Assistant Professor, Department of Molecular and Cell Biology, School of Basic Sciences, The University of Mazandaran, Babolsar, Iran
[2] MSc Student, Department of Molecular and Cell Biology, School of Basic Sciences, The University of Mazandaran, Babolsar, Iran

(Received June 9, 2013; Accepted August 6, 2013)

Abstract

Background and purpose: Actinomycetes were always considered as a source of essential new antibiotic producers and secondary metabolite in pharmaceutical industries. This study aimed to isolate antibiotic producing actinomycetes from sediments of the Caspian Sea and investigate their potential as antifungal metabolites production.

Materials and methods: Sediments of the Caspian Sea were collected from 5 and 10 meters depth. Samples were diluted and cultured in Starch Casein Agar (SCA) selective media. The strains were isolated and purified using morphological and microscopy methods. The primary screening was performed by the cross streak method in order to find the active strains. The produced metabolites were extracted from active strains and antifungal activities were evaluated against pathogen fungus by the disc diffusion method.

Results: Of the sediments, 20 strains were isolated and identified. All of the seven strains were determined as active actinomycetes in the primary screening. Results in the secondary screening showed that the active isolates had a good antifungal effect on *Candida sp. and Aspergillus sp*. The results revealed that the strains MN1, MN2 and MN3 were shown more antifungal activities than the others.

Conclusion: Results of this study declared that sediments of the Caspian Sea are rich in actinomycetes, active in the case of new antifungal compounds production, that need to be identified and purified.

Keywords: Marine actinomycetes, antifungal activity, the Caspian Sea

J Mazand Univ Med Sci 2013; 23(104): 80-87 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و سوم شماره ۱۰۴ شهریور سال ۱۳۹۲ (۸۷-۸۰)

بررسی فعالیت ضد قارچی اکتینومیست‌های جداشده از رسوبات بستر دریای مازندران

مجتبی محسنی[۱]
حامد نوروزی[۲]

چکیده

سابقه و هدف: اکتینومیست‌ها همواره به عنوان یک منبع اصلی تولیدکننده آنتی‌بیوتیک‌های جدید و متابولیت‌های ثانویه متنوع، در داروسازی مورد توجه بوده‌اند. هدف از این تحقیق جداسازی اکتینومیست‌های تولیدکننده آنتی‌بیوتیک از رسوبات بستر دریای مازندران و بررسی پتانسیل تولید متابولیت‌های ضد قارچی توسط این ارگانیسم‌ها بود.

مواد و روش‌ها: رسوبات بستر دریای مازندران از اعماق ۵ و ۱۰ متری جمع‌آوری شد. نمونه‌ها رقیق شدند و برای جداسازی اکتینومیست‌ها در محیط کشت انتخابی استارچ کازئین آگار (SCA) کشت داده شدند. جدایه‌ها توسط روش‌های مورفولوژی و میکروسکوپی کلنی‌ها، شناسایی و جداسازی شدند. غربالگری اولیه جهت یافتن جدایه‌های فعال با روش Cross streak انجام شد. متابولیت‌های تولیدشده توسط جدایه‌های فعال، استخراج شدند و بررسی فعالیت آن‌ها علیه قارچ‌های بیماریزا با استفاده از روش انتشار در دیسک بررسی شد.

یافته‌ها: از رسوبات دریا، تعداد ۲۰ جدایه اکتینومیست جداسازی و شناسایی شد. در غربالگری اولیه ۷ جدایه به عنوان اکتینومیست فعال شناسایی شد. نتایج مرحله دوم غربالگری نشان داد که جدایه‌های فعال جداشده، فعالیت ضد قارچی مناسبی علیه گونه‌های *کاندیدا* و *آسپرژیلوس* داشتند. نتایج نشان داد که جدایه‌های MN1، MN2 و MN3 فعالیت ضد قارچی بیشتری نسبت به بقیه جدایه‌های فعال داشتند.

استنتاج: نتایج این تحقیق نشان می‌دهد رسوبات بستر دریای مازندران غنی از اکتینومیست‌های فعال تولیدکننده ترکیبات ضد قارچی جدید است، که نیازمند شناسایی و خالص‌سازی آن می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: اکتینومیست‌های دریایی، فعالیت ضد قارچی، دریای مازندران

مقدمه

اکتینومیست‌ها باکتری‌های گرم مثبت و رشته‌ای هستند که به صورت آزاد، ساپروفیت و گاه همزیست با گیاهان دیده می‌شوند. این باکتری‌ها را می‌توان در همه اکوسیستم‌ها از جمله خاک، آب، رسوبات دریایی و نیز آب‌های گرم جداسازی کرد (۱). اکتینومیست‌ها حدود ۱۰ درصد از جمعیت باکتریایی رسوبات بستر دریا را تشکیل می‌دهند. میکروارگانیسم‌های زیستگاه‌های دریایی به عنوان منابع شگفت‌انگیز تولید مواد بیواکتیو قوی بشمار می‌روند. گزارش‌های موجود در مورد اکتینومیست‌های دریایی، اندک است (۲). اکتینومیست‌ها دارای پتانسیل بالایی در تولید متابولیت‌های ثانویه مثل آنتی‌بیوتیک‌ها، آنزیم‌ها، علف‌کش‌ها، مواد ضد سرطان و دیگر ترکیبات مفید می‌باشند (۴، ۳). حدود ۲۳۰۰۰ نوع متابولیت ثانویه فعال توسط میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شود و اکتینومیست‌ها بیش از ۷۵ درصد از آنتی‌بیوتیک‌ها و ترکیبات ضد میکروبی مختلف، تولید می‌کنند. این ترکیبات به عنوان منابع جدید فعال، شناخته می‌شوند (۵). در سال‌های اخیر به دلیل نیاز به داروهای جدید، میکروارگانیسم‌های دریایی به عنوان منبع جدید با پتانسیل تولید متابولیت‌های منحصر به فرد، مورد توجه قرار گرفته‌اند (۶).

مولف مسئول: مجتبی محسنی- بابلسر: دانشگاه مازندران. E-mail: m.mohseni@umz.ac.ir
۱. استادیار، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
۲. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۳/۱۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۲/۴/۲ تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۵/۱۵

قارچ‌های پاتوژن، عامل بروز بسیاری از بیماری‌ها مثل کچلی، مسمومیت غذایی و بیماری‌های گیاهی هستند و باعث بروز مشکلات جدی در سراسر جهان شده‌اند. برخی گونه‌های قارچ نظیر *Claviceps purpurea* تولید مایکوتوکسین می‌کند که برای انسان بسیار سمی است (۶). امروزه شمار بیمارانی که از بیماری‌های قارچی رنج می‌برند و به خصوص بروز عفونت‌های فرصت‌طلب در مبتلایان به نقص سیستم ایمنی، رو به افزایش است. از طرفی قارچ‌ها ماهیت یوکاریوتی دارند و یافتن داروهای ضد قارچی با سمیت انتخابی بر میزبان آسان نیست (۷). همچنین با توجه به اهمیت بیماری‌های قارچی و پیدایش مقاومت دارویی، نیاز مبرم به تولید داروهای ضد قارچی جدید است (۹، ۸). بنابراین نیاز به داروهای ضد قارچی جدید و مؤثر به یک چالش عمده، در صنعت داروسازی تبدیل شده است.

اغلب داروهای ضد قارچی مورد استفاده در پزشکی، دارای اثرات جانبی هستند. شمار زیادی از ترکیبات ضد قارچی تولیدشده توسط میکروارگانیسم‌ها، دارای اثرات سمی برای انسان هستند و قابلیت مصرف سیستمیک ندارند (۱۰). امروزه تعداد کمی از داروهای ضد قارچی مورد استفاده، از گونه‌های اکتینومیست به ویژه جنس *استرپتومیسس* استخراج شده‌اند. از مهم‌ترین آن‌ها نیستاتین، آمفوتریپسین B و پیمارسین می‌باشد (۷، ۱). مطالعات گسترده برای به دست آوردن آنتی‌بیوتیک‌های جدید از اکتینومیست‌ها با اثرات بهتر و سمیت کمتر بر میزبان، ادامه دارد (۱۱). با این حال توجه کمی به جداسازی اکتینومیست‌های دریایی با خاصیت ضد قارچی، شده است.

در کشور ما نیز مطالعات زیادی برای جداسازی اکتینومیست‌ها با فعالیت ضد میکروبی از مناطق مختلف گزارش شده است (۱۲، ۵، ۱)؛ اما تاکنون هیچ مطالعه‌ای روی اکتینومیست‌های بستر دریای مازندران صورت نگرفته است. هاشمی و همکاران تعداد ۲۴ جدایه *استرپتومیسس* از خاک جنگل استان گلستان جداکردند که از میان آن‌ها، دو جدایه دارای اثر ضد قارچی قوی بودند (۱۲). همچنین وجود ۴۴ جدایه اکتینومیست با فعالیت ضد باکتریایی، از خاک آذربایجان شرقی گزارش شد (۱). دهناد و همکاران نیز تعداد ۱۲ جدایه اکتینومیست با تأثیر ضد میکروبی علیه باکتری‌های بیماری‌زا، مورد بررسی قرار دادند (۵). در این تحقیق برای اولین بار اکتینومیست‌های فعال تولیدکننده ترکیبات ضد قارچی، از رسوبات بستر دریای مازندران جداسازی و مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

رسوبات بستر دریای مازندران با موقعیت جغرافیایی ۳۶ درجه و ۴۳ دقیقه شمالی و ۳۶ درجه و ۴۴ دقیقه شمالی از اعماق ۵ و ۱۰ متر توسط سمپلر مخصوص (Van vein grab ۰/۲ متر مربع) جمع‌آوری شد و در ظروف استریل و در کوتاه‌ترین زمان به آزمایشگاه منتقل شد. سپس نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا اشکال رویشی اکتینومیست‌ها و سایر باکتری‌ها کاهش یابند و اسپورهای اکتینومیست‌ها جدا شوند (۱۳).

جداسازی اکتینومیست‌ها

برای جداسازی اکتینومیست‌ها از روش رقیق‌سازی متوالی استفاده شد. یک گرم از هر نمونه در ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد حل شد. نمونه‌ها رقیق شدند و برای جداسازی اکتینومیست‌ها، یک میلی‌لیتر از رقت‌های 10^{-2} و 10^{-3} در محیط کشت اختصاصی SCA (استارچ کازیین آگار شامل: ۱۵ گرم آگار، ۱۰ گرم نشاسته محلول، ۲ گرم پتاسیم فسفات، ۲ گرم پتاسیم نیترات، ۲ گرم سدیم کلرید، ۰/۳ گرم کازیین، ۰/۰۵ گرم منیزیم سولفات ۷ آبه، ۰/۰۲ گرم کلسیم کربنات، ۰/۰۱ گرم سولفات آهن ۷ آبه و یک لیتر آب دریای فیلترشده برای افزایش جداسازی اکتینومیست‌ها) در pH = ۷/۵ کشت داده شدند (۱۴). برای جلوگیری از رشد قارچ و باکتری به ترتیب مقدار ۲۵ میکروگرم در لیتر نیستاتین و ۱۰ میکروگرم در لیتر نالیدیکسیک اسید به محیط کشت افزوده شد. پس از

تلقیح، پلیت‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۱ روز گرمخانه‌گذاری شدند. کلنی‌های اکتینومیست به صورت پودری و خشک، در سطح آگار جداسازی شدند. شناسایی اولیه اکتینومیست‌ها بر اساس مشخصات مورفولوژی کلنی (سطح و پشت کلنی) و نیز مشخصات میکروسکوپی مسیلیوم هوایی، وضعیت اسپور و شکل انشعابات اسپور انجام شد. جدایه‌های خالص‌شده برای مراحل بعد در سطح شیب‌دار محیط کشت SCA رشد داده شدند و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

بررسی فعالیت ضد میکروبی جدایه‌ها

برای غربالگری اولیه اکتینومیست‌های دارای فعالیت ضد میکروبی، از روش Cross Streak استفاده شد (۱۵، ۳). تعداد ۲۰ جدایه اکتینومیست جداشده از رسوبات دریا، انتخاب و خالص‌سازی شدند. برای غربالگری اکتینومیست‌های فعال از نظر تولید فراورده‌های متابولیکی به روش Cross Streak، هر اکتینومیست در مرکز پلیت نوترین آگار به صورت یک خط مستقیم کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۳ روز در ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. سپس جدایه‌های بیماری‌زا شامل *اشریشیا کولی* PTCC۱۵۳۳، *سالمونلا تیفی* PTCC۱۶۰۹، *باسیلوس سوبتیلیس* PTCC۱۱۵۶، *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC ۲۵۹۲۳ و *کلبسیلا پنومونیه* به صورت یک خط عمود بر خط اصلی کشت اکتینومیست، تلقیح شد. پلیت‌ها به طور مجدد به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، گرماگذاری شدند. هاله‌ی عدم رشد اندازه‌گیری شد و بهترین جدایه‌های فعال اکتینومیست، برای مرحله بعد انتخاب شدند.

استخراج متابولیت‌های ضد قارچی جدایه‌های فعال اکتینومیست

برای استخراج متابولیت‌های ضد قارچی، جدایه‌های فعال اکتینومیست در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط مایع Actinomycete Isolation Medium (شامل ۵ گرم گلیسرول، ۴ گرم سدیم پروپیونات، ۲ گرم سدیم کازیینات، ۰/۵ گرم پتاسیم فسفات، ۰/۱ گرم آسپارژین، ۰/۱ گرم منزیم سولفات، ۰/۰۰۱ گرم سولفات آهن) تلقیح شد (۳). برای تولید ترکیبات ضد قارچی، ارلن‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز در گرمخانه شیکردار با دور ۱۸۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. برای جداسازی میسلیوم‌ها از فاز مایع، محیط کشت فیلتر و در ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. با توجه به حلالیت ترکیبات آنتی‌بیوتیکی در حلال‌های آلی، برای استخراج متابولیت‌های ثانویه ضد قارچی از حلال آلی اتیل استات استفاده شد (۱۷، ۱۶). یک برابر حجم سوپرناتانت به دست‌آمده از هر جدایه، اتیل استات به آن اضافه شد. فاز آلی حاوی ترکیبات آنتی‌بیوتیک، توسط دکانتور جدا شد و توسط گرما تغلیظ گردید. از عصاره خام استخراج‌شده برای بررسی فعالیت ضد قارچی جدایه‌ها استفاده شد.

بررسی فعالیت ضد قارچی جدایه‌ها

بررسی اثرات آنتاگونیستی و ضد قارچی عصاره خام حاصل از اکتینومیست‌های جداشده، به روش انتشار در دیسک (Disc diffusion) انجام شد (۲۰-۱۸). در این آزمایش اثر ضد قارچی جدایه‌ها علیه قارچ‌های استاندارد شامل *کاندیدا آلبیکنس PTCC۶۰۲۷*، *کاندیدا کروزئی PTCC۶۲۵۸*، *آسپرژیلوس نایجر*، *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس فومیگاتوس*، ارزیابی شد. دیسک‌های کاغذی استریل (قطر ۶ میلی‌متر، پادتن، ایران) آغشته به عصاره خام (۳۰ میکرولیتر) روی سطح محیط کشت سابرو دکستروز آگار پوشیده‌شده با یک لایه نازک قارچی، قرار داده شد (۲۱). از دیسک حاوی آنتی‌بیوتیک نیستاتین به عنوان شاهد مثبت و اتیل استات به عنوان شاهد منفی استفاده شد. پلیت‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت برای قارچ‌ها و به مدت ۲۴ ساعت برای مخمرها، گرماگذاری شد. سپس هاله‌ی عدم رشد (بر حسب میلی‌متر) اندازه‌گیری و ثبت شد (۲۰-۱۸).

یافته‌ها

در این پژوهش از هر عمق، تعداد ۵ نمونه رسوب دریا بررسی شد. کلنی‌های اکتیومیست پس از ۷ تا ۱۰ روز نمایان

شد. از بین رسوبات اعماق مختلف دریا، تعداد ۲۰ جدایه اکتینومیست به صورت کلنی‌های پودری و خشک، در سطح آگار جداسازی شدند. رنگ پشت و روی کلنی، سطح کلنی، شکل میکروسکوپی میسلیوم هوایی و دیگر خصوصیات مورفولوژیکی کلنی‌ها بررسی شد. از نظر مورفولوژی جدایه‌های MN2 و MN41 اسپور منفرد و بقیه‌ی جدایه‌ها اسپور زنجیره‌ای تولید می‌کنند (جدول شماره ۱). نتایج رنگ‌آمیزی و بررسی میکروسکوپی مسیلیوم های هوایی و اسپورها و نیز نتایج فعالیت آنزیمی اکتینومیست‌های فعال در جدول شماره ۱ خلاصه شد.

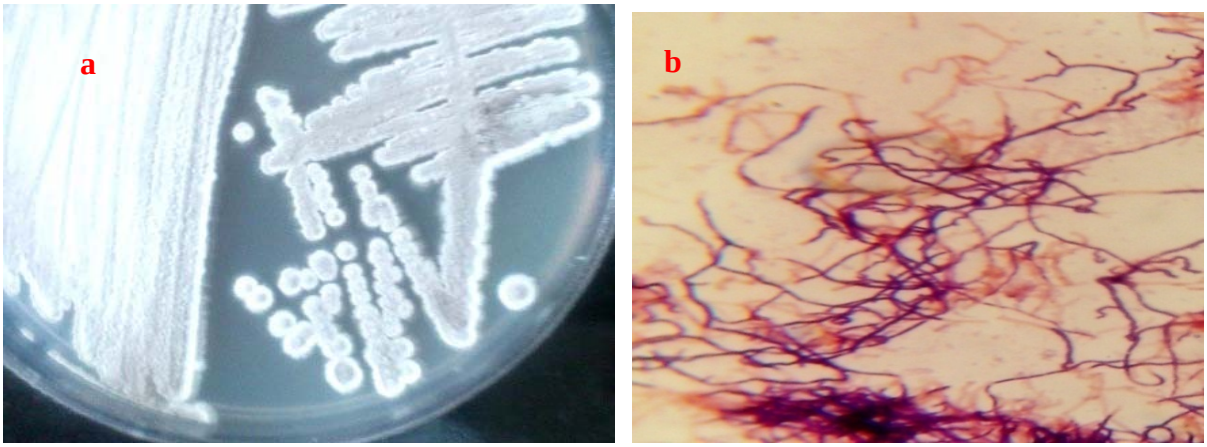
طبق جدول شماره ۱ نتایج حاصل از فعالیت آنزیمی جدایه‌ها در محیط‌های کشت حاوی نشاسته و کازیین نشان داد که تمام جدایه‌ها، فعالیت پروتئازی و آمیلازی داشتند. همچنین ویژگی مورفولوژیکی کلنی و میکروسکوپی جدایه فعال MN1 در تصویر شماره ۱ مشاهده می‌شود.

برای بررسی فعالیت ضد قارچی جدایه‌های، دو مرحله غربالگری انجام شد. برای شناسایی جدایه‌های فعال، مرحله اول غربالگری انجام شد و از بین ۲۰ جدایه، تعداد ۱۵ جدایه فعالیت ضد میکروبی علیه حداقل یک باکتری داشتند. نتایج فعالیت ضد میکروبی در جدول شماره ۲ نشان داده شد. از بین این جدایه‌های فعال، تعداد ۷ جدایه با بهترین خاصیت ضد میکروبی به نام‌های MN1، MN2، MN3، MN38، MN39، MN44 و MN41، برای بررسی فعالیت ضد قارچی ثانویه انتخاب شدند (جدول شماره ۲).

همان طور که در جدول شماره ۲ دیده می‌شود، نتایج غربالگری اولیه نشان داد که جدایه‌های فعال دارای خاصیت ضد باکتریایی بیشتری علیه باکتری‌های گرم مثبت بودند (جدول شماره ۲). علاوه بر این بیشترین فعالیت جدایه MN38 علیه *باسیلوس سوبتیلیس* (۰/۲ ± ۲۷ میلی‌متر)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (۰/۵ ± ۲۰ میلی‌متر) و *اشریشیا کولی*

جدول شماره ۱: ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی جدایه‌های اکتینومیست

نام‌جدایه‌ها	وضعیت اسپور	شکل انشعابات اسپور	رنگ پشت کلنی	رنگ سطح کلنی	آزمایش پروتئاز	آزمایش آمیلاز	آزمایش کاتالاز	تولید پیگمان
MN1	زنجیره‌ای	Simple (Flexibbilis)	خاکستری	قهوه‌ای	+	+	+	+
MN2	منفرد	Simple (retinaculum-apertum)	طوسی	سفید	+	+	+	+
MN3	زنجیره‌ای	Simple (rectus)	سفید	طوسی	+	+	+	+
MN38	زنجیره‌ای	Vertiiucllate (Monoverticillus)	سفید	خاکستری	+	+	+	+
MN39	زنجیره‌ای	Simple (Rectus)	خاکستری	طوسی	+	+	+	+
MN41	منفرد	Vertiiucllate (Biverticillus)	طوسی	سفید	+	+	+	+
MN44	زنجیره‌ای	Simple (Rectus)	سفید	سفید	+	+	+	−



تصویر شماره ۱: جدایه MN1 از رسوبات بستر دریای مازندران: رنگ و شکل کلنی اکتینومیست رشدکرده بر روی محیط کشت اختصاصی SCA (a) و تصویر میکروسکوپی میسلیوم‌ها (b).

جدول شماره ۲: غربالگری اولیه اکتینومیست‌های جداشده از رسوبات بستر دریا با روش cross-streak

جدایه‌ها	باکتری‌های آزمایش شده					
	سودوموناس آئروژینوزا	*سالمونلا تیفی*	*استافیلوکوکوس آرئوس*	*کلبسیلا پنومونیه*	*باسیلوس سوبتیلیس*	*اشرشیا کلی*
MN1	+	−	+	−	+	-
MN2	+	+	+	+	+	+
MN3	+	+	+	+	+	+
MN8	+	−	+	−	-	+
MN17	-	−	+	−	+	+
MN19	+	−	+	−	+	-
MN23	+	−	+	−	+	-
MN33	+	−	+	−	+	+
MN35	+	−	+	−	+	-
MN36	+	−	+	−	+	-
MN38	+	+	+	+	+	+
MN39	+	+	+	+	+	+
MN40	+	+	+	+	+	+
MN41	+	+	+	+	+	+

+: دارای تأثیر ضد باکتریایی −: فاقد تأثیر ضد باکتریایی

(۰/۳ ± ۲۰ میلی‌متر)؛ جدایه MN39 علیه *کلبسیلا پنومونیه* (۰/۱ ± ۲۴ میلی‌متر)، *اشریشیا کولی* (۰/۴ ± ۲۳ میلی‌متر) و *باسیلوس سوبتیلیس* (۰/۲ ± ۲۳ میلی‌متر) و جدایه MN3 علیه *سودوموناس آئروجینوزا* (۰/۲ ± ۲۰ میلی‌متر) بود.

فعالیت ضد قارچی عصاره خام استخراج‌شده از ۷ جدایه اکتینومیست فعال، با روش دیسک دیفیوژن بررسی شد. نتایج حاصل از غربالگری ثانویه در جدول شماره ۳ خلاصه شده است.

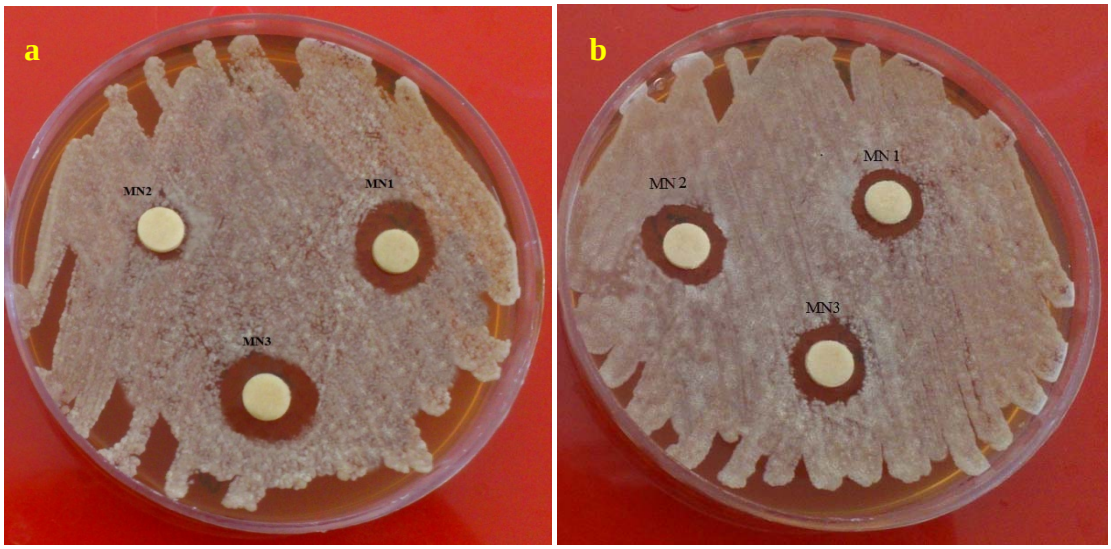
در بین جدایه‌ها، فعالیت ضد قارچی جدایه‌های MN2 و MN3 بیش از سایر جدایه‌ها بود (تصویر شماره ۲).

نتایج جدول شماره ۳ نشان می‌دهد عصاره خام استخراج شده از جدایه MN2، علیه *آسپرژیلوس فلاووس* (۱/۴ ± ۱۲ میلی‌متر) اثر مهارکنندگی داشت. همچنین بیشترین فعالیت جدایه MN1 علیه *آسپرژیلوس فومیگاتوس* (۲/۱ ± ۱۶ میلی‌متر)، جدایه MN2 علیه *کاندیدا کروزئی* (۰/۷ ± ۱۶ میلی‌متر) و جدایه MN3 علیه *کاندیدا آلبیکنس* (۱/۴ ± ۱۶ میلی‌متر) بود.

جدول شماره ۳: فعالیت ضد قارچی عصاره خام جدایه‌های اکتینومیست فعال علیه قارچ‌ها به صورت هاله ممانعت از رشد بر حسب میلی‌متر (داده‌ها با سه تکرار نشان داده شده است).

جدایه‌ها	*آ. فلاووس*	*آ. فومیگاتوس*	*آ. نایجر*	*ک. کروزئی*	*ک. آلبیکنس*
	انحراف معیار ± میانگین	انحراف معیار ± میانگین	انحراف معیار ± میانگین	انحراف معیار ± میانگین	انحراف معیار ± میانگین
MN1	بدون تأثیر	۱۶ ± ۲/۱	۱۴ ± ۱/۷	۱۳ ± ۱/۴	۱۴ ± ۱/۴
MN2	۱۲ ± ۱/۴	۱۴ ± ۱/۴	۱۱ ± ۰/۴	۱۶ ± ۰/۷	ب.ت
MN3	بدون تأثیر	۱۳ ± ۰/۴	۱۰ ± ۰/۷	۱۴ ± ۰/۴	۱۶ ± ۱/۴
MN8	بدون تأثیر	ب.ت	ب.ت	۱۱ ± ۱/۷	۷ ± ۱/۴
MN11	بدون تأثیر	۸ ± ۱/۴	ب.ت	۱۲ ± ۱/۴	۱۳ ± ۰/۴
MN15	بدون تأثیر	۹ ± ۱/۴	ب.ت	۱۳ ± ۰/۴	۹ ± ۱/۷
MN21	بدون تأثیر	۱۲ ± ۱/۷	ب.ت	۱۰ ± ۰/۷	۱۱ ± ۱/۴

ک: کاندیدا؛ *آ: آسپرژیلوس*



تصویر شماره ۲: فعالیت ضد قارچی عصاره خام استخراج‌شده از جدایه‌های MN1، MN2 و MN3 به صورت هاله ممانعت از رشد علیه *کاندیدا آلبیکنس* (a) و *کاندیدا کروزئی* (b) به روش انتشار در دیسک

بحث

بررسی‌های اخیر حاکی از آن است که سیستم‌های ژنتیکی در میکروارگانیسم‌ها قادر به برنامه‌ریزی برای مقابله با عوامل تهدیدکننده حیات آن‌ها، می‌باشد (۲۲، ۱۲). بر این اساس گونه‌های مقاوم میکروبی در حال ایجاد و گسترش هستند. این موضوع می‌تواند بشر را در آستانه ورود به یک فاجعه پزشکی قرار دهد و چه بسا یک عفونت کوچک، به دلیل نبودن داروهای مؤثر تبدیل به بیماری مرگبار شود. از طرفی هنوز تعدادی از بیماری‌های قارچی، باکتریایی، ویروسی و انگلی وجود دارند که داروی مؤثر علیه آن‌ها شناخته نشده است. از این رو حتی در آغاز قرن ۲۱، با آن که عصر طلایی آنتی‌بیوتیک‌ها سپری شده است، هنوز متابولیت ثانویه میکروارگانیسم‌ها می‌تواند برای تولید آنتی‌بیوتیک‌های جدید زمینه مناسبی برای تحقیقات کاربردی به شمار آید. در این بین کشف و توسعه عوامل ضد قارچی جدید از متابولیت‌های ثانویه، جایگاه خود را حفظ کرده است (۱۲). از میان میکروارگانیسم‌ها، اکتینومیست‌ها به دلیل اهمیتی که در تولید آنتی‌بیوتیک‌ها دارند همواره مورد توجه بوده‌اند و تولید آنتی‌بیوتیک توسط این میکروارگانیسم‌ها، از مهم‌ترین ویژگی آن‌ها بشمار می‌آید (۲۳).

هدف از این پژوهش جداسازی اکتینومیست‌ها از رسوبات بستر دریای مازندران و یافتن متابولیت‌های ضد میکروبی فعال بود. در ترکیه، از بین ۱۶ نمونه خاک ریزوسفر گیاهان دارویی، تعداد ۱۷ جدایه *استرپتومیسس* جدا شد که یک جدایه فعالیت ضد قارچی نشان داد و *استرپتومیسس سپکتابیلیس* معرفی شد (۲۴). همچنین در هند از بین ۱۰۰ اکتینومیست جداشده از محیط‌های نمکی، تعداد ۳ جدایه دارای فعالیت ضد درماتوفیتی بود (۲۵). در مطالعه مشابهی در کشور ترکیه، تعداد ۴۶ نمونه خاک برای جستجوی اکتینومیست مورد مطالعه قرار گرفت که ۷۴ جدایه جداسازی شد. از میان این جدایه‌ها، تعداد ۳۴ جدایه فعالیت ضد قارچی داشتند (۲۶). در تحقیق حاضر، از رسوبات بستر دریای مازندران تعداد ۲۰ جدایه اکتینومیست جداسازی شد. با مقایسه نتایج سایر مطالعات انجام‌شده، تعداد جدایه‌های اکتینومیست جداشده جالب توجه است. کاتیرسان و همکاران توانستند اکتینومیست‌هایی را از رسوبات دریایی جداسازی کنند که دارای فعالیت ضد قارچی بود (۲۷). این نتایج مشابه یافته‌های پژوهش حاضر است.

برای بررسی فعالیت ضد قارچی اکتینومیست‌های جداشده از رسوبات بستر دریای مازندران، از دو جدایه مخمر و سه جدایه کپک استفاده شد. از مجموع اکتینومیست‌های فعال

جداشده، ۷ جدایه دارای فعالیت ضد قارچی خوب بودند. فراوانی جدایه‌های اکتینومیست جداشده در این مطالعه نسبت به فراوانی اکتینومیست‌های جداشده در مطالعات قبلی، بیشتر بود. نتایج این بررسی نشان داد که از مجموع اکتینومیست‌های جداشده، درصد قابل توجهی از جدایه‌ها دارای فعالیت ضد قارچی بودند (۶). در مطالعات قبلی، اغلب جدایه‌های اکتینومیست از خاک‌های مناطق مختلف جدا شدند. در این تحقیق به منظور بررسی فعالیت ضد قارچی میکروارگانیسم‌های بومی ایران، برای اولین بار از رسوبات بستر دریا، اکتینومیست‌ها جداسازی شدند و مطالعه گردیدند. نتایج نشان داد که رسوبات بستر دریای مازندران می‌تواند به عنوان منبع غنی از اکتینومیست‌های فعال که توانایی تولید متابولیت‌های ضد قارچی جدید را دارند، مورد مطالعه دقیق‌تری قرار گیرد. بنابراین با استخراج، خالص‌سازی و مطالعه دقیق‌تر متابولیت‌های فعال اکتینومیست‌های رسوبات بستر دریای مازندران، شاید بتوان آنتی‌بیوتیک‌های جدید و مناسب برای درمان بیماری‌های عفونی ناشی از میکروارگانیسم‌های مقاوم، معرفی کرد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از جناب آقای دکتر ابوالقاسم روحی استادیار پژوهشکده اکولوژی دریای خزر که در جمع‌آوری نمونه‌ها از دریای مازندران همکاری کردند، سپاسگزاری می‌کنیم.

References

1. Abdi Soofiani S, Dehnad AR, Nahaei MR, Parsa Yegane L, Barzegari A, Maleki Kakolr H. Molecular Identification of Streptomyces Spp. with Antibacterial Activity Isolated from East Azerbaijan Soils. Med J Tabriz Univ Med Sci 2011; 33(2): 49-56. (Persian).
2. Safaeian S, Nouhi A, Oryan S. Studies on cytotoxic activity of marine actionomycetes from persian gulf on artemia franciscana and artemia Urmiana. Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources 2005; 11(4): 133-9. (Persian).
3. Valli S, Suvathi SS, Aysha O, Nirmala P, Vinoth KP, Reena A. Antimicrobial potential of Actinomycetes species isolated from marine environment. Asian Pac J Trop Biomed 2012; 2(6): 469-73.
4. Petrova DH, Shishkov SA, Vlahov SS. Novel thermostable serine collagenase from Thermoactinomyces sp. 21E: purification and some properties. J Basic Microbiol 2006; 46(4): 275-85.
5. Dehnad A, Bakhshi R, Parsa Yeganeh L, Monadi Sefidan A, Montazam SH, Abdi Soofiani S. Screening of Streptomycetes with Antibacterial Activity from Soil Samples of Azarbaijan Regions of Iran. Journal of Microbial Biotechnology 2009; 1(1): 18-22.
6. Sharma H, Parihar L. Antifungal activity of extracts obtained from actinomycetes. Journal of Yeast and Fungal Research 2010; 1(10): 197-200.
7. Shadzi S. Medical Mycology. Isfahan, Iran: Jahade Daneshgahi Press; 2009. (Persian).
8. Ouhdouch Y, Barakate M, Finance C. Actinomycetes of Moroccan habitats: Isolation and screening for antifungal activities. European Journal of Soil Biology 2001; 37(2): 69-74.
9. Gupte M, Kulkarni P, Ganguli BN. Antifungal antibiotics. Appl Microbiol Biotechnol 2002; 58(1): 46-57.
10. Emami S. Synthesis of novel 2-methyl-3-triazolyl chromanone oxime etherderivatives as potential antifungal agents. J Mazandaran Univ Med Sci 2006; 16(53): 16-24. (Persian).
11. Henkel T, Breiding-Mack S, Zeeck A, Grabley S, Hammann PE, Hütter K, et al. Secondary metabolites by chemical screening, 18. Narbosines, new carbohydrate metabolites from Streptomyces. Liebigs Annalen der Chemie 1991; (6): 575-80.
12. Hashemi S, Nasrollahi Omra A, Pordeli H, Hosenian A. Study of Anti-fungal Effects of Isolated streptomyces sp. from Gorgan Areas. Medical Laboratory Journal Golestan University of Medical Sciences 2010; 4(2): 7-16.
13. Takizawa M, Colwell RR, Hill RT. Isolation and diversity of actinomycetes in the chesapeake bay. Appl Environ Microbiol 1993; 59(4): 997-1002.
14. Das S, Ward LR, Burke C. Screening of marine Streptomyces spp. for potential use as probiotics in aquaculture. Aquaculture 2010; 305(1-4): 32-41.
15. Williams ST, Goodfellow M, Wellington EM, Vickers JC, Alderson G, Sneath PH, et al. A probability matrix for identification of some Streptomycetes. J Gen Microbiol 1983; 129(6): 1815-30.
16. Jianyou L, Jianrong X, Yongheng C. Isolation and identification of two marine-derived Streptomyces from marine mud of coast and offshore Zhuhai, and bioactive potential for plant pathogenic fungi.

African Journal of Biotechnology 2011; 10(56): 11855-60.
17. Singh LS, Baruah I, Bora TC. Actinomycetes of Loktak habitat: isolation and screening for antimicrobial activities. Biotechnology 2006; 5(2): 217-21.
18. Siva Kumar K, Haritha R, Mohan J, Ramana T. Screening of Marine Actinobacteria for Antimicrobial Compounds. Research Journal of Microbiology 2011; 6(4): 385-93.
19. Tenover FC. Antibiotic Susceptibility Testing. In: Schaechter M, Editor. Encyclopedia of Microbiology. Oxford, UK: Academic Press; 2009.
20. Boyle VJ, Fancher ME, Ross RW. Rapid, modified Kirby-Bauer susceptibility test with single, high-concentration antimicrobial disks. Antimicrob Agents Chemother 1973; 3(3): 418-24.
21. Choi SH, Son MJ, Kim SH, Choi SY, Lee YH, Choi JE, et al. Isolation and Medium Development of the Actinomycetes, Streptomyces griseofuscus CNU-A91231, Inhibiting Phytopathogenic Fungi. Korean journal of microbiology and biotechnology 2009; 37(4): 322-32.
22. Cohen SN, Chang AC, Hsu L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. Proc Natl Acad Sci U S A 1972; 69(8): 2110-4.
23. Bharti A, Kumar V, Gusain O, Bisht GS. Antifungal activity of actinomycetes isolated from Garhwal region. Journal of Sci Engg Tech Mgt 2010; 2(2): 3-9.
24. Khamna S, Yokota A, Peberdy JF, Lumyong S. Antifungal activity of Streptomyces spp. isolated from rhizosphere of Thai medicinal plants. International Journal of Integrative Biology 2009; 6(3): 143-7.
25. Lakshmipathy DT, Kannabiran K. A Morphological, Biochemical and Biological Studies of Halophilic Streptomyces sp. Isolated from Saltpan Environment. American Journal of Infectious Diseases 2009; 5(3): 200-6.
26. Sahin N, Ugur A. Investigation of the antimicrobial activity of some Streptomyces isolates. Turkish Journal of Biology 2003; 27(2): 79-84.
27. Kathiresan K, Balagurunathan R, Selvam MM. Fungicidal activity of marine actinomycetes against phytopathogenic fungi. Indian Journal of Biotechnology 2005; 4(2): 271-6.