Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 12, Number 6 (January - February)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Isolation of ASR7 Actinomycete Isolated from S12 Demospongia Marine Sponge and Study of Its Antibacterial Activity

Razieh Pordel, Soheila Matroodi*, Isaac Zamani

Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Sciences and Technology, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2017/10/21
Accepted: 2018/02/21
Available online: 2019/03/06

Article Subject:
Antimicrobial Substances

IJMM 2019; 12(6): 409-418

Corresponding author:

Soheila Matroodi
Department of Marine biology, Faculty of Marine Science and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Iran

Email:
s.matroodi@kmsu.ac.ir

Use your device to scan and read the article online

Abstract

Background and Aims: Marine Actinomycetes are gram-positive bacteria that sometimes are free, saprophytic or plant and animal-associated, including marine sponges. More than 75% of antibiotics and antimicrobial compounds are produced by actinomycetes. In recent years, due to the need for new drugs, marine microorganisms have been considered as new sources of potential production of significant metabolites. The purpose of this study is isolation and identification of marine sponge-associated Actinomycete and investigation of its antibacterial activity.

Materials and Methods: The Actinomycete was isolated from the marine Sponge collected from the depths of coastal waters in Bushehr and screened for antibacterial activity on pathogenic microorganisms of *Escherichia coli*، *Bacillus cereus*، *Klebsiella* spp.، *Salmonella* spp. and *Proteus* spp. using a Disk Diffusion Method. For molecular identification, genomic DNA was first extracted from isolate and then, the16S rDNA gene was amplified by PCR and Sequenced. The results were analyzed using bioinformatic programs, Bioedit and MEGA6.

Results: In this study, based on phylogeny studies, it was determined that the isolate belonged to thegenus *Streptomyces*, and biochemical studies showed that all tests except catalase and gram were negative; antibacterial activity study showed significant activity against three pathogenic bacteria, *E. coli*, *Bacillus cereus* and *Salmonella* spp. It was more active against Salmonella spp. (around 16mm inhibition zone diameter).

Conclusions: The results showed that depths of the Bushehr coastal waters have marine sponge associated actinomycetes, which are a source of secondary metabolites with biological activity.

Keywords: Actinomycete, Marine sponge, Antibacterial activity, Pathogenic bacteria, 16S rDNA

Copyright © 2019, Iran J Med Microbiol This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

How to cite this article:

Pordel R, Matroodi S, Zamani I. Isolation of ASR7 Actinomycete Isolated from S12 Demospongia Marine Sponge and Study of Its Antibacterial Activity. Iran J Med Microbiol. 2019; 12 (6) :409-418

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۲ – شماره ۶ – بهمن-اسفند ۱۳۹۷

Journal homepage: www.ijmm.ir

جداسازی ایزوله اکتینومایست جدید ASR7 از اسفنج دریایی چندشکلی S12 و بررسی فعالیت ضدباکتریایی آن

راضیه پردل، سهیلا مطرودی*، اسحاق زمانی

گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم وفنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۶/۰۷/۲۹

پذیرش:۱۳۹۶/۱۲/۰۲

انتشارآنلاین: ۱۳۹۷/۱۲/۲۵

موضوع:

مواد ضد میکروبی

IJMM1397;12(6): 409-418

نویسنده مسئول:

سهیلا مطرودی

گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم وفنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران

پست الکترونیک:

s.matroodi@kmsu.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: *اکتینومایست*های دریایی باکتری‌هایی گرم مثبت هستند که به‌صورت آزاد، ساپروفیت یا همزیست با گیاهان و جانوران از جمله اسفنج‌های دریایی دیده می‌شوند. اخیرا به‌دلیل نیاز به داروهای جدید، به میکروارگانیسم‌های دریایی به‌عنوان منبع جدیدی با پتانسیل تولید متابولیت‌های منحصربه‌فرد، توجه می‌شود. هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی اکتینومایست همزیست با اسفنج دریایی چندشکلی *S12* جمع‌آوری‌شده از اعماق آب‌های استان بوشهر و بررسی فعالیت ضدباکتریایی آن است.

مواد و روش‌کار: ایزوله اکتینومایست از اسفنج دریایی *S12* جمع‌آوری‌شده از اعماق آب‌های بوشهر، جداسازی شدند. ژن 16SrDNA ایزولهٔ مذکور با تکنیک PCR تکثیر و توالی‌یابی و نتایج حاصل با استفاده از برنامه‌های بیوانفورماتیک Bioedit و MEGA6 برای شناسایی و تأیید ایزوله ارزیابی شد. سپس فعالیت ضدباکتریایی عصارهٔ ایزولهٔ جداشده با روش انتشار در دیسک روی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای *Escherichia coli*، *Bacillus cereus*، *Klebsiella* spp.، *Salmonella* spp. و *Proteus* spp. انجام شد.

یافته‌ها: در این تحقیق، براساس مطالعات فیلوژنی مشخص شد که ایزولهٔ مدنظر متعلق به جنس *استرپتومایسس* است و با توجه به میزان هومولوژی با سایر گونه‌های استرپتومایسس می‌توان آن را گونه‌ای جدید معرفی کرد. مطالعات بیوشیمیایی نشان داد که تمام تست‌های انجام‌شده به استثنای تست‌های گرم و کاتالاز منفی است. ایزولهٔ مطالعه‌شده فعالیت جالب توجهی علیه سه باکتری بیماری‌زای انسانی *Escherichia coli*، *Bacillus cereus* و *Salmonella* spp. نشان داد که بیشترین فعالیت ضدباکتریایی آن علیه باکتری *Salmonella* spp. با قطر هالهٔ در حدود ۱۶ میلی‌متر بود.

نتیجه‌گیری: اسفنج‌های اعماق آب‌های استان بوشهر اکتینومایست‌های همزیست با خود دارند که منبعی غنی از متابولیت‌های ثانویه با فعالیت زیستی هستند. نتایج نشان داد که سویهٔ اکتینومیست جداشده یک گونهٔ استرپتومایسس جدید با فعالیت ضدباکتری جالب توجه است. این تحقیق اولین گزارش از جداسازی اکتینومیست دریایی همزیست با اسفنج در ایران است..

کلمات کلیدی: اکتینومایست، اسفنج دریایی، فعالیت ضدباکتریایی، باکتری‌های بیماری‌زا، *16SrDNA*

کپی‌رایت © مجله میکروب شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

مقدمه

اسفنج‌ها (شاخهٔ پوریفرا) بی‌مهرگان ساده، چندسلولی و کف‌زی فیلترکنندهٔ تغذیه و در زیستگاه‌های بنتیک، متصل به سطوح جامد هستند. بیش از ۶۰۰۰ گونهٔ توصیف‌شده از اسفنج‌ها در طیف گسترده‌ای از محیط دریایی و تازه ساکن هستند (۲ ، ۱). اهمیت اسفنج‌ها به‌دلیل وجود منابع چشمگیری از مواد زیست فعال دریایی است؛ به‌طوری که ۴۰ درصد از تمام محصولات طبیعی دریایی را به خود اختصاص داده‌اند (۳). مطالعات متعددی برای استخراج متابولیت‌های اسفنج‌ها که برای دفاع از خود در برابر انواع خاصی از میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌کنند، انجام شده است (۵، ۴، ۲). از سوی دیگر، تولید طیف گسترده‌ای از متابولیت‌های ثانویه از سوی اکتینوباکتری‌های مرتبط با اسفنج شناسایی شده‌اند (۲). حدس زده می‌شود که باکتری‌های مرتبط با اسفنج‌ها تولیدکنندهٔ واقعی بخش زیادی از مواد زیست فعال مشتق‌شده از اسفنج‌ها هستند (۸-۶). زیست تودهٔ اسفنج شامل درصد جالب‌توجهی (بالاتر از ۶۰ درصد) از باکتری‌ها است که در سلول‌ها و ماتریکس اسفنج‌ها قرار دارند (۹). مطالعات وابسته به کشت و هچنین مطالعات

مولکولی نشان دادند که اکتینوباکتریا همزیستی میکروبی جالب‌توجهی با اسفنج‌های دریایی دارند (۱۳-۱۰). اکتینوباکتریا، گرم مثبت، عمدتا هوازی و در درجهٔ اول موجودات زنده‌خاک و تولیدکنندهٔ بسیاری از داروهای خاص هستند. با این حال، مطالعات اخیر نشان داد که برخی از گونه‌های اکتینوباکتریا، ساکنان طبیعی محیط‌های دریایی هستند. این باکتری‌ها به‌دلیل پتانسیل زیاد خود در تولید آنزیم‌های خارج سلولی و همچنین در سنتز انواع زیادی از متابولیت‌های فعال زیستی، درخور توجه هستند. میکرو ارگانیسم‌های تولیدکنندهٔ آنتی‌بیوتیک، تقریبا ۷۰ درصد اکتینو باکتری‌ها را تشکیل داده‌اند (۱۴). استرپتومایسس منبع غالب این آنتی‌بیوتیک‌ها میان جنس‌های دیگر اکتینوباکتری‌ها است. Moran و همکاران (۱۹۹۵) با استفاده از کاوشگرهای ژن *16SrRNA* گزارش دادند که اولین جمعیت طبیعی استرپتومایسس، بخشی از جمعیت باکتریایی دریایی بود (۱۶). همچنین نخستین بار Mincer و همکاران (۲۰۰۲) توزیع گسترده و پایدار اکتینوباکتری‌ها در محیط دریایی را گزارش کردند (۱۷). مطالعات روی اکتینوباکتری‌های مرتبط با اسفنج‌ها، به چند اسفنج محدود شده است (۳). مطالعات مستقل از کشت در اسفنج *Rhopaloeide sodorabile* (۱۰)، گونه‌های *Xestospongia* (۹)، *Aplysina aerophoba*، *Theonella swinhoei* و مطالعات وابسته به کشت در اسفنج‌های *Pseudoceratina clavat*، گونه‌های *Craniella australiensis* (۱۹)، *Hymeni acidonperleve* (۳)، *Haliclona* spp. (۲۰)، *Iotrochota* spp. (۲۱)، *Halichondria panicea* (۲۲)، *Stelletta tenuis* و *Halichondri arugosa* وجود اکتینو باکتری‌های مرتبط با اسفنج‌ها را نشان داده‌اند. با این حال، این مطالعات به درک کلی از تنوع، توزیع و اکولوژی آنها محدود شده است (۳۳).

این گروه تحقیقاتی مدت ۵ سال است که روی اکتینومیست های دریایی از جمله ایزولهٔ اکتینومایست جدید ASR7 کار می کند. برای سهولت در نامگذاری از این سیستم استفاده شده است: A مخفف حرف اول اکتینومیست است و دو حرف بعدی ابتدای اسم و فامیل دانشجو و شمارهٔ ۷ نیز ایزوله هایی هستند که از سوی این دانشجو جداسازی شده‌اند.

هدف از این مطالعه که برای اولین بار در کشور انجام می‌شود، جداسازی و شناسایی اکتینوباکتری همزیست با اسفنج دریایی جمع‌آوری‌شده از اعماق آب‌های بوشهر و بررسی فعالیت ضدباکتریایی آن علیه باکتری‌های بیماری‌زای انسانی است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

در آبان ماه ۱۳۹۵، نمونه‌برداری با غواصی در اعماق دریای بوشهر انجام گرفت. نمونهٔ اسفنج چندشکلی *S12* درون ظرف پلاستیکی استریل به آزمایشگاه میکروبیولوژی واقع در دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر منتقل و تا زمان استفاده در یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد.

جداسازی اکتینومایست همزیست با اسفنج

نمونه اسفنج ۵ بار با آب دریای استریل شست‌وشو و درآزمایشگاه درون هاون استریل، با تیغهٔ اسکالپل به قطعات یک سانتی‌متر مکعبی برش داده شد. سپس با ۱۰ حجم از آب دریای استریل با استفاده از مخلوط‌کننده هموژن شد (۳۵-۳۳). آنگاه قطعات بافتی اضافی دور ریخته شد و از مایع یک‌دستی که به دست آمد، رقت‌های سریالی با آب دریای استریل (۱۰-۱ تا ۱۰-۷) تهیه شد و ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت روی محیط‌های کشت M_1(نشاسته ۱۰ گرم، پپتون ۲ گرم، عصاره مخمر ۴ گرم، آگار ۱۸ گرم و آب دریا ۱ لیتر) (۳۴، ۲۵، ۱۷، ۳)، NA (Nutrient Agar)، SCA (Starch Casein Agar) و WA (WaterAgar) که با آنتی بیوتیک‌های نالیدیکسیک اسید (۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، فیشرساینتیفیک، امریکا) و نیستاتین (۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، شرکت عماد درمان پارس، ایران) (۲۵) که به‌ترتیب برای جلوگیری از رشد باکتری‌های گرم منفی سریع‌الرشد و قارچ‌ها ضمیمه شده بودند، کشت داده و به‌مدت ۳۰ تا ۶۰ روز در دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس درون انکوباتور انکوبه شدند. پس از این مدت، کلنی‌های متفاوتی بر محیط‌های کشت نمایان شد و اکتینومایست براساس شکل ظاهری خشک، حالت پودری و گچی که داشت از محیط کشت NA جداسازی شد و چندین بار برای خالص‌سازی، به‌طور پی‌درپی به محیط کشت جدید انتقال یافت.

شناسایی اکتینومیست

پس از شناسایی مورفولوژی و بیوشیمیایی با انواع تست‌های کاتالاز، MR-VP، سیمون سیترات، SIM، TSI، لیزین دکربوکسیلاز و اورنیتین دکربوکسیلاز، شناسایی مولکولی ایزوله به ترتیب مراحل زیر انجام گرفت (۳۷).

استخراج DNA

استخراج DNA براساس پروتکل استخراج DNA، از باکتری‌های گرم مثبت و قلرچ‌ها، طبق مراحل گفته‌شده انجام شد (۳۶). پس از سنجش کیفیت DNA استخراجی روی ژل آگارز ۱٪

وزنی/حجمی با الکتروفورز افقی، برای تکثیر ژن *16S rDNA*، PCRبا برنامهٔ زیر و مواد و مقادیر آورده شده در «جدول ۱» با استفاده از آغازگرهایF27 و R1492 «جدول ۲» (۳۴) که اختصاصی ژن 16S rDNA هستند، انجام شد. برای اطمینان از عدم‌آلودگی در واکنش PCR و برای کنترل منفی از تمام مقادیر جدول ۱ استفاده شد؛ به استثنای DNA ژنومی که به‌جای آن آب به‌کار رفت. در واکنش PCR واسرشته سازی اولیه ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه برای یک سیکل، برای ۳۰ سیکل واسرشته سازی، الحاق و بسط به ترتیب ۹۴ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۰ درجه ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه ۴۵ ثانیه، بسط نهایی ۷۲ درجه سیلسیوس به مدت ۵ دقیقه برای یک سیکل انجام شد.

جدول ۱. مواد استفاده‌شده برای انجام واکنش PCR

مواد	مقدار مصرفی برای حجم ۲۵ میکرولیتری
DNAاستخراجی (۱۰۰نانوگرم/ میکرولیتر)	۲ میکرولیتر
آنزیم تک پلی مراز	۰/۵ میکرولیتر
PCR Buffer (10x)	۲/۵ میکرولیتر
$MgCl_2$ (۵۰ میلی‌مولار/ میکرولیتر)	۱ میکرولیتر
dNTP(۱میلی‌مولار/ میکرولیتر)	۰/۵ میکرولیتر
آغازگر ۱ (۱۰پیکومول/ میکرولیتر)	۲ میکرولیتر
آغازگر ۲ (۱۰پیکومول/ میکرولیتر)	۲ میکرولیتر
آب تزریقی	۱۴/۵ میکرولیتر

جدول ۲. آغازگرهای استفاده‌شده در تحقیق حاضر

دمای اتصال	توالی آغازگر	نام پرایمر
۵۰ درجه سلسیوس	F: 5′- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′	F27
۵۰ درجه سلسیوس	R: 5′- GGTTACCTTGTTACGACTT-3′	R1492

تجزیه‌وتحلیل داده‌های مولکولی

کروماتوگرام توالی به‌دست‌آمده از شرکت ژن فناوران ابتدا با نرم‌افزار Chromas بررسی و ویرایش شد. به‌منظور مقایسهٔ توالی نمونه با دیگر توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعات داده‌های ژنتیکی (NCBI) از برنامهٔ Blast (۳۴) که یکی از ابزارهای هم‌ردیفی توالی‌های DNA است، استفاده شد که میزان تشابه نمونه و شناسایی اولیه به دست آمد. برای رسم درخت فیلوژنتیکی نیز نرم‌افزار MEGA6 به‌کار رفت؛ به این صورت که توالی DNA گونه-های مشابه یا نزدیک با نمونهٔ مطالعه‌شده از پایگاه داده‌های ژنتیکی استخراج و به همراه توالی DNA مطالعه‌شده وارد این نرم‌افزار شدند. از توالی مربوط به ژن 16SrDNA جنس *Nocardia* برای برون گروه یا outgroup استفاده و درخت فیلوژنی به روش پیوند هم‌جواری (Neighbor joining) ترسیم شد (۳۴).

بررسی فعالیت ضدباکتریایی

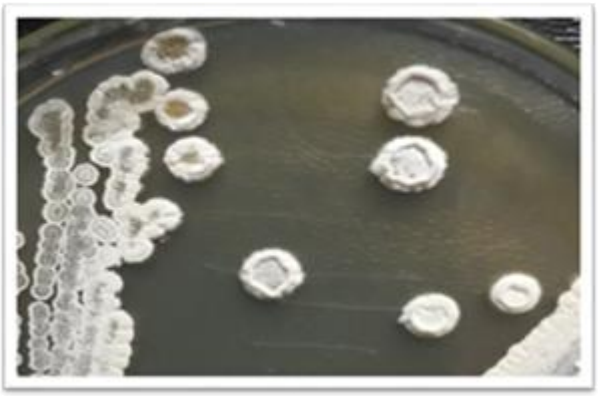
برای این هدف ابتدا ایزولهٔ اکتینومایست روی محیط کشت جامد M_1 در دمای ۲۸ درجه سلسیوس رشد داده شد. پس از آن، تک‌کلنی‌های تازهٔ ایزوله از محیط کشت جامد برداشته شد و در ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع M_1کشت داده شد و در انکوباتور شیکردار با دور ۱۵۰ و دمای ۲۸ درجه سلسیوس، به‌مدت ۱۰ روز برای تحریک تولید متابولیت‌های ثانویه قرار گرفت. پس از دورهٔ انکوباسیون، برای حذف زیست توده‌های میسلیومی از کشت، محیط کشت مایع حاوی باکتری در میکرتیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته، با ۷۰۰ دور در دقیقه (rpm) به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی با حلال هایاتیل استات (۱:۱) (۳۴) و متانول(۱:۱) (۲۵) استخراج شد. در ادامه برای به‌دست آمدن عصارهٔ خام، حلال با تبخیرکننده در

دمای کمتر از ۳۵ درجه سلسیوس تبخیر داده شد. روش انتشار در دیسک نیز با توجه به استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی برای سنجش فعالیت ضدمیکروبی انجام گرفت (۲۸)؛ به این طریق که سوآپ استریل به سوسپانسیون باکتری‌های بیماری‌زا (هرکدام جداگانه) که پس از رشد در محیط کشت LB مایع به غلظت استاندارد نیم مک فارلند (۱/۵ ×۱۰^{۸}cfu/mL) رسیده بودند آغشته و روی محیط کشت مولر هینتون آگار (MHA) ۳۰ میکرولیتر عصاره باکتریایی به دیسک‌های بلانک (بیشترین حجمی که توسط دیسک قابل جذب است) استریل ۶ میلی‌متری تلقیح شد و روی محیط کشت MHA حاوی باکتری‌های بیماری‌زا با فاصله‌های معین قرار گرفت (۳۴) و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند (۳۴). پس از انکوباسیون هالهٔ فقدان رشد اندازه‌گیری شد. باکتری‌های بیماری‌زای استفاده‌شده در مطالعه حاضر، *Escherichia coli*، *Bacillus cereus*، *Salmonella typhimurium* هستند. همچنین در این آزمایش، از نالیدیکسیک اسید برای کنترل مثبت علیه باکتری‌های بیماری‌زای گرم منفی، از آمپی‌سیلین علیه باکتری گرم مثبت *باسیلوس سرئوس* و از محیط کشت بدون باکتری برای کنترل منفی استفاده شد .

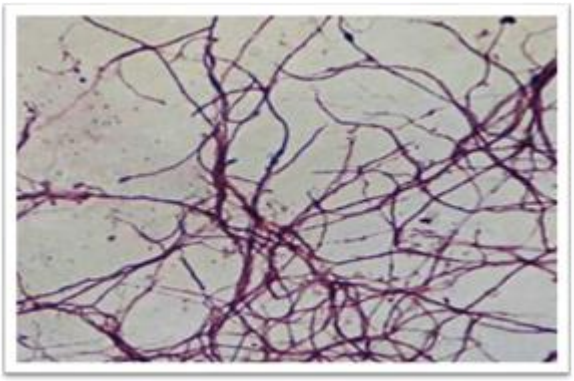
یافته‌ها

از نمونه اسفنج S12 جمع‌آوری‌شده، ایزولهٔ اکتینومایست ASR7، جداسازی شد. این ایزوله ابتدا براساس ریخت‌زایی و رنگ‌آمیزی گرم شناسایی شد، شکل ظاهری و رنگ‌آمیزی گرم ایزوله به‌ترتیب، در «شکل ۱» و «شکل۲» قابل مشاهده است. این نتایج نشان داد که ایزولهٔ ASR7، گرم مثبت و رشته‌ای شکل است و از نظر ریخت‌زایی ، پس از یک هفته کشت روی محیط کشت M_1، تک کلنی‌های گرد، چروکیده و متوسط با پشت‌وروی شیری رنگ و اسپورهای سفید دارد. همچنین کانی‌های در وسط تورفتگی و در اطراف و نیز هاله برآمدگی دارند.

نتایج بیوشیمیایی ایزولهٔ ASR7 در «جدول ۳» آمده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، ایزولهٔ اکتینومایست جداشده از اسفنج دریایی S12 برای همهٔ تست‌های انجام‌شده در این مطالعه، به‌غیر از تست کاتالاز منفی است. نتیجهٔ رنگ‌آمیزیگرم نیز مثبت بود.



شکل ۱. کلنی‌های ASR7 پس از یک هفته رشد روی محیط کشت M_1



شکل ۲. رنگ‌آمیزی گرم ایزوله ASR7 زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۱۰۰

جدول ۳. نتایج تست‌های بیوشیمیایی برای ایزولهٔ ASR7

تست‌ها	نتایج
کاتالاز	+
سیمون سیترات	-
لایزین دکربوکسیلاز	-
ارنیتین دکربوکسیلاز	-
MR	-
VP	-
TSI	-
SIM	
تولید H2S	-
حرکت	-
ایندول	-
گرم	+

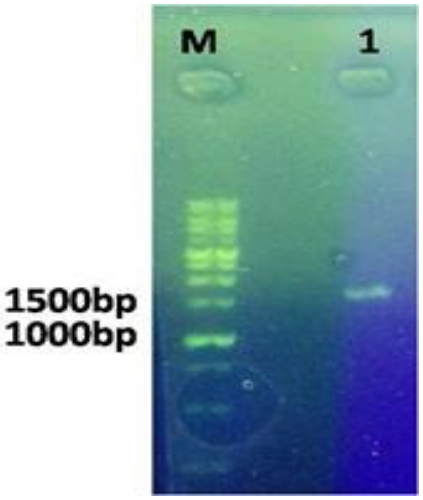
شناسایی مولکولی

ژن 16SrDNA ایزولهٔ ASR7 به طول تقریباً ۱۵۰۰ جفت باز تکثیر شد. (شکل۳) نتایج حاصل از توالی‌یابی صحت باند تکثیرشده را تأیید کرد.

نتایج به‌دست‌آمده از بلاست توالی نوکلئوتیدی حاصل از توالی‌یابی ژن *16SrDNA* در پایگاه داده‌های اطلاعات ژنتیکی (NCBI) نشان داد که این توالی بیشترین شباهت (۹۵٪) را با گونهٔ *Streptomyces cyaneofuscatus* دارد و با بقیهٔ گونه‌های ثبت‌شده این شباهت ۹۴٪ و کمتر است (جدول ۴). این نتیجه از نظر مولکولی تأیید می‌کند که ایزولهٔ مطالعه‌شده از جنس استرپتومایسس است. همچنین نشان می‌دهد که ایزولهٔ مطالعه‌شده گونهٔ جدید است.

نتایج حاصل از رسم درخت فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 به روش پیوند هم‌جواری (NJ) و بوت استرپ ۱۰۰۰، نشان می‌دهد که ایزولهٔ ASR7 با هیچ‌یک از گونه‌های مشابه ثبت شده در یک کلاد خواهری قرار نمی‌گیرد (شکل۴).

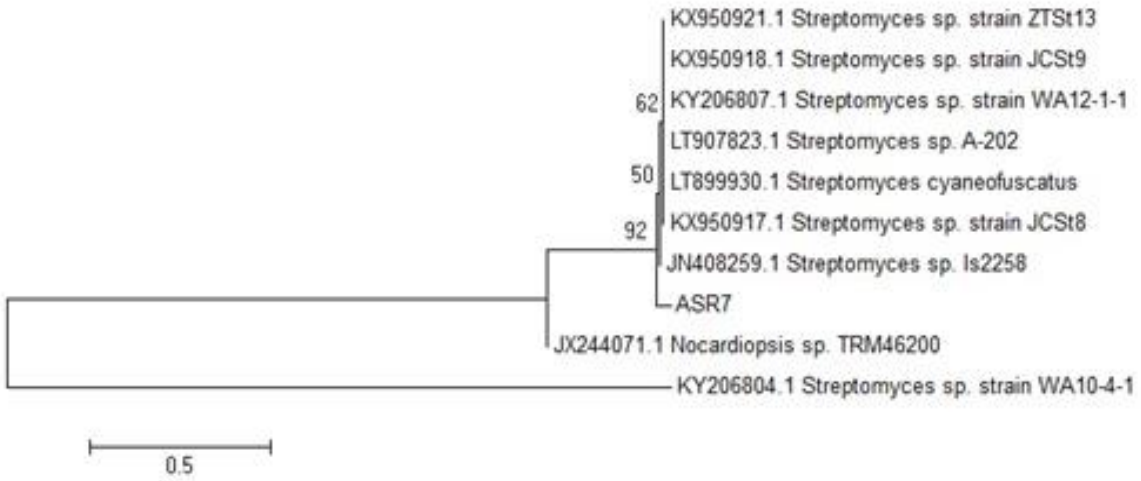
نتایج حاصل نشان داد که عصارهٔ اتیل استاتی فعالیت ضدباکتریایی خوبی علیه باکتری‌های بیماری‌زا دارد، درحالی‌که عصارهٔ متانولی روی باکتری‌های بیماری‌زا مؤثر نبود. قطر هالهٔ رشدنیافتگی باکتری‌های *Salmonella* spp. ، *Escherichia coli*، *Bacillus cereus* در مواجهه با عصارهٔ اتیل استاتی به‌ترتیب ۱۵/۹، ۱۴/۵۹ و ۱۳/۰۹ میلی‌متر بود و روی دو باکتری بیماری‌زای *Proteuse* spp. و *Klebsiella* spp. اثر ضدباکتریایی مشاهده نشد (شکل ۵).



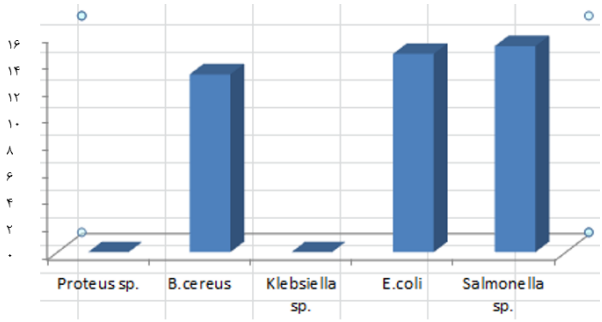
شکل۳. محصول PCR ژن *16S rDNA* ایزولهٔ اکتینومایست بر ژل آگارز ۱ درصد. ستون ۱: محصول تکثیرشده، M: سایز مارکر 1kb

جدول۴. گونه‌هایی که بیشترین شباهت را با گونهٔ مطالعه‌شده در سطح توالی نوکلئوتیدی *16SrDNA* دارند

گونه	درصد شباهت
Streptomyces cyaneofuscatus	۹۵
Streptomyces spp. A-202	۹۴
Streptomyces spp. strain WA12-1-1	۹۴
Streptomyces spp. strain WA10-4-1	۹۴
Streptomyces spp. strain ZTSt13	۹۴
Streptomyces spp. strain JCSt9	۹۴
Streptomyces spp. strain JCSt8	۹۴



شکل۴. درخت فیلوژنی ایزولهٔ ASR7 براساس توالی ژن 16S rDNA. گونهٔ *Nocardiopsis* TRM4620 به‌عنوان برون‌گروه در نظر گرفته شده است.



شکل ۵. نمودار میله ای قطر هاله های مهاری رشد فعالیت ضد باکتریایی ایزوله ASR7 علیه ۵ باکتری بیماری زا

بحث

در حال حاضر برای جداسازی اکتینومایست‌ها، روی صخره‌های مرجانی و اسفنج‌های دریایی تمرکز شده است، زیرا بهترین محیط‌های شناخته‌شده اکتینو مایست‌های دریایی هستند. مطالعات مختلفی تنوع و فراوانی اکتینو باکتری‌های همزیست را اندازه‌گیری کرده و دریافته‌اند که در سیستم‌های نامبرده، این باکتری‌ها به‌طور گسترده و پایداری در ارتباط هستند (۳۸-۴۰). بین گونه‌های اسفنجی متفاوت، وجود، فراوانی و تنوع اکتینو باکتری‌های قابل‌کشت متفاوت است (۲۳). با این حال، میکرومونوسپورا، رودوکوکوس و استرپتومایسس از گروه‌های غالب در محیط دریایی گزارش شده‌اند (۳۳). فراوانی جنس استرپتومایسس نیز قبلا گزارش شده است (۲۲، ۲۱)؛ به‌طوری‌که روش‌های وابسته به کشت و مستقل از کشت برای استرپتو مایسس‌های همزیست با اسفنج *Haliclona* spp. نشان داد که اعضای استرپتو مایسس‌ها غالب هستند (۲۵). به‌طور مشابه بیش از ۸۰٪ از جدایه‌های *Iotrochota* spp. متعلق به جنس استرپتومایسس است (۲۱). بیشترین فراوانی جنس به عنوان استرپتومایسس (۷۴٪) از میان جدایه‌های *Hymenia cidonperlev* جمع‌آوری‌شده از دریای زرد (چین) گزارش شده است (۳) که این گزارش‌ها با مطالعهٔ حاضر همخوانی داشتند.

به‌نظر می‌رسد که استرپتو مایسس‌ها جنس غالب اکتینو باکتری‌های مرتبط با اسفنج‌های جمع‌آوری شده از شرق دریای مدیترانه هستند. در تحقیق حاضر، ایزولهٔ جداشده از اسفنج دریایی چندشکلی *S12* از جنس استرپتومایسس بود. مطالعات حاصل از بلاست توالی ژن *16S rDNA* نشان داد که ایزلهٔ ASR7 یک گونهٔ جدید از جنس استرپتومایسس است. تمام گونه‌هایی که براساس توالی ژن‌های *16S rDNA* ۹۸٪ و کمتر از آن با توالی ژن‌های ثبت‌شده از گونه‌های موجود در بانک اطلاعات ژنی شباهت داشته باشند، گونه‌ای جدید شناخته می‌شوند (۳۵) که توالی ژنی در ایزولهٔ تحت مطالعه با حداکثر ۹۵٪ شباهت با گونه *Streptomyces cyaneofuscatus* یک گونهٔ استرپتومایسس دریایی جدید به‌حساب می‌آید.

Mahmoud و همکاران (۲۰۰۹)، مطالعه‌ای روی جداسازی و شناسایی باکتری‌های همزیست با اسفنج *Haliclona simulans* انجام دادند (۳۸). آنها نشان دادند که ترکیبات جداشده از جدایه‌ها *استرپتومایس* SM2 و SM4 فعالیت‌های آنتی‌بیوتیکی وسیع‌الطیف دارند. این مطالعه نشان می‌دهد که میکروب‌های همزیست با اسفنج‌های دریایی قابل کشت منبع مهم ترکیبات فعال بیولوژیکی هستند. ایزولهٔ مطالعه‌شده در این تحقیق فعالیت ضدمیکروبی جالب‌توجهی علیه سه باکتری بیماری‌زای *Salmonella*sp، *Escherichia coli* و *Bacillus cereus* نشان داد.

Zhang و همکاران (۲۰۰۹) مطالعه‌ای دربارهٔ جداسازی و شناسایی باکتری‌های همزیست با اسفنج‌های دریای چین جنوبی و همچنین فعالیت ضدباکتریایی آنها را علیه باکتری‌های بیماری‌زای مختلف، با روش انتشار در دیسک مشابه روش به کاربرده‌شده در تحقیق حاضر انجام دادند (۴۲). آنها نشان دادند که از میان ۸۰ جدایه، ۱۸ جدایه فعالیت ضدمیکروبی گسترده‌ای علیه قارچ‌ها، باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دارند. مطالعات گزارش‌شده و نیز نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان‌دهندهٔ فعالیت ضدمیکروبی متابولیت‌های مرتبط با باکتری‌های همزیست با اسفنج‌های دریایی به‌ویژه استرپتومایسس‌های متعلق به شاخهٔ اکتینوباکتریا است. این نتایج اهمیت گونه‌های این جنس را در صنعت داروسازی و بیوتکنولوژی بالا می‌برد.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که اسفنج *S12* جمع‌آوری‌شده از اعماق آب‌های بوشهر باکتری همزیست با خود دارد که فعالیت ضدمیکروبی جالب‌توجهی علیه باکتری‌های بیماری‌زای انسانی انجام می‌دهد. به‌نظر می‌رسد اسفنج‌های دریایی خلیج‌فارس یک منبع بالقوه از اکتینومیست‌های دریایی ارزشمند از نظر بیوتکنولوژی دارویی هستند که لازم است در این راستا مطالعات بیشتری صورت گیرد.

سپاسگزاری

از دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر که امکان انجام این پروژهٔ تحقیقاتی را فراهم کردند، تشکر و قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Fieseler L, Horn M, Wagner M, Hentschel U. Discovery of the Novel Candidate Phylum "Poribacteria" in Marine Sponges. J Appl Environ Microbiol. 2004;70(6):3724-32. https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3724-3732.2004 PMID:15184179 PMCID:PMC427773

2. Taylor MW, Radax R, Steger D, Wagner M. Sponge-Associated Microorganisms: Evolution, Ecology, and Biotechnological Potential. Microbiol Mol Biol Rev. 2007;71(2):295-347. https://doi.org/10.1128/MMBR.00040-06 PMID:17554047 PMCID:PMC1899876

3. Zhang H, Lee YK, Zhang W, Lee HK. Culturable actinobacteria from the marine sponge Hymeniacidonperleve: isolation and phylogenetic diversity by 16S rRNA gene-RFLP analysis. Antonie Van Leeuwenhoek. 2006;90(2):159-69. https://doi.org/10.1007/s10482-006-9070-1 PMID:16871424

4. Christensen A, Martin GD. Identification and bioactive potential of marine microorganisms from selected Florida coastal areas. Microbiologyopen. 2017;6(4):1-10. https://doi.org/10.1002/mbo3.448 PMID:28127894 PMCID:PMC5552912

5. Thakur NL, Müller WE. Biotechnological potential of marine sponges. Curr Sci. 2004;86(11):1506-12.

6. Brinkmann CM. Marker A., Kurtboke Dİ. An Overview on Marine Sponge-Symbiotic Bacteria as Unexhausted Sources for Natural Product Discovery. Diversity. 2017;9(40):1-31.

7. Indraningrat AA, Smidt H, Sipkema D. Bioprospecting Sponge-Associated Microbes for Antimicrobial Compounds. Marine Drugs. 2016;14(5):87. https://doi.org/10.3390/md14050087 PMID:27144573 PMCID:PMC4882561

8. Sathiyanarayanan G, Saibaba G, Kiran GS, Yang YH, Selvin J. Marine sponge-associated bacteria as a potential source for polyhydroxyalkanoates. Crit Rev Microbiol. 2017;43(3):294-312. https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1206060 PMID:27824282

9. Montalvo NF, Mohamed NM, Enticknap JJ, Hill RT. Novel actinobacteria from marine sponges. Antonie Van Leeuwenhoek. 2005;87(1):29-36. https://doi.org/10.1007/s10482-004-6536-x PMID:15726288

10. Webster NS, Wilson KJ, Blackall LL, Hill RT. Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge Rhopaloeidesodorabile. Appl Environ Microbiol. 2001;67(1):434-44. https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.434-444.2001 PMID:11133476 PMCID:PMC92596

11. Hentschel U, Hopke J, Horn M, Friedrich AB, Wagner M, Hacker J, Moore BS. Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. Appl Environ Microbiol. 2002;68(9):4431-40. https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4431-4440.2002 PMID:12200297 PMCID:PMC124103

12. Kamke J, Taylor MW, Schmitt S. Activity profiles for marine sponge-associated bacteria obtained by 16S rRNAvs 16S rRNA gene comparisons. ISME J. 2010;4(4):498-508. https://doi.org/10.1038/ismej.2009.143 PMID:20054355

13. Webster NS, Taylor MW, Behnam F, Lücker S, Rattei T, Whalan S, Horn M, Wagner M. Deep sequencing reveals exceptional diversity and modes of transmission for bacterial sponge symbionts. Environ Microbiol. 2010;12(8):2070-82 PMID:21966903 PMCID:PMC2936111

14. Miyadoh S. Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: a producing microorganism approach. Actinomycetologica. 1993;7(2):100-6. https://doi.org/10.3209/saj.7_100

15. Kämpfer P. The family Streptomycetaceae, part I: taxonomy. New York: Springer, The Prokaryotes; 2006, p. 538-604.

16. Moran MA, Rutherford LT, Hodson RE. Evidence for indigenous Streptomyces populations in a marine environment determined with a 16S rRNA probe. Appl Environ Microbiol. 1995;61(10):3695-700. PMID:7487005 PMCID:PMC167668

17. Mincer TJ, Jensen PR, Kauffman CA, Fenical W. Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. Appl Environ Microbiol. 2002;68(10):5005-11. https://doi.org/10.1128/AEM.68.10.5005-5011.2002 PMID:12324350 PMCID:PMC126404

18. Kim TK, Garson MJ, Fuerst JA. Marine actinomycetes related to the 'Salinospora' group from the Great Barrier Reef sponge Pseudoceratina clavata. Environ Microbiol. 2005;7(4):509-18. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00716.x PMID:15816928

19. Li ZY, Liu Y. Marine sponge Craniellaaustrialiensis-associated bacterial diversity revelation based on 16S rDNA library and biologically active Actinomycetes screening, phylogenetic analysis. Lett Appl Microbiol. 2006;43(4):410-6. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01976.x PMID:16965372

20. Jiang S, Sun W, Chen M, Dai S, Zhang L, Liu Y, Lee KJ, Li X. Diversity of culturable actinobacteria isolated from marine sponge Haliclona sp. Antonie Van Leeuwenhoek. 2007;92(4):405-16. https://doi.org/10.1007/s10482-007-9169-z PMID:17566868

21. Baskaran R, Subramanian T, Zuo W, Qian J, Wu G, Kumar A. Major Source of Marine Actinobacteria and Its Biomedical Application. New York: Springer, Microbial Applications Vol.2; 2017, p. 55-82. https://doi.org/10.1007/978-3-319-52669-0_3

22. Schneemann I, Ohlendorf B, Zinecker H, Nagel K, Wiese J, Imhoff JF. Nocapyrones A– D, γ-pyrones from a Nocardiopsis strain isolated from the marine sponge Halichondriapanicea. J Nat Prod. 2010;73(8):1444-7. https://doi.org/10.1021/np100312f PMID:20695474

23. Zhang H, Zhang W, Jin Y, Jin M, Yu X. A comparative study on the phylogenetic diversity of culturableactinobacteria isolated from five marine sponge species. Antonie Van leeuwenhoek. 2008;93(3):241-8. https://doi.org/10.1007/s10482-007-9196-9 PMID:17717723

24. Selvin J, Shanmughapriya S, Gandhimathi R, Kiran GS, Ravji TR, Natarajaseenivasan K, Hema TA. Optimization and production of novel antimicrobial agents from sponge associated marine actinomycetes Nocardiopsisdassonvillei MAD08. Appl Microbiol Biotechnol. 2009;83(3):435-45. https://doi.org/10.1007/s00253-009-1878-y PMID:19190903

25. Abdelmohsen UR, Pimentel-Elardo SM, Hanora A, Radwan M, Abou-El-Ela SH, Ahmed S, et al. Isolation, phylogenetic analysis and anti-infective activity screening of marine sponge-associated actinomycetes. Mar drugs. 2010;8(3):399-412. https://doi.org/10.3390/md8030399 PMID:20411105 PMCID:PMC2857355

26. Jensen PR, Gontang E, Mafnas C, Mincer TJ, Fenical W. Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. Environ Microbiol. 2005;7(7):1039-48. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00785.x PMID:15946301

27. Connon SA, Giovannoni SJ. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. Appl Environ Microbiol. 2002;68(8):3878-85. https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.3878-3885.2002 PMCID:PMC124033

28. Wikler MA, editor. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Seventeenth informational supplement. Wayne, PA: Approved Standards CLSI; 2007.

29. Liu D, Coloe S, Baird R, Pedersen J. Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. J Clin Microbiol. 2000;38(1):471. PMID:10681211 PMCID:PMC88759

30. Hameş-Kocabaş EE, Ataç UZ. Isolation strategies of marine-derived actinomycetes from sponge and sediment samples. J Microbiol Methods. 2012;88(3):342-7. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.01.010 PMID:22285852

31. Jensen PR, Dwight R, Fenical W. Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. Appl Environ Microbiol. 1991;57(4):1102-8. PMID:2059035 PMCID:PMC182852

32. Zhang H, Zhang W, Jin Y, Jin M, Yu X. A comparative study on the phylogenetic diversity of culturableactinobacteria isolated from five marine sponge species. Antonie Van leeuwenhoek. 2008;93(3):241-8. https://doi.org/10.1007/s10482-007-9196-9 PMID:17717723

33. Selvin J, Shanmughapriya S, Gandhimathi R, Kiran GS, Ravji TR, Natarajaseenivasan K, Hema TA. Optimization and production of novel antimicrobial agents from sponge associated marine actinomycetes Nocardiopsis dassonvillei MAD08. Appl Microbiol Biotechnol. 2009;83(3):435.

34. Öner Ö, Ekiz G, Hameş EE, Demir V, Gübe Ö, Özkaya FC, et al. Cultivable sponge-associated actinobacteria from coastal area of Eastern Mediterranean Sea. Advances in Microbiology. 2014;4(06):306. https://doi.org/10.4236/aim.2014.46037

35. Prieto-Davó A, Fenical W, Jensen PR. Comparative actinomycete diversity in marine sediments. Aquat Microb Ecol. 2008;52(1):1-1. https://doi.org/10.3354/ame01211

36. Cheng HR, Jiang N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. Biotechnol Lett. 2006;28(1):55-9. https://doi.org/10.1007/s10529-005-4688-z PMID:16369876

37. Salami F. Isolation and determination of Streptomyces that produce antibiotic from soil. Pajouhesh va Sazandegi. 2004;17(3):41-7.

38. Mahmoud HM, Kalendar AA. Coral-associated Actinobacteria: diversity, abundance, and biotechnological potentials. Front Microbiol. 2016;7:204. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00204 PMID:26973601 PMCID:PMC4770044

39. Abdelmohsen UR, Yang C, Horn H, Hajjar D, Ravasi T, Hentschel U. Actinomycetes from Red Sea sponges: sources for chemical and phylogenetic diversity. Mar Drugs. 2014;12(5):2771-89. https://doi.org/10. 3390 /md12052771 PMID:24824024 PMCID:PMC4052315

40. Braña AF, Fiedler H-P, Nava H, González V, Sarmiento-Vizcaíno A, Molina A, et al. Two

41. Kennedy J, Baker P, Piper C, Cotter PD, Walsh M, Mooij MJ, et al. Isolation and analysis of bacteria with antimicrobial activities from the marine sponge Haliclona simulans collected from Irish waters. Mar Biotechnol (NY). 2009;11(3):384-96. https://doi.org/10.1007/s10126-008-9154-1 PMID:18953608

42. Zhang W, Zhang F, Li Z, Miao X, Meng Q, Zhang X. Investigation of bacteria with polyketide synthase genes and antimicrobial activity isolated from South China Sea sponges. J Appl Microbiol. 2009;107(2):567-75. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04241.x PMID:19302490

Streptomyces species producing antibiotic, antitumor, and anti-inflammatory compounds are widespread among intertidal macroalgae and deep-sea coral reef invertebrates from the central Cantabrian Sea. Microb Ecol. 2015;69(3):512-24. https://doi.org/10.1007/s00248-014-0508-0 PMID:25319239