

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

عنوان:

**جداسازی، شناسایی و ارزیابی
فعالیت ضد میکروبی اکتینومیسست های
دریایی از رسوبات دریای عمان**

مجری:

محسن گذری

شماره ثبت

۵۲۹۳۳

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

عنوان طرح/ پروژه : جداسازی، شناسایی و ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اکتینومیسست‌های دریایی از رسوبات دریای عمان

کد مصوب: ۹۲۱۳۷-۱۲-۷۵-۲

نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : محسن گذری

نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرح‌های ملی و مشترک دارد) :-

نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : محسن گذری

نام و نام خانوادگی همکار(ان): محمد صدیق مرتضوی، یزدان مرادی، رامین کریم زاده، منصور صدریان،

محمود ابراهیمی، محسن ملکوتی، یوسف آفتابسوار

نام و نام خانوادگی مشاور(ان) :-

نام و نام خانوادگی ناظر(ان) :-

محل اجرا: استان هرمزگان

تاریخ شروع: ۹۲/۷/۱

مدت اجرا: ۱ سال

ناشر: موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

تاریخ انتشار: سال ۱۳۹۶

حق چاپ برای مؤلف محفوظ است. نقل مطالب، تصاویر، جداول، منحنی‌ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است.

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

پروژه : جداسازی، شناسایی و ارزیابی فعالیت ضد میکروبی
اکتینومیست های دریایی از رسوبات دریای عمان
کد مصوب: ۹۲۱۳۷-۱۲-۷۵-۲
شماره ثبت (فروست): ۵۲۹۳۳ تاریخ: ۹۶/۱۰/۲۰
با مسئولیت اجرایی جناب آقای محسن گذری دارای مدرک
تحصیلی دکتری تخصصی در رشته میکروبیولوژی می باشد.
پروژه توسط داوران منتخب بخش زیست فناوری و فناوری
آبزیان در تاریخ ۹۶/۱/۲۸ مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید
گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در:

ستاد □ پژوهشکده ■ مرکز □ ایستگاه □

با سمت کارشناس در پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای
عمان مشغول بوده است.

صفحه	عنوان	« فهرست مندرجات »
۱	چکیده	۱
۲	۱- مقدمه	۲
۲	۱-۱- محیط های دریایی	۲
۳	۱-۲- فراورده های طبیعی دریایی	۳
۴	۱-۳- دریای عمان	۴
۵	۱-۴- اکتینومايست های دریایی	۵
۷	۱-۵- فعالیت ضد میکروبی اکتینوباکتریهای دریایی	۷
۸	۱-۶- اکتینومايست ها در رسوبات دریایی	۸
۹	۱-۷- باکتری های بیماریزای مورد بررسی	۹
۱۰	۱-۸- فرضیه های تحقیق	۱۰
۱۰	۱-۹- اهداف تحقیق	۱۰
۱۰	۱-۱۰- پیشینه تحقیق	۱۰
۱۴	۲- مواد و روشها	۱۴
۱۴	۲-۱- وسایل مورد استفاده در این تحقیق	۱۴
۱۴	۲-۲- مواد مورد استفاده در این تحقیق	۱۴
۱۷	۲-۳- میکروارگانيسم های مورد استفاده در این تحقیق	۱۷
۱۷	۲-۴- عملیات میدانی	۱۷
۱۸	۲-۵- عملیات آزمایشگاهی	۱۸
۲۴	۲-۶- تجزیه و تحلیل آماری	۲۴
۲۵	۳- نتایج	۲۵
۲۵	۳-۱- جداسازی اکتینومايست ها از نمونه های رسوب دریایی	۲۵
۳۰	۳-۲- ارزیابی فعالیت ضد میکروبی ایزوله های اکتینومیست	۳۰
۳۵	۳-۳- بررسی کینتیک رشد و تولید آنتی بیوتیک توسط ایزوله های مولد	۳۵
۳۸	۳-۴- شناسایی اکتینومايست های جدا شده	۳۸
۵۲	۴- بحث و نتیجه گیری	۵۲
۵۸	پیشنهادها	۵۸
۵۹	منابع	۵۹
۶۳	چکیده انگلیسی	۶۳

چکیده

اکتینومایست‌ها باکتریهای گرم مثبت و رشته‌ای می‌باشند و با سهم قابل توجهی در اکتشاف و توسعه داروهای بیوتکنولوژیک ایفا می‌نمایند. مطالعات اخیر تنوع و فعالیت متابولیک منحصر به فرد اکتینومایست‌های ساکن در زیستگاه‌های دریایی را تایید نموده است. در این پروژه برای نخستین بار جمعیت‌های اکتینومایست مولد ترکیبات ضد میکروبی ساکن در رسوبات دریای عمان در سال ۱۳۸۹ مورد غربالگری و شناسایی قرار گرفتند. حدود ۸۴ ایزوله اکتینومایست از ۱۴ نمونه رسوب جداسازی گردید که از این تعداد ۴۷ ایزوله با اعمال تیمار حرارتی به عنوان بهترین تیمار جداسازی گردیدند. محیط کشت گلوکز آسپاراژین آگار با جداسازی ۳۲ ایزوله بیشترین کارایی را نشان داد. ارزیابی فعالیت ضد میکروبی ایزوله‌های بدست آمده با روش آگار رویی نشان داد ۲۴ درصد ایزوله‌ها در مقابل *Staphylococcus aureus*، ۱۲ درصد در مقابل *Escherichia coli* و ۲۳ درصد در مقابل *Candida albicans* ترکیبات ضد میکروبی تولید نمودند. حداقل غلظت بازدارندگی آنتی بیوتیک‌های تولید شده توسط ایزوله‌های منتخب در مقابل *S. aureus*، *E. coli* و *C. albicans* بترتیب ۱۲۸ تا ۲۵۶، ۱۲۸ تا ۵۱۲ و ۶۴ تا ۱۲۸ میکروگرم بر میلی لیتر ثبت شد. مطالعات اولیه در زمینه شناسایی ایزوله‌های مولد بیانگر حضور غالب جنس *Streptomyces* در نمونه‌های رسوب بود. نتایج شناسایی مورفولوژیک، بیوشیمیایی و کموتاکسونومیک تعلق ایزوله‌های 70 IFSIRI، 137 IFSIRI، 145 IFSIRI، 193 IFSIRI، 214 IFSIRI به جنس *Streptomyces* را تایید نمود. توالی 16S rRNA ایزوله‌های منتخب بترتیب با *Streptomyces chartreusis*، *S. qinglanensis*، *S. Cacaoi*، *S. violaceoruber* و *S. diastaticus* بیش از ۹۹ درصد تشابه ژنتیکی نشان داد. نتایج آنالیزهای فیلوژنتیک بیانگر قرارگیری سویه‌های مولد جدا شده و سویه‌های مولد آنتی بیوتیک‌های تجاری در یک خوشه بود. نتایج این مطالعه پتانسیل بالای فعالیت ضد میکروبی اکتینومایست‌های جدا شده از رسوبات دریای عمان را به منظور اکتشاف آنتی بیوتیک‌های جدید نشان داد.

کلمات کلیدی: اکتینومایست‌های دریایی، آنتی بیوتیک، آنالیز فیلوژنتیک، دریای عمان

۱- مقدمه

امروزه میکروارگانیزم‌های دریایی به عنوان منبع بکری جهت اکتشاف ترکیبات زیست فعال به شمار می‌آیند (Bull et al., 2005). اکتینوماست‌ها گروهی از باکتری‌های گرم مثبت با درصد گوانین-سیتوزین بالا می‌باشند و مولد ۷۰ درصد آنتی بیوتیک‌های طبیعی هستند (Fiedler et al., 2005). با توجه به کاهش رشد کشف آنتی بیوتیک‌های جدید از اکتینوماست‌های خاکزی مطالعه اکتینوماست‌های دریایی با هدف یافتن ترکیبات جدید آغاز شده است. تعداد متابولیت‌های کشف شده از اکتینوماست‌های دریایی بطور تصاعدی در حال افزایش است (Jensen et al., 2005). با توجه به روند صعودی مقاومت باکتریها به آنتی بیوتیک، کشف آنتی بیوتیک‌های جدید جهت مقابله با پاتوژنهای انسانی، حیوانی و گیاهی حیاتی است. تنوع فیزیولوژیک بالای اکتینوماست‌ها، همواره این میکروارگانیزم‌ها را به عنوان تولید کنندگان بالقوه ترکیبات طبیعی مطرح نموده است. متأسفانه علیرغم بهره‌مندی کشورمان از ۱۰۵۷۹۰ کیلومتر مربع آبهای سرزمینی کمبود مطالعات اکتشافی میکروارگانیزم‌های دریایی احساس می‌شود (نامی و حیدری پور، ۱۳۹۱). پروژه حاضر اولین مطالعه انجام شده در زمینه جداسازی و ارزیابی فعالیت اکتینوماست‌های دریایی ساکن در رسوبات دریای عمان بود. با عنایت به بکر بودن اکوسیستم دریای عمان و تنوع زیستی گسترده این منطقه جداسازی میکروارگانیزم‌های بومی گامی بلند و موثر در جهت دستیابی به ترکیبات زیست فعال جدید خواهد بود. دستیابی به اکتینوماست‌های دریایی دارای قابلیت تولید ترکیبات آنتی بیوتیک در مقابل میکروارگانیزم‌های بیماریزا توانمندی بالقوه‌ای را جهت گسترش تحقیقات در این زمینه ایجاد می‌نماید. با ادامه مطالعات روی سویه‌های مولد بدست آمده در قالب پروژه‌های مستقل می‌توان ترکیبات آنتی بیوتیک طبیعی را تولید کرده و در مراحل بعد اقدام به شناسایی ساختار شیمیایی آنها نمود. در صورت جدید بودن ساختار ترکیبات آنتی بیوتیک امکان ثبت حقوقی این ترکیبات به منظور تجاری سازی فرآورده‌های تولید شده وجود دارد. امروزه شرکتهای داروسازی مهمی در دنیا مانند Novartis، Nereus، Ecopia Biosciences بر روی فرآورده‌های طبیعی تولید شده توسط میکروارگانیزم‌ها متمرکز شده‌اند. این پروژه با هدف جداسازی و غربالگری و شناسایی ایزوله‌های اکتینوماست از رسوبات دریای عمان در راستای دستیابی به باکتریهای بومی مولد آنتی بیوتیک بود.

۱-۱- محیط‌های دریایی

اقیانوس‌ها به عنوان منشأ حیات بیش از ۷۰ درصد سطح زمین و ۸۰ درصد حیات جانوری موجود را در بر گرفته‌اند. بخش عظیمی از این متنوع‌ترین اکوسیستم کره زمین بکر و مطالعه نشده باقی مانده است. وجود زیستگاه‌های مختلف با شرایط محیطی متفاوت از نظر فاکتورهایی مانند دسترسی به مواد مغذی، حضور نور، میزان شوری، دما، فشار، اکسیژن و سایر عوامل زمینه‌توان را در این اکوسیستم بزرگ موجب شده است. بیش از ۴۰۰۰۰ گونه از موجودات مختلف اعم از میکروارگانیزم‌ها، علف‌های دریایی، جلبک‌ها، مرجان‌ها و

جانوران در محیط‌های دریایی حضور دارند. این تنوع بی‌نظیر نقشی حیاتی در اکتشاف و مطالعه ترکیبات طبیعی از منابع دریایی ایفا می‌نماید. با توجه به تفاوت فوق‌العاده شرایط محیط دریایی با محیط‌های خاکی برآورد می‌شود که اکتینومیسست‌های دریایی نیز دارای خصوصیات متفاوتی با انواع خاکزی خود باشند. بنابراین ممکن است انواع متنوعی از ترکیبات زیست‌فعال را تولید نمایند (Mincer et al., 2005). علیرغم تنوع زیستی گسترده در محیط‌های دریایی تحقیق در زمینه فراورده‌های طبیعی دریایی هنوز در مراحل ابتدایی خویش قرار دارد و در مقایسه با زیستگاه‌های خاکی بررسی نشده باقی مانده است. از دلایل این موضوع می‌توان به غیرقابل کشت بودن اکثر میکروارگانیسم‌های دریایی اشاره نمود (Heald et al., 2001).

مطالعه سیستماتیک محیط‌های دریایی به عنوان منبع ترکیبات زیست‌فعال جدید بطور جدی از اواسط دهه ۱۹۷۰ آغاز شد. بخش عمده‌ای از مطالعات فعالیت‌های زیستی متابولیت‌های دریایی در زمینه ترکیبات با ویژگی‌های نوروکسیک، ضد ویروسی، ضد سرطانی، ضد میکروبی و سیتوتوکسیک متمرکز شده‌اند.

۲-۱- فرآورده‌های طبیعی دریایی

فراورده‌های طبیعی از گذشته همواره نقطه اتکاء درمان بیماری‌های انسان بوده‌اند و امروزه نیز جزء اصلی داروسازی مدرن محسوب می‌شوند. تنوع ارگانیسم‌های موجود در محیط‌های دریایی پژوهشگران را به شناسایی فراورده‌های دریایی جدید ترغیب نموده است. ترکیبات طبیعی دریایی فرصتی فوق‌العاده را برای دستیابی به ترکیبات متنوع و منحصر به فرد که از سایر منابع قابل استحصال نیستند فراهم نموده است و به توسعه خط تولید دارو منجر شده است. میکروارگانیسم‌های دریایی می‌توانند ترکیبات منحصر به فرد با ساختارهای شیمیایی جدید تولید نمایند. استفاده از این ترکیبات در صنایع داروسازی در حال گسترش می‌باشد. طیف گسترده متابولیت‌های ثانویه موجود در طبیعت گنجینه بی‌نظیری را جهت اکتشاف و توسعه دارو فراهم آورده است. فراورده‌های طبیعی در نتیجه انتخاب واحدهای سازنده ساده و محدود طی مسیرهای بیوستزی در ارگانیسم‌های زنده ساخته می‌شوند و در هر دو بخش ساختاری و عملکردی تنوع بی‌نظیری را ارائه می‌دهند. تنوع ایجاد شده بسیار بیشتر از تنوع ناشی از سنتز شیمیایی می‌باشد. از اینرو شناسایی ساختار ترکیبات زیست‌فعال الگوهای جدیدی را برای سنتز شیمیایی داروهای مدرن ایجاد می‌نماید. در این زمینه مطالعاتی جدید بر روی سنتز بر اساس بیوستز متمرکز شده‌اند. ترکیبات اصلی بسیاری از داروها در نتیجه برنامه‌های توسعه اکتشاف دارو بدست آمده است (Bhakuni and Rawat 2006). مسلماً امروزه بخش قابل توجهی از داروهای مورد استفاده در پزشکی مدرن از ترکیبات طبیعی ساخته شده‌اند. ترکیبات زیست‌فعال بویژه در زمینه‌های ضد التهابی، ایمنوترایی و شیمی درمانی سرطان حضور پررنگی داشته‌اند. پیشرفت‌های فراوان در بیولوژی ملکولی، تعیین توالی ژنتیکی و بیوانفورماتیک راه را برای بهره‌برداری از پتانسیل دارویی فراورده‌های باکتری‌های دریایی هموار نموده است (Waters et al, 2010). ارگانیسم‌های مولد ترکیبات طبیعی شامل در تمامی تاکسون‌های حیات یافت می‌شوند.

نتایج یک بررسی تحلیلی نشان داد از ۴۱۹۶ ترکیب زیست فعال جدید اکتشاف شده از محیط‌های دریایی ۱۳ درصد معادل ۵۲۱ ترکیب فعالیت ضد باکتریایی و ۵ درصد دارای فعالیت ضد قارچی بودند. بررسی منشاء تولید این ترکیبات زیست فعال نشان داد از میان تمامی ارگانسیم‌های مولد این ترکیبات، باکتریها بیشترین نسبت تولید ترکیبات زیست فعال به کل ترکیبات تولید شده را به میزان ۴۶ درصد دارا می‌باشند. این در صورتی است که میانگین این نسبت در سایر ارگانسیم‌های دریایی ۲۸ درصد می‌باشد (Blunt et al., 2015).

۳-۱- دریای عمان

۳-۱-۱- ویژگی‌های عمومی دریای عمان

دریای عمان بصورت مثلثی بین کشورهای ایران، عمان و پاکستان قرار دارد. حداکثر طول آن از شمال غرب تا جنوب شرق ۹۵۰ کیلومتر و حداکثر عرض آن از شمال شرق به جنوب غرب حدود ۳۴۰ کیلومتر است. این حوضه اقیانوسی کوچک، باقیمانده اقیانوس قدیمی نئوتتیس است. این اقیانوس به علت برخورد ورقه عربی به اورازیا در طول زمان کوچک شده است. پیامد این برخورد ایجاد یک گوه برافزایشی^۱ در مکران است (Uchapi et al., 2002). این گوه برافزایشی از کراچی تا تنگه هرمز امتداد می‌یابد. دریای عمان یک دریای ژرف است که از راه تنگه هرمز به خلیج فارس با عمق پایین متصل می‌شود. در بخش جنوب شرقی حوضه دریای عمان به پشته Murray با طول ۴۲۰ کیلومتر و عرض ۲۰ تا ۵۰ کیلومتر منتهی می‌شود. بخش دیگر مخروط ایندوس می‌باشد که در شرق پشته Murray قرار داشته و در اثر انباشت رسوبات رود ایندوس ایجاد شده است. در مرکز حوضه، یک خیز قاره‌ای باریک و یک پهنه ژرف گسترده وجود دارد. پهنه ژرف دریای عمان بیش از ۳۴۰۰ متر عمق دارد. این پهنه در واقع بخشی از ورقه عربی است که از شمال به گوه برافزایشی مکران و از جنوب به پشته Murray محدود می‌شود. پهنه ژرف خلیج عمان، به علت همگرایی پشته Murray و گوه برافزایشی مکران در شرق باریک می‌شود (Uchapi et al., 2002). پوسته دریای عمان با حدود شش کیلومتر ضخامت دارای ماهیتی اقیانوسی است. روی این پوسته حدود هفت کیلومتر رسوبات متراکم قرار گرفته است (Bhattacharya and Chaubey., 2001). این رسوبات دارای دو بخش پایینی با حدود ۴ کیلومتر ضخامت به نام توریدیت‌های هیمالیا است و بخش بالایی با حدود ۳ کیلومتر ضخامت موسوم به ماسه‌های مکران است. روی ماسه‌های مکران، پوشش نازکی از رسوبات عصر حاضر موسوم به هولوسن قرار گرفته است (Uchapi et al., 2002). منبع رسوبات معروف به توریدیت‌های هیمالیا پنجه آبرفتی رود ایندوس در شرق است (Kopp et al., 2000). منشاء ماسه‌های مکران بخش‌های شمالی گوه برافزایشی مکران است. توریدیت‌های هیمالیا متشکل از رسوبات توریدیتی و گل‌های همپلاژیک است (Platt et al., 1988) بخش اعظم ماسه‌های مکران حاصل از فرسایش گوه برافزایشی مکران حاصل شده است (Schluter, 2002).

¹ Accretionary wedge

۲-۳-۱- ویژگی‌های اقیانوس شناسی دریای عمان

دریای عمان به دریای عرب و اقیانوس هند متصل بوده و جزء دریا‌های عمیق محسوب می‌شود. آب دریای عمان بطور میانگین دارای شوری 37 PSU می‌باشد. حداکثر دمای سطح آب در مرداد ماه به ۳۲ و حداقل دمای سطح آب در دی ماه به حدود ۱۹/۸ درجه سانتیگراد می‌رسد (Emery, 1956). دریای عمان در حاشیه شمالی سیستم‌های جوی گرمسیری قرار گرفته و در معرض وزش بادهای موسمی مونسون قرار می‌گیرد. بدلیل کوتاه بودن تغییرات فصلی در این دریا لذا این تغییرات باعث ایجاد جریان‌های دریایی نمی‌شوند. جهت جریان‌های سطحی آب در دریای عمان در مناطق مختلف متغیر است و به جهت وزش باد وابسته است. در تابستان بدلیل وزش بادهای موسمی جنوب غربی آب به داخل دریای عمان و در جهت شمال غربی جریان دارد و باعث ایجاد جریان سطحی از دریای عمان به خلیج فارس می‌گردد. در زمستان با وجود بادهای موسمی شمال شرقی آب به خارج دریای عمان جریان می‌یابد. بادهای شدید در دریای عمان در بهار و زمستان بویژه در ماه‌های دی و بهمن می‌وزند. جزر و مد نامنظم بوده و از شرق به غرب بیشتر می‌شود. در بخش شرقی حدود دو متر و در دهانه تنگه هرمز به حدود ۳/۵ متر می‌رسد. سرعت جزر و مد در حاشیه شمالی دریای عمان به حدود ۲ گره دریایی می‌رسد. پدیده فراچاهش^۲ در شمال غرب دریای عمان و حوالی جاسک به وقوع می‌پیوندد. مطالعات نشان داده است که در ساحل دریای عمان به علت ویژگی‌های توپوگرافی امواج به دام افتاده در اثر توپوگرافی به فراوانی مشاهده شده‌اند (فدوی حسینی و همکاران، ۱۳۷۶).

۴-۱- اکتینومیست‌های دریایی

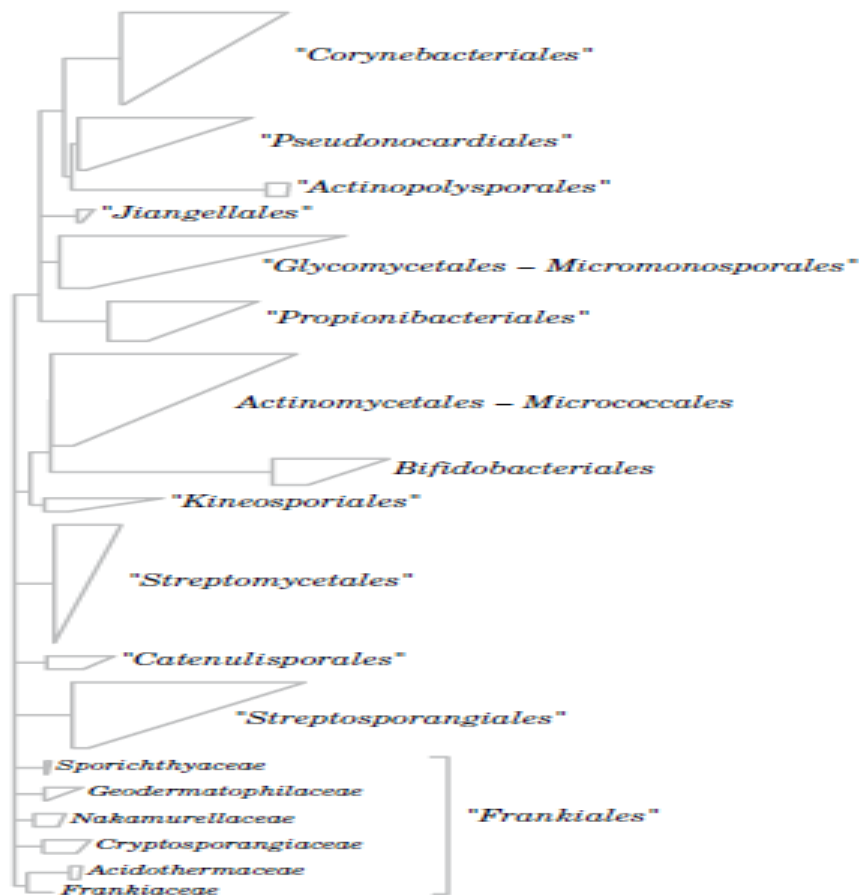
۴-۱-۱- طبقه بندی اکتینومیست‌ها

رده اکتینوباکتریها به عنوان بزرگترین رده در میان شش رده موجود در شاخه اکتینوباکتریها محسوب می‌شود. شاخه اکتینوباکتریها متنوع و گسترده‌ترین شاخه در میان ۱۶ شاخه باکتریها می‌باشد. این رده از راسته‌هایی تشکیل شده است که تا سال ۲۰۰۹ همگی زیر مجموعه راسته‌های *Actinomycetales* و *Bifidobacteriales* بودند اما اکنون هر کدام یک راسته به حساب می‌آیند (Zhi et al, 2009). در این رده دو کلاد^۳ بزرگ وجود دارد (شکل ۲). کلاد اول شامل *Actinopolysporales*, *Corynebacteriales*

Pseudonocardiales و *Glycomycetales*, *Jiangellales*, *Micromonosporales*, *Propionibacteriales*, شامل *Micrococcales* و *Actinomycetales*, *Bifidobacteriales*, *Kineosporiales* می‌باشد.

^۲ Upwelling

^۳ Clade



شکل ۲. نمایی از راسته‌های موجود در رده اکتینوباکتریها بر اساس آنالیز فیلوژنتیک توالی 16S rRNA

۲-۴-۱- اهمیت اکتینومايست های دریایی

اکتینوباکتریهای دریایی از لحاظ اقتصادی و بیوتکنولوژیک ارزشمندترین پروکاریوت‌ها محسوب می‌شوند. متابولیت‌های ثانویه تولید شده توسط اکتینوباکتریهای دریایی طیف وسیعی از فعالیت‌های زیستی را ارائه می‌نمایند (Berdy 2005; Manivasagan *et al.* 2013). جنس استرپتومايسس به عنوان یکی از غنی‌ترین جنس‌های اکتینوباکتریها به تنهایی تعداد زیادی از ملکولهای زیست‌فعال را تولید می‌کند. با این حال هنوز بخش عظیمی از پتانسیل بیوسینتتیک گروه‌های میکروبی بررسی نشده باقی مانده است. در دهه‌های گذشته مطالعات گسترده‌ای روی استرپتومايسس‌های خاکزی انجام شده است. از اینرو شانس یافتن گونه‌های جدید از زیستگاه‌های خشکی بسیار کاهش یافته است. بیش از ۵۰۰ گونه استرپتومايسس مسئول تولید ۷۰-۸۰ درصد متابولیت‌های ثانویه هستند (Watve *et al.*, 2001). این متابولیت‌ها فعالیت‌های مختلفی شامل ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد سرطانی، ضد تومور، سیتوتوکسیک، سیتواستاتیک، ضد التهابی، ضد انگلی، ضد مالاریا، ضد ویروسی، آنتی‌اکسیدان و ضد رگ‌زایی و غیره ارائه می‌کنند. دیگر اعضاء اکتینوباکتریها مانند جنس‌های *Saccharopolyspora*, *Amycolatopsis*, *Micromonospora*, *Actinoplanes* نیز مولد ترکیبات زیست‌فعال می‌باشند. یکی از دلایل مهم

اکتشاف متابولیت‌های ثانویه جدید وجود پاتوژن‌های مقاومی است که دیگر به آنتی بیوتیک‌های رایج پاسخ نمی‌دهند (Lam 2006; Ekwenye and Kazi 2007). تعداد مرگ و میر ناشی از پاتوژن‌های مقاوم رو به افزایش است. در این زمینه متابولیت‌های ثانویه تولید شده توسط اکتینوباکتریها می‌توانند پایه‌ای برای سنتز داروهای جدیدی باشند که می‌توانند در مقابله با میکروبهای مقاوم مورد استفاده قرار گیرند (Fenical and Jensen 2006). اکتینوباکتریها ۱۰ درصد از باکتریهای کلونیزه شده روی توده‌های زیستی را تشکیل می‌دهند و از رسوبات دریایی قابل جداسازی هستند (Ward and Bora. 2006).

جدول ۱-۳- متابولیت‌های جدید تولید شده توسط اکتینومیست‌های دریایی در بین سالهای ۲۰۰۳-۲۰۰۵

Compound	Source	Biological activity	Reference
Chinikomycins	<i>Streptomyces</i> sp.	Anticancer	Li et al. (2005)
Chloro-dihydroquinones	Novel actinomycete	Antibacterial; anticancer	Soria-Mercado et al. (2005)
Glaciapyrroles	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial	Macherla et al. (2005)
Frigocyclinone	<i>Streptomyces griseus</i>	Antibacterial	Bruntner et al. (2005)
Lajollamycin	<i>Streptomyces nodosus</i>	Antibacterial	Manam et al. (2005)
Mechercharmycins	<i>Thermoactinomyces</i> sp.	Anticancer	Kanoh et al. (2005)
Salinosporamide A	<i>Salinispora tropica</i>	Anticancer; antimalarial	Jensen et al. (2007) and Prudhomme et al. (2008)
Sporolide A	<i>Salinispora tropica</i>	Unknown	Jensen et al. (2007)
Salinosporamides B & C	<i>Salinispora tropica</i>	Cytotoxicity	Williams et al. (2005)
2-Allyloxyphenol	<i>Streptomyces</i> sp.	Antimicrobial; food preservative; oral disinfectant	Arumugam et al. (2009)
Saliniketal	<i>Salinispora arenicola</i>	Cancer chemoprevention	Jensen et al. (2007)
Marinomycins A-D	<i>Marinispora</i>	Antimicrobial; anticancer	Kwon et al. (2006)
Cyanosporaside A	<i>Salinispora pacifica</i>	Unknown	Jensen et al. (2007)
Lodopyridone	<i>Saccharomonospora</i> sp.	Anticancer	Maloney et al. (2009)
Arenimycin	<i>Salinispora arenicola</i>	Antibacterial; anticancer	Asolkar et al. (2010)
Salinispyrone	<i>Salinispora pacifica</i>	Unknown	Jensen et al. (2007)
Salinipyrones A & B	<i>Salinispora pacifica</i>	Mild cytotoxicity	Oh et al. (2008)
Pacificanones A & B	<i>Salinispora pacifica</i>	Antibacterial	Oh et al. (2008)
Arenicolides A-C	<i>Salinispora arenicola</i>	Mild cytotoxicity	Jensen et al. (2007) and Williams et al. (2007)
1-hydroxy-1-norresistomycin	<i>Streptomyces chinaensis</i>	Antibacterial; anticancer	Gorajana et al. (2005) and Kock et al. (2005)
Resistoflavin methyl ether	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial; anti-oxidative	Kock et al. (2005)
Staurosporinone	<i>Streptomyces</i> sp.	Antitumor; phycotoxicity	Wu et al. (2006)
Sesquiterpene	<i>Streptomyces</i> sp.	Unknown	Wu et al. (2006)
1,8-Dihydroxy-2-ethyl-3-methylanthraquinone	<i>Streptomyces</i> sp.	Antitumor	Huang et al. (2006)
Caboxamycin	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial; anticancer	Hohmann et al. (2009)
Butenolides	<i>Streptoverticillium luteovercillatum</i>	Antitumor	Li et al. (2006)
Daryamides	<i>Streptomyces</i> sp.	Antifungal; anticancer	Asolkar et al. (2006)
Piericidins	<i>Streptomyces</i> sp.	Antitumor	Hayakawa et al. (2007a)
Proximicins	<i>Verrucospora</i> sp.	Antibacterial; anticancer	Fiedler et al. (2008)
Streptokordin	<i>Streptomyces</i> sp.	Antitumor	Jeong et al. (2006)
ZHD-0501	<i>Actinomadura</i> sp.	Anticancer	Han et al. (2005)
Bisanthraquinone	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial	Socha et al. (2006)
Tirandamycins	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial	Carlson et al. (2009)

۵-۱- فعالیت ضد میکروبی اکتینوباکتریهای دریایی

اکتینوباکتریهای دریایی دارای قابلیت تولید طیف گسترده‌ای از متابولیت‌های ثانویه می‌باشند. هر سویه اکتینوباکتری دارای پتانسیل ژنتیک تولید ۱۰ تا ۲۰ متابولیت ثانویه می‌باشد (Bentley et al. 2002; Lam 2006). حدود ۲۳۰۰۰ آنتی بیوتیک از میکروارگانیسم‌ها کشف شده است. بر آورد می‌شود از این تعداد ۱۰۰۰۰ آنتی بیوتیک از اکتینوباکتریها کشف شده‌اند (Okami and Hotta, 1988). در این میان استرپتومایسس‌ها به عنوان دسته

ای بی رقیب در میان سایر گروه‌های میکروبی مطرح می‌باشند. مطالعات نسبتاً کم و تنوع گسترده اکتینوباکتریها دانشمندان را برای کشف ترکیبات جدید مجذوب این تاکسون نموده است.

۱-۵-۱- فعالیت ضد باکتریایی

فعالیت ضد باکتریایی فرایندی است که طی آن رشد باکتریها با مکانیسم‌های مختلف از قبیل تولید آنتی بیوتیک، باکتریوسین، سیدروفور و یا تغییر شرایط محیطی مهار یا ممانعت می‌شود. بررسی فعالیت ضد باکتریایی در شرایط *In vitro* نخستین گام در دستیابی به آنتی بیوتیک‌های موثر علیه عوامل عفونت‌زا می‌باشد. بیماریهای عفونی همچنان به عنوان یکی از دلایل اصلی مرگ و میر ناشی از میکروارگانیزم‌های مقاوم به شمار می‌روند (Ravikumar et al. 2012). فراوانی مقاومت به آنتی بیوتیک در پاتوژن‌ها در سرتاسر جهان به مرز هشدار دهنده‌ای رسیده است. کاهش کارایی و مقاومت پاتوژن‌ها به آنتی بیوتیک توسعه عوامل جدید جایگزین را ضروری ساخته است (Ravikumar et al. 2010). برای غلبه بر این مشکل توسعه داروهای موثر جدیدتر بدون عوارض جانبی یک نیاز فوری است. بطور کلی اکتینوباکتریهای دریایی در بسیاری از مناطق دنیا از لحاظ فعالیت ضد باکتریایی مطالعه شده‌اند.

۱-۵-۲- فعالیت ضد قارچی اکتینوماست‌ها

اکتینوباکتریهای دریایی ابزارهای بیولوژیک جدیدی برای تولید ترکیبات ضد قارچی هستند (Wanner 2009). *Streptomyces* sp. DA11 دریایی جداشده از دریای جنوب چین با تولید آنزیم کیتیناز فعالیت‌های ضد قارچی خود را علیه *Candida albicans* و *Aspergillus niger* نشان داد (Han et al. 2009).

۱-۶- اکتینوماست‌ها در رسوبات دریایی

فراوانی اکتینوماست‌ها در رسوبات دریایی ۱۰۰۰۰ برابر کمتر از فراوانی آنها در زیستگاه‌های خاکی است (Mincer et al., 2002). مطالعه فراوانی اکتینوباکتریها در رسوبات دریایی بیانگر آن است که این باکتریها علیرغم عملکردهای اکولوژیک مهم در محیط دریایی، بخش اندکی از باکتریهای قابل کشت در رسوبات را تشکیل می‌دهند. فراوانی اکتینوباکتریها در رسوبات اعماق مختلف در چندین مطالعه بررسی شده است (جدول ۱-۱). اکتینوباکتریها همچنین حدود ۹ درصد باکتریهای کلونیزه شده روی توده‌های دریایی را تشکیل می‌دهند (Kim and Fuerst, 2006). این باکتریها نقشهای اکولوژیک متنوعی را در رسوبات دریایی ایفا می‌نمایند. رسوبات منبع بزرگی از کرین در کره زمین می‌باشند و در برگیرنده مواد آلی محلول (DOC^4) می‌باشند. دسته دیگری از مواد آلی، مواد آلی ذره‌ای (POM^5) هستند که در حد واسط رسوبات با آب ته نشین می‌شوند. با توجه به قابلیت‌های

⁴Dissolved organic matter

⁵Particulate organic matter

قوی آنزیمی اکتینوباکتریها در تجزیه مواد آلی، این باکتریها نقش مهمی در چرخه عناصر بویژه چرخه های کربن و نیتروژن ایفا نمایند (Bull et al., 2005).

۷-۱- باکتری های بیماریزای مورد بررسی

۷-۱-۱ - *Staphylococcus aureus*

یک کوکسی گرم مثبت است. بطور معمول از پوست و بینی افراد سالم جدا می شود. این باکتری یکی از عوامل عمده عفونت بیمارستانی، عفونت پوست و بافت نرم، عفونت داخل عروقی، پنومونی، آرتریت سپتیک، اندوکادیت، استئومیلیت، عفونت جسم خارجی و سپسیس است (Steele, 2013). تمام انسانها در طول زندگی خود به نوعی عفونت *S. aureus* را تجربه می کنند که شدت آن از یک مسمومیت غذایی یا عفونت پوستی خفیف تا عفونت های تهدید کننده زندگی متغیر است. *S. aureus* به سرعت نسبت به اغلب آنتی بیوتیک ها مقاومت پیدا می کنند و مشکلات درمانی متعددی را پدید می آورند. این باکتری با تولید بتالاکتاماز که تحت کنترل پلاسمید است در مقابل بسیاری از پنی سیلین ها مقاوم می شود. همچنین نژاد های مقاوم به ونکومایسین نیز یافت شده است. *S. aureus* می تواند از طریق توانایی تکثیر و انتشار گسترده در بافت ها و تولید مواد خارج سلولی مثل آنزیم ها و توکسین ها ایجاد بیماریهایی چون آبسه، سندرم پوستی پوسته ریزی دهنده و سندرم شوک توکسیک کند (Jawetz, 2001).

۷-۲-۱ - *Escherichia coli*

یک باسیل گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه است که بطور شایع در روده جانوران خونگرم وجود دارد. شایعترین عامل عفونت دستگاه ادراری است و حدود ۹۰ درصد عفونت های ادراری در زنان جوان را به خود اختصاص می دهد. علائم بالینی این عفونت به صورت تکرر ادرار، سوزش ادراری، خون در ادرار و چرک در ادرار است. همچنین عامل مهم ایجاد اسهال است. از جمله اسهال آبکی در نوزادان و اسهال مسافرتی. از دیگر بیماریهایی که این باکتری ایجاد می کند می توان به سپسیس و مننژیت به خصوص در نوزادان اشاره کرد (Jawetz, 2001).

۷-۳-۱ - *Candida albicans*

یک مخمر بیماریزا است. این مخمر شایعترین عفونت قارچی سیستمیک است که از راههای مختلف ایجاد بیماری می نماید از آن جمله می توان به کاندیدیاز جلدی و مخاطی اشاره نمود. بیماریهایی نظیر برفک دهانی و ولوواژینیت توسط این مخمر ایجاد می شود. این مخمر همچنین در نواحی چین خورده بر روی پوست عفونت ایجاد می کند. نوع دیگر بیماری کاندیدیاز سیستمیک است که پس از ورود به جریان خون کلیه ها را درگیر

می‌کند، می‌تواند به دریچه‌های مصنوعی قلب بچسبد و می‌تواند تقریباً در هر جایی عفونت کاندیدایی به وجود آورد مثل آرتريت، منژیت و اندوفتالیت. (Jawetz, 2001).

۸-۱- فرضیه‌های تحقیق

- ۱- جمعیت‌های اکتینومایست قابل کشت در رسوبات دریای عمان حضور دارند.
- ۲- اکتینومایست‌های جداشده مولد ترکیبات ضد میکروبی در مقابل سویه‌های بیماریزای هدف می‌باشند.
- ۳- جدایه‌های اکتینومایست بدست آمده قادر به تولید ترکیبات آنتی بیوتیک در شرایط آزمایشگاهی می‌باشند.

۹-۱- اهداف تحقیق

- ۱- جداسازی سویه‌های اکتینومایست از نمونه‌های رسوب دریای عمان
- ۲- ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اکتینومایست‌های جدا شده در مقابل میکروارگانسیم‌های بیماریزا
- ۳- شناسایی پلی‌فازی و آنالیز فیلوژنتیک اکتینومایست‌های جداشده از رسوبات دریای عمان

۱۰-۱- پیشینه تحقیق

در دهه اخیر مطالعات گسترده‌ای در زمینه جداسازی اکتینومایست‌ها از محیط‌های دریایی از جمله رسوبات انجام گردیده است. در این زمینه تاکنون مطالعات غربالگری در نواحی مختلف از قبیل اقیانوس آرام (Jensen et al., 2005, 2006)، خلیج مکزیک (Maldonado 2009) دریای ژاپن (Igarashi 2015)، دریای چین (Xiong 2015)، دریای مدیترانه (Gartner et al, 2016)، اقیانوس هند (Gopalakrishnan et al., 2014) بطور متمرکز انجام شده است. در مطالعات مختلف حضور اکتینومایست‌ها به عنوان جمعیت‌های ثابت و گسترده در رسوبات دریایی نشان داده شده است. با کشف یک تاکسون جدید از اکتینوباکتریها دریایی به نام *Salinospora* شواهد بیشتری از پراکندگی گسترده آنها در رسوبات دریایی فراهم شد. این جنس جدید تنها در حضور آب دریا تکثیر می‌نمود. مطالعات فیلوژنتیک نشان داد جنس *Salinospora* در خانواده *Micromonosporaceae* قرار می‌گیرد (Mincer et al., 2002). همچنین در داخل کشور چندین مطالعه توسط مجری پروژه حاضر انجام شده است. در مطالعه اول فعالیت آنتاگونیستی اکتینومایست‌های جدا شده از ۵۳ نمونه رسوب جمع‌آوری شده از بخش شمالی خلیج فارس از خور موسی تا تنگه هرمز بررسی شد. نتایج نشان داد ۱۷ درصد از ایزوله‌های بدست آمده در مقابل سه گونه بیماری‌زای ویبریو شامل *V. alginolyticus*، *V. parahaemolyticus* و فعالیت ضد میکروبی ارائه نمودند. شناسایی بیوشیمیایی، فیزیولوژیک و مورفولوژیک بیانگر تعلق ایزوله‌های مولد آنتی بیوتیک به جنس *Streptomyces* بود. شناسایی ژنتیکی سویه برتر مولد آنتی بیوتیک ترادف ژنتیک بالای بین سویه برتر با *Streptomyces anulatus* را نشان داد (گذری ۱۳۸۸). مطالعه بعدی صورت گرفته توسط مجری پروژه حاضر و

همکاران با هدف جداسازی و شناسایی اکتینومایست‌های مولد آنتی بیوتیک از رسوبات دریایی خلیج فارس در محدوده استان هرمزگان ۶۰ ایزوله اکتینومایست از ۱۰ نمونه رسوب جداسازی شد. بررسی فعالیت ضد میکروبی ایزوله‌های بدست آمده نشان داد بترتیب ۳۳، ۲۰ و ۳۰ درصد ایزوله‌ها در مقابل *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli* و *Candida albicans* فعالیت ضد میکروبی نشان دادند. مطالعات شناسایی مورفولوژیک، بیوشیمیایی، فیزیولوژیک و کموتاکسونومیک روی ایزوله‌های منتخب شامل Ifro 12، Ifro 33 و Ifro 47 بیانگر تعلق آنها به جنس *Streptomyces* بود. مطالعات ژنتیک ملکولی بر اساس آنالیز ژن 16S rRNA نشان داد ایزوله‌های Ifro 12، Ifro 33 و Ifro 47 دارای 99 درصد تشابه بترتیب با سویه‌های *S. olivaceus*، *S. cacaoi* و *S. variabilis* بودند (گدیری و همکاران ۱۳۹۵). در مطالعه دیگری Gozari و همکاران ۲۰۱۶ نشان دادند ۲۷ درصد ایزوله‌های جدا شده از رسوبات استخرهای پرورش میگو منطقه تیاب در مقابل هر چهار سویه مهم بیماریزای ویبریو شامل *V. alginolyticus*، *harveyi*، *V. parahaemolyticus* و *V. anguillarum* فعالیت آنتاگونیستی ارائه نمودند. غربالگری فعالیت آنزیمی سویه‌های آنتاگونیست بیانگر تولید آنزیم‌های آمیلاز، لیپاز و پروتئاز توسط بترتیب ۴۴، ۲۶ و ۳۷ درصد ایزوله‌های آنتاگونیست بود. ایزوله MNM-1400 با بیشترین فعالیت آنتاگونیستی و آنزیمی در آزمون بیماریزایی هیچ علائمی از بیماری را در لارو میگو ایجاد نکرد. شناسایی ژنتیک بیانگر ۹۹ درصد تشابه ژن 16S rRNA سویه MNM-1400 با *Streptomyces californicus* بود (Gozari et al., 2016). نتایج مطالعات انجام شده در این زمینه تاکنون منجر به اکتشاف عوامل زیست فعال بسیاری گردیده است که برای نمونه در ذیل تنها به چند آنتی بیوتیک شاخص اشاره می‌گردد.

Abyssomicin C یک آنتی بیوتیک پلی کتاید چند حلقه‌ای است و توسط سویه دریایی *Verrucosipora* تولید شده است (Riedlinger et al. 2004). این ترکیب توانایی ممانعت از بیوسنتز پارا آمینوبنزوئیک اسید را دارا است و بنابراین سنتز اسید فولیک را متوقف می‌نماید. این ترکیب همچنین توانایی فعالیت علیه باکتری‌های گرم مثبت نظیر ایزوله‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به چند دارو و مقاوم به ونکومايسین را دارد. Abyssomicin و ترکیبات مشابه آن توانایی دارند که به عنوان عاملی ضد باکتریایی علیه پاتوژن‌های دارای مقاومت چندگانه بکار گرفته شوند.

Bonactin یک آنتی بیوتیک جدید می‌باشد که از سویه *Streptomyces* sp BD21-2 تولید شد. این باکتری از رسوبات کم عمق هاوایی جداسازی شد. این ترکیب فعالیت ضد باکتریایی علیه هر دو دسته گرم مثبت و گرم منفی همچنین فعالیت ضد قارچی را نشان داد (Schumacher et al. 2003).

دهیدروکوئینونهای کلرینه شده آنتی بیوتیک‌های جدیدی هستند که توسط یک سویه دریایی *Streptomyces* sp. تولید شدند (Soria-Mercado et al, 2005). این ترکیبات دارای اسکلت‌های کربن جدیدی هستند اما با متابولیت‌های رده Napyradiomycin مرتبط می‌باشند. ساختارهای این ملکول‌های جدید دارای اثرات ضد میکروبی و سیتوتوکسیک قابل ملاحظه‌ای در مقابل سلول‌های سرطانی می‌باشند. **Diazepinomicin** یک ترکیب

dibenzodiazepinone فارنسیله شده منحصر به فرد است که توسط سویه های میکرومونوسپورا تولید شده است. این ترکیب دارای فعالیت ضد باکتریایی، ضد التهابی و ضد توموری است. Diazepinomicin در شرایط آزمایشگاهی طیف گسترده سیتوتوکسیته را نشان می دهد و ثابت شده است که در شرایط بالینی در مقابل تومور مغزی، سرطان پروستات و سرطان سینه فعالیت دارد (Charan et al. 2004). این ترکیب به عنوان یک عامل ضد سرطان توسط شرکت اکویپا بیوساینس پیشنهاد شد و در سوم ژانویه ۲۰۰۶ این گروه در کانادا مرحله آزمایشات بالینی این ماده را انجام دادند.

Frigocyclinone یک آنتی بیوتیک آنگوئوسیکلون می باشد که از *Streptomyces griseus strain NTK 97* جداسازی شده است. این آنتی بیوتیک حاوی یک بخش تترانگومایسین بوده که با پیوند C گلیکوزیدی به آمینوداکسی شوگر Ossamine متصل گردیده است. این آنتی بیوتیک فعالیت ضد باکتریایی خود را علیه باکتریهای گرم مثبت نشان می دهد (Bruntnet et al. 2005).

Essramycin یک آنتی بیوتیک تریازولوپیریمیدین است که بوسیله *Streptomyces sp.* تولید گردیده است. این ترکیب دارای فعالیت ضد باکتریایی با حداقل غلظت ممانعت کننده ۲-۸ $\mu\text{g/mL}$ علیه باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی می باشد (El-Gendy et al. 2008).

Lynamicins پیرولهای بیس ایندول کلرینه شده هستند که از *Marinispora sp* جداسازی شده اند. طیف فعالیت ضد میکروبی این ترکیبات در مقابل ۱۱ پاتوژن نشان داد که این مواد دارای طیف گسترده فعالیت علیه باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی می باشند. این ترکیبات فعالیت قابل ملاحظه ای مقابل پاتوژنهای مقاوم به دارو شامل *S.aureus* مقاوم به متی سیلین و *Enterococcus faecium* مقاوم به ونکومایسین نشان دادند (McArthur et al. 2008).

Marinopyrroles متابولیت هایی به شدت هالوژنه و کایرال با ساختار غیر معمول بیس پیرول هستند. این متابولیت ها از *Streptomyces sp* جداسازی شده اند. فعالیت آنتی بیوتیک این متابولیت ها در مقابل *S.aureus* مقاوم به متی سیلین تایید شده است (Hughes et al. 2008).

Caboxamycin یک آنتی بیوتیک بنزوکسازول جدید است. این آنتی بیوتیک بوسیله کروماتوگرافی با عملکرد بالا مجهز به آشکارساز آرایه دیودی (HPLC-DAD) از عصاره *Streptomyces sp. NTK 937* تشخیص داده شد. سویه مولد این آنتی بیوتیک از رسوبات Canary Basin جداسازی شد. این آنتی بیوتیک فعالیت بازدارندگی خود را در مقابل باکتریهای گرم مثبت، رده های سلولی توموری ارائه نموده است. همچنین این ترکیب فعالیت بازدارندگی خود را در مقابل آنزیم فسفودی استراز اعمال نمود (Hohmann et al. 2009).

Glyciapyrroles A, B, C آنتی بیوتیک های جدید پیرولوسکوئترین هستند که بوسیله *Streptomyces sp.* NPS008187 تولید شدند. این ترکیبات فعالیت ضد باکتریایی نشان دادند (Macherla et al. 2005).

Tirandamycin C یک ترکیب جدید دی انویل تترامیک اسید است که توسط *Streptomyces* sp. 307-9 تولید گردید. این آنتی بیوتیک فعالیت بازدارندگی خود را علیه *Enterococcus faecium* مقاوم به ونکومایسین ارائه نمود (Carlson et al. 2009).

Bisanthraquinone یک آنتی بیوتیک جدید جدا شده از *Streptomyces* sp. می باشد. فعالیت های زیستی این ترکیب علیه سویه های *Enterococcus faecium* مقاوم به ونکومایسین (VRE)، سویه های مقاوم به متی سیلین، حساس به متی سیلین و *S. aureus* مقاوم به تتراسایکلین سنجش شده است (Socha et al., 2006).

Salinosporamide A یا NPI-0052 یک بتالاکتام گامالاکتام جدید است که از مایع تخمیری اکتینومیست دریایی اجباری *Salinospira tropica* جداسازی شد. این ترکیب یک بازدارنده پروتئوزوم است که آپوپتوزیس را در سلول های مغز استخوان القاء می کند و مکانیسم آن از مکانیسم عمل داروی ضدسرطان Bortezomib که بازدارنده پروتئوزوم است متمایز می باشد. این ترکیب توسط شرکت داروسازی نرئوس تولید شد و در سال ۲۰۰۶ برای ورود به مطالعات بالینی جهت درمان سرطان در انسان برنامه ریزی شد. NPI-0052 اولین کاندیدای بالینی برای درمان سرطان است. که از تخمیر نمکی یک اکتینومیست دریایی تولید شد. سویه *Salinospira tropica* همچنین دو ماکرولید به نام های Sporolide A و Sporolide B را تولید می نماید. این دو ترکیب از دو پلی کتاید مختلف ساخته شده اند که حاوی تعداد زیادی کربن اکسید شده هستند. این موضوع تا اندازه ای به ساختار منحصر به فرد این ترکیبات کمک می نماید. با اینکه Sporolide A,B هیچ فعالیت بیولوژیک تایید شده ای در تست های غربالگری مواد ضد سرطانی و ضد میکروبی ندارند اما توانایی فراوان اکتینومیست های دریایی را در تولید متابولیت های ثانویه جدید ثابت می کنند (Maldonado et al., 2005).

Marinomycins A, B با ادامه مطالعات در زمینه اکتینومیست های جدا شده از رسوبات دانشمندان موفق به شناسایی جنس *Marinospora* شدند و مطالعات شیمیایی بر روی آن انجام شد. مطالعات اولیه به سرعت منجر به کشف یکسری از ترکیبات آنتی بیوتیکی و آنتی توموری ویژه و منحصر به فرد شد. این ترکیبات Marinomycin A و B نام گذاری شدند. Marinomycin ها ماکرولیدهای شبیه پلی ان هستند اما به طور معمول فعالیت ضد قارچی مرتبط با آنتی بیوتیک های پلی ان را ندارند. این ترکیبات دارای توانایی سیتوتوکسیته هستند. همچنین دارای فعالیت ضدباکتریایی در مقابل استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین و انتروکوکوس فکالیس مقاوم به ونکومایسین می باشد (Fenical et al., 2006). N-(2-hydroxyphenyl)-2-phenazinamine (NHP) یک آنتی بیوتیک جدید است که از *Nocardia dassonvillei* جداسازی شده است. این ترکیب جدید فعالیت ضد قارچی قابل ملاحظه ای علیه *C. albicans* و رده سلولی HEPG2 نشان داد (Gao et al., 2012). Chandrananimycin A یک آنتی بیوتیک جدید جدا شده از *Actinomadura* sp می باشد. این ترکیب فعالیت ضد قارچی خود را علیه *Mucor miehei* ارائه نمود. این آنتی بیوتیک همچنین فعالیت ضد جلبک علیه میکروجلبکهای *Chlorella vulgaris* و *Chlorella sorokiniana* نشان داد (Maskey et al. 2003). در مطالعه دیگری کاپرولاکتون ها که آنتی بیوتیک های اخیرا جدا شده از *Streptomyces* sp بودند سمیت گیاهی متوسطی را نشان دادند و فعالیت نوید بخشی علیه سلولهای انسانی همراه با سمیت کلی پایین ارائه نمودند (Stritzke et al., 2004).

۲- مواد و روشها

۲-۱- وسایل مورد استفاده در این تحقیق

نام دستگاه	شرکت سازنده	نام دستگاه	شرکت سازنده
اتو کلاو	ریحان طب	هود لامینار کلاس ۲	ژال تجهیز
انکوباتور	فرآزما تجهیز	انکوباتور شیکردار	Visoin
انکوباتور یخچالدار	فرآزما تجهیز	اسپکتروفوتومتر	Toshiba
آون	فرآزما تجهیز	نمونه گیر رسوب گراب	Hydrobios
ترازو	ae ADAM	pH متر	sartorius
بن ماری	پارس آزما	ترموسایکلر	Eppendorf
سانتریفوژ	universal	تانک الکتروفورز	
میکروسکوپ	nikon	ترمومیکسر	Eppendorf
پلیت ۱۰، ۸، ۶، سانتی متری	صفا آرا	ژل نگار	
پمپ میلی پور	Platinum	سمپلر (10, 100, 1000µl)	Eppendorf
شیکر لوله	IKA vortex	مایکروویو	Kenwood
یخچال	امرسان	سر سمپلر آبی، زرد و کریستالی	Eppendorf

۲-۲- مواد مورد استفاده در این تحقیق

جدول ۲-۲- مواد و معرف های مورد استفاده

ماده	شرکت	ماده	شرکت
کیت رنگ آمیزی گرم		کلرید سدیم	Merck
Cycloheximide	Sigma	پودر آگاروز	سیناژن
Nalidixic acid	Sigma	dNTP Mix (10mM)	Fermentase
اتانول ۹۶ درصد		MgCl ₂ (50 Mm)	Fermentase
آرژنین	Merck	پرایمر	Generay
آگار-آگار	Merck	گلیسرول	Merck
آب دیونیزه		بافر 10X PCR	Fermentase
اتانول مطلق	Merck	ISP media	Hi media
محلول اتیدیوم بر مایند	GenetBio	nutrient agar	Merck
آسپاراژین	Merck	Czapek-Dox agar	Merck
ایزوپروپانول	Merck	Bennet Agar	Merck
Taq DNA Polymerase	Fermentase	Peptone Yeast extract iron Agar	Merck
SDS	Merck	Nutrient broth	Merck
EDTA	Merck	نشاسته	Merck

جدول ۲-۳- ترکیب محیط کشت های استفاده شده

محیط کشت Tryptone-yeast extract broth (ISP I)	
۵ گرم	تریپتون
۳ گرم	عصاره مخمر
۱ لیتر	آب
قیل از اتوکلاو pH روی ۷ تا ۷/۲ تنظیم شود.	
Yeast extract- malt extract agar (ISP II) محیط کشت	
۴ گرم	عصاره مخمر
۱۰ گرم	عصاره مالت
۴ گرم	دکستروز
۱ لیتر	آب مقطر
۲۰ گرم	آگار
قیل از اتوکلاو pH روی ۷ تا ۷/۲ تنظیم شود.	
محیط کشت Oatmeal agar (ISP III)	
۲۰ گرم	آرد جو
۱۸ گرم	آگار
۱ میلی لیتر	محلول نمکهای کمیاب
۱ لیتر	آب مقطر
قیل از اتوکلاو pH روی ۷/۲ تنظیم شود.	
Inorganic salts-starch agar (ISP IV) محیط کشت	
۱ گرم	دی پتاسیم هیدروژن فسفات
۱ گرم	سولفات منیزیم ۷ آب
۱ گرم	کلرید سدیم
۲ گرم	سولفات امونیوم
۲ گرم	کربنات کلسیم
۱ میلی لیتر	محلول نمکهای کمیاب
۱ لیتر	آب مقطر
۲۰ گرم	آگار
قیل از اتوکلاو pH روی ۷/۴ تنظیم شود.	
Glycerol-asparagine agar (ISP V) محیط کشت	
۱	L-آسپاراژین
۵	گلیسرول
۱	دی پتاسیم هیدروژن فسفات
۱ میلی لیتر	محلول نمکهای کمیاب
۱ لیتر	آب مقطر

۲۰ گرم	آگار
قبل از اتوکلاو pH روی ۷ تا ۷/۴ تنظیم شود.	
Peptone-yeast extract iron agar (ISP VI) محیط کشت	
۳۶ گرم	محیط پپتون ایرون آگار
۱ گرم	عصاره مخمر
۱ لیتر	آب مقطر
قبل از اتوکلاو pH روی ۷ تا ۷/۲ تنظیم شود.	
Tyrosine agar (ISP VII) محیط کشت	
۱ گرم	L-آسپاراژین
۱۵ گرم	گلیسرول
۰/۵ گرم	L-تیروزین
۰/۵ گرم	دی پتاسیم هیدروژن فسفات
۰/۵ گرم	سولفات منیزیم ۷ آب
۰/۵ گرم	کلرید سدیم
۰/۰۱ گرم	سولفات آهن ۷ آب
۱ میلی لیتر	محلول نمکهای کمیاب
۱ لیتر	آب مقطر
۲۰ گرم	آگار
قبل از اتوکلاو pH روی ۷/۲ تا ۷/۴ تنظیم شود.	
Carbon utilization medium (ISP IX) محیط کشت	
غلظت نهایی ۱ درصد	منبع کربن مورد نظر
۱ میلی لیتر	محلول نمکهای کمیاب
۱ لیتر	محیط پایه نمکی آگار دار
قبل از اتوکلاو pH روی ۶/۸ تا ۷ تنظیم شود.	
Czapek-Dox agar	
۳۰	سوکروز
۲	نیتрат سدیم
۱	دی پتاسیم فسفات
۰/۵	سولفات منیزیم
۰/۵	کلرید پتاسیم
۰/۰۱	سولفات آهن
۱۵	آگار
قبل از اتوکلاو pH روی ۶/۸ تا ۷ تنظیم شود	
Bennet Agar	
۱	عصاره مخمر
۱	عصاره گوشت
۲	کازئین هیدرولیز شده

۱۰	دکستروز
۱۵	آگار
۱۰۰۰	آب مقطر
قبل از اتوکلاو pH روی ۷/۳ تنظیم شود.	

۲-۳- میکروارگانسیم های مورد استفاده در این تحقیق

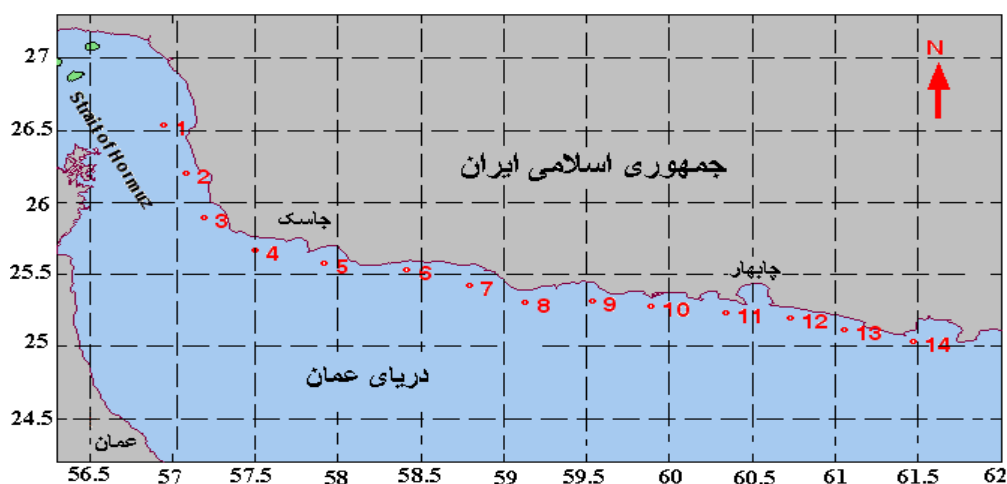
در این پژوهش سویه های باکتریایی و قارچی ذیل به منظور تعیین فعالیت ضد میکروبی اکتینومیست های جداسازی شده مورد استفاده قرار گرفتند.

<i>Escherichia coli</i>	PTCC: 1276
<i>Staphylococcus aureus</i>	PTCC: 1112
<i>Candida albicans</i>	PTCC: 19751

۲-۴- عملیات میدانی

۱-۲-۴- منطقه مورد مطالعه و تعیین ایستگاه های نمونه برداری

عملیات نمونه برداری این تحقیق همزمان با اجرای یکی از گشتهای تحقیقاتی دریایی پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان به انجام رسید. این گشت دریایی که در اردیبهشت ماه ۱۳۹۰ و با بکارگیری شناور صیادی-تحقیقاتی فردوس ۱ در دریای عمان انجام شد. منطقه مورد مطالعه بین طول جغرافیایی $30^{\circ} 56'$ تنگه هرمز تا $30^{\circ} 61'$ مرز پاکستان (منتهالیه بندر گواتر) و عرض جغرافیایی 25° تا $26^{\circ} 5'$ قرار داشت. در حین نمونه برداری مختصات جغرافیایی ایستگاهها توسط دستگاه GPS ثبت گردید. همچنین عمق هر ایستگاه بوسیله دستگاه اکوساندر اندازه گیری شد. تعیین ایستگاه ها بصورتی انجام شد که تمام منطقه مورد بررسی را در فواصل یکسان پوشش دهد. نمونه برداری به صورت تصادفی و تعداد نمونه بطور یکسان انتخاب شد. موقعیت جغرافیایی ایستگاه های نمونه برداری در شکل ۱-۲ نشان داده شده است.



شکل ۱-۲: موقعیت مکانی ایستگاه های نمونه برداری شده در دریای عمان

۲-۴-۲- نمونه برداری از رسوبات بستر دریا و نحوه نگهداری آنها

نمونه برداری از رسوبات بستر دریا با استفاده از یک دستگاه نمونه بردار رسوبات سطحی (Van Veen Grab) با سطح مقطع ۰/۱ متر مربع انجام شد. در کلیه ایستگاهها پس از اتمام عملیات نمونه برداری، بلافاصله محتویات رسوب داخل نمونه بردار به درون بطری های شیشه ای استریل منتقل و سپس در داخل یخچال با دمای حدود ۴ درجه سانتی گراد نگهداری گردید



شکل ۲-۲- دستگاه نمونه بردار رسوبات سطحی

۲-۵- عملیات آزمایشگاهی

۲-۵-۱- پیش تیمارهای فیزیکی

به منظور افزایش بازده جداسازی اکتسنومايست ها و حذف میکروارگانيسم های غیر هدف از تیمارهای فیزیکی حرارت دادن و خشک کردن در معرض هوا استفاده شد. تیمار حرارتی با انتقال نمونه های رسوب در شرایط آسپتیک^۱ به میزان یک گرم به پلیت های شیشه ای و حرارت دادن در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ دقیقه انجام شد. تیمار خشک کردن در معرض هوا پس از انتقال نمونه های رسوب به ظروف استریل و قرار دادن تحت هود لامینار به مدت دو هفته انجام شد. بدنبال آن رقیق سازی نمونه ها با استفاده از روش رقت متوالی تهیه شد (Hames-Kocabas *et al.*, 2012).

۲-۵-۲- جداسازی اکتینومایست‌ها از رسوبات دریایی

- روش انجام کشت

از نمونه رسوبات دریایی تهیه رقت شده و تیمار شده به میزان 10^6 بر روی محیط‌های کشت جداسازی ریخته شد. سپس با استفاده از لوله شیشه‌ای خمیده با روش پخش کردن در سطح پلیت^۷ کشت شدند. پلیت‌های کشت داده شده به صورت وارونه درون گرمخانه با دمای 28°C قرار داده شد. نمونه‌ها تا ۴ هفته از لحاظ رشد کلونی‌های اکتینومایست مورد بررسی قرار گرفتند (Zhang et al., 2008).

- خالص‌سازی سویه‌های جداسازی شده

مقداری از کلنی رشد یافته بر روی محیط جداسازی را بوسیله فیلدوپلاتین استریل بر روی پلیت جدید محتوی محیط کشت منتقل و به صورت خطی کشت داده و گرماگذاری شد. خالص‌سازی تا مرحله‌ای ادامه یافت که از خلوص کلونی بوسیله انجام رنگ آمیزی گرم و مشاهدات میکروسکوپی اختصاصی اطمینان حاصل شد.

- نگهداری ایزوله‌های اکتینومایست خالص شده

ایزوله‌های خالص شده بر روی محیط کشت ISP II به صورت شیدار درون لوله آزمایش کشت داده شدند. پس از گرماگذاری و رشد روی آنها گلیسرول ریخته و در دمای 20°C - نگهداری شدند (Dworkin et al., 2006).

۲-۵-۳- بررسی فعالیت ضد میکروبی ایزوله‌های اکتینومایست

- غربالگری و ارزیابی فعالیت ضد میکروبی ایزوله‌های اکتینومایست

فعالیت ضد میکروبی ایزوله‌های اکتینومایست در مقابل سویه‌های استاندارد مورد نظر با استفاده از روش آگار رویی^۸ انجام شد (Dworkin et al., 2006). به منظور تایید تولید ترکیبات آنتی بیوتیک روش انتشار از چاهک^۹ مورد استفاده قرار گرفت (Madigan et al. 1997).

- تولید متابولیت‌های ضد میکروبی

سوسپانسیون اسپوری جدایه‌های منتخب مولد ترکیبات فعال با تعداد 10^5 CFU/ml در محیط بهینه جوانه زدن^{۱۰} با ترکیب ۱ درصد پیتون، ۱ درصد عصاره مالت و ۲ درصد گلیسرول تلقیح شدند. پس از گرماگذاری در دمای 30°C

⁷ Plate Spreading

⁸ Overlay method

⁹ Well diffusion method

¹⁰ Seeding medium

۲۸ با دور RPM ۲۲۰ و ایجاد میسلیوم‌های به محیط بهینه تولید PM-1 منتقل شدند. پس از اتمام دوره ۵ روزه گرماگذاری با شرایط قبلی، مایع تخمیری حاصله با استفاده از سیستم فیلتراسیون میلی پور فیلتر گردید.

- استخراج متابولیت‌های ثانویه

مایع تخمیری بدست آمده از هر سویه با استفاده از روش استخراج مایع-مایع استخراج شد. مایع تخمیری و حلال اتیل استات با نسبت حجمی (۱:۱) طی سه مرحله مخلوط شدند. پس از همزدن به مدت یک ساعت درون قیف جداکننده ریخته و فاز آبی و آلی جدا شدند. فاز اتیل استات جمع آوری شده و تحت خلا با سیستم تبخیر کننده چرخان^{۱۱} خشک گردید.

- تعیین حداقل غلظت‌های بازدارندگی^{۱۲} (MIC) و کشندگی (MBC) آنتی بیوتیک‌های تولید شده

حداقل غلظت‌های بازدارنده و کشنده آنتی بیوتیک‌های تولید شده توسط ایزوله‌های مولد در مقابل سویه‌های بیماری زای مورد آزمون بر اساس روش استاندارد میکرودايلوشن برات^{۱۳} انجام شد (CLSI 2015). از آنتی بیوتیک‌های ضد باکتریایی استرپتومایسین و ضد قارچی کتوکونازول به عنوان کنترل مثبت در جهت تضمین کیفیت و اعتبار بخشی به نتایج استفاده شد. جهت تعیین MBC از چاهک‌های فاقد رشد در محیط کشت MHA تلقیح گردید. کمترین غلظت بدون رشد به عنوان میزان MBC ثبت شد.

۴-۵-۲- بررسی کینتیک رشد و تولید آنتی بیوتیک توسط ایزوله‌های مولد

کینتیک رشد ایزوله‌های مولد بر اساس سنجش بیومس در بازه‌های زمانی ۲۴ ساعته به مدت ۶ روز تعیین گردید. وزن بیومس تولید شده در هر بازه زمانی ثبت شد. کینتیک تولید آنتی بیوتیک بر اساس قطر هاله ممانعت از رشد در در بازه‌های زمانی ۲۴ ساعته به مدت ۶ روز اندازه‌گیری و ثبت گردید. (Dutta., 2010).

۵-۵-۲- شناسایی اکتینومایست‌های تولید کننده آنتی بیوتیک جدا شده

۱-۵-۵-۲- بررسی ویژگیهای مورفولوژیک

- کشت سویه‌های اکتینومایست به منظور مطالعات مورفولوژی میکروسکوپی

کشت روی لام^{۱۴}: با اسکالپل از محیط ISP II قطعاتی به مساحت یک سانتی متر مربع و قطر ۳ mm بریده شد و روی لام استریل قرار گرفته بر روی لوله U شکل در پلیت شیشه ای حاوی ۲ ml آب مقطر استریل قرار گرفت

¹¹ Rotary evaporator

¹² Minimum inhibitory concentration

¹³ Microdilution Broth

¹⁴ slide culture

چهار ضلع محیط بوسیله فیلدو پلاتین با مقدار کمی باکتری کشت داده شد سپس لامل استریل روی آن قرار داده شد و به مدت ۱۴ روز در دمای 28°C گرماگذاری شد. از روز چهارم مورفولوژی میسلیم هوایی هر روز تحت شرایط سترون بررسی می شود (Goodfellow *et al.*, 2012).

- بررسی رشد و مورفولوژی سویه های اکتینومايست روی محیط های مختلف

میزان رشد سویه ها، رنگ میسلیم رویشی، رنگ میسلیم هوایی، تشکیل اسپور و تولید پیگمان محلول در آب بر روی محیط های مختلف شامل: Nutrient Agar, ISP VII, ISP VI, ISPV, ISPIV, ISP III, ISP II, Czapek-Dox Agar, Bennet Agar و Agar شناسایی و مورد بررسی قرار گرفت (Goodfellow *et al.*, 2012).

۲-۵-۵-۲- بررسی خصوصیات فیزیولوژیک

- بررسی تولید پیگمان محلول غیر ملانوییدی

توانایی تولید پیگمان های محلول بر روی محیط Nutrient Agar, Czapek-Dox Agar, ISP V, ISPIV, ISP III, ISP II و Bennet Agar با ۱۴ روز گرماگذاری در 28°C بررسی شد (Goodfellow *et al.*, 2012).

- بررسی تولید پیگمان ملانوییدی

با استفاده از محیط های Peptone Yeast extract iron Agar و Tyrosine Agar بعد از ۱۴ روز گرماگذاری در 28°C بررسی شد (Goodfellow *et al.*, 2012).

- بررسی محدوده دمای رشد

توانایی ایزوله ها برای رشد در دماهای مختلف با استفاده از محیط بنت آگار اصلاح شده بررسی شد. پس از تلقیح محیط کشت با مایع تلقیح رشد ایزوله ها در دماهای 4°C , 20°C , 30°C , 35°C , 40°C درجه سانتیگراد بعد از یک هفته بررسی شد (Goodfellow *et al.*, 2012).

- بررسی محدوده رشد در pH های مختلف

توانایی ایزوله ها برای رشد در pH های مختلف با استفاده از محیط بنت آگار اصلاح شده بررسی شد. پس از تلقیح محیط کشت با مایع تلقیح رشد ایزوله ها در pH های 5 , 6 , 7 , 8 , 9 درجه سانتیگراد بعد از یک هفته بررسی شد (Goodfellow *et al.*, 2012).

۳-۵-۲- بررسی ویژگی های کموتاکسونومیک

- تعیین نوع ایزومر اسید آمینه دی آمینوپایمیلیک اسید دیواره سلولی

ویژگی های کموتاکسونومیک از قبیل ترکیب دی آمینوپایمیلیک اسید دیواره سلولی ایزوله های اکتینوماست دارای فعالیت ضد میکروبی با استفاده از روش Ruan مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور پس از تهیه بیومس مناسب از ایزوله مورد نظر و انجام فرایندهای هیدرولیز اقدام به انجام کروماتوگرافی لایه نازک گردید. پس از عمل آشکارسازی صفحه کروماتوگرافی R_f هر نمونه با نمونه های شاهد مورد مقایسه قرار گرفت و نوع ایزومر دیواره سلولی تعیین شد (Ruan, 1994).

۴-۵-۲- بررسی ویژگیهای ژنتیکی

- استخراج DNA ایزوله های مولد

استخراج DNA ژنومی ایزوله های مولد با استفاده از روش تغییر یافته Ezaki انجام شد. بدین منظور بیومس مناسب با توجه به مرحله رشد باکتری تهیه شد. بدنبال آن انجام فرایند پاکسازی بیومس صورت گرفت. مراحل مختلف لیز سلولی، پروتئین زدایی و خالص سازی DNA ژنومی صورت گرفت (Ezaki et al. 1990). به منظور بررسی کمیت DNA استخراج شده جذب نمونه استخراج شده در طول موج های ۲۶۰، ۲۳۰ و ۲۸۰ نانومتر با استفاده از روش اسپکتروفوتومتری اندازه گیری شد و نسبت جذب در هر طول موج تعیین شد. و غلظت DNA ژنومی استخراج شده بدست آمد. کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

- تکثیر ژن 16S rRNA ایزوله های مولد

به منظور تکثیر ژن 16S rRNA از واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) استفاده شد. بدین منظور از ترکیب واکنش PCR با فرمول زیر استفاده شد. برنامه زنجیره دمایی واکنش PCR در جدول ۲ نشان داده شده است. پس از انجام واکنش کیفیت محصول PCR تولید شده با استفاده از روش الکتروفورز روی ژل آگاروز مورد ارزیابی قرار گرفت.

جدول ۱-۲- ترکیب واکنش PCR جهت تکثیر ژن 16s rRNA

غلظت نهایی	حجم (μl)	اجزا واکنش
۱X	۵	بافر ۱۰ X
۴ mM	۳	Mgcl ₂
۰/۲mM	۵	dNTPs
۱۰ pmol	۱	برایمر رفت
۱۰ pmol	۱	برایمر برگشت
۱ u/μl	۰.۳	پلیمراز Taq
۱۰ pg	۱	DNA زئومی
-	تا ۵۰ μl	آب مقطر
	۵۰	حجم کل

جدول ۲-۲- برنامه زنجیره دمایی واکنش PCR جهت تکثیر ژن 16s rRNA

مدت زمان (ثانیه)	درجه حرارت (°C)	مرحله
۲۴۰	۹۴	واسرشت سازی اولیه
۶۰	۹۴	واسرشت سازی
۶۰	۶۰	اتصال
۱۲۰	۷۲	گسترش
۳۰۰	۷۲	گسترش نهایی
	۳۵	تعداد چرخه

-تعیین توالی ژن 16S rRNA ایزوله های مولد

محصول PCR تولید شده طبق دستورالعمل شرکت Promega آماده سازی و با واسطه به شرکت مزبور ارسال شد. تعیین توالی ژن 16S rRNA تکثیر شده با استفاده از روش sanger و تکنیک a Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing kit انجام گردید.

-تعیین کیفیت توالی ژن 16S rRNA و آنالیز تطابق ایزوله های مولد

ارزیابی کیفیت توالی های ژن 16S rRNA بدست آمده با استفاده از نرم افزار DNA BASER Sequence Assembler 4.10 انجام شد. پس از اطمینان از کیفیت مطلوب توالی های بدست آمده اقدام به مقایسه و تطابق این

توالی‌ها در مقابل توالی‌های ژن 16S rRNA سایر سویه‌های موجود در بانک ژن^{۱۵} NCBI گردید. بدین منظور از نرم افزار Megablast استفاده شد (Zhang et al., 2000).

-آنالیز فیلوژنتیک ایزوله‌های مولد

به منظور بررسی فاصله ژنتیکی و تکاملی ایزوله‌های مولد و درک جایگاه تاکسونومیک سویه‌ها نسبت به هم از مدل‌های آنالیز فیلوژنتیک و رسم درخت با الگوهای متفاوت بر اساس روش‌های neighbor-joining و Maximum Likelihood استفاده گردید. رسم درخت فیلوژنتیک پس از هم تراز کردن توالی‌های منتخب بوسیله نرم افزار MEGA6 انجام شد (Tamura et al, 2013).

۲-۶- تجزیه و تحلیل آماری

تمامی آزمون‌ها با سه تکرار انجام شد. نتایج غربالگری فعالیت ضد میکروبی بصورت میانگین \pm انحراف استاندارد ارائه شد. نتایج تنوع زیستی بصورت درصد بیان شد. محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار Excell 2013 MicrosoftTM انجام گردید (Microsoft, Seattle, WA). معناداری آماری توپولوژی درخت ترسیم شده با آنالیز bootstrap بر اساس ۱۰۰۰ تکرار (Felsenstein 1985) و با نرم افزار MEGA 7 محاسبه شد.

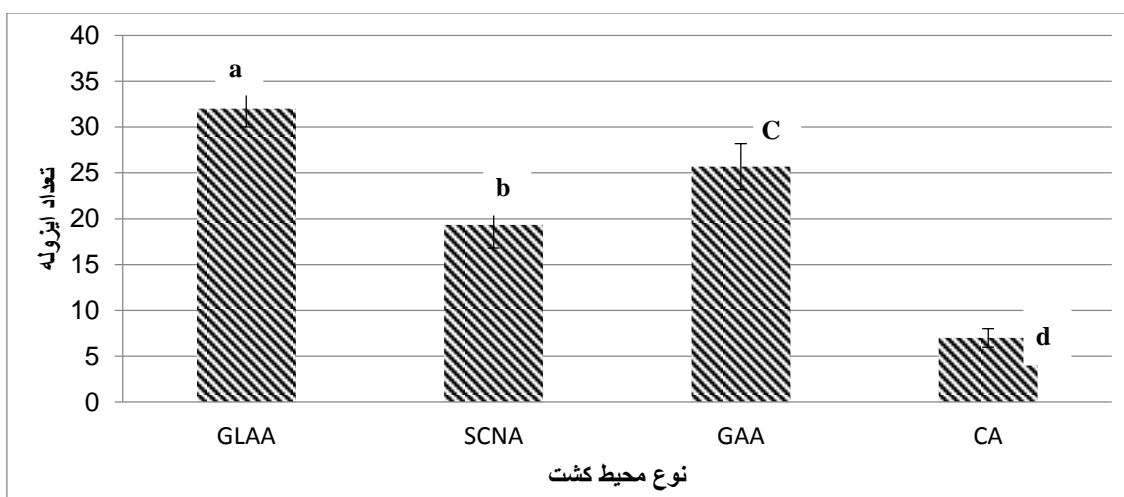
¹⁵ National center for Biotechnology information

۳- نتایج

۳-۱- جداسازی اکتینومایست‌ها از نمونه‌های رسوب دریایی

۳-۱-۱- ارزیابی کارایی محیط‌های کشت مختلف در جداسازی اکتینومایست‌ها

بدنبال جمع آوری ۱۴ نمونه رسوب و انجام تیمارهای مورد نظر کشت نمونه‌ها انجام شد. مرحله جداسازی با استفاده از ۴ محیط کشت جداسازی شامل کیتین آگار (CA)، گلیسرول آرژنین آگار (GAA)، گلوکز آسپاراژین آگار (GLAA) و نشاسته کازئین نترات آگار (SCNA) انجام گردید. در مجموع حدود ۸۴ ایزوله اکتینومایست بدست آمد. فراوانی ایزوله‌های اکتینومایست در محیط‌های کشت در شکل ۳-۱ نشان داده شده است. محیط کشت GLAA با جداسازی میانگین ۳۲ ایزوله محیط کشت مناسبی برای جداسازی اکتینومایست‌ها از نمونه‌های رسوب دریایی عمان ارزیابی شد. بدنبال آن محیط‌های کشت GAA و SCNA بترتیب با جداسازی میانگین ۲۵/۶۶ و ۱۹/۳۳ در مرحله بعدی قرار گرفتند. آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون تعقیبی توکی بیانگر معنادار بودن اختلاف میزان جداسازی اکتینومایست‌ها در میان محیط‌های کشت مختلف بود ($p < 0/05$).



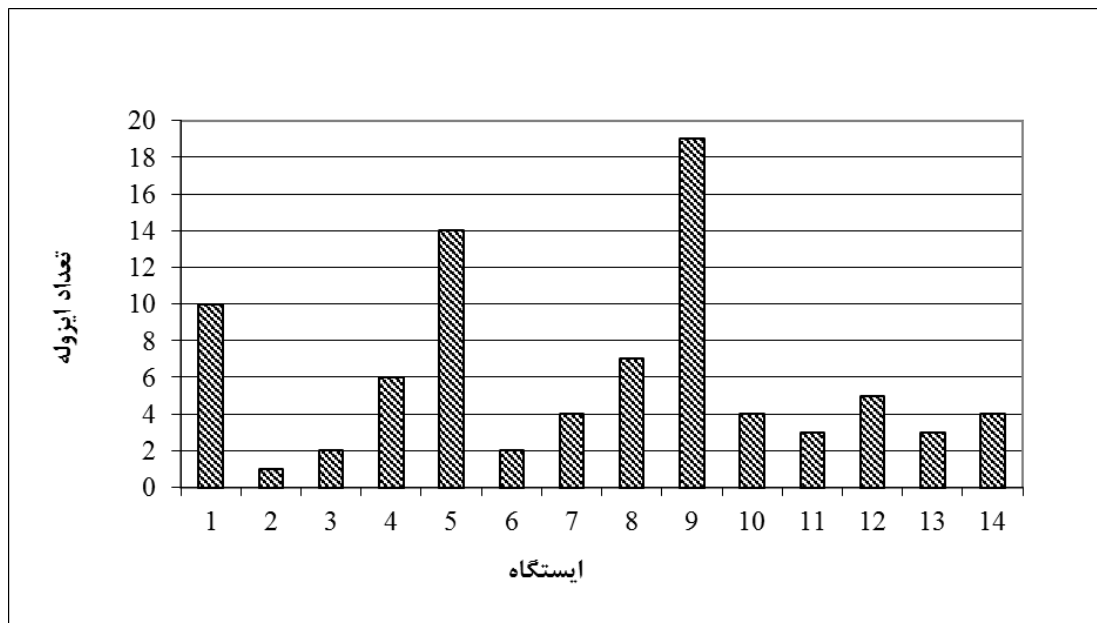
شکل ۳-۱- بررسی میزان جداسازی اکتینومایست‌ها از نمونه‌های رسوبات دریایی با استفاده از محیط‌های جداسازی مختلف (حروف لاتین مختلف بالای هر ستون بیانگر معنادار بودن در سطح $p < 0/05$ می باشد).

۳-۱-۲- تفکیک ایزوله‌های اکتینومایست بر اساس مکان نمونه برداری

مکان جداسازی هر کدام از ایزوله‌های بدست آمده از رسوبات به تفکیک ایستگاه‌های نمونه برداری در جدول ۳-۱ مشخص گردید. همچنین میزان جداسازی ایزوله‌های اکتینومایست در هر ایستگاه نمونه برداری تعیین شد (شکل ۳-۲).

جدول ۳-۱- تعیین مکان جداسازی ایزوله های اکتینومايست به تفکیک ایستگاه های نمونه برداری

شماره ایستگاه	عمق ایستگاه (متر)	شماره ایزوله
۱	۳۴	۳۱-۳۰-۲۹-۲۸-۲۷-۲۶-۲۵-۲۳-۲۲-۲۱
۲	۵۴	۴۱
۳	۴۸	۴۰-۳۹
۴	۴۶	۷۰-۴۸-۴۹-۵۰-۵۱-۵۲
۵	۲۹	۲۲۲-۱۸۱-۱۸۰-۲۱۴-۲۰۲-۱۲۰-۱۲۵-۱۲۱-۱۱۶-۱۱۵-۱۱۴-۱۱۳-۱۱۲-۱۱۱
۶	۴۹	۱۴-۱۳
۷	۳۸	۲۰-۱۲-۱۰-۹
۸	۳۲	۶۳-۵۹-۵۸-۴۹-۴۸-۴۶-۴۵
۹	۱۸	-۲۴۵-۲۴۳-۲۴۲-۱۹۲-۱۹۱-۲۱۲-۲۴۱-۲۳۸-۱۹۹-۱۹۵-۱۹۸-۱۹۴-۱۹۳ ۲۶۳-۲۶۰-۲۵۹-۲۵۳-۲۴۹-۲۴۸
۱۰	۵۳	۴۳-۴۵-۴۶-۶۰
۱۱	۴۲	۸۹-۸۵-۸۳
۱۲	۳۵	۸-۲-۱
۱۳	۵۲	۱۴۰-۱۳۹-۱۳۷
۱۴	۳۸	۱۶۴-۱۵۸-۱۵۲-۱۴۵



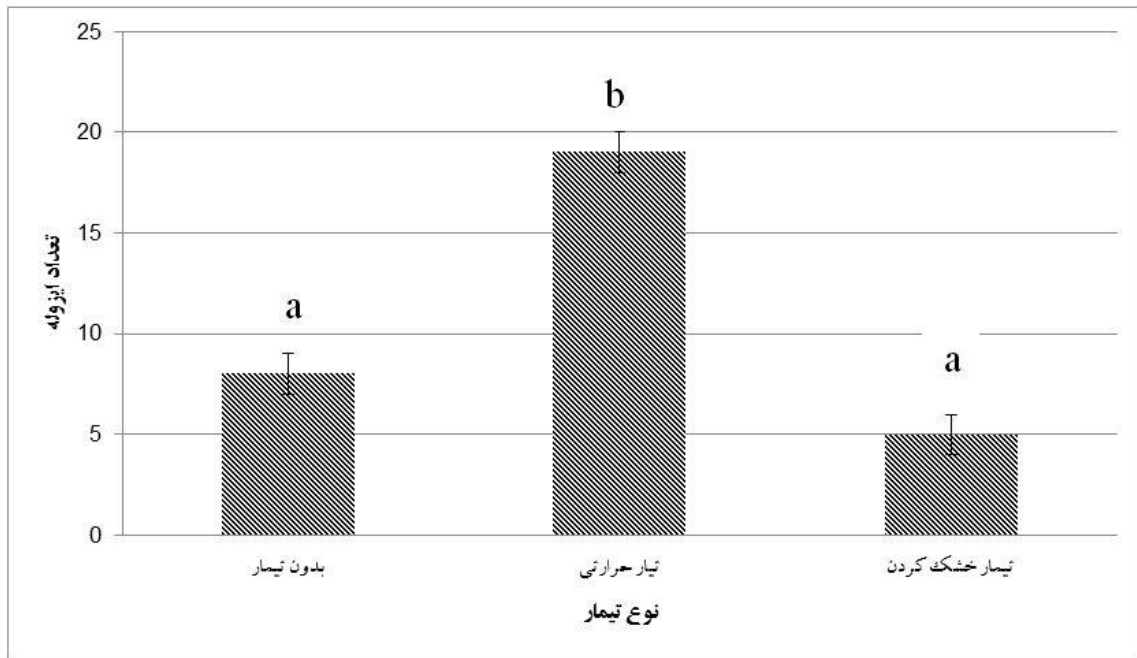
شکل ۳-۲- تعداد ایزوله به تفکیک ایستگاه نمونه برداری

۳-۱-۳- بررسی اثر تیمارهای فیزیکی بر جداسازی اکتینومایست ها

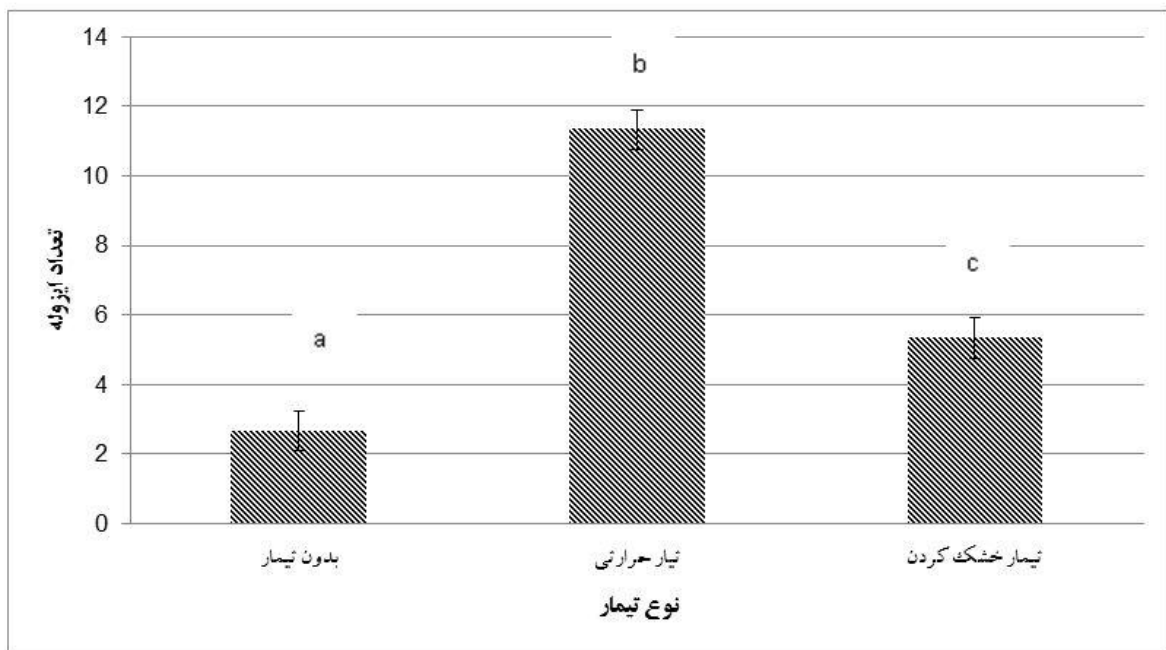
جهت افزایش بازده جداسازی اکتینومایست ها و حذف یا کاهش قارچها و باکتریهای غیر هدف موجود در نمونه رسوب از تیمارهای حرارتی استفاده شد. نتایج انجام تیمارهای فیزیکی و بدنیال آن کشت نمونه در محیط های مختلف نشان داد که در تمام محیط های جداسازی تیمار حرارتی با جداسازی متوسط ۵۵/۶۶ بیشترین کارایی را ارائه نمود (شکل های ۳-۳، ۳-۴، ۳-۵، ۳-۶). تجزیه تحلیل آماری با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون تعقیبی توکی بیانگر معنادار بودن اختلاف آماری در سطح $p > 0.05$ بین ستون های دارای حروف لاتین متفاوت می باشد. بنابر این میزان اختلاف معناداری بین تیمار خشک کردن و بدون تیمار در نمونه های جداسازی شده در محیط GLAA و GAA مشاهده نشد. در حالیکه در محیط کشت های SCNA و CA اختلاف میانگین جداسازی محیط کشت معنادار بود ($p > 0.05$).



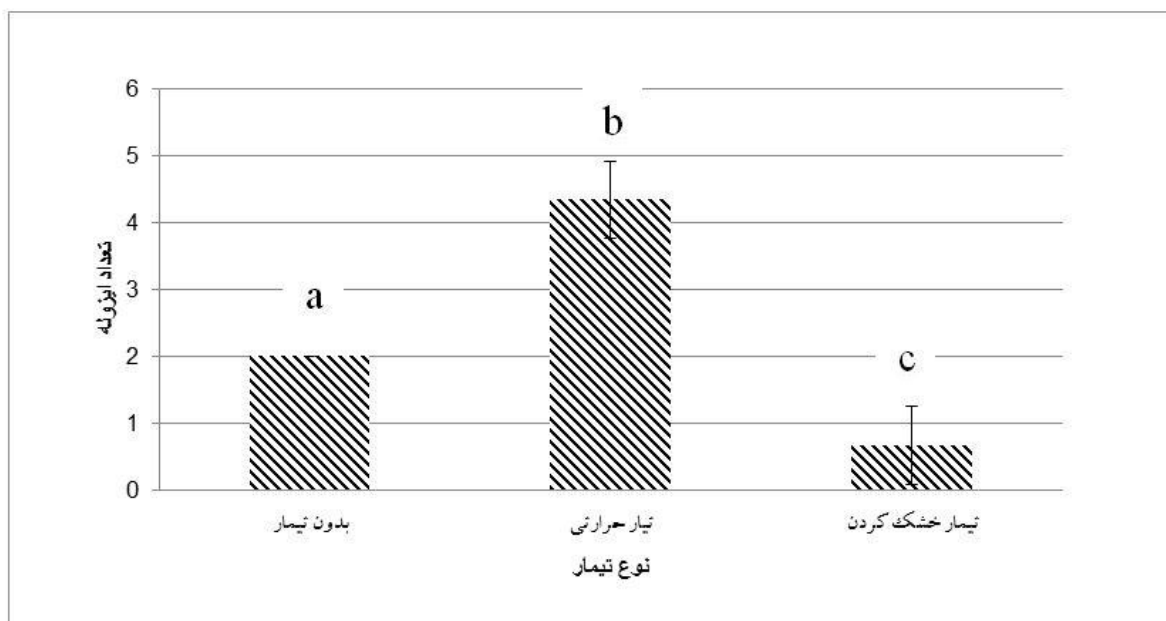
شکل ۳-۳- بررسی اثر تیمارهای فیزیکی بر میزان جداسازی در محیط کشت GAA (حروف لاتین مختلف بالای هر ستون بیانگر معنادار بودن در سطح $p < 0.05$ می باشد)



شکل ۳-۴- بررسی اثر تیمارهای فیزیکی بر میزان جداسازی در محیط کشت GLAA (حروف لاتین مختلف بالای هر ستون بیانگر معنادار بودن در سطح $p < 0.05$ می باشد)



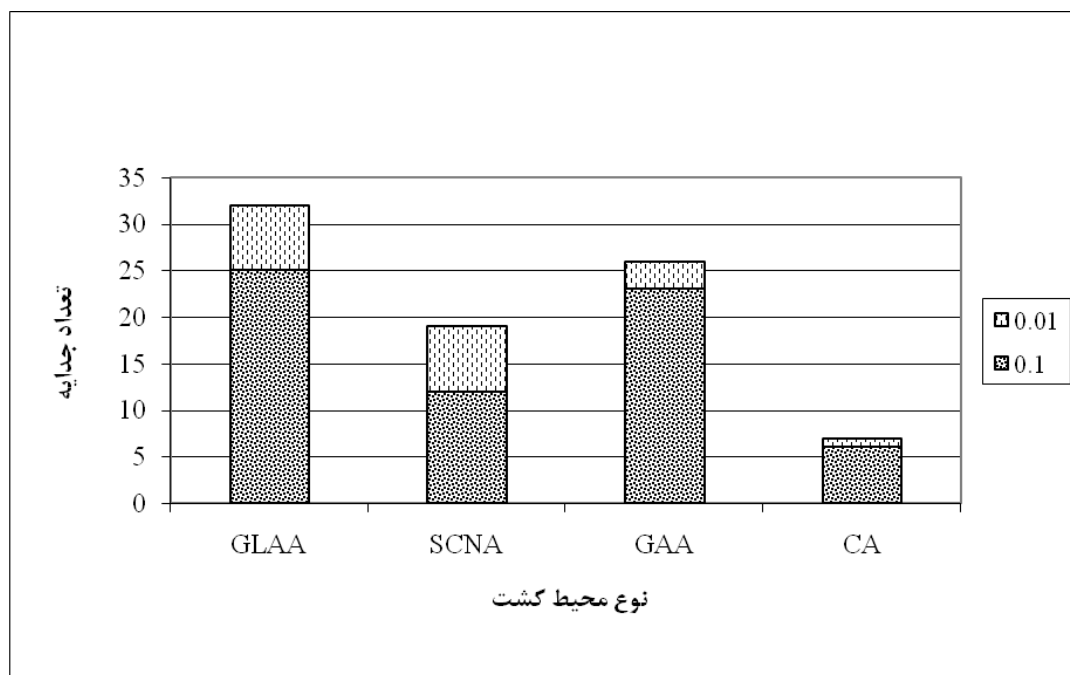
شکل ۳-۵- بررسی اثر تیمارهای فیزیکی بر میزان جداسازی در محیط کشت SCNA (حروف لاتین مختلف بالای هر ستون بیانگر معنادار بودن در سطح $p < 0.05$ می باشد)



شکل ۳-۶- بررسی اثر تیمارهای فیزیکی بر میزان جداسازی در محیط کشت CA (حروف لاتین مختلف بالای هر ستون بیانگر معنادار بودن در سطح $p < 0.05$ می باشد)

۳-۱-۴- بررسی تاثیر رقیق سازی بر جداسازی اکتینومایست ها

بررسی اثر رقیق سازی نمونه های تیمار شده بر میزان جداسازی ایزوله های اکتینومایست بیانگر بیشترین میزان جداسازی در رقت ۰/۱ در تمام محیط های کشت بود (شکل ۳-۷).



شکل ۳-۷- بررسی تاثیر میزان رقیق سازی بر جداسازی اکتینومایست ها

۳-۲- ارزیابی فعالیت ضد میکروبی ایزوله‌های اکتینومیست

۳-۲-۱- ارزیابی فعالیت ضد میکروبی ایزوله‌های اکتینومیست در مقابل *S. aureus*

تمام ۸۴ ایزوله اکتینومیست بدست آمده به منظور ارزیابی فعالیت ضد میکروبی در مقابل سویه استاندارد *S. aureus* مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج غربالگری فعالیت ضد میکروبی با روش آگار دولایه نشان داد ایزوله‌های IFSIRI 70، IFSIRI 137، IFSIRI 145، IFSIRI 193، IFSIRI 214 فعالیت ضد میکروبی بالایی را ارائه نمودند (جدول ۳-۲). در مجموع ۲۰ ایزوله معادل ۲۳ درصد ایزوله‌های مورد بررسی فعالیت ضد میکروبی علیه *S. aureus* نشان دادند. به منظور بررسی تولید ترکیبات ضد میکروبی ایزوله‌های مولد از روش انتشار از چاهک استفاده شد. نتایج نشان داد اکثر ایزوله‌های مولد در غربالگری اولیه قادر به تولید ترکیبات ضد میکروبی علیه *S. aureus* می‌باشند. در بین ایزوله‌های IFSIRI 70، IFSIRI 137، IFSIRI 145، IFSIRI 193، IFSIRI 214 با میانگین هاله ممانعت از رشد بترتیب ۱۵/۶۶، ۲۵، ۱۶/۱۶، ۳۳ و ۳۲/۶۶ بیشترین میزان ترکیبات ضد میکروبی را تولید نمودند (جدول ۳-۳).

جدول ۳-۲- ارزیابی فعالیت ضد میکروبی ایزوله‌های اکتینومیست در مقابل *S. aureus* با روش آگار دو لایه

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

نام سویه	قطر هاله ممانعت از رشد	نام سویه	قطر هاله ممانعت از رشد
IFSIRI 120	+	IFSIRI 184	++
IFSIRI 125	+	IFSIRI 192	++
IFSIRI 70	+++	IFSIRI 193	++++
IFSIRI 130	++	IFSIRI 200	++
IFSIRI 137	++++	IFSIRI 214	++++
IFSIRI 139	++	IFSIRI 215	+
IFSIRI 147	++	IFSIRI 218	+
IFSIRI 145	+++	IFSIRI 219	+
IFSIRI 160	+	IFSIRI 220	++
IFSIRI 171	++	IFSIRI 223	+

جدول ۳-۳- ارزیابی فعالیت ضد میکروبی ایزوله‌های اکتینومایست در مقابل *S. aureus* با روش انتشار از پلیت

نام سویه	قطر هاله ممانعت از رشد	نام سویه	قطر هاله ممانعت از رشد
IFSIRI 70	۰/۵۷ ± ۱۵/۶۶	IFSIRI 184	۰/۵۷ ± ۱۴/۱۶
IFSIRI 130	۰/۵۷ ± ۱۲/۱۶	IFSIRI 192	۱/۱۵ ± ۱۱/۳۳
IFSIRI 137	۰ ± ۲۵	IFSIRI 193	۱ ± ۳۳
IFSIRI 139	۰/۵۷ ± ۱۲/۶۶	IFSIRI 200	۰/۵۷ ± ۱۲/۶۶
IFSIRI 145	۱/۱۵ ± ۱۶/۱۶	IFSIRI 214	۱/۱۵ ± ۳۲/۶۶
IFSIRI 147	۰/۵۷ ± ۱۲/۶۶	IFSIRI 220	۰/۵۷ ± ۱۴/۱۶
IFSIRI 171	۰/۵۷ ± ۱۲/۳۳		

۲-۲-۳- ارزیابی فعالیت ضد میکروبی ایزوله‌های اکتینومایست در مقابل *E. coli*

تمام ۸۴ ایزوله اکتینومایست بدست آمده به منظور ارزیابی فعالیت ضد میکروبی در مقابل سویه استاندارد *E. coli* مورد بررسی قرار گرفتند. غربالگری فعالیت ضد میکروبی با روش آگار دولایه نشان داد ایزوله‌های IFSIRI 70، IFSIRI 137، IFSIRI 145، IFSIRI 214 فعالیت ضد میکروبی بالایی را ارائه نمودند (جدول ۳-۴). در مجموع ۱۰ ایزوله معادل ۱۱/۹ درصد ایزوله‌های مورد بررسی فعالیت ضد میکروبی علیه *E. coli* نشان دادند. به منظور بررسی تولید ترکیبات ضد میکروبی ایزوله‌های مولد از روش انتشار از چاهک استفاده شد. نتایج نشان داد اکثر ایزوله‌های مولد در غربالگری اولیه قادر به تولید ترکیبات ضد میکروبی علیه *E. coli* می‌باشند. در بین ایزوله‌های IFSIRI 70، IFSIRI 137، IFSIRI 145، IFSIRI 214 با میانگین هاله ممانعت از رشد بترتیب ۱۴/۳۳، ۱۹/۳۳، ۱۴/۳۳ و ۲۵/۳۳ بیشترین میزان ترکیبات ضد میکروبی را تولید نمودند (جدول ۳-۵).

جدول ۳-۴- ارزیابی فعالیت ضد میکروبی ایزوله‌های اکتینومایست در مقابل *E. coli* با روش آگار دو لایه

نام سویه	قطر هاله ممانعت از رشد	نام سویه	قطر هاله ممانعت از رشد
+	IFSIRI 193	++	IFSIRI 70
+	IFSIRI 200	+++	IFSIRI 137
+++	IFSIRI 214	++	IFSIRI 145
+	IFSIRI 218	+	IFSIRI 171
+	IFSIRI 220	+	IFSIRI 192

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

جدول ۳-۵- ارزیابی فعالیت ضد میکروبی ایزوله‌های اکتینومایست در مقابل *E. coli* با روش انتشار از پلیت

نام سویه	قطر هاله ممانعت از رشد	نام سویه	قطر هاله ممانعت از رشد
IFSIRI 70	۱ ± ۱۴/۳۳	IFSIRI 214	۰/۷۵ ± ۲۵/۳۳
IFSIRI 137	۰/۵۷ ± ۱۹/۳۳		
IFSIRI 145	۰/۵۷ ± ۱۴/۳۳		

۳-۲-۳- ارزیابی فعالیت ضد میکروبی ایزوله‌های اکتینومیست در مقابل *C. albicans*

تمام ۸۴ ایزوله اکتینومیست بدست آمده به منظور ارزیابی فعالیت ضد میکروبی در مقابل سویه استاندارد *C. albicans* مورد بررسی قرار گرفتند. غربالگری فعالیت ضد میکروبی با روش آگار دولایه نشان داد ایزوله‌های IFSIRI 70، IFSIRI 137، IFSIRI 145، IFSIRI 214 فعالیت ضد میکروبی بالایی را ارائه نمودند (جدول ۳-۶). در مجموع ۱۸ ایزوله معادل ۲۲/۶۱ درصد ایزوله‌های مورد بررسی فعالیت ضد میکروبی علیه *C. albicans* نشان دادند. به منظور بررسی تولید ترکیبات ضد میکروبی ایزوله‌های مولد از روش انتشار از چاهک استفاده شد. نتایج نشان داد اکثر ایزوله‌های مولد در غربالگری اولیه قادر به تولید ترکیبات ضد میکروبی علیه *C. albicans* می‌باشند. در بین ایزوله‌های IFSIRI 70، IFSIRI 137، IFSIRI 145، IFSIRI 214 با میانگین هاله ممانعت از رشد بترتیب ۱۴/۳۳، ۲۲، ۱۳/۳۳ و ۱۷/۳۳ بیشترین میزان ترکیبات ضد میکروبی را تولید نمودند (جدول ۳-۷).

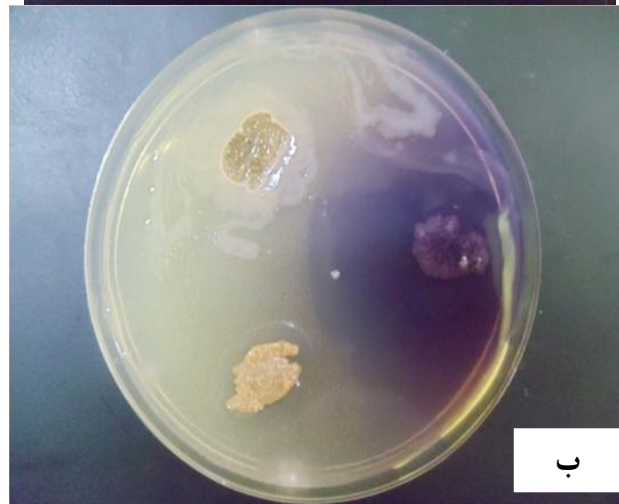
جدول ۳-۶- ارزیابی فعالیت ضد میکروبی ایزوله‌های اکتینومیست در مقابل *C. albicans*

نام سویه	قطر هاله ممانعت از رشد	نام سویه	قطر هاله ممانعت از رشد
IFSIRI 120	+	IFSIRI 192	++
IFSIRI 125	+	IFSIRI 200	++
IFSIRI 70	++	IFSIRI 207	+
IFSIRI 130	++	IFSIRI 214	+++
IFSIRI 137	++++	IFSIRI 218	+
IFSIRI 139	++	IFSIRI 219	++
IFSIRI 147	++	IFSIRI 220	++
IFSIRI 145	++	IFSIRI 223	+
IFSIRI 160	+		
IFSIRI 184	++		

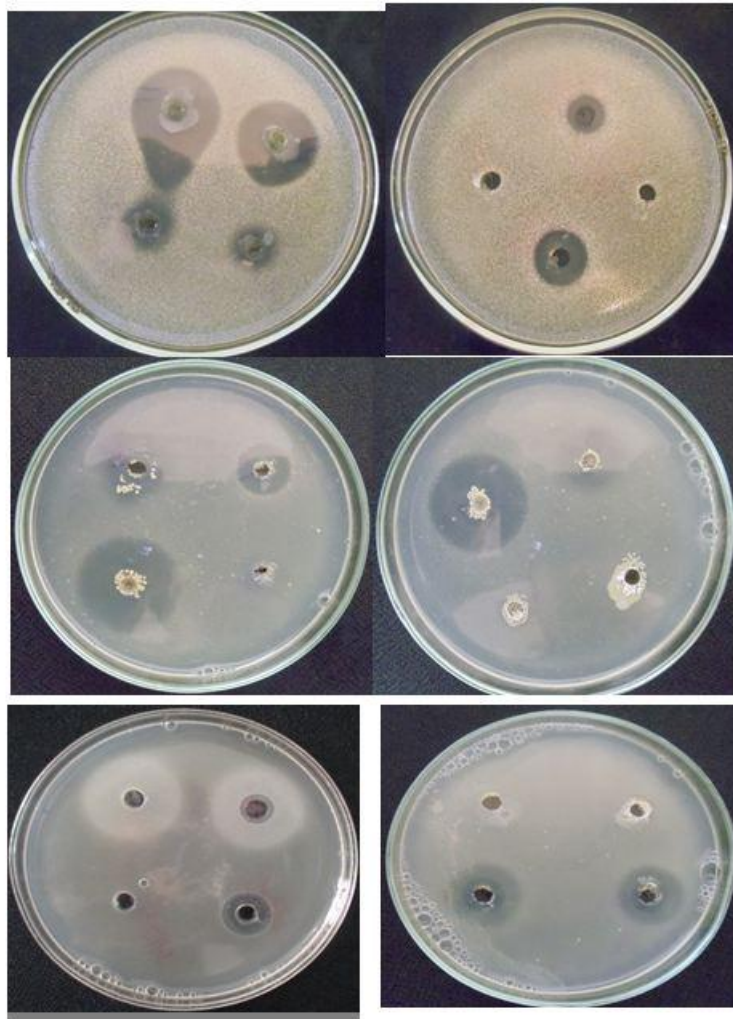
قطر هاله ممانعت از رشد: + < ۱۰ mm ، ++ ۱۰-۲۰ mm ، +++ ۲۰-۳۰ mm ، <++++ ۳۰ mm

جدول ۳-۷- ارزیابی فعالیت ضد میکروبی ایزوله‌های اکتینومیست در مقابل *C. albicans* با روش انتشار از چاهک

نام سویه	قطر هاله ممانعت از رشد	نام سویه	قطر هاله ممانعت از رشد
IFSIRI 70	۰/۵۷ ± ۱۴/۳۳	IFSIRI 192	۱/۱۵ ± ۱۱
IFSIRI 130	۰/۵۷ ± ۱۲/۶۶	IFSIRI 200	۱ ± ۱۰
IFSIRI 137	۰/۵۷ ± ۲۲	IFSIRI 214	۰/۵۷ ± ۱۷/۳۳
IFSIRI 139	۰/۵۷ ± ۱۱/۳۳	IFSIRI 219	۰ ± ۱۴
IFSIRI 147	۰/۵۷ ± ۱۲/۶۶	IFSIRI 220	۰ ± ۱۳
IFSIRI 145	۰/۵۷ ± ۱۳/۳۳		
IFSIRI 184	۱ ± ۱۲		



شکل ۳-۸- فعالیت ضد میکروبی ایزوله‌های جدا شده در مقابل الف: *C. albicans* ب: *E. coli* ج: *S. aureus*



شکل ۳-۹- تولید ترکیبات ضد میکروبی توسط ایزوله‌های بدست آمده با روش انتشار از چاهک

۴-۲-۳- تعیین حداقل غلظت‌های بازدارندگی و کشندگی ترکیبات آنتی بیوتیک

بررسی حداقل غلظت بازدارندگی آنتی بیوتیک‌های تولید شده در مقابل *S. aureus* از ۱۲۸ تا ۲۵۶ $\mu\text{g/ml}$ متغیر بود. در حالیکه غلظت کشندگی در محدوده ۱۲۸ تا ۵۱۲ $\mu\text{g/ml}$ ثبت گردید. آنتی بیوتیک‌های تولید شده در مقابل *E. coli* حداقل غلظت بازدارندگی از ۱۲۸ تا ۵۱۲ $\mu\text{g/ml}$ را نشان دادند. غلظت کشندگی ترکیبات آنتی بیوتیکی مورد بررسی در مقابل *E. coli* از ۲۵۶ تا ۱۰۰۰ $\mu\text{g/ml}$ گزارش شد. متابولیت‌های آنتی بیوتیک مورد بررسی حداقل غلظت بازدارندگی در مقابل *C. albicans* از ۶۴ تا ۱۲۸ $\mu\text{g/ml}$ را ارائه نمودند (جدول ۳-۸ و ۳-۹).

جدول ۳-۸- حداقل غلظت بازدارندگی ترکیبات آنتی بیوتیک تولید شده

Isolates	Minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g/ml}$)		
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
IFSIRI 70	۲۵۶	۵۱۲	۱۲۸
IFSIRI 137	۱۲۸	۲۵۶	۶۴
IFSIRI 145	۱۲۸	۲۵۶	۱۲۸
IFSIRI 193	۲۵۶	-	-
IFSIRI 214	۱۲۸	۱۲۸	۶۴
<i>Streptomycin</i>	۸	۸	-
<i>Ketoconazole</i>	-	-	۱۶

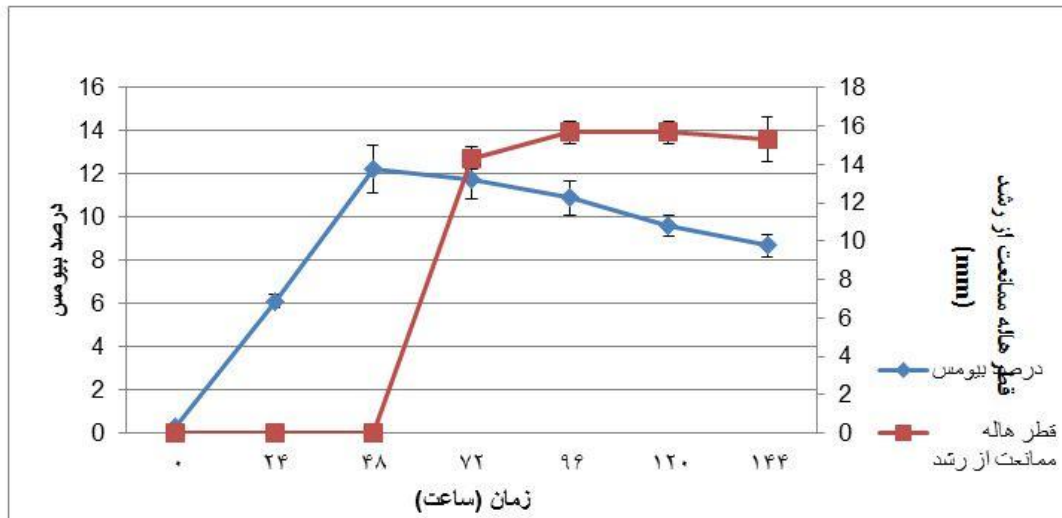
جدول ۳-۹- حداقل غلظت کشندگی ترکیبات آنتی بیوتیک تولید شده

Isolates	Minimum Bactericidal concentration ($\mu\text{g/ml}$)	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
IFSIRI 70	۵۱۲	۱۰۰۰
IFSIRI 137	۲۵۶	۵۱۲
IFSIRI 145	۱۲۸	۲۵۶
IFSIRI 193	۲۵۶	-
IFSIRI 214	۲۵۶	۲۵۶

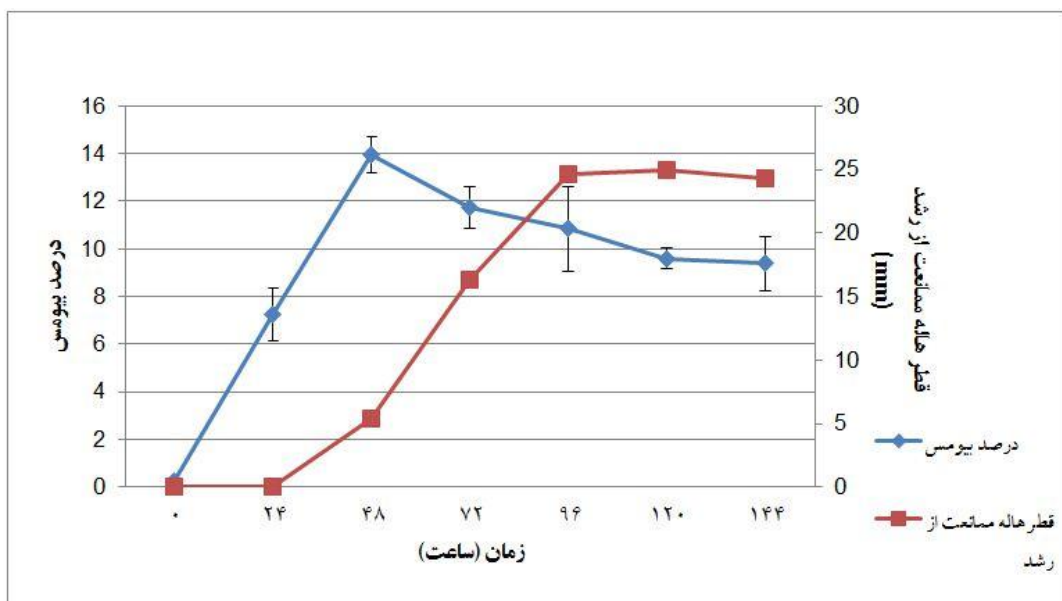
۳-۳- بررسی کینتیک رشد و تولید آنتی بیوتیک توسط ایزوله های مولد

مطالعه کینتیک رشد ایزوله های مولد منتخب بر اساس درصد بیومس تولید شده نشان داد ایزوله IFSIRI 70 پس از ۴۸ ساعت از شروع تلقیح به بالاترین میزان بیومس رسید و سپس وارد فاز سکون گردید. در مراحل سکون و رکود تغییرات قابل ملاحظه ای در میزان بیومس مشاهده نشد. بررسی کینتیک تولید آنتی بیوتیک توسط این ایزوله بیانگر آغاز تولید آنتی بیوتیک با توقف رشد لگاریتمی بود. بیشترین میزان تولید آنتی بیوتیک پس از گذشت ۹۶ ساعت از تلقیح مشاهده گردید (شکل ۳-۱۰). بررسی کینتیک رشد ایزوله IFSIRI 137 بیانگر بیشینه میزان رشد و تولید بیومس ۴۸ ساعت پس از تلقیح بود. با ورود به فاز سکون میزان بیومس کاهش یافت. تولید آنتی بیوتیک با گذشت ۴۸ ساعت از افزودن مایه تلقیح شروع شد و پس از ۱۲۰ ساعت به بیشترین میزان رسید (شکل ۳-۱۱). این مطالعات در مورد ایزوله IFSIRI 145 نشان داد رشد لگاریتمی تا ۴۸ ساعت پس از تلقیح بصورت تصاعدی وجود دارد و بعد از آن با شیب ملایم تری تا ۷۲ ساعت ادامه دارد تا وارد فاز سکون گردد. این درحالیست که تولید آنتی بیوتیک بعد از ۴۸ ساعت آغاز شده و پس از ۱۲۰ ساعت بیشترین میزان آنتی بیوتیک در محیط کشت تجمع می یابد (شکل ۳-۱۲). نمودار کینتیک رشد ایزوله IFSIRI 193 بیانگر استمرار رشد تصاعدی و فاز لگاریتمی تا ۴۸ ساعت پس از تلقیح می باشد. تولید آنتی بیوتیک توسط این ایزوله پس از ۹۶ ساعت به بیشترین میزان می رسد (شکل ۳-۱۳). بررسی منحنی رشد و روند تغییرات میزان بیومس توسط

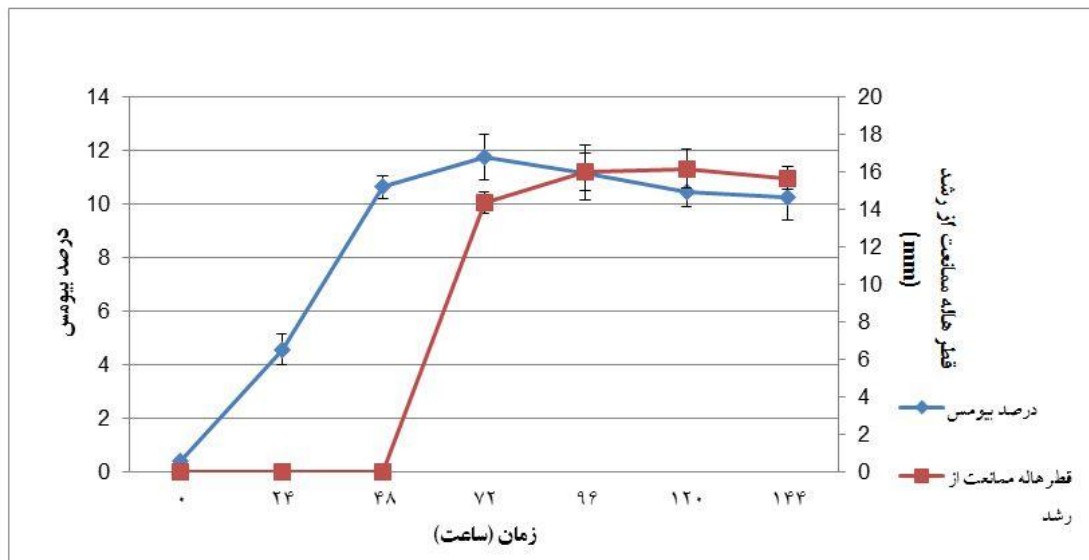
ایزوله IFSIRI 214 نشان داد پس از خاتمه مرحله رشد لگاریتمی طی ۴۸ ساعت پس از تلقیح تولید آنتی بیوتیک آغاز شده و ظرف ۹۶ ساعت بیشترین غلظت آنتی بیوتیک در محیط تولید می‌شود (شکل ۳-۱۴).



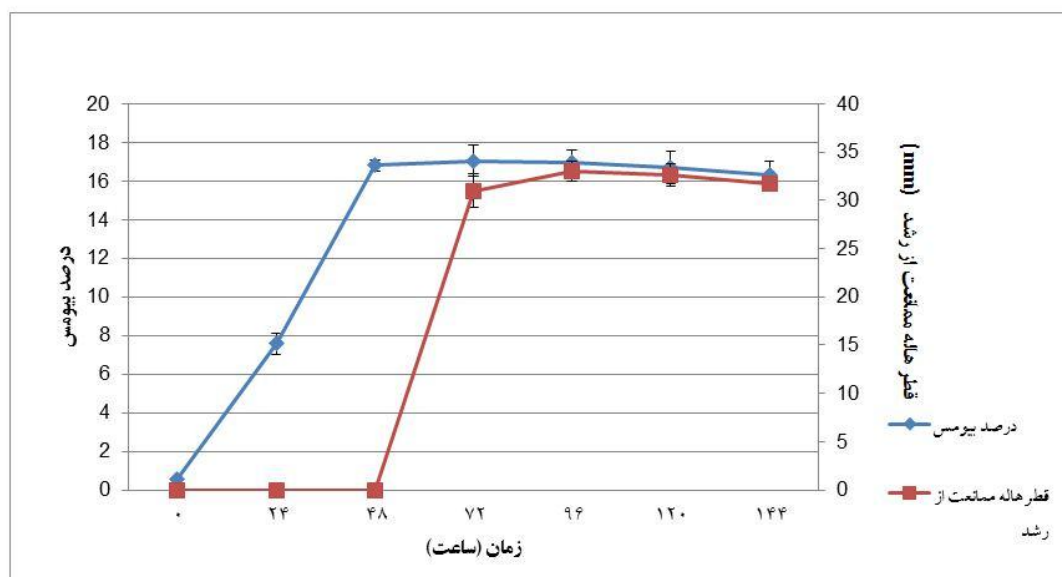
شکل ۳-۱۰- کینتیک رشد و تولید ایزوله IFSIRI 70



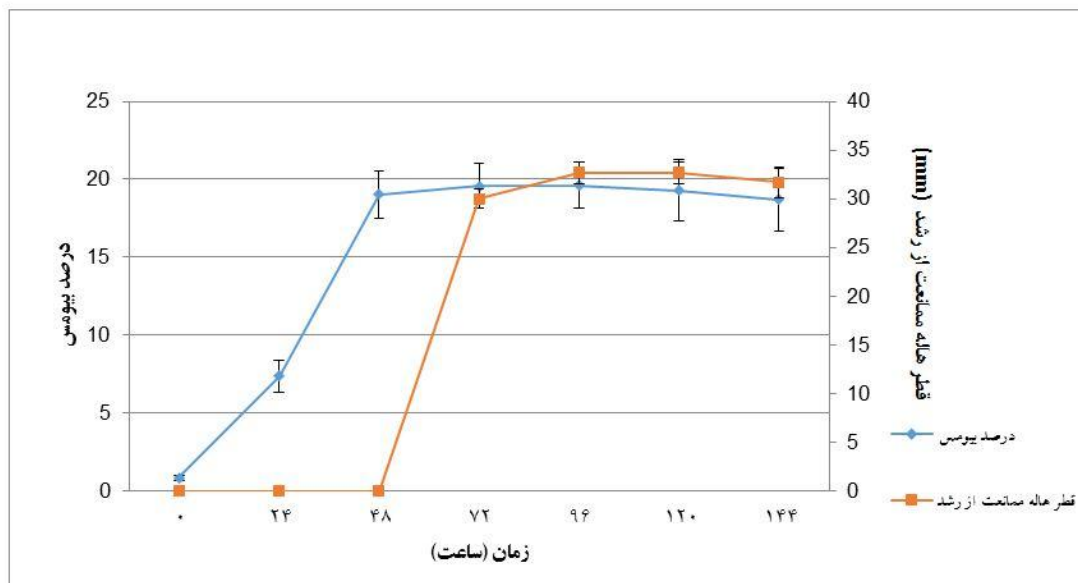
شکل ۳-۱۱- کینتیک رشد و تولید ایزوله IFSIRI 137



شکل ۳-۱۲- کینتیک رشد و تولید ایزوله IFSIRI 145



شکل ۳-۱۳- کینتیک رشد و تولید ایزوله IFSIRI 193



شکل ۳-۱۴ - کینتیک رشد و تولید ایزوله IFSIRI 214

۳-۴- شناسایی اکتینوماست های جدا شده

۳-۴-۱- بررسی ویژگیهای مورفولوژیک ماکروسکوپی و میکروسکوپی ایزوله های مولد

مطالعه ویژگیهای مورفولوژیک ماکروسکوپی ایزوله های مولد نشان داد ایزوله IFSIRI 70 دارای میسلیم های هوایی و رویشی خاکستری رنگ روی محیط ISP II بود. این ایزوله روی تمامی محیط های کشت مورد بررسی به خوبی رشد و اسپور تولید نمود (جدول ۳-۸). مشاهده مورفولوژی میکروسکوپی نشان داد آرایش اسپورهای این ایزوله به فرم Spiral تعلق دارد. اسپور های این ایزوله با تشکیل زنجیره ای طویل و پیچ خورده بصورت باز سازماندهی شده اند. ایزوله IFSIRI 137 دارای میسلیم های هوایی سفید رنگی روی محیط ISP II بود. میسلیم های رویشی این ایزوله به رنگ بژ (نخودی) گزارش گردید. رشد و تولید اسپور توسط این ایزوله روی محیط های ISP IV و ISP V به میزان کم و روی محیط CDA متوسط گزارش گردید. اگرچه این سویه روی سایر محیط های کشت به خوبی رشد و اسپور تولید نمود (جدول ۳-۸). مطالعه میکروسکوپی آرایش اسپوری این ایزوله بیانگر تعلق این ایزوله به فرم Rectus-Flexibilis بود. اسپور های این ایزوله در توالی های طویل و مستقیم قرار گرفتند (شکل ۳-۱۶). نتایج بررسی ها در مورد سویه IFSIRI 145 دارای میسلیم های هوایی زرد و میسلیم رویشی سفید رنگ روی محیط کشت ISP II می باشد. رشد و تولید اسپور روی اغلب محیط های کشت مورد بررسی بجز Bennet Agar و ISP II کم گزارش گردید (جدول ۳-۸).. آرایش زنجیره اسپوری این ایزوله به فرم Spiral تعلق داشت. ایجاد مارپیچ ای بسته به خوبی مشهود بود. در مواردی که مارپیچ ایجاد شده بصورت ناقص شکل گرفته اشکال قلاب و حلقه نیز مشاهده گردید (شکل ۳-۱۷). ایزوله IFSIRI 193 دارای میسلیم های هوایی و رویشی زرد رنگ روی محیط کشت ISP II بودند. رشد و تولید اسپور این ایزوله روی محیط کشت های

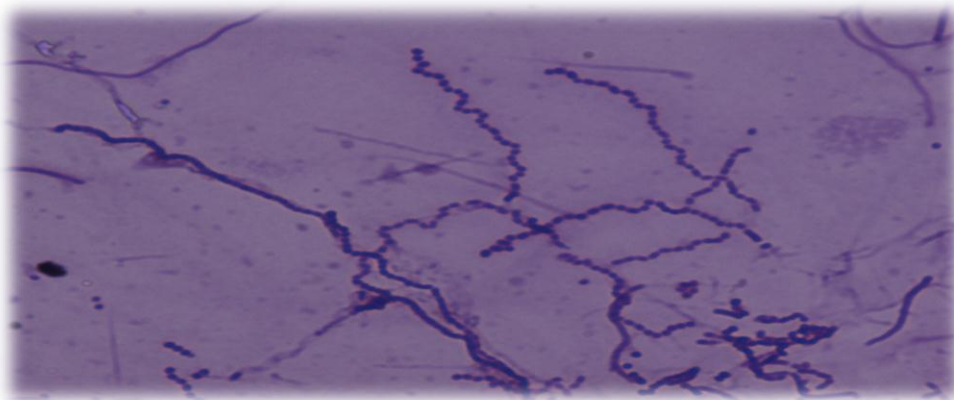
Czapek-Dox agar و نوترینت آگار کم گزارش شد. در حالیکه روی محیط‌های کشت Bennet Agar و ISP II بخوبی رشد و اسپور تولید نمود. رشد و تولید اسپور روی سایر محیط‌های کشت متوسط گزارش گردید (جدول ۳-۱۰). بررسی‌های میکروسکوپی نشان داد آرایش اسپور این ایزوله بصورت Rectus-Flexibilis می‌باشد. اسپورهای تولید شده توسط این ایزوله بصورت مستقیم و متوالی در زنجیره‌های طویل سازماندهی شده بودند (شکل ۳-۱۸). ایزوله IFSIRI 214 دارای میسلیم هوایی و رویشی بترتیب خاکستری و قرمز رنگ بود. رشد و تولید اسپور توسط این ایزوله روی محیط‌های کشت مورد بررسی خوب و متوسط گزارش گردید (جدول ۳-۱۰). آرایش اسپوری این ایزوله به فرم Rectus-Flexibilis بود. اسپورهای ایجاد شده توسط این ایزوله در زنجیره‌ها طویل و بصورت موجی قرار گرفته‌اند (شکل ۳-۱۹).

جدول ۳-۱۰- ویژگیهای مورفولوژیک ماکروسکوپی ایزوله‌های مولد منتخب

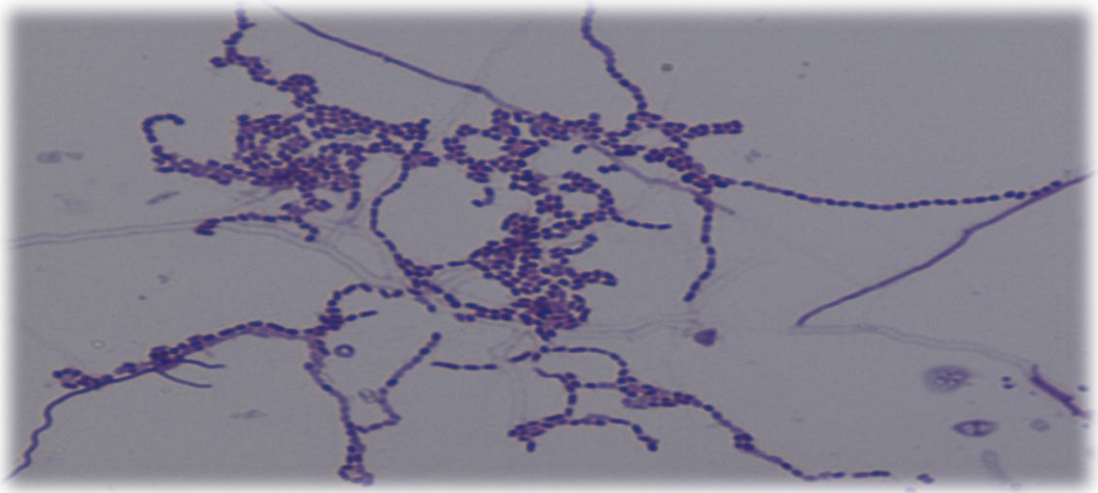
IFSIRI 214	IFSIRI 193	IFSIRI 145	IFSIRI 137	IFSIRI 70	مشخصه	
GR	Y	Y	W	GR	هوایی	بررسی رنگ میسلیم
R	Y	W	B	GR	رویشی	
G	G	F	G	G	ISP II	رشد و تولید اسپور در محیط‌های:
G	F	L	G	G	ISP III	
F	F	L	L	G	ISP IV	
F	F	L	L	G	ISP V	
F	F	L	G	G	ISP VI	
F	F	L	G	G	ISP VII	
G	L	L	F	G	CDA	
G	G	G	G	G	BA	
F	L	L	G	G	NA	

رشد و تولید اسپور: خوب: G متوسط: F کم: L

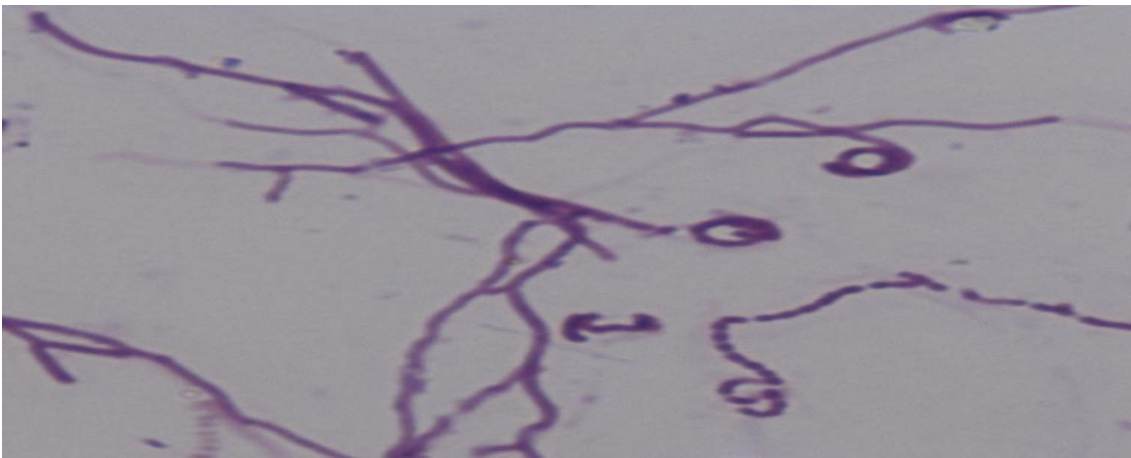
رنگ کلونی: خاکستری: GR سفید: W قرمز: R نخودی (بژ): B



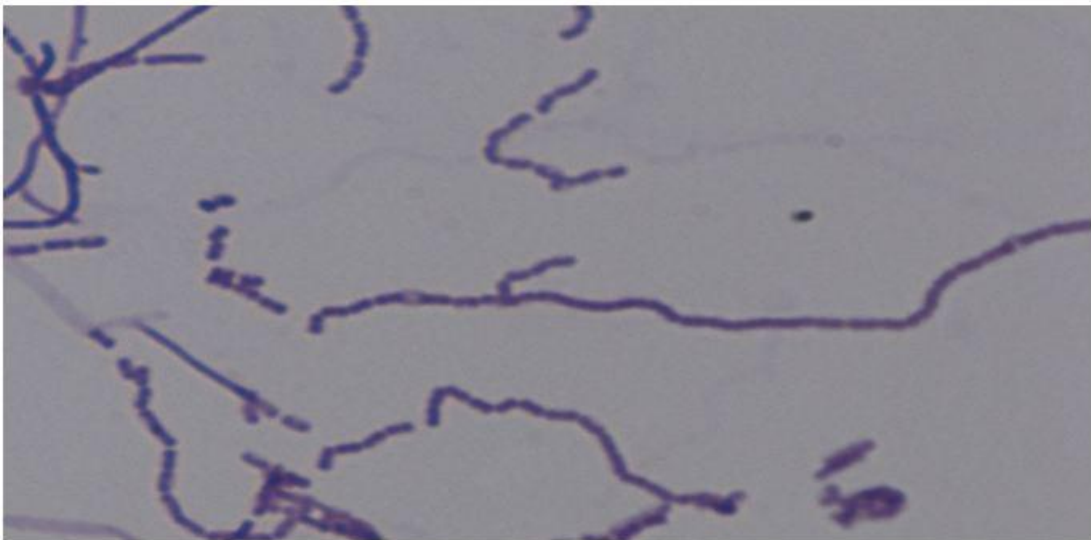
شکل ۳-۱۵- تصویر میکروسکوپی ایزوله IFSIRI 70



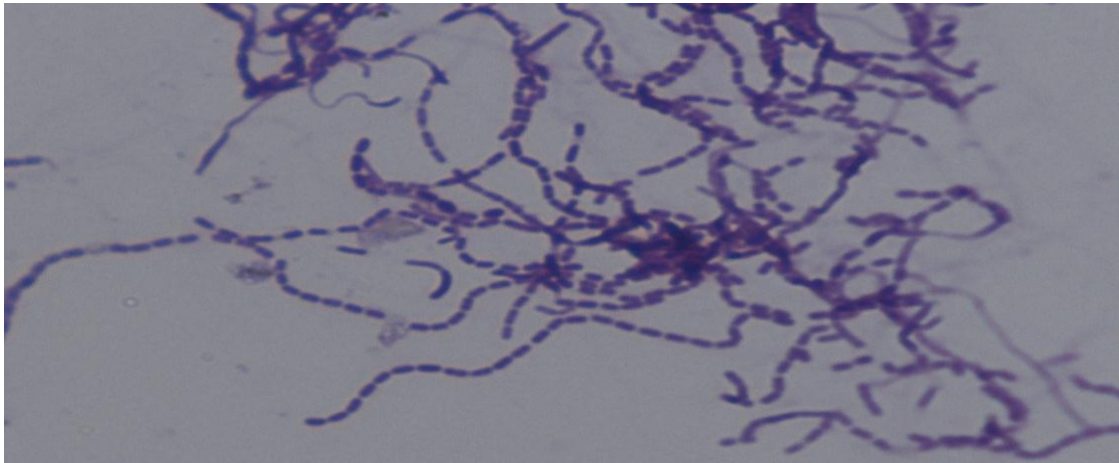
شکل ۳-۱۶- تصویر میکروسکوپی ایزوله IFSIRI 137



شکل ۳-۱۷- تصویر میکروسکوپی ایزوله IFSIRI 145



شکل ۳-۱۸- تصویر میکروسکوپی ایزوله IFSIRI 193



شکل ۳-۱۹- تصویر میکروسکوپی ایزوله IFSIRI 214



ایزوله IFSIRI 145

ایزوله IFSIRI 193



ایزوله IFSIRI 70

ایزوله IFSIRI 214



ایزوله IFSIRI 137

شکل ۳-۲۰- مورفولوژی ماکروسکوپی ایزوله های مولد منتخب

۲-۴-۳- بررسی ویژگی‌های فیزیولوژیک ایزوله‌های مولد منتخب

مطالعه ویژگی‌های فیزیولوژیک ایزوله‌های مولد نشان داد هیچکدام از ایزوله‌های منتخب قادر به تولید پیگمان ملانوئیدی روی محیط کشت‌های Peptone Yeast extract iron Agar و Tyrosine Agar نمی‌باشند. از میان ایزوله‌های مورد بررسی تنها ایزوله IFSIRI 70 قادر به تولید پیگمان غیر ملانوئیدی بود. همه ایزوله‌های مورد بررسی در دمای ۲۰° و ۳۰° رشد نموده و قادر به رشد در دماهای ۴° و ۴۵° نبودند. ایزوله‌های IFSIRI 70، IFSIRI 145، IFSIRI 193 در دمای ۴۰° رشد نمودند. نتایج تعیین محدوده pH رشد نشان داد هیچ کدام از ایزوله‌های مورد بررسی توانایی رشد در اسیدیته ۵ را نداشتند. این در حالیست که در pH های ۶، ۷، ۸، ۹ رشد نمودند (جدول ۳-۱۱).

جدول ۳-۱۱- ویژگی‌های فیزیولوژیک ایزوله‌های مولد منتخب

IFSIRI 214	IFSIRI 193	IFSIRI 145	IFSIRI 137	IFSIRI 70	مشخصه	
-	-	-	-	-	تولید پیگمان ملانوئیدی	
-	-	-	-	+	تولید پیگمان غیر ملانوئیدی	
-	-	-	-	-	۴	دمای رشد
+	+	+	+	+	۲۰	
+	+	+	+	+	۳۰	
-	+	+	-	+	۴۰	
-	-	-	-	-	۴۵	
-	-	-	-	-	۵	pH
+	+	+	+	+	۶	
+	+	+	+	+	۷	
+	+	+	+	+	۸	
+	+	+	+	+	۹	

۳-۴-۳- بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی و کموتاکسونومیک ایزوله‌های مولد منتخب

مطالعه ویژگی‌های بیوشیمیایی ایزوله‌های مولد از نظر مصرف منابع کربن و نیتروژن نشان داد ایزوله IFSIRI 70 و IFSIRI 137 توانایی مصرف منابع کربن شامل گلوکز، فروکتوز، زایلوز، آرابینوز، رامنوز، سوکروز، گالاکتوز، مانیتول و اینوزیتول را دارند در حالیکه قادر به استفاده از رافینوز برای رشد نبودند. در میان منابع نیتروژن مورد

بررسی این ایزوله‌ها تنها قادر به استفاده از آرژینین بودند. ایزوله IFSIRI 145 منابع کربن شامل گلوکز، فروکتوز، زایلوز، آرابینوز، گالاکتوز، مانیتول را مصرف نمود اگرچه قادر به مصرف رامنوز، اینوزیتول، سوکروز و رافینوز نبود. این ایزوله نیز تنها قادر به استفاده از آرژینین به عنوان منبع نیتروژن بود. ایزوله IFSIRI 193 با الگوی متفاوت منابع کربن شامل گلوکز، فروکتوز، زایلوز، آرابینوز، سوکروز، گالاکتوز و مانیتول را برای رشد خود مصرف نمود و قادر به استفاده از رامنوز، اینوزیتول و رافینوز نبود. این ایزوله هر دو آمینواسید آرژینین و آسپاراژین را به عنوان منبع نیتروژن مورد مصرف قرار داد. ایزوله IFSIRI 214 نیز با مصرف گلوکز، فروکتوز، زایلوز، آرابینوز، گالاکتوز و مانیتول انرژی مورد نیاز برای رشد خود را تامین نمود. اگرچه این ایزوله قادر به استفاده از رامنوز، سوکروز، اینوزیتول و رافینوز به عنوان تنها منبع کربن در محیط کشت نبود. این سویه با مصرف آمینواسیدهای والین، آرژینین و آسپاراژین الگوی متفاوتی از مصرف منابع نیتروژن را ارائه نمود. بررسی ویژگی‌های کموتاکسونومیک ایزوله‌های مولد نشان داد دیواره سلولی آنها حاوی ایزومر نوع LL از ایزومر آمینو اسید دی آمینوپایملیک اسید (DAP) بود (جدول ۳-۱۲).

جدول ۳-۱۲- ویژگی‌های بیوشیمیایی و کموتاکسونومیک ایزوله‌های مولد منتخب

IFSIRI 214	IFSIRI 193	IFSIRI 145	IFSIRI 137	IFSIRI 70	مشخصه
+	+	+	+	+	گلوکز
+	+	+	+	+	فروکتوز
+	+	+	+	+	زایلوز
+	+	+	+	+	آرابینوز
-	-	-	+	+	رامنوز
-	+	-	+	+	سوکروز
-	-	-	-	-	رافینوز
+	+	+	+	+	گالاکتوز
+	+	+	+	+	مانیتول
-	-	-	+	+	اینوزیتول
+	-	-	-	-	والین
+	+	+	+	+	آرژینین
-	-	-	-	-	اورنیتین
+	+	-	-	-	آسپاراژین
LL	LL	LL	LL	LL	نوع ایزومر DAP

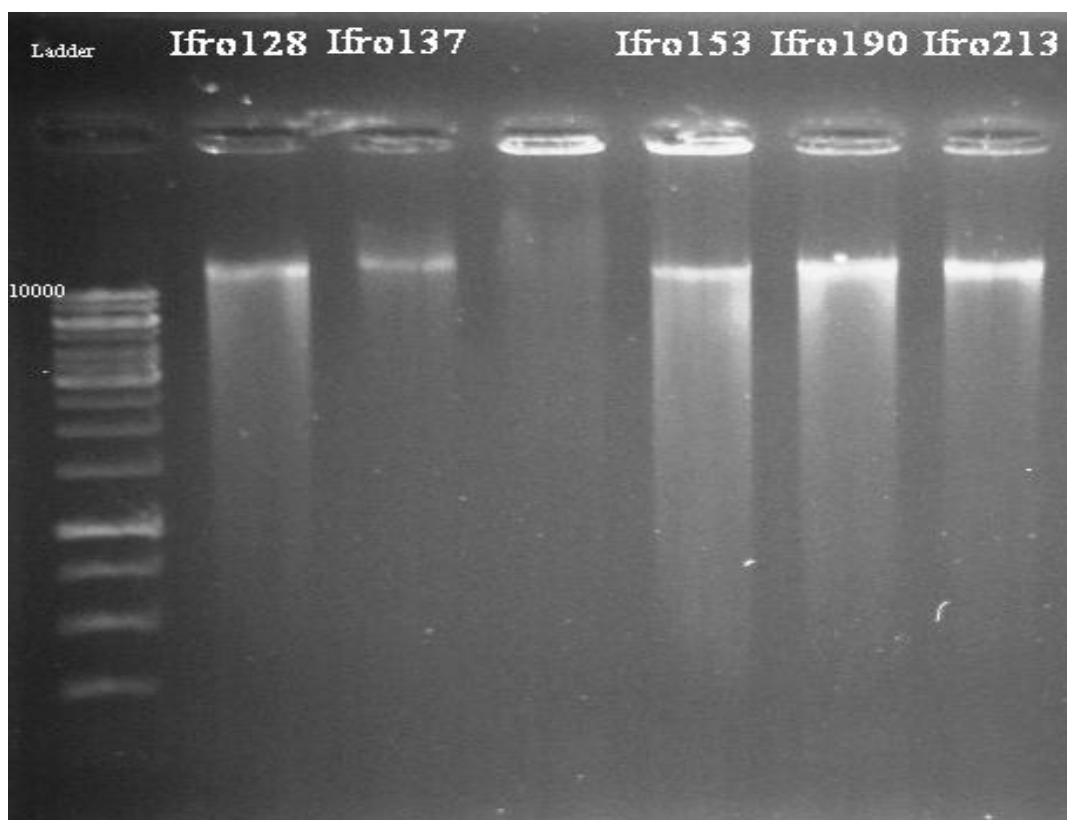
۴-۴-۳- شناسایی ژنتیکی ایزوله‌های مولد

- استخراج DNA ژنومی

نتایج حاصل از الکتروفورز DNA ژنومی استخراج شده از ایزوله‌های مولد صحت فرایند استخراج را تایید نمود. نتایج استخراج توالی با طول بیش ۱۰ kbp را نشان داد. همانطور که در شکل ۳-۲۱ مشاهده می‌شود تمامیت و ساختار سالم DNA طی فرایند استخراج حفظ گردیده است. بررسی کمیت و کیفیت DNA ژنومی استخراج شده با روش اسپکتروفوتومتری بیانگر خلوص مناسب نمونه‌های بدست آمده و غلظت کافی برای فرایندهای پایین دستی بود (جدول ۳-۱۳).

جدول ۳-۱۳- استخراج DNA ایزوله‌های مولد

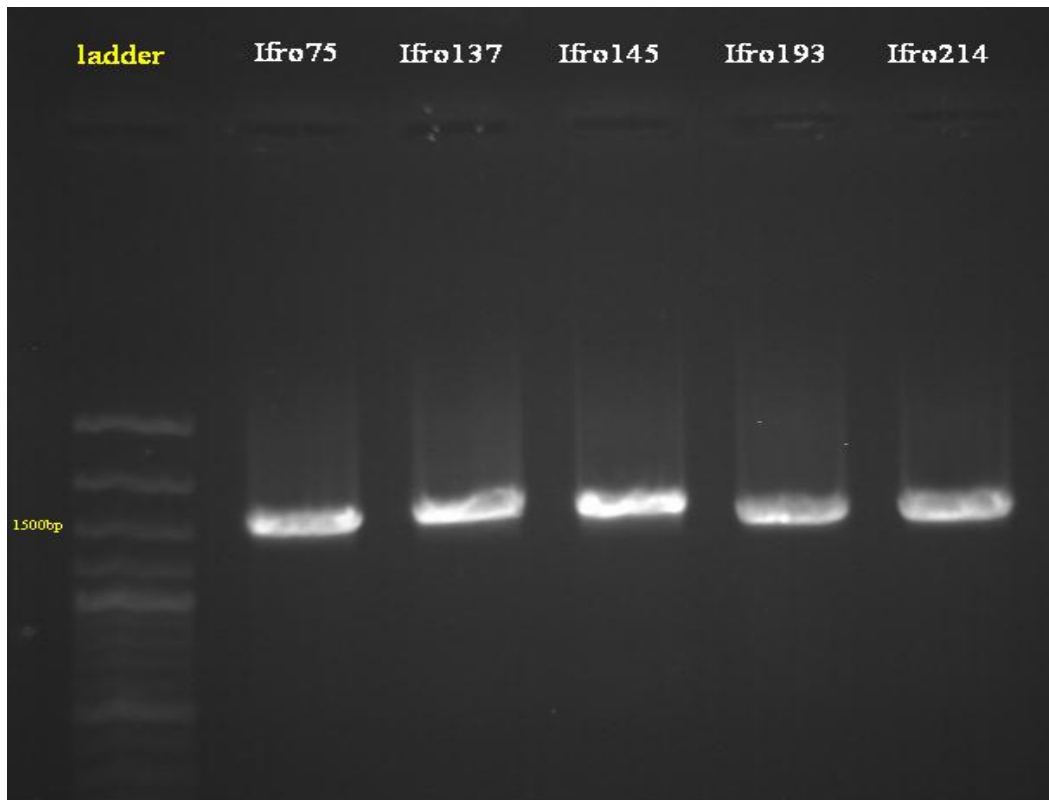
غلظت DNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	۲۶۰/۲۸۰	ایزوله
۰/۳۹۲	۱/۸۶	IFSIRI 70
۰/۲۰۴	۱/۷۵	IFSIRI 137
۰/۴۵۵	۱/۷۸	IFSIRI 145
۰/۶۲۱	۱/۸۹	IFSIRI 193
۰/۵۶۱	۱/۸	IFSIRI 214



شکل ۳-۲۱- الکتروفورز DNA ژنومی استخراج شده از سویه‌های مولد منتخب روی ژل آگاروز

- تکثیر ژن 16S rRNA ایزوله های مولد

نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR ژن 16S rRNA ایزوله های مولد بیانگر تولید توالی هایی با طول حدود ۱۵۰۰ bp بود. همانطور که در شکل ۳-۲۲ مشاهده می شود فرایند زنجیره ای پلیمرز بصورت اختصاصی انجام شده و هیچ باند غیر اختصاصی و دایمر پرایمر ایجاد نشده است.



شکل ۳-۲۲- تکثیر ژن 16S rRNA ایزوله های مولد

- آنالیز تطابق ایزوله های مولد

نتایج آنالیز تطابق سویه های بدست آمده با سویه های موجود در بانک ژن بیانگر میزان همولوژی بالای ۵ ایزوله منتخب با سویه های موجود در بانک ژن بود. نتایج نشان داد سویه IFSIRI 70 بیشترین همولوژی را با سویه *Streptomyces chartreusis* ۹۹ درصد همولوژی نشان داد این در حالی بود که این سویه همین میزان تشابه را با سایر سویه های نزدیک به خود نشان داد. سویه IFSIRI 137 بیشترین همولوژی را با سویه *Streptomyces qinglanensis* ارائه نمود اگرچه با سایر سویه های موجود میزان تشابه پایین تری حدود ۹۸ درصد و کمتر نشان داد. سویه IFSIRI 145 تشابهی حدود ۹۹ درصد را با *Streptomyces cacaoi* و *Streptomyces violaceoruber* نشان داد. میزان تشابه این سویه با سایر سویه های نزدیک کمتر از ۹۸ درصد و پایین تر بود. سویه IFSIRI 193 نیز بالاترین تشابه را به میزان ۹۹ درصد با *Streptomyces diastaticus* و سایر سویه های نزدیک خود ارائه نمود.

(جدول ۹۹). نزدیک ترین سویه شناسایی شده موجود به IFSIRI 214 سویه *Streptomyces champavatii* با تشابه ۹۹ درصد بود. سایر سویه های نزدیک نیز همین میزان تشابه را نشان دادند.

جدول ۳-۱۴- آنالیز تطابق ایزوله IFSIRI 70 با نزدیک ترین سویه ها در بانک ژن

NO	closest strains	Max score	Total score	Query coverage	E value	Ident	Accession
1	<i>Streptomyces chartreusis</i> strain NBRC 12753	2023	2023	100%	0.0	99%	NR_118341.1
2	<i>Streptomyces variabilis</i> strain NRRL B-3984	2023	2023	100%	0.0	99%	NR_043840.1
3	<i>Streptomyces labedae</i> strain NBRC 15864	2023	2023	100%	0.0	99%	NR_041192.1
4	<i>Streptomyces erythrogriseus</i> strain NBRC 14601	2023	2023	100%	0.0	99%	NR_112438.1
5	<i>Streptomyces matensis</i> strain NBRC 12889	2023	2023	100%	0.0	99%	NR_041088.1
6	<i>Streptomyces griseoincarnatus</i> strain NBRC 12871	2023	2023	100%	0.0	99%	NR_112312.1
7	<i>Streptomyces griseorubens</i> strain NBRC 12780	2023	2023	100%	0.0	99%	NR_041066.1

جدول ۳-۱۵- آنالیز تطابق ایزوله IFSIRI 137 با نزدیک ترین سویه ها در بانک ژن

NO	closest strains	Max score	Total score	Query coverage	E value	Ident	Accession
1	<i>Streptomyces qinglanensis</i> strain 172205	2484	2484	100%	0.0	99%	NR_109303.1
2	<i>Streptomyces smyrnaeus</i> strain SM3501	2377	2377	99%	0.0	98%	NR_134201.1
3	<i>Streptomyces flocculus</i> strain NBRC 13041	2370	2370	100%	0.0	98%	NR_041100.1
4	<i>Streptomyces panacagri</i> strain Gsoil 519	2359	2359	100%	0.0	98%	NR_112566.1
5	<i>Streptomyces cacaoi</i> strain NBRC 12748	2353	2353	99%	0.0	98%	NR_041061.1
6	<i>Streptomyces albus</i> strain NRRL B-1811	2350	2350	100%	0.0	97%	NR_118467.1
7	<i>Streptomyces gibsonii</i> strain NBRC 15415	2350	2350	100%	0.0	97%	NR_041180.1

جدول ۳-۱۶- آنالیز تطابق ایزوله IFSIRI 145 با نزدیک ترین سویه ها در بانک ژن

NO	closest strains	Max score	Total score	Query coverage	E value	Ident	Accession
1	<i>Streptomyces cacaoi</i> strain NBRC 12748	1945	1945	100%	0.0	99%	NR_041061.1
2	<i>Streptomyces violaceoruber</i> strain CSSP679	1914	1914	100%	0.0	99%	NR_115407.1
3	<i>Streptomyces smyrnaeus</i> strain SM3501	1849	1849	100%	0.0	98%	NR_134201.1
4	<i>Streptomyces yogyakartensis</i> strain DSM 41766	1829	1829	100%	0.0	97%	NR_117958.1
5	<i>Streptomyces javensis</i> strain DSM 41764	1829	1829	100%	0.0	97%	NR_117957.1
6	<i>Streptomyces yogyakartensis</i> strain NBRC 100779	1829	1829	100%	0.0	97%	NR_041416.1
7	<i>Streptomyces violaceusniger</i> strain NBRC 13459	1829	1829	100%	0.0	97%	NR_041141.1

جدول ۳-۱۷- آنالیز تطابق ایزوله IFSIRI 193 با نزدیک ترین سویه ها در بانک ژن

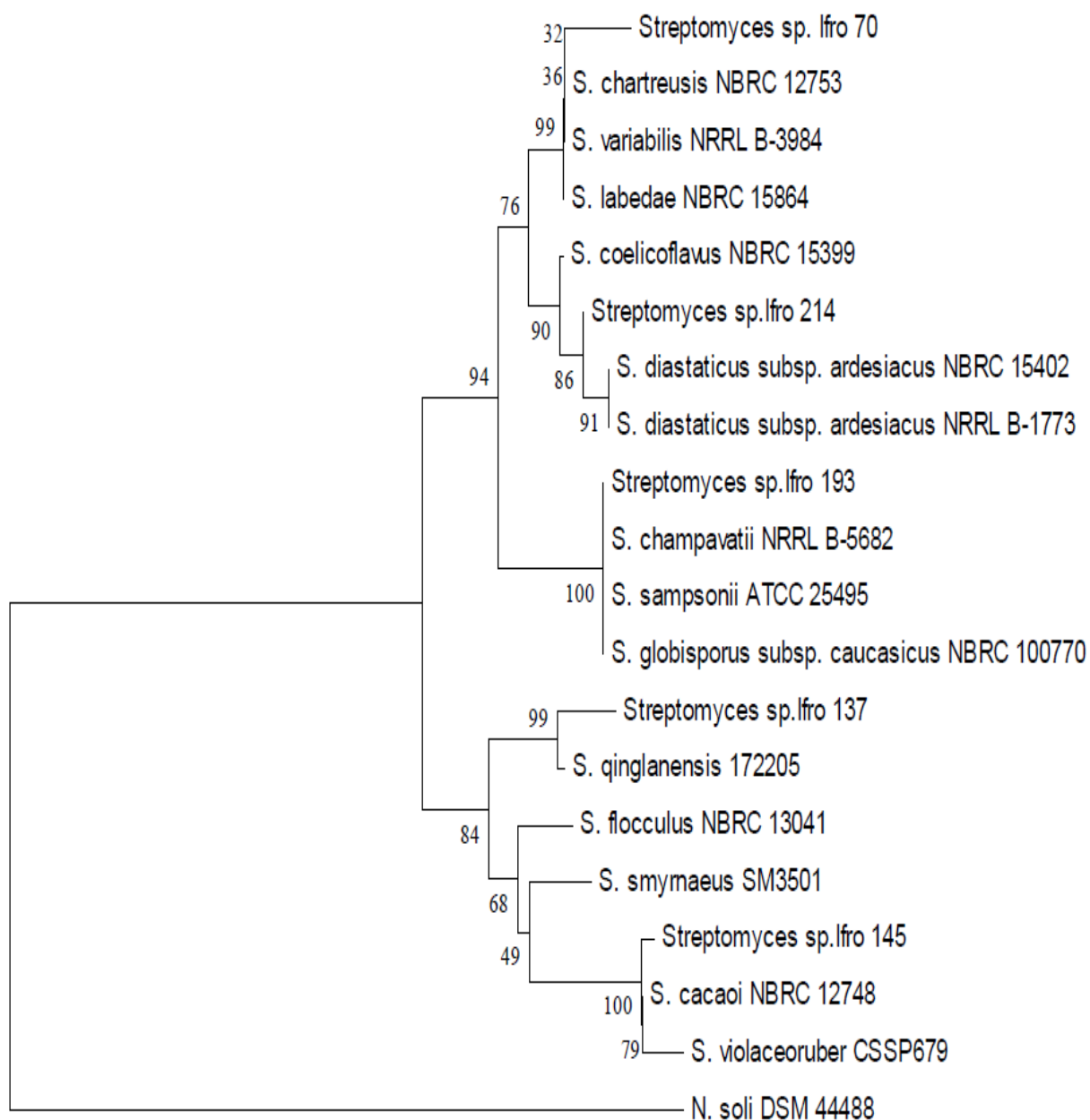
NO	closest strains	Max score	Total score	Query coverage	E value	Ident	Accession
1	<i>Streptomyces diastaticus</i> subsp. ardesiacus strain NBRC 15402	2549	2549	100%	0.0	99%	NR_112454.1
2	<i>Streptomyces diastaticus</i> subsp. ardesiacus strain NRRL B-1773	2543	2543	100%	0.0	99%	NR_043486.1
3	<i>Streptomyces coelicoflavus</i> strain NBRC 15399	2540	2540	100%	0.0	99%	NR_041175.1
4	<i>Streptomyces coelicoflavus</i> strain CSSP410	2510	2510	98%	0.0	99%	NR_115371.1
5	<i>Streptomyces rubrogriseus</i> strain NBRC 15455	2494	2494	100%	0.0	99%	NR_041188.1
6	<i>Streptomyces lienomycini</i> strain NBRC 15425	2488	2488	100%	0.0	99%	NR_112464.1
7	<i>Streptomyces aurantiogriseus</i> strain CSSP525	2488	2488	100%	0.0	99%	NR_115385.1

جدول ۳-۱۸- آنالیز تطابق ایزوله IFSIRI 214 با نزدیک ترین سویه ها در بانک ژن

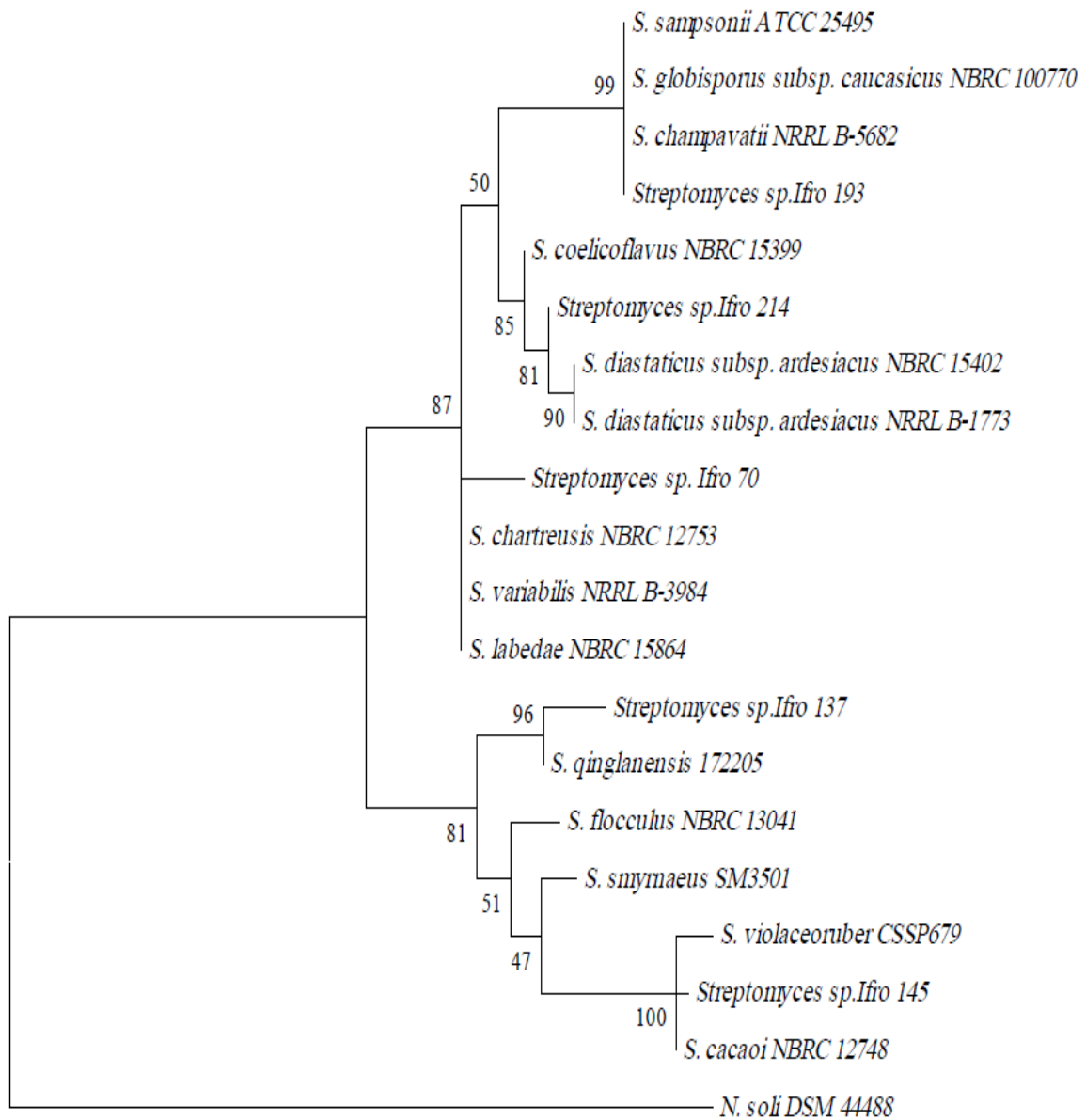
NO	closest strains	Max score	Total score	Query coverage	E value	Ident	Accession
1	<i>Streptomyces champavatii</i> strain NRRL B-5682	2538	2538	100%	0.0	99%	NR_115669.1
2	<i>Streptomyces sampsonii</i> strain ATCC 25495	2538	2538	100%	0.0	99%	NR_025870.1
3	<i>Streptomyces globisporus</i> subsp. <i>caucasicus</i> strain NBRC 100770	2534	2534	100%	0.0	99%	NR_112593.1
4	<i>Streptomyces champavatii</i> strain NBRC 15392	2534	2534	100%	0.0	99%	NR_112451.1
5	<i>Streptomyces odorifer</i> strain NBRC 13365	2534	2534	100%	0.0	99%	NR_112382.1
6	<i>Streptomyces albidoflavus</i> strain NBRC 13010	2534	2534	100%	0.0	99%	NR_041095.1
7	<i>Streptomyces odorifer</i> strain DSM 40347	2534	2534	100%	0.0	99%	NR_026535.1

- آنالیز فیلوژنتیک سویه های مولد

محاسبه فاصله ژنتیکی سویه های مولد با نزدیکترین سویه های موجود بر اساس ژن 16s rRNA نشان داد فاصله ژنتیکی بین سویه IFSIRI 70 با تمام سویه های مورد بررسی حداکثر ۰/۰۵ و حداقل ۰/۰۱ بود. فاصله ژنتیکی سویه IFSIRI 137 با سایر سویه های مورد بررسی با بیشینه ۰/۰۴ و کمینه ۰/۰۱ ثبت شد. نتایج این محاسبات نشان داد سویه IFSIRI 145 فاصله ژنتیکی با *S. Cacaoi* NBRC 12748 نشان نداد و بیشترین فاصله ژنتیکی به میزان ۰/۰۴ در مورد این سویه ثبت گردید. نتایج نشان داد بین سویه های IFSIRI 193 و IFSIRI 214 با نزدیکترین سویه های موجودشان فاصله ژنتیکی وجود نداشت (جدول ۳-۱۹). نتایج حاصل از آنالیز فیلوژنتیک میان سویه های مولد بر اساس توالی ژن 16s rRNA نشان داد این سویه ها بصورت دو کلاد مجزا از لحاظ تکاملی قرار گرفته اند. سویه های IFSIRI 137 و IFSIRI 145 در یک کلاد قرار گرفته و سویه های IFSIRI 70، IFSIRI 214 و IFSIRI 193 در کلاد دیگری واقع شده اند. بررسی تکاملی درخت فیلوژنتیک رسم شده بر اساس روش Neighbour joining نشان داد که هر دو کلاد از یک جد مشترک انشقاق یافته اند و کلاد دوم از لحاظ تکاملی زودتر از کلاد اول افتراق حاصل نموده است (شکل ۲۳-۳). نتایج حاصل از آنالیز فیلوژنتیک سویه های مولد با نزدیک ترین سویه های موجود در بانک ژن NCBI بیانگر ایجاد دو کلاد بود. بر اساس آنالیز فیلوژنتیک با روش Neighbour joining سویه های IFSIRI 70 و IFSIRI 214 در یک کلاد اما در دو خوشه جداگانه قرار گرفتند. سویه IFSIRI 193 در خوشه دیگر قرار گرفته و با خوشه اول دارای جد مشترک می باشد. سویه IFSIRI 137 و IFSIRI 145 در کلاد دوم واقع شدند (شکل ۲۴-۳). ترسیم درخت فیلوژنتیک بر اساس روش Maximum likelihood بطور کلی از الگوی خوشه بندی نزدیکی با روش قبلی پیروی نمود اما طول شاخه ها و توپولوژی تفاوت نشان داد (شکل ۲۵-۳).



شکل ۳-۲۴ - درخت فیلوژنتیک سویه های مولد منتخب و نزدیکترین سویه های موجود بر اساس روش Neighbour joining. اعداد نشان داده شده در کنار گره ها بیانگر میزان Bootstrap است. نوار مقیاس بیانگر جایگزینی یک نوکلئوتید در ۱۰۰ نوکلئوتید می باشد.



شکل ۳-۲۵ - درخت فیلوژنتیک سویه های مولد منتخب و نزدیکترین سویه های موجود بر اساس روش Maximim liklihood. اعداد نشان داده شده در کنار گره ها بیانگر میزان Bootstrap است. شاخص (Bar) بیانگر جایگزینی یک نوکلئوتید در ۱۰۰ نوکلئوتید می باشد.

جدول ۳-۲۰- ترکیب نوکلئوتیدی ژن 16s rRNA سویه های مورد مطالعه

Domain: Data	T(U)	C	A	G	Total
<i>Streptomyces</i> sp. IFSIRI 70	18.5	25.3	22.3	33.9	1118.0
<i>Streptomyces</i> sp. IFSIRI 137	18.7	25.4	22.1	33.7	1378.0
<i>Streptomyces</i> sp. IFSIRI 145	18.2	25.1	21.4	35.3	1075.0
<i>Streptomyces</i> sp. IFSIRI 193	18.2	25.4	22.3	34.1	1393.0
<i>Streptomyces</i> sp. IFSIRI 214	18.2	25.5	22.5	33.8	1395.0
<i>S. chartreusis</i> NBRC 12753	18.3	25.4	22.1	34.2	1392.0
<i>S. variabilis</i> NRRL B-3984	18.1	25.5	22.3	34.1	1499.0
<i>S. labedae</i> NBRC 15864	18.1	25.6	22.5	33.8	1454.0
<i>S. qinglanensis</i> 172205	18.6	25.2	22.3	34.0	1487.0
<i>S. smyrnaeus</i> SM3501	18.3	25.3	22.0	34.3	1494.0
<i>S. flocculus</i> NBRC 13041	18.4	25.3	22.2	34.1	1476.0
<i>S. cacaoi</i> NBRC 12748	18.3	25.3	22.2	34.3	1479.0
<i>S. violaceoruber</i> CSSP679	18.5	25.4	22.1	34.0	1420.0
<i>S. diastaticus</i> subsp. <i>ardesiacus</i> NBRC 15402	18.1	25.5	22.4	33.9	1464.0
<i>S. diastaticus</i> subsp. <i>ardesiacus</i> NRRL B-1773	17.9	25.5	22.4	34.2	1486.0
<i>S. coelicoflavus</i> NBRC 15399	18.0	25.3	22.8	33.8	1480.0
<i>S. champavatii</i> NRRL B-5682	19.1	25.3	21.9	33.7	1567.0
<i>S. sampsonii</i> ATCC 25495	18.6	25.3	22.2	33.9	1531.0
<i>S. globisporus</i> NBRC 100770	18.2	25.2	22.4	34.2	1481.0
Avg.	18.4	25.3	22.3	34.0	1428.2

-ثبت ژن

توالی های ژن 16S rRNA ایزوله های مورد بررسی پس از اطمینان از صحت تعیین توالی و انجام تطابق با سایر گونه های موجود در بانک ژن NCBI با استفاده از نرم افزار BankIt با شماره های دستیابی KX641927, KX641930, KX641928, و KX641931 ثبت گردید.

۴- بحث و نتیجه گیری

شیوع میکروارگانسیم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک یک چالش جدید برای حیات موجودات زنده روی کره زمین است. از اینرو برنامه‌های اکتشاف آنتی‌بیوتیک‌های جدید همواره مورد توجه پژوهشگران و شرکت‌های داروسازی بین‌المللی قرار گرفته است. اکتینومایست‌ها به عنوان مهمترین تاکسون مولد آنتی‌بیوتیک در میان میکروارگانسیم‌ها، تولیدکننده ۷۰ درصد آنتی‌بیوتیک‌های شناخته شده می‌باشند. با کاهش چشمگیر روند اکتشاف آنتی‌بیوتیک‌های جدید از اکتینومایست‌های خاکریز توجه دانشمندان به زیستگاه‌های کاوش نشده مانند دریاها جلب شده است و نتیجه آن تاکنون کشف ۱۸۵۵۲ ترکیب زیست فعال جدید از ۲۷ شاخه ارگانسیم‌های ساکن در محیط‌های دریایی بوده است. در این مطالعه برای نخستین بار دریای عمان به عنوان زیستگاه اکتینومایست‌ها مورد بررسی قرار گرفت. رسوبات دریای عمان بدلیل ارتباط با اقیانوس هند و دریای عرب و از سوی دیگر پیوستگی با سواحل مکران و یژگیهای ژئولوژیک و فیزیکوشیمیایی خاصی یافته و می‌تواند زیستگاه منحصر به فردی برای اکتینومایست‌های دریایی باشند. در این مطالعه رسوبات به عنوان زیستگاه اکتینومایست‌ها تعیین و مورد مطالعه قرار گرفت. حضور اکتینومایست‌ها در رسوبات دریایی در سایر مطالعات نیز مورد تایید قرار گرفت. این باکتریها در رسوبات عمیق و نیمه عمیق جمعیت غالب را تشکیل داده اند (Mincer *et al.*, 2002). با این حال فراوانی اکتینومایست‌ها در رسوبات بسیار کمتر و حدود ۰/۰۰۰۱ محیط‌های خاکی گزارش شده است (Jensen *et al.*, 2007). از سوی دیگر فراوانی اکتینومایست‌ها در آب بسیار اندک بوده و در این زمینه رسوبات می‌توانند با در بر گرفتن جمعیت‌های پایدار اکتینومایست‌ها منبع نوید بخشی برای جداسازی و بهره برداری از این میکروارگانسیم‌های ارزشمند باشند. انتخاب ۱۴ ایستگاه مختلف در سرتاسر دریای عمان امکان دستیابی به جمعیت‌های پایدار اکتینومایست‌ها ساکن در رسوبات با ساختار، جنس و ترکیبات مختلف و شرایط فیزیکوشیمیایی محیطی در اعماق متفاوت را فراهم ساخت. با توجه به نقش مهم ترکیب محیط کشت در میزان جداسازی باکتریها و دستیابی به ایزوله‌های متنوع طراحی یک محیط کشت انتخابی برای جداسازی تمام اکتینومایست‌ها غیر ممکن است (Zucchi *et al.*, 2011). بدین منظور از ۴ محیط کشت جداسازی استفاده شد که از میان آنها محیط کشت گلوکز آسپاراژین آگار با جداسازی میانگین ۳۸/۰۹ قابلیت بالاتری نسبت به سه محیط کشت دیگر در جداسازی اکتینومایست‌ها ارائه نمود. بدلیل وجود منوساکارید گلوکز به عنوان منبع کربن و اسید آمینه آسپاراژین به عنوان منبع نیتروژن در این محیط کشت امکان متابولیزه نمودن مواد مغذی بوسیله ایزوله‌های اکتینومایست تسهیل گردید. همچنین اکتینومایست‌های دریایی بدلیل شرایط فیزیولوژیک ضعیف و زمان تکثیر نسبتاً طولانی سازگاری بهتری با محتوای پایین ترکیبات مغذی آلی در این محیط کشت نشان دادند و رشد باکتریهای سریع‌الرشد مداخله‌کننده در فرایند جداسازی کاهش یافت (Gartner *et al.*, 2011). سایر مطالعات نیز افزایش کارایی جداسازی اکتینومایست‌های دریایی با بکارگیری محیط کشت‌های حاوی مقادیر پایین مواد مغذی آلی را تایید نمودند (Koch 2001). محیط کشت گلیسرول آرژنین آگار با جداسازی میانگین ۲۵/۶۶ پس

از محیط کشت گلوکز آسپاراژین آگار کارایی خوبی ارائه داد. گلیسرول به عنوان یک منبع کربن به وفور در در رسوبات دریایی وجود داشته و بخشی از اکتینومایست‌های ساکن در رسوبات مکانیسم‌های متابولیک مرتبط با تجزیه گلیسرول را طی تکامل در خود توسعه داده اند (Liu 2011). بنابر این گلیسرول موجود در محیط کشت گلیسرول آرژینین آگار بخوبی توسط ایزوله‌های اکتینومایست مورد استفاده قرار گرفته و ایزوله‌های فراوانی بر روی آن رشد نمودند. آرژینین به عنوان تنها منبع نیتروژن موجود در این محیط کشت بصورت انتخابی رشد اکتینومایست‌ها را تحریک نمود. اکتینومایست‌ها عموماً بدلیل دارا بودن مسیرهای بیوشیمیایی کاتابولیسم آرژینین به سهولت از این منبع اختصاصی نیتروژن استفاده می‌نمایند (Khodadad et al., 2011). در این محیط کشت به منظور مهار عوامل مداخله‌کننده از جمله رشد باکتریهای تک سلولی و قارچهای موجود در نمونه رسوب و افزایش میزان جداسازی ایزوله‌های اکتینومایست از تیمارهای فیزیکی استفاده شد. تیمار حرارتی ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه بیشترین کارایی را در جداسازی اکتینومایست‌ها نشان داد. دلیل افزایش کارایی جداسازی با اعمال تیمار حرارتی مقاومت دمایی اسپورهای اکتینومایست و حساسیت اغلب قارچهای و برخی باکتریهای موجود به تیمار حرارتی بود (Hames Kocabas & Uzel., 2012). تیمار خشک کردن در هوا نیز با کاهش تعداد باکتری‌های سریع‌الرشد زمینه را برای بقاء اکتینومایست‌های سازگار با محیط دارای فعالیت آبی^{۱۶} پایین فراهم نمود (Gontang et al., 2007). در سایر مطالعات نیز تیمار خشک کردن در هوا کارایی خوبی در جداسازی اکتینومایست‌ها از نمونه‌های رسوب نشان داد (Jensen et al., 2005 ; Mincer et al., 2002). از نمونه بدون تیمار بدلیل حضور گسترده قارچها و باکتری‌های سریع‌الرشد نیز جداسازی بهینه‌ای انجام نشد. بررسی فراوانی ایزوله‌های جدا شده در ایستگاه‌های مختلف نشان داد ایستگاه‌های ۹، ۵ و ۱ با جداسازی بترتیب ۱۹، ۱۴ و ۱۰ ایزوله بیشترین فراوانی را ارائه نمودند. فراوانی نسبی بالاتر ایزوله‌های بدست آمده می‌تواند به علت عمق پایین این ایستگاه‌ها باشد. در ایستگاه اول احتمالاً بدلیل جریان‌های خروجی از خلیج فارس به دریای عمان و عمق پایین رسوبات تحت تاثیر اکتینومایست‌های ورودی از خشکی قرار گرفته‌اند. ایستگاه‌های ۹ و ۵ نیز به علت واقع شدن در نزدیکی دهانه خروجی رودخانه‌هایی مانند جگین حاوی فراوانی بالایی از ایزوله‌های اکتینومایست بودند. احتمالاً برخی از سویه‌های جدا شده در این ایستگاه‌ها منشأ خاکی داشته و بدنبال سیلاب‌های فصلی بصورت رودخانه وارد دریای گردیده و در اعماق کم رسوب گذاری کرده‌اند. بررسی فعالیت ضد میکروبی ایزوله‌های بدست آمده بر اساس روش آگار دولایه نشان داد بترتیب ۲۳، ۱۱/۹ و ۲۲/۶۱ درصد از ایزوله‌های جدا شده در مقابل *S.aureus*، *E.coli* و *C.albicans* فعالیت ضد میکروبی ارائه نمودند. با این حال ارزیابی تولید ترکیب ضد میکروبی با استفاده از روش انتشار از چاهک نشان داد بترتیب ۱۵/۴۷، ۵/۹۵ و ۱۵/۴۷ درصد از ایزوله‌های جدا شده در مقابل *S.aureus*، *E.coli* و *C.albicans* ترکیب ضد میکروبی تولید نمودند. تفاوت میزان ایزوله‌های مولد در روش آگار دولایه با روش انتشار از آگار می‌تواند بدلیل اعمال سایر مکانیسم

¹⁶ Water activity

های بازدارندگی غیر از تولید آنتی بیوتیک توسط برخی ایزوله‌های اکتینوماست در پیرامون کلونی خود باشد که امکان رشد میکروارگانیسم مورد آزمون را سلب نموده است. در مطالعه‌ای که توسط مجری پروژه حاضر و همکاران انجام شد میزان فعالیت ضد میکروبی اکتینوماست‌های جدا شده از رسوبات خلیج فارس در محدوده استان هرمزگان در مقابل گونه‌های *S.aureus*، *E.coli* و *C.albicans* به ترتیب ۳۳، ۲۰ و ۳۰ درصد گزارش گردید (گذری و همکاران ۱۳۹۵). گذری و همکاران در مطالعه دیگری نشان دادند ۲۷ درصد اکتینوماست‌های جدا شده از رسوبات استخرهای پرورش میگو بندر تباب را در مقابل حداقل یکی از گونه‌های بیماری‌زای *V. parahaemolyticus*، *V. anguillarum*، *V. alginolyticus* و *harveyi* فعالیت ضد باکتریایی ارائه می‌کنند. همچنین ۱۲ درصد ایزوله‌های جدا شده در مقابل هر چهار گونه مورد بررسی ویبریو فعالیت ضد باکتریایی نشان دادند (Gozari et al., 2016) در یک مطالعه فعالیت ضد میکروبی اکتینوماست‌های جدا شده از خلیج بنگال ۲۴ درصد گزارش گردید (Suthindhiran & Kannabiran., 2009). در تحقیق دیگری Ramesh و همکارانش میزان فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی اکتینوماست‌های جدا شده از خلیج بنگال را به ترتیب ۵۳٪ و ۷۲٪ گزارش نمودند (Ramesh et al., 2009). در همین راستا ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اکتینوماست‌های جدا شده از خلیج Otsuchi ۵۹ درصد گزارش شد (Imada et al., 2007). Zheng و همکارانش در تایوان میزان فعالیت ضد میکروبی ایزوله‌های اکتینوماست بومی را ۴۳ درصد گزارش نمودند (Zheng et al., 2000). مطالعه دیگری توسط Bredholt در نروژ انجام شده که نشان می‌دهد فعالیت ضد میکروبی اکتینوماست‌های بومی ناحیه Trondheim Fjord در مقابل کاندیدا آلبیکنس ۳۹ درصد می‌باشد (Bredholt et al., 2008). بیشتر بودن درصد ایزوله‌های موثر علیه باکتری *S. aureus* می‌تواند بدلیل تفاوت ساختار دیواره سلولی باکتریها و نفوذ پذیری بالاتر دیواره سلولی باکتریهای گرم مثبت نسبت به ترکیبات ضد میکروبی در مقایسه با باکتریهای گرم منفی باشد (Lambert, 2002). تعیین حداقل غلظت بازدارنده آنتی بیوتیک‌های تولید شده بیانگر اثر کمتر آنها در مقایسه با آنتی بیوتیک‌های استاندارد بود. این کاهش فعالیت می‌تواند بدلیل ترکیب ناخالص آنتی بیوتیک‌های تولید شده در مقایسه با خلوص بالای آنتی بیوتیک‌های استاندارد می‌باشد. نتایج بررسی کینتیک رشد و تولید آنتی بیوتیک توسط ایزوله‌های مولد نشان داد سویه‌های مولد منتخب بعد از ۴۸ ساعت رشد تصاعدی به فاز سکون وارد شده و میزان قابل توجه ترکیب آنتی بیوتیک در این فاز تولید گردید. با توجه به تطابق منحنی رشد و تولید آنتی بیوتیک می‌توان نتیجه‌گیری نمود که ترکیب آنتی بیوتیک تولید شده به متابولیت‌های ثانویه تعلق دارد. تفاوت در منحنی رشد و تولید ایزوله‌های مورد بررسی را می‌توان به توانمندی و قابلیت‌های متابولیک و بیوسنتزی ایزوله‌های مورد مطالعه در مصرف منابع مغذی، دما، pH و میزان اکسیژن در دسترس مرتبط دانست. با توجه به افزودن مایه تلقیح فعال به محیط کشت، فاز تاخیری در کلیه نمودارها حذف شده چون سلول در مرحله آماده‌سازی ماده تلقیح مراحل سازگاری با محیط کشت از قبیل تولید آنزیم‌ها و کوفاکتورهای مسئول متابولیسم کردن منابع مغذی را تولید نموده است. نکته قابل توجه در کینتیک رشد ایزوله IFSIRI 214 در میان فاز لگاریتمی با وقفه‌ای

در رشد ایجاد شده است که می‌تواند در نتیجه پدیده رشد دیوکسیک^{۱۷} باشد. دلیل این پدیده وجود دو منبع کربن گلوکز و نشاسته در محیط کشت می‌باشد. سلول باکتری پس از اتمام منبع گلوکز طی یک مرحله تاخیری برای مصرف منبع دوم که نشاسته می‌باشد از لحاظ متابولیک آماده شده است (Dutta, 2010). در تمام ایزوله‌های مورد بررسی میزان افزایش بیومس پس از ۴۸ ساعت بشدت کاهش یا متوقف گردید. در این وضعیت میکروارگانسیم بدلائیل مختلف مانند اتمام منابع مغذی و تولید عوامل بازدارنده ناشی از متابولیسم سلول در محیط کشت رشد خود را محدود ساخته^{۱۸} است. بنابراین تعادلی بین مرگ و رشد سلول ایجاد شده و جمعیت سلولها معمولاً ثابت می‌ماند. بررسی منحنی کیتیک رشد تمام ایزوله‌های مورد بررسی نشان داد بیشترین میزان آنتی بیوتیک در این مرحله تولید گردید. در این مرحله ایزوله‌های مولد بوسیله آنزیم‌های مرتبط که طی فاز لگاریتمی رشد تولید شده اند با الگوهای پیچیده اقدام به بیوسنتز آنتی بیوتیک نمودند (Saxena, 2015). شناسایی اولیه ایزوله‌های دارای فعالیت ضد میکروبی بیانگر تعلق آنها به جنس *Streptomyces* بود. سایر مطالعات نیز حضور گسترده اعضاء جنس *Streptomyces* را در رسوبات مناطق کم تایید می‌نمایند (Kokare et al. 2004, Fiedler et al. 2005). در همین زمینه مطالعه ای که توسط گذری و همکاران بر روی اکتینومیست‌های جدا شده از رسوبات خلیج فارس در محدوده استان هرمزگان انجام شد بیانگر حضور غالب جمعیت‌های *Streptomyces* در رسوبات مورد مطالعه بود (گذری و همکاران، ۱۳۹۵). همچنین در مطالعه دیگری فراوانی گسترده اعضای جنس *Streptomyces* در رسوبات نمونه برداری شده از بخش شمالی خلیج فارس تایید شد (گذری و همکاران ۱۳۸۸). مطالعه Jensen و همکارانش نیز نشان داد تعداد ایزوله‌های استرپتومایسس با عمق ایستگاه‌ها رابطه معکوسی داشت (Jensen et al., 1991). در مطالعه دیگری Vijayakumar و همکارانش اعلام نمودند استرپتومایسس‌ها جمعیت غالب اکتینومیست‌های قابل کشت در رسوبات دریایی نواحی کم عمق را تشکیل می‌دهند. (Vijayakumar et al., 2007). شناسایی پلی فازی ایزوله‌های مولد منتخب بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک، بیوشیمیایی، فیزیولوژیک و ژنتیک تعلق آنها را به گونه‌های مختلف جنس *Streptomyces* نشان داد. آنالیز حاصل از تطابق توالی 16s rRNA سویه‌های جدا شده با نمونه‌های موجود در بانک ژن NCBI بیانگر همولوژی ۹۹ درصدی سویه‌های جدا شده با سویه‌های قبلی بود. بطوریکه سویه IFSIRI 70 دارای ۹۹ درصد همولوژی با سویه‌های *Streptomyces chartreusis* مولد آنتی بیوتیک Chartreusin و *Streptomyces variabilis* مولد آنتی بیوتیک variapeptin بود (Nakagawa et al., 1990). سویه IFSIRI 137 با سویه *Streptomyces qinglanensis* مولد ترکیب ضد سرطان PreQ0 base ۹۹ درصد تشابه داشت (Xu et al., 2015). همچنین سویه IFSIRI 145 به میزان ۹۹ درصد تشابه با *Streptomyces cacaoi* مولد آنتی بیوتیک‌های Polyoxins نشان داد (Chen et al., 2009). سویه IFSIRI193 تشابه ۹۹ درصدی با *Streptomyces diastaticus* مولد آنتی بیوتیک‌های Oligomycins A and C ارائه نمود. همچنین

¹⁷ Diauxic growth

¹⁸ Self limiting

سویه IFSIRI 214 با *Streptomyces albidoflavus* مولد یک آنتی بیوتیک غیر پلی ان ضد قارچی به میزان ۹۹ درصد همولوژی نشان داد (Augustine et al., 2005). همولوژی بالای سویه‌های جدا شده در مطالعه حاضر با سویه‌های مولد آنتی بیوتیک‌های مهم می‌تواند نوید بخش پتانسیل بالای رسوبات دریای عمان برای اکتشاف سویه‌های مولد آنتی بیوتیک باشد. تعیین فاصله ژنتیکی میان سویه‌های مولد و نزدیکترین سویه‌ها در بانک ژن NCBI بیانگر فاصله ژنتیکی ۰/۰۵ تا ۰/۰۱ بین سویه IFSIRI 70 با تمام سویه‌های مورد بررسی بود. همچنین فاصله ژنتیکی سویه IFSIRI 137 با سایر سویه‌های مورد بررسی از ۰/۰۱ تا ۰/۰۴ متغیر بود. فاصله ژنتیکی بین سویه‌های IFSIRI 145، IFSIRI 193 و IFSIRI 214 با برخی از نزدیکترین سویه‌هایشان وجود نداشت. بر اساس این نتایج می‌توان بیان نمود که احتمالاً سویه‌های IFSIRI 70 و IFSIRI 137 سویه‌های جدیدی می‌باشند که برای تایید گونه‌های جدید نیازمند مطالعات بیشتری هستند. آنالیز تکاملی سویه‌های مولد آنتی بیوتیک بر اساس ژن 16s rRNA با استفاده از روش‌های فاصله‌ای و کاراکتری صورت گرفت. استفاده از هر دو الگوی تکاملی فاصله‌ای و کاراکتری امکان ترسیم درخت فیلوژنتیک با توپولوژی صحیح و طول شاخه‌های دقیق را فراهم می‌نماید. بنابراین با بهره‌برداری از الگوریتم‌های مختلف سازنده درخت تصویر واضحی از سیر تکاملی سویه‌های مولد آنتی بیوتیک فراهم نمود (Abdo et al., 2005). توالی ژن 16s rRNA به عنوان یک ژن اورتولوگ و ساعت ملکولی بطور گسترده در مطالعات فیلوژنتیک باکتریها مورد مطالعه قرار گرفته است. ترتیب توالی این ژن به میزان بالایی حفاظت شده و اطلاعات دقیقی را برای تمایز در سطح گونه و جنس فراهم می‌کند (Sacchi et al., 2002). آنالیز این ژن نتایج ارزشمندی را در زمینه شناسایی گونه‌های جدید و اکتشاف ترکیبات زیست فعال از اکتینومایست‌ها ارائه نموده است (Liu et al., 2012). نتایج آنالیز فیلوژنتیک بر اساس روش فاصله‌ای joining Neighbour بیانگر وجود دو کلاد جداگانه می‌باشد. علیرغم قرارگیری سویه‌های IFSIRI 70، IFSIRI 214 و IFSIRI 193 در کلاد اول و انشعاب آنها از یک جد مشترک اما میزان واگرایی تکاملی در میان این سه سویه متفاوت بود. سویه IFSIRI 70 از نرخ واگرایی سریعتری نسبت به دو سویه دیگر برخوردار است. نرخ بالاتر واگرایی می‌تواند بدلیل تفاوت میزان جهش و تنگناهای ژنتیکی در نتیجه فشارهای انتخابی بر روی ژن 16s rRNA باشد. قرارگیری سویه‌های IFSIRI 70 و IFSIRI 214 در یک خوشه می‌تواند بدلیل نزدیکی جغرافیایی زیستگاه این دو سویه باشد. سویه‌های مذکور از ایستگاه‌های ۴ و ۵ جداسازی شده‌اند که هر دو در منطقه رسوبات هولوسن در منطقه نزدیک به جاسک و سیریک نمونه برداری شده بود. سویه‌های IFSIRI 137 و IFSIRI 145 با واگرایی تکاملی قابل ملاحظه‌ای نسبت به هم در کلاد دوم قرار گرفتند. سویه IFSIRI 137 با نرخ واگرایی پایین تر زودتر از IFSIRI 145 از جد مشترکشان انشعاب یافته است. از سوی دیگر میزان جهش‌های واقع شده در ژن 16s rRNA سویه IFSIRI 145 بیشتر از نوکلئوتید به ازای هر ۱۰۰۰ نوکلئوتید است. این دو سویه برترتیب از ایستگاه‌های ۱۳ و ۱۴ که احتمالاً تحت تاثیر رسوبات رودخانه‌های ایندوس و سرباز قرار دارند جداسازی شدند. روش آماری Bootstrap به میزان بالایی صحت توپولوژی درخت رسم شده و اعتبار فیلوژنتیک

آن را تایید نمود (شکل ۳-۲۳). تفسیر درخت فیلوژنتیک سویه های مولد منتخب و نزدیکترین سویه های موجود بر اساس روش Neighbour joining نیز توپولوژی مشابهی ارائه نمود. نتایج نشان داد اگرچه سویه IFSIRI 70 و سویه های نزدیک آن در یک خوشه قرار گرفته اند اما نرخ واگرایی بالاتری برخوردار بوده و جهش های بیشتری را متحمل شده است. سویه IFSIRI 214 با نزدیکترین سویه های مورد بررسی در موقعیت تکاملی ویژه ای قرار گرفته از لحاظ واگرایی تکاملی قبل از سویه های *S. diastaticus* و بعد از *S. coelicoflavus* انشقاق یافته است. با اینحال هر سه سویه با اعتبار آماری بالایی دارای منشا منوفیلتیک یکسان می باشند. سویه IFSIRI 193 در یک خوشه جداگانه قرار گرفت و با سویه های IFSIRI 70 و IFSIRI 214 در یک کلاذ قرار گرفته و دارای جد مشترک می باشند. نرخ واگرایی سویه IFSIRI 193 با نزدیک ترین سویه ها یکسان بود و با اعتبار ۱۰۰ درصد در یک خوشه قرار گرفتند. سویه های IFSIRI 137 و IFSIRI 145 در یک کلاذ قرار گرفته اما نرخ واگرایی تکاملی و الگوی شاخه زایی متفاوتی دارند. سویه IFSIRI 137 با سویه تازه شناسایی شده *S. qinglanensis* در یک خوشه قرار گرفته اما میزان جهش های واقع شده در آن بیشتر است. با توجه به اختلاف زیستگاه سویه های *S. qinglanensis* و IFSIRI 137 که بترتیب از رسوبات جنگل های مانگرو Hainan و رسوبات اوتروفیک دریای عمان می توان اختلاف میزان جهش در نتیجه فشارهای محیطی این دو زیستگاه را بهتر درک نمود. ترسیم درخت فیلوژنتیک با استفاده از روش کاراکتری Maximum likelihood نیز به میزان زیادی توپولوژی درخت فاصله ای را به عنوان محتمل ترین درخت را تایید نمود. با این تفاوت که IFSIRI 214 و IFSIRI 193 را در یک خوشه قرار داده است. با توجه به اختلاف مبنای روش های فاصله ای و کاراکتری می توان تصویر جامعی از روند فیلوژنتیک سویه ها ارائه نمود. ترکیب نوکلئوتیدی ژن 16s rRNA سویه های مورد مطالعه بیانگر محتوای بالای نوکلئوتید های گوانین و سیتوزین بود. این یافته در مورد باکتریهای متعلق به اکتینوباکتریها در سایر مطالعات نیز تایید شده بود. این با در نظر گرفتن این نکته که اینکه اکثر ترکیبات زیست فعال تولید شده توسط اکتینومیست ها از جنس *Streptomyces* بدست آمده اند و همچنین میزان بالای ایزوله های دارای فعالیت ضد میکروبی در این پژوهش، پیش بینی می شود رسوبات این منطقه از خلیج فارس منبع با ارزشی برای اکتشاف فراورده های طبیعی دریایی باشند.

پیشنهادها

۱. پیشنهاد می‌گردد سویه‌های IFSIRI 70 و IFSIRI 137 به منظور انجام آزمون‌های شناسایی تکمیلی به خارج از کشور ارسال گردد. بدین منظور می‌توان پس از تامین اعتبار هماهنگی لازم با شرکت DSMZ آلمان صورت بگیرد. تایید جدید بودن گونه‌های مذکور در سطح گونه علاوه بر افزودن بر تنوع زیستی شناخته شده موجود در کشور امکان نام گذاری گونه‌ها و ثبت در کتب مرجع را فراهم می‌کند. از جنبه دیگر پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان می‌تواند در زمره معدود مراکز اکتشاف، شناسایی و ثبت گونه‌های باکتریایی در کشور قرار گیرد و در زمینه دریایی به عنوان قطب شناسایی میکروارگانیزم‌های دریایی مطرح گردد.
۲. با توجه به جداسازی گونه‌های مولد ترکیبات ضد میکروبی از محیط بکر دریای عمان و امکان جدید بودن ترکیبات تولید شده پیشنهاد می‌شود پروژه‌ای جهت خالص سازی و تعیین ساختار این ترکیبات تدوین گردد.
۳. مطالعه و سنجش دیگر فعالیت‌های زیستی ایزوله‌های مولد پیشنهاد می‌گردد.
۴. پیشنهاد می‌شود سایر کاربردهای میکروارگانیزم‌های بومی جدا شده در این تحقیق در زمینه‌های مختلف مانند پاکسازی آلاینده‌های دریایی، تصفیه پساب و غیره بصورت پروژه‌های تحقیقاتی مورد مطالعه قرار گیرد.

منابع

- گذری، محسن. (۱۳۸۸) بررسی فعالیت آنتاگونیستی اکتینومیست‌های جدا شده از خلیج فارس بر روی سویه های ویبریو بیماریزا در ماهی و میگو، کارشناسی ارشد، دانشکده علوم پایه / دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم
- گذری محسن، مرتضوی محمد صدیق، کریم زاده رامین، ابراهیمی محمود، دهقانی رضا، ۱۳۹۵. جداسازی، شناسایی و ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اکتینومیست‌ها از رسوبات دریایی خلیج فارس در محدوده استان هرمزگان. مجله علمی شیلات ایران. ۲۵ (۱): ۸۱-۹۳
- فدوی حسینی، هادی. ۱۳۷۶. تاثیر امواج بدام افتاده بر شکل گیری سواحل در دریای عمان، اولین همایش زمین شناسی دریایی ایران،
- نامی، محمد حسن، حیدری پور، اسفندیار. (۱۳۹۱). الگوی جدید برای محاسبه دقیق مساحت و طول مرزهای کشور ج.ا.ایران. جغرافیا (برنامه ریزی منطقه ای). ۲ (۲): ۲۴۸-۲۲۹.
- Abdo, Z., Minin, V. N., Joyce, P., & Sullivan, J. (2005). Accounting for Uncertainty in the Tree Topology Has Little Effect on the Decision-Theoretic Approach to Model Selection in Phylogeny estimation. *Mol Biol Evol*, 22(3), 691-703.
- Augustine S. K., Bhavsar S. P. . Kapadnis, B. P. 2005. A non-polyene antifungal antibiotic from *Streptomyces albidoflavus* PU 23. *Journal of Biosciences*. 30(2): 201-211.
- Bhakuni, D.S. and Rawat, D.S., 2006. Bioactive marine natural products. Springer Science & Business Media.
- Bentley SD, Chater KF, Cerden˜ o-Tárraga AM, et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*. 2002; 417:141-7.
- Berdy J. Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot* 2005; 58:1-26.
- Bhattacharya, G. C. and Chaubey, A. K. 2001. Western Indian Ocean – A glimpse of the tectonic scenario. In: *The Indian Ocean - A perspective*, Sengupta, R. and Desa, D. (eds), Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi, pp. 691 - 729.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Keyzers, R.A., Munro, M.H. and Prinsep, M.R., 2015. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep*, 32(2), pp.116-211.
- Bredholt, H.; Fjærvik, E.; Johnsen, G.; Zotchev, S.B., (2008), Actinomycetes from sediments in the Trondheim Fjord, Norway: Diversity and biological activity. *Mar. Drugs*, 6, 12-24.
- Bruntner C, Binder T, Pathom-aree W, Goodfellow M, Bull AT, Potterat O, et al. Frigo-cyclinone, a novel angucyclinone antibiotic produced by a *Streptomyces griseus* strain from Antarctica. *J Antibiot (Tokyo)* 2005; 58:346-9.
- Bull AT, Stach JEM, Ward AC, Goodfellow M (2005) Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. *Anton Leeuw Int J G* 87:65-79.
- Carlson JC, Li S, Burr DA, Sherman DH. Isolation and characterization of tiran-damycins from a marine-derived *Streptomyces* sp. *J Nat Prod* 2009; 72:2076-9
- Charan, R.D., Schlingmann, G., Janso, J., (2004), Diazepinomicin, a new antimicrobial alkaloid from marine *Micromonospora* sp, *J. Nat. Prod*, 67:1431-1433.
- Chen W, Huang T, He X, Meng Q, You D, Bai L, Li J, Wu M, Li R, 2009. Characterization of the polyoxin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces cacaoi* and engineered production of polyoxin H. *J Biol Chem*. 284(16): 10627-10638.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2015). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; fifteenth informational supplement, M100-S25, vol. 35, no. 3. Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne, Pa..
- Dutta R, Fundamentals of Biochemical Engineering, Springer, berlin, 2010.
- Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., et al., (2006), *The prokaryotes*, springer, 3:548-622
- Ekwenye UN and Kazi E (2007) Investigation of plasmid DNA and antibiotic resistance in some pathogenic organism. *Afr J Biotechnol* 6:877-880.

- El-Gendy, M.M., Shaaban, M., Shaaban, K.A., El-Bondkly, A.M., Laatsch, H., 2008. Essramycin: a first triazolopyrimidine antibiotic isolated from nature. *J. Antibiot.* 61, 149–157.
- Emery, K.O. (1956). Sediments and water of Persian Gulf. *Bull. Amer. Ass. Petrol. Geol.* 40 (10): 2354-2383.
- Ezaki, T., Hashimoto, Y., Yamamoto, H., Lucida, M.L., Liu, S., Kusunoki, S., Asano, K., Yabuuchi, E., 1990, Evaluation of the microplate hybridization method for rapid identification of *Legionella* species. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease*, 9: 213–217.
- Fenical, W., (1993), Chemical studies of marine bacteria: developing a new resource, *Chem. Rev*, 93(5): 1673-1683.
- Fenical, W., Jensen, P.R., (2006), Developing a new resource for drug discovery marine actinomycete bacteria. *Nat Chem. Biol.* 2, 12:666-673.
- Fiedler, H.P., Bruntner, C., Bull, AT., (2005), Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. *Antonie Leeuwenhoek*, 87:37-42.
- Gao, B, Gupta RS (2012) Microbial Systematics in the Postgenomics Era. *Antonie van Leeuwenhoek*.
- Gartner, A., Ohlendorf, B., Schulz, D., Zinecker, H., Wiese, J., Imhoff, J.F., 2011. Levantilides A and B, 20-membered macrolides from a micromonospora strain isolated from the mediterranean deep sea sediment. *Mar. Drugs* 9, 98–108.
- Goodfellow M. 2012 Phylum XXVI. Actinobacteria phyl. nov. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd edn (eds M Goodfellow, P Ka'mpfer, H-J Busse, ME Trujillo, K-I Suzuki, W Ludwig, WB Whitman), pp. 1–2083. New York, NY: Springer.
- Gopalakrishnan, S., Sunder, J. and Venu, S., 2014. Distribution of cultivable actinobacteria from the marine sediments along the Andaman Coast of Eastern Indian Ocean. *Adv. Anim. Vet. Sci*, 2(12), pp.668-682.
- Gozari M, Mortazavi M, Bahador N, Tamadoni jahromi S, Rabbaniha M. Isolation and screening of antibacterial and enzyme producing marine actinobacteria to approach probiotics against some pathogenic vibrios in shrimp *Litopenaeus vannamei*. *IJFS*. 2016; 15 (2) :630-644
- Hames-Kocabas, E.E. and Uzel, A. (2012) Isolation Strategies of Marine-Derived Actinomycetes from Sponge and Sediment Samples. *Journal of Microbiological Methods*, 88, 342-347.
- Han Y, Yang B, Zhang F, Miao X, Li Z (2009) Characterization of antifungal chitinase from marine *Streptomyces* sp. DA11 associated with South China Sea sponge *Craniella australiensis*. *Mar Biotechnol* 11:132–140
- Heald SC, Brando PFB, Hardicre R, Bull AT (2001) Physiology, biochemistry and taxonomy of deep-sea nitrile metabolizing *Rhodococcus* strains. *Antonie van Leeuwenhoek* 80:169–183.
- Hohmann C, Schneider K, Bruntner C, Irran E, Nicholson G, Bull AT, et al. Caboxam-ycin, a new antibiotic of the benzoxazole family produced by the deep-sea strain *Streptomyces* sp. NTK 937. *J Antibiot* 2009; 62:99–104.
- Hughes CC, Prieto-Davo A, Jensen PR, Fenical W: The marinopyrroles, antibiotics of an unprecedented structure class from a marine *Streptomyces* sp. *Org Lett* 2008, 10:629-631.
- Imada, C., Koseki, N., Kamata, M., Kobayashi, T., Hamada-Sato, N., 2007. Isolation and characterization of antibacterial substances produced by marine actinomycetes in the presence of seawater. *Actinomycetologica*, 21:27–31.
- Igarashi, Y., 2015. Antitumor Compounds from Actinomycetes in Deep-sea Water of Toyama Bay. In *Handbook of Anticancer Drugs from Marine Origin* (pp. 367-382). Springer International Publishing.
- Jensen, P.R., Mincer, T.J., Williams, P.G., Fenical, W., (2005), Marine actinomycete diversity and natural product discovery, *Antonie Leeuwenhoek*, 87:43-48.
- Jensen, P.R., Williams, P.G., Oh, D., Zeigler, L., Fenical, F., (2007) Species Specific Secondary Metabolite Production in Marine Actinomycetes of Genus *Salinispora*. *Appl. Environ. Microbiol*, 73: 1146–1152
- Jensen, P.R.; Dwight, R.; Fenical, W. (1991) Distribution of actinomycetes in near- shore tropical marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol*, 57, 1102- 1108.
- Khodadad, C.L.M, A.R. Zimmerman, S. Uthandi, S.J. Green, and J.S. Foster (2011) Taxa-specific changes in soil microbial community composition induced by pyrogenic carbon amendments. *Soil Biology & Biochemistry*, 43: 385 - 392.
- Koch AL (2001) Oligotrophs versus copiotrophs. *Bioassays*, 23:657–661.
- Kokare, C.R., Mahadik, K.R., Kadam, S.S., Chopade, B.A., 2004. Isolation, characterization and antimicrobial activity of marine halophilic *Actinopolyspora* species AH1 from the west coast of India., *Current Science*, 86:593–597.
- Kopp, C., Fruehn, J., Flueh, E.R., Reichert, C., Kukowski, N., Bialas, J. & Klaeschen, D., 2000. Structure of the Makran subduction zone from wide-angle and reflection seismic data, *Tectonophysics*, 329, 171–191.

- Lam, K.S., (2006), Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes, *Curr Opin Microbiol*, 9:245–251.
- Lambert, P. A., 2002. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and *mycobacteria*, *Journal of Applied Microbiology*, 92:46S-54S.
- Liu, J.; Luo, C.; Smith, P. A.; Chin, J. K.; Page, M. G. P.; Paetzel, M.; Romesberg, F. E. J. *Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 17869.
- Liu, X., Bolla, K., Ashforth, E.J., Zhuo, Y., Gao, H., Huang, P., Stanley, S.A., Hung, D.T., and Zhang, L. (2012) Systematics-guided bioprospecting for bioactive microbial natural products. *Antonie van Leeuwenhoek* 2012, 101, 55–66, doi: 10.1007/s10482-011-9671-1.
- Macherla VR, Liu J, Bellows C, Teisan S, Lam KS, Potts BCM. Glaciapyrroles A, B and C, pyrrolonesquiterpenes from a *Streptomyces* sp. isolated from an Alaskan marine sediment. *J Nat Prod* 2005; 68:780–3.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J (1997) *Brock biology of microorganisms* vol 514. prentice hall Upper Saddle River, NJ,
- Maldonado LA, Fragoso-Yáñez D, Pérez-García A, Rosellón-Druker J, Quintana ET (2009) Actinobacterial diversity from marine sediments collected in Mexico *Antonie Van Leeuwenhoek* 95:111-120
- Maldonado LA, Fenical W, Jensen PR, Kauffman CA, Mincer TJ, Ward AC, et al. *Salinispora arenicola* gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family Micromonosporaceae. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005a; 55:1759–66.
- Manivasagan P., Venkatesan J., Sivakumar K. and Kim S.K., Marine actinobacterial metabolites: Current status and future perspectives, *Microbiol. Res.*, 2013; 168: 311-332.
- Maskey RP, Helmke E, Laastsch H (2003) Himalomycin A and B: isolation and structure elucidation of new fridamycin type antibiotics from a marine *Streptomyces* isolate. *J Antibiot* 56:942–949.
- Maskey RP, Kock I, Helmke E, Laatsch H. Isolation and structure determination of phenazostatin D, a new phenazine from a marine actinomycete isolate *Pseudonocardia* sp. B6273. *Z Naturforsch* 2003; 58b:692–4.
- McArthur, K.A., Mitchell, S.S., Tsueng, G., Rheingold, A., White, D.J., Grodberg, J., Lam, K.S., Potts, B.C., 2008. Lynamycins A–E, chlorinated bisindole pyrrole antibiotics from a novel marine actinomycete. *J. Nat. Prod.* 71, 1732–1737.
- Mincer TJ, Fenical W, Jensen PR (2005) Culture-dependent and culture-independent diversity within the obligate marine actinomycete genus *Salinispora*. *Appl Environ Microbiol* 71:7019– 7028.
- Mincer TJ, Jensen PR, Kauffman CA, Fenical W (2002) Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Appl Environ Microbiol* 68:5005–5011.
- Nakagawa M, Hayakawa Y, Adachi K, Seto H. 1990. A new depsipeptide antibiotic, variapeptin. *Agric Biol Chem.* 54(3):791-4.
- Okami Y, Hotta K (1988) Search and discovery of new antibiotics. In: Goodfellow M, Williams ST, Mordarski M (eds) *Actinomycetes in biotechnology*. Academic press, London, pp 33–67.
- Platt, J.P., Leggett, J.K., Alam, S., 1988. Slip vectors and fault mechanics in the Makran accretionary wedge, southwest Pakistan. *J. Geophys. Res.* 93 (B7), 7955-7973.
- Ramesh, S., Mathivanan, N. 2009. Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25:2103–2111.
- Ravikumar S, Gnanadesigan M, Suganthi P, Ramalakshmi A. Antibacterial potential of chosen mangrove plants against isolated urinary tract infections bacterial pathogens. *Int J Med Med Sci* 2010; 2(3): 94-99.
- Riedlinger, J., Reicke, A., Zahner, H., Krismer, B., (2004), Abyssomicins, inhibitors of the para-aminobenzoic acid pathway produced by the marine *Verrucospora* strain AB-18- 032, *J. Antibiot*, 57:271-279.
- Ruan, J.S. (1994). Rapid isolation and identification of actinomycetes. In: *UNESCO Southeast Asia Regional Training Workshop-Rapid Method in Microbiology and Biotechnology*. Bangkok. October 19-28.
- Sacchi S, Lorenzi S, Molla G et al. (2002) Engineering the substrate specificity of D-aminoacid oxidase. *J Biol Chem* 277, 27510–27516.
- Saxena S, *Applied Microbiology* Springer, India, 2015.
- Schluter H.U., A. Prexl, Ch. Gaedicke, H. Roeser, Ch. Reichert, H. Meyer, C. von Daniels (2002) ,The Makran accretionary wedge: sediment thicknesses and ages and the origin of mud volcanoes ,*Marine Geology* 185 (2002) 219-232.
- Schumacher RW, Talmage SC, Miller SA, Sarris KE, Davidson BS and Goldberg A (2003) Isolation and structure determination of an antimicrobial ester from a marine sediment derived bacterium. *J Nat Prod* 66: 1291–1293.

- Socha AM, LaPlante KL, Rowley DC. New bisanthraquinone antibiotics and semi-synthetic derivatives with potent activity against clinical *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates. *Bioorg Med Chem* 2006; 14:8446–54.
- Soria-Mercado IE, Prieto-Davo A, Jensen PR, Fenical W. Antibiotic terpenoid chloro-dihydroquinones from a new marine actinomycete. *J Nat Prod* 2005; 68:904–10.
- Steele RW. *Clinical Handbook of Pediatric Infectious Disease*: CRC Press; 2013. Gontang, E.A., Fenical, W., Jensen, P.R., 2007. Phylogenetic diversity of Gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3272–3282.
- Suthindhiran, K., Kannabiran, K., 2010. Diversity and exploration of bioactive marine actinomycetes in the Bay of Bengal of the Puducherry coast of India. *Indian Journal Microbiol*, 50(1):76-82.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30:2725-2729.
- Vijayakumar R, Muthukumar C, Thajuddin N, Panneerselvam A, Saravanamuthu R (2007). Studies on the diversity of actinomycetes in the Palk Strait region of Bay of Bengal, India. *Actinomycetologica*, 21: 59-65.
- Wanner LA (2009) A patchwork of *Streptomyces* species isolated from potato common scab lesions in North America. *Am J Pot Res* 86:247–264.
- Ward AC and Bora N (2006) Diversity and biogeography of marine actinobacteria. *Curr Opin Microbiol* 9:279–286.
- Waters AL, Hill RT, Place AR, Hamann MT. The expanding role of marine microbes in pharmaceutical development. *Curr Opin Biotechnol* 2010; 21:780–6.
- Watve, M. G., Tickoo, R., Jog, M. M. & Bhole, B. D. (2001). How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch Microbiol* 176, 386–390.
- Xiong, Z.Q., Liu, Q.X., Pan, Z.L., Zhao, N., Feng, Z.X. and Wang, Y., 2015. Diversity and bioprospecting of culturable actinomycetes from marine sediment of the Yellow Sea, China. *Archives of microbiology*, 197(2), pp.299-309.
- Xu D, Ma M, Liu Y, Zhou T, Wang K, Deng Z, Hong K., 2015. PreQ0 base, an unusual metabolite with anti-cancer activity from *Streptomyces qinglanensis* 172205, *Anticancer Agents Med Chem.* 15(3):285-90.
- Yang PW, Li MG, Zhao JY, Zhu MZ, Shang H, Li JR, Cui XL, Huang R, Wen ML. 2010. Oligomycins A and C, major secondary metabolites isolated from the newly isolated strain *Streptomyces diastaticus*. *Folia Microbiol (Praha)*. 55(1):10-6.
- Zhang YQ, Yu LY, Wang D, Liu HY, Sun CH, Jiang W, Zhang YQ, Li WJ (2008) *Roseomonas vinacea* sp. nov., a Gram-negative coccobacillus isolated from a soil sample. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:2070–2074.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., Miller, W. 2000, A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*, 7(1-2):203-14.
- Zheng, Z.H., Zeng, W., Huang, Y.J., Yang, Z.Y., Li, J. & Cai, H.R. Su, W.J. (2000). Detection of antitumor and antimicrobial activities in marine organism associated actinomycetes isolated from the Taiwan Strait, China. *FEMS Microbiology Letters* 188, 87–91.
- Zhi X.-Y., Li W.-J., Stackebrandt E. (2009). An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 589–608.
- Zucchi, T.D., Guidolin, A.S., Consoli, F.L. (2011). Isolation and characterization of actinobacteria ectosymbionts from *Acromyrmex subterraneus brunneus* (Hymenoptera, Formicidae). *Microbiological Research*, 166:68—76.

Abstract

Actinomycetes are gram positive and filamentous bacteria and produce major portion of the bioactive compounds hence play an integral role in the novel drugs development. Recent studies demonstrated that marine habitats inhabiting actinomycetes have unique biodiversity and metabolic activity. For the first time Oman Sea sediments were investigated as a source of antibiotic producing marine actinomycetes in this project. Approximately 84 isolates were obtained from 14 collected sediment samples. Among four culture media and two treatments, Glucose asparagine agar and heat treatment isolated 32 and 47 isolates respectively and exhibited highest efficiency. Evaluation of antimicrobial activity of the isolated actinomycetes by top layer agar revealed that 24, 12, 23 percent of isolates showed antimicrobial activity against *S.aureus*, *E.coli* and *C.albicans* respectively. Determination of Minimum inhibitory concentrations of extracted antibiotics were recorded as 128-256, 128-512 and 62-128 µg/ml against *S.aureus*, *E.coli* and *C.albicans* respectively. Preliminary identification studies showed that the potent isolates exhibited typical morphology of *Streptomyces* genus predominantly. Result of Morphological, biochemical and chemotaxonomical identification revealed that IFSIRI 70, IFSIRI 137, IFSIRI 145, IFSIRI 193, IFSIRI 214 belonged to *Streptomyces* genus. Molecular identification by 16s rRNA gene analysis showed high similarity (99%) between IFSIRI 70, IFSIRI 137, IFSIRI 145, IFSIRI 193, IFSIRI 214 strains with *S. chartreusis*, *S. qinglanensis*, *S. Cacaoi*, *S. violaceoruber* and *S. diastaticus* respectively. Phylogenetic analysis showed that isolated producer strains and some commercial antibiotic strains located in a common cluster. These results exhibited high antimicrobial potential of the potent actinomycetes isolates for new antibiotic discovery.

Keywords: Marine actinomycetes, Antimicrobial activity, Sediments, Oman Sea, Phylogenetic analysis

**Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute – Persian Gulf and Oman Sea Ecology
Research Center**

Project Title : Isolation, identification and antimicrobial evaluation of marine actinomycetes from Oman sea sediments

Approved Number: 2-75-12-92137

Author: Mohsen Gozari

Project Researcher : Mohsen Gozari

**Collaborator(s) : M.S. Mortazavi, Y. Moradi, R. Karimzadeh, M. Sadrian, M. Ebrahimi
Y. Aftabsavar, M. Malakuti**

Advisor(s): -

Supervisor: -

Location of execution : Hormazgan province

Date of Beginning : 2014

Period of execution : 1 Year

Publisher : Iranian Fisheries Science Research Institute

Date of publishing : 2018

**All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted
without indicating the Original Reference**

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute - Persian Gulf and Oman Sea Ecology
Research Center

Project Title :
Isolation, identification and antimicrobial evaluation of
marine actinomycetes from Oman sea sediments

Project Researcher :

Mohsen Gozari

Register NO.
52933