

## جداسازی اکتینومیست‌های مولد مواد آنتی‌باکتریال بر علیه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین از خاکهای منطقه آستارا

نور امیرمظفری<sup>۱\*</sup>، سهیلا درویشی ویزنه<sup>۲</sup>، خسرو عیسی‌زاده<sup>۳</sup>، علیرضا طاهری<sup>۴</sup>

### چکیده

**زمینه و هدف:** استافیلوکوکوس اورئوس از عوامل مهم عفونت‌های شدید در بیمارستان و جامعه است و سویه مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) این باکتری، شیوع و مرگ و میر بالایی دارد. این مطالعه با هدف جداسازی اکتینومیست‌های تولیدکننده مواد آنتی‌باکتریال برای درمان آنتی‌بیوتیکی و کنترل پخش عفونت صورت گرفت.

**روش بررسی:** پس از نمونه برداری از خاکهای مناطق مختلف شهرستان آستارا، برای جداسازی و خالص‌سازی اکتینومیست‌ها از محیط کشت

Starch Casein Agar (SCA) استفاده شد. در مرحله بعد، با غربالگری اولیه به روش تلقیح نقطه‌ای، بررسی خواص ضد میکروبی بر روی ۹۶ ایزوله انجام شد. سپس از محیط کشت اختصاصی ISP2 برای جداسازی استرپتومایسس‌ها در مرحله غربالگری ثانویه استفاده شد و با تعیین قدرت ضد میکروبی علیه MRSA، سویه‌های قوی از نظر تولید مواد ضد میکروبی با روش انتشار در چاهک و براساس قطر هاله عدم رشد انتخاب شدند. در مرحله آخر برای شناسایی ایزوله‌های فعال از تست‌های بیوشیمیایی مختلف مانند تست مصرف قند، اوره‌آز، مصرف سیترات و غیره استفاده شد.

**یافته‌ها:** از ۵۱ نمونه خاک جمع‌آوری شده از مناطق مختلف آستارا، ۹۶ ایزوله اکتینومیست جداسازی شد. در غربالگری اولیه، ۹ ایزوله فعالیت ضد باکتریایی نشان دادند که از این تعداد ۳ ایزوله FS38، AS22 و AS13 در انتخاب ثانویه فعال بودند و به ترتیب هاله‌هایی به قطر ۲۸، ۱۷ و ۱۵ mm نشان دادند.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این تحقیق نشان داد خاکهای شهرستان آستارا غنی از ایزوله‌های فعال در زمینه تولید مواد آنتی‌باکتریایی می‌باشد که نیازمند بررسی‌های بیشتری است.

**کلید واژه‌ها:** اکتینومیست‌ها؛ فعالیت ضد میکروبی؛ استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین؛ استرپتومایسس.

<sup>۱</sup>دانشیار میکروبی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

<sup>۲</sup>دانشجوی کارشناس ارشد میکروبی‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران.

<sup>۳</sup>استادیار میکروبی‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران.

<sup>۴</sup>استادیار میکروبی‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آستارا، آستارا، ایران.

\* نویسنده مسئول مکاتبات:

نور امیرمظفری، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:

amirmozafari@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۲۲

تاریخ پذیرش: ۹۲/۳/۴

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Amirmozaffari N, Darvishi Vizaneh S, Isazadeh K, Taheri AR. Isolation of actinomycetes producing antibacterial against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from soils of Astarra region. Qom Univ Med Sci J 2014;8(2):59-68. [Full Text in Persian]

## مقدمه

اکتینومیست‌ها اغلب موجوداتی هتروتروف و مزوفیلند که در دمای  $25-30^{\circ}\text{C}$  درجه سلسیوس رشد کرده و اکثراً به شرایط اسیدی حساسند. همچنین ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی متنوعی داشته و دارای DNA با درصد بالای G+C (۷۵-۵۷٪) می‌باشند (۱). این موجودات گروه بزرگی از باسیل‌های گرم مثبت بوده که تمایل به ایجاد زنجیره یا رشته دارند و اکثراً ساپروفیتند، همچنین به فراوانی در خاک توزیع شده و از لحاظ فراوانی استرپتومایسس‌ها، نزدیک به ۷۰٪ بیشترین تعداد و در رده‌های بعدی نوکاردیا و میکرومونوسپورا قرار دارند. اکتینومیست‌ها وابسته به کورینه باکتریوم‌ها، مایکوباکتریوم‌ها، همچنین استرپتومایسس هستند.

این باسیل‌های گرم مثبت تمایل به ایجاد فیلامنت‌هایی دارند که در نتیجه رشد و منشعب شدن، شبکه‌ای از آنها را تشکیل می‌دهند که میسلیم نامیده می‌شود. ایجاد حالت رشته‌ای در طبقات مختلف اکتینومیست متنوع بوده و در برخی به صورت اولیه است و در بقیه نیز به دو صورت میسلیم رویشی (Substrate mycelium) و میسلیم هوایی (Aerial mycelium) دیده می‌شود. میسلیم هوایی ممکن است اسپور تولید کند یا به اشکال کوکوباسیلی شکسته شود. اکتینومیست‌ها نقش مهمی در تجزیه مواد آلی و تولید متابولیت‌های ثانویه و مواد فعال بیولوژیکی از جمله آنزیم‌های هیدرولیتیک و آنتی‌بیوتیک‌ها دارند. امروزه حدود ۱۴۰-۱۳۰ فرآورده میکروبی و تعداد مشابهی از مشتقات آنها در طب انسانی به خصوص شیمی‌درمانی و دامپزشکی کاربرد دارد و حدود ۲۰-۱۵ فرآورده نیز در بخش کشاورزی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳،۴).

تولید آنتی‌بیوتیک‌ها به طور منحصر به فرد متعلق به گونه‌های استرپتومایسس بوده که تا به حال ۵۰۰ آنتی‌بیوتیک از آنها جدا شده است و در پزشکی، صنعت و کشاورزی کاربرد دارند. از جمله آنتی‌بیوتیک‌های مهم جدا شده از استرپتومایسس‌ها می‌توان به استرپتومیسین و اسپکتینومایسین جدا شده از گونه *S. griseus*، تتراسایکلین از گونه *S. aureofaciens*، کلروتتراسیکلین و اریترومایسین از گونه‌های *S. aureofaciens erythaeus* اشاره کرد (۳).

با توجه به اینکه باکتری‌های پاتوژن، به خصوص استافیلوکوکوس اورئوس روز به روز به آنتی‌بیوتیک‌های موجود مقاومت نشان داده و سالانه خسارات مالی و جانی زیادی نیز به بار می‌آورند، لذا مراکز تحقیقاتی در پی ارائه آنتی‌بیوتیک‌هایی هستند که این مقاومت باکتری‌های عفونی را بشکنند. مطالعه بر روی آنتی‌بیوتیک‌های جدید و سایر متابولیت‌های میکروبی مؤثر در فعالیت‌های زیستی به دلیل دارا بودن پتانسیل استفاده در کشاورزی، مصارف دارویی و صنعتی، رو به افزایش است و در این میان گونه‌های جنس استرپتومایسس همچنان به‌عنوان یکی از منابع اصلی تولیدکننده متابولیت‌های جدید زیستی مورد توجه می‌باشد. پرواضح است که خاکهای مناطق مختلف ایران دارای تنوع وسیعی از این جنس باکتریایی بوده که می‌تواند به‌عنوان منبع بسیار خوبی از لحاظ تولید متابولیت‌های ثانویه مهم و آنتی‌بیوتیک‌های جدید مورد بررسی و مطالعه قرار گیرد (۵). این تحقیق با هدف تشخیص اکتینومیست‌های تولیدکننده مواد آنتی‌باکتریال بر علیه MRSA برای اولین بار در منطقه آستارا انجام شد. شرایط اقلیمی متفاوت ایران می‌تواند گونه‌های بسیاری از استرپتومایسس را در خود داشته باشد، اما متأسفانه هنوز در ایران برای یافتن تنوع استرپتومایسس‌ها و به تبع آن جداسازی آنتی‌بیوتیک‌هایی با قدرت بیشتر، کار زیادی صورت نگرفته است.

## روش بررسی

در این مطالعه توصیفی-مقطعی، ۵۱ نمونه خاک از عمق ۱۰-۱۵cm از مناطق مختلف شهرستان آستارا اعم از خاکهای زراعی، جنگلی و ساحلی جمع‌آوری شد و بلافاصله به آزمایشگاه جهت جداسازی اکتینومیست‌ها و اندازه‌گیری رطوبت و pH انتقال داده شدند. برای اندازه‌گیری رطوبت، ۸g از نمونه خاک وزن و سپس در دمای  $90^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲ ساعت در داخل فور قرار گرفت که اختلاف وزن حاصله به‌عنوان رطوبت خاک در نظر گرفته شد. برای اندازه‌گیری pH پس از انتقال نمونه‌ها، ابتدا ۴g از نمونه خاک در ۲۰ml از آب مقطر به‌خوبی حل گردید، سپس با استفاده از دستگاه pH متر، pH آنها اندازه‌گیری شد. برای جداسازی و خالص‌سازی اکتینومیست‌ها، ابتدا نمونه‌های خاک در درجه حرارت اتاق به مدت ۵ روز خشک شدند.

محیط ISP2 (International Streptomyces Project Broth 2) در ادامه، تلقیح شدند. در ادامه، محیط‌های تلقیح شده در  $28^{\circ}\text{C}$  بر روی شیکر با دور ۱۵۰rpm به مدت ۷ روز قرار گرفتند، سپس این محیط کشت مایع در دور ۴۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و محلول رویی (Supernatant) به لحاظ فعالیت ضد میکروبی خارج سلولی با روش انتشار در چاهک؛ مقابل میکروارگانیزم‌های استاندارد مورد آزمایش تست شد. برای غربالگری ثانویه یا روش انتشار در چاهک (Well Diffusion Method) سوسپانسیون ۰/۵ مک‌فارلند از نمونه استاندارد با سوآپ استریل به صورت سفره‌ای روی محیط Mueller Hinton Agar (Biomark, India) کشت داده شد و یکسری چاهک روی محیط ذکر شده ایجاد گردید. سپس به میزان ۷۰µl از محلول رویی کشت‌های مایع اکتینومیست در داخل هر چاهک ریخته شد و این پلیت‌ها در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. خواص ضد میکروبی با اندازه‌گیری قطر هاله‌های مهارى (برحسب mm) در اطراف چاهک بعد از هر انکوباسیون تعیین شدند. هر آزمایش ۳ بار در روز پنجم، هفتم و دهم تکرار و میانگین قطر هاله‌های مهارى محاسبه گردید (۱۲،۱۰). کلنی‌های جدا شده از نظر مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفت. همچنین از نظر مورفولوژی، رنگ میسلیم اولیه، ثانویه و خصوصیات اسپور مورد بررسی قرار گرفت. به جهت بررسی خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی آنها نیز از تست‌های تحمل نمک، مصرف قندهای مختلف، مصرف سیترات، متیل‌رد، TSI، SIM، تست‌های اوره‌آز، احیای نیترات، تجزیه کازئین، تجزیه نشاسته و غیره استفاده شد (۶،۳). داده‌ها با استفاده از واریانس یک‌طرفه تجزیه و تحلیل شدند.

### یافته‌ها

در این مطالعه از ۵۱ نمونه خاک جمع‌آوری شده از مکان‌های مختلف شهرستان آستارا، تعداد ۹۶ کلنی اکتینومیست جداسازی شد که میزان فراوانی اکتینومیست‌ها ۹۶٪ بود (جدول شماره ۱).

در ادامه، رقت‌های  $10^{-1}$  -  $10^{-4}$  تهیه و روی محیط Starch Casein Agar (Biomark, India) کشت داده شد، سپس در  $28^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۴-۱۰ روز انکوبه شدند. به محیط کشت فوق‌الذکر به جهت مهار رشد باکتری‌ها، ۲۵mg/l کاناماسین و برای مهار رشد قارچ‌ها ۵۰۰mg/l سیکلوهاگزامید اضافه گردید. در مرحله بعد، کلنی‌های مجزا با خصوصیات مورفولوژیکی اکتینومیست‌ها (رنگ پشت و روی کلنی، سطح کلنی، شکل میکروسکوپی میسلیم هوایی) ایزوله و به جهت خلص‌سازی نیز مجدداً در محیط SCA به صورت خطی کشت داده شدند. این ایزوله‌ها در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  نگهداری شدند تا در مواقع لزوم پاساژ داده شود. برای غربالگری اولیه یا کشت نقطه‌های فعالیت ضد میکروبی، به‌طور اولیه تکنیک تلقیح نقطه‌های (Spot) ایزوله‌های خلص اکتینومیست روی محیط Actinomycetes Isolation Agar Medium (Biomark, India) انجام شد. در ادامه، پلیت‌ها در  $28^{\circ}\text{C}$  به مدت ۶ روز انکوبه شده و سپس معکوس شدند و به مدت ۴۰ دقیقه در مجاورت کلروفرم قرار گرفتند (کلروفرم بر روی دیواره اکتینومیست‌ها اثر گذاشته و نفوذپذیری آن را بیشتر می‌کند). در ادامه، کلنی‌ها با یک لایه نازکی از سوسپانسیون ۰/۵ مک‌فارلند که حاوی نمونه استاندارد Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA): ATCC 43300 می‌باشد پوشیده شد. این سویه از مرکز کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. پلیت‌ها در  $37^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند و قطر هاله‌های مهارى میکروارگانیزم‌های مورد آزمایش (MRSA) بعد از انکوباسیون مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به اینکه این نوع از استاف‌ها نسبت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومند؛ در نتیجه اکتینومیست‌هایی که توانایی تولید مواد آنتی‌باکتریال بر علیه این استافیلوکوک‌ها را داشته باشند باعث لیز آنها و در نتیجه تشکیل هاله می‌شوند. در واقع، MRSA قدرت تولید مواد آنتی‌باکتریال توسط اکتینومیست‌ها را بررسی می‌کند (۱۳،۱۱،۵). در روش کشت غوطه‌ور (Submerge Method) اکتینومیست‌هایی که در بررسی‌های اولیه فعال بوده و قدرت ضد میکروبی داشتند در داخل

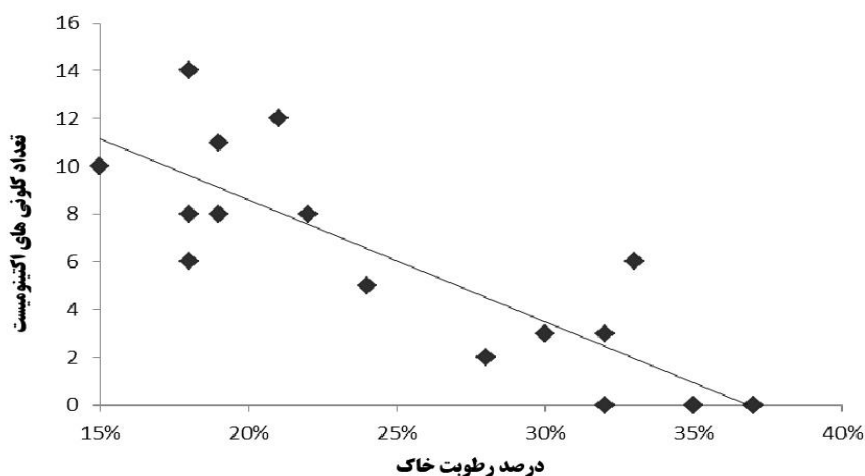
جدول شماره ۱: فراوانی اکتینومیسست‌های جدا شده بر حسب مکان، نوع و تعداد نمونه‌های خاک

| مکان‌های نمونه برداری | مشخصات نمونه | نوع خاک | تعداد نمونه خاک | تعداد کلنی ایزوله شده | فراوانی ایزوله‌ها (%) |
|-----------------------|--------------|---------|-----------------|-----------------------|-----------------------|
| کازرو                 |              | زراعی   | ۳               | 3 (AS1-AS3)           | ۳                     |
| بهارستان              |              | زراعی   | ۲               | 8 (AS4-AS11)          | ۸                     |
| ویرمونی               |              | زراعی   | ۳               | 11 (AS12-AS22)        | ۱۱                    |
| لوندویل               |              | زراعی   | ۳               | 6 (AS23-AS28)         | ۶                     |
| قلعه                  |              | زراعی   | ۳               | 14 (AS29-AS42)        | ۱۴                    |
| عباس آباد             |              | زراعی   | ۳               | 10 (AS43-AS52)        | ۸                     |
| عسگر آباد             |              | جنگلی   | ۳               | 8 (FS1-FS۸)           | ۸                     |
| گیلاده                |              | جنگلی   | ۳               | 6 (FS۹-FS14)          | ۶                     |
| باغچه سرا             |              | جنگلی   | ۳               | .                     | ۰                     |
| بهارستان              |              | جنگلی   | ۲               | 5 (FS15-FS19)         | ۵                     |
| حیران                 |              | جنگلی   | ۳               | 8 (FS20-FS۲۷)         | ۸                     |
| آق چای                |              | جنگلی   | ۳               | 12 (FS۲۸-FS39)        | ۱۲                    |
| چلونند                |              | ساحلی   | ۳               | .                     | ۰                     |
| سیبلی                 |              | ساحلی   | ۴               | .                     | ۰                     |
| لوندویل               |              | ساحلی   | ۳               | 2 (CS1-CS2)           | ۲                     |
| قره سو                |              | ساحلی   | ۳               | 3 (CS3-CS5)           | ۳                     |
| آستار                 |              | ساحلی   | ۴               | .                     | ۰                     |
| فراوانی               |              |         | ۵۱              | ۹۶                    | ۹۶                    |

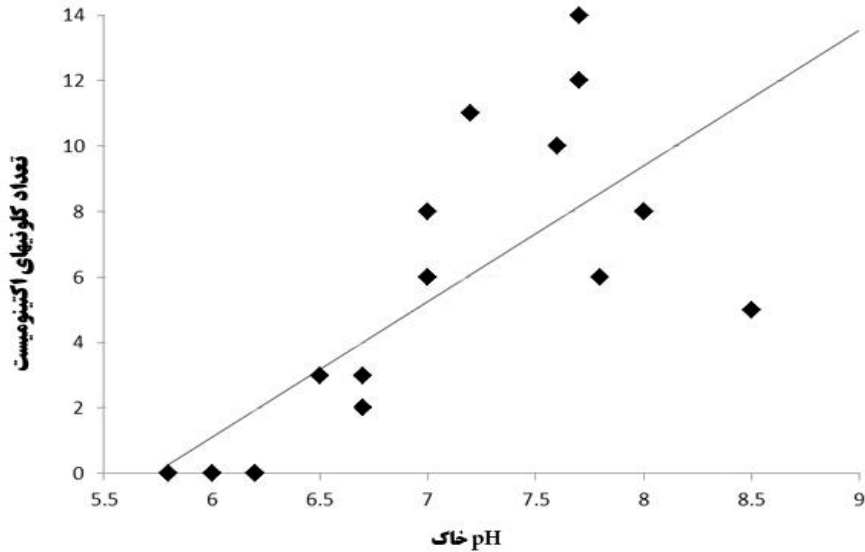
AS: agriculture sample FS: forest sample CS: coastal sample

معنی‌داری وجود داشت (با افزایش رطوبت تعداد کلنی کاهش می‌یابد). تعداد زیادی از اکتینومیسست‌ها در رطوبت ۲۰-۱۸٪ ایزوله شدند (نمودار شماره ۱ و ۲، جدول شماره ۲).

در این مطالعه ارتباط بین pH با تعداد کلنی ایزوله شده از آنها در سطح معنی‌داری بود (با افزایش pH تعداد کلنی افزایش می‌یابد) و بیشترین تعداد اکتینومیسست‌ها در pH=۷/۵-۸ قرار داشتند. همچنین بین رطوبت نمونه‌های خاک با تعداد کلنی ایزوله شده، ارتباط



نمودار شماره ۱: ارتباط بین رطوبت خاک و تعداد کلنی اکتینومیسست‌های ایزوله شده از خاکهای شهرستان آستارا



نمودار شماره ۲: ارتباط بین pH و تعداد کلنی اکتینومیسست‌های ایزوله‌شده از خاکهای شهرستان آستارا

جدول شماره ۲: pH و رطوبت نمونه خاکهای جمع‌آوری‌شده از مناطق مختلف شهرستان آستارا

| مکان‌های نمونه‌برداری | مشخصات نمونه | میانگین pH خاک | انحراف معیار pH خاک | میانگین رطوبت خاک هر منطقه (%) | انحراف معیار رطوبت خاک هر منطقه |
|-----------------------|--------------|----------------|---------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| کانرود                | ۶/۷          | ۰/۲۶           | ۳۲                  | ۱                              |                                 |
| بهارستان              | ۸            | ۰/۴۲           | ۲۲                  | ۱/۴۱                           |                                 |
| ویرمونی               | ۷/۲          | ۰/۲            | ۱۹                  | ۲                              |                                 |
| لوندویل               | ۷            | ۰/۲            | ۲۳                  | ۱/۷۳                           |                                 |
| قلعه                  | ۷/۷          | ۰/۲۶           | ۱۸                  | ۱/۷۳                           |                                 |
| عباس‌آباد             | ۷/۶          | ۰/۲۵           | ۱۸                  | ۲/۶۴                           |                                 |
| عسگر‌آباد             | ۷/۸          | ۰/۲۶           | ۱۸                  | ۲/۶                            |                                 |
| گیلاده                | ۷            | ۰/۲            | ۱۹                  | ۲/۶۴                           |                                 |
| باغچه‌سرا             | ۶/۲          | ۰/۲            | ۳۷                  | ۱/۷۳                           |                                 |
| بهارستان              | ۸/۵          | ۰/۴۲           | ۲۴                  | ۲/۸                            |                                 |
| حیران                 | ۷/۷          | ۰/۲۶           | ۲۱                  | ۲/۶۴                           |                                 |
| آق‌چای                | ۸            | ۰/۴۳           | ۱۸                  | ۴                              |                                 |
| چلونند                | ۶/۲          | ۰/۴            | ۳۵                  | ۲/۶۳                           |                                 |
| سیلی                  | ۶            | ۰/۲۴           | ۳۲                  | ۱/۶۳                           |                                 |
| لوندویل               | ۶/۷          | ۰/۲۶           | ۲۸                  | ۲                              |                                 |
| قره‌سو                | ۶/۵          | ۰/۳            | ۳۰                  | ۳/۴۶                           |                                 |
| آستار                 | ۵/۸          | ۰/۲۲           | ۳۸                  | ۳/۵۵                           |                                 |

در روش غربالگری اولیه یا روش کشت نقطه‌ای از ۹۶ کلنی ایزوله شده اکتینومیست، ۹ ایزوله فعالیت ضد میکروبی نشان داد که ۴ عدد از این ایزوله‌ها از خاک زراعی، ۴ ایزوله از خاک جنگلی و یک ایزوله از خاک ساحلی جدا شده بود.

در مرحله غربالگری ثانویه یا روش انتشار چاهک از بین ۹ ایزوله فعال در مرحله غربالگری اولیه، تعداد ۳ ایزوله (AS13, AS22, FS38) فعالیت ضد MRSA داشتند (شکل، جدول شماره ۳).

جدول شماره ۳: نتایج غربالگری اولیه و غربالگری ثانویه اکتینومیست‌ها

| غربالگری ثانویه                     | غربالگری اولیه                      | مراحل غربالگری ایزوله‌های فعال شده | ایزوله‌ها |
|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|-----------|
| مجموع قطر هاله عدم رشد<br>MRSA (mm) | مجموع قطر هاله عدم رشد<br>MRSA (mm) |                                    |           |
| -                                   | -                                   | -                                  | AS 1- 5   |
| -                                   | ۱۲                                  | AS8                                | AS6-10    |
| ۱۷                                  | ۲۰                                  | AS13                               | AS 11-15  |
| -                                   | -                                   | -                                  | AS 16-20  |
| ۲۸                                  | ۳۲                                  | AS22                               | AS21-25   |
| -                                   | -                                   | -                                  | AS 26-30  |
| -                                   | -                                   | -                                  | AS 31-35  |
| -                                   | -                                   | -                                  | AS 36-40  |
| -                                   | ۱۴                                  | AS45                               | AS 41-45  |
| -                                   | -                                   | -                                  | AS 46-50  |
| -                                   | -                                   | -                                  | AS 51-52  |
| -                                   | ۱۵                                  | FS5                                | FS 1- 5   |
| -                                   | -                                   | -                                  | FS 6-10   |
| -                                   | -                                   | -                                  | FS 11-15  |
| -                                   | ۱۲                                  | FS17                               | FS 16-20  |
| -                                   | -                                   | -                                  | FS 21-25  |
| -                                   | ۱۱                                  | FS29                               | FS 26-30  |
| -                                   | -                                   | -                                  | FS 31-35  |
| ۱۵                                  | ۲۳                                  | FS38                               | FS 36-49  |
| -                                   | ۱۷                                  | CS3                                | CS 1- 5   |

برای شناسایی گونه‌ها انجام شد که این ایزوله‌ها مربوط به جنس استرپتومایسس بود (جدول شماره ۴).

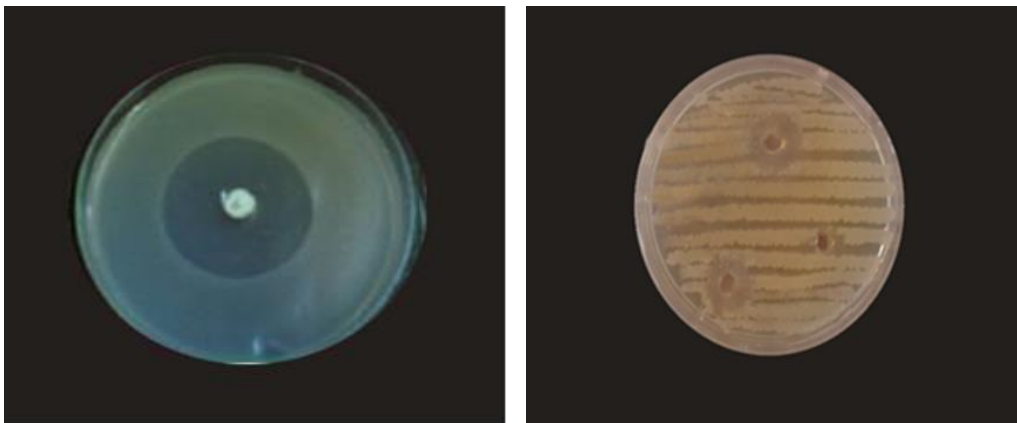
در مرحله آخر تست‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مختلف روی ۳ ایزوله فعال (AS13, AS22, FS38)

جدول شماره ۴: مشخصات مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی ایزوله‌های فعال دارای خاصیت ضد میکروبی

| FS38    | AS13    | AS22    | ایزوله‌های فعال شده<br>ویژگی‌ها |
|---------|---------|---------|---------------------------------|
| کرم‌رنگ | سفید    | سفید    | رنگ سطح کلنی در SCA             |
| قهوه‌ای | کرم     | سفید    | رنگ پشت کلنی در SCA             |
| S       | S       | RF      | شکل اسپور                       |
| -       | -       | -       | رنگ آمیزی اسید فست              |
| +       | +       | +       | تخمیر گلوکز                     |
| +       | -       | +       | تخمیر آرابینوز                  |
| -       | -       | -       | تخمیر مانیتول                   |
| +       | +       | +       | تخمیر گالاکتوز                  |
| +       | +       | +       | تخمیر فروکتوز                   |
| -       | -       | -       | تخمیر سوکروز                    |
| -       | -       | -       | تخمیر مالتوز                    |
| -       | +       | -       | احیای نیترات                    |
| +       | -       | +       | اوره‌آز                         |
| +       | +       | +       | تجزیه کازین                     |
| +       | +       | +       | تست نشاسته                      |
| alk/alk | alk/alk | alk/alk | TSI                             |
| -       | -       | -       | SIM                             |
| -       | -       | -       | متیل‌رد                         |
| +       | +       | +       | مصرف سیترات                     |
| +       | +       | +       | رشد در نمک ۱/۵٪                 |
| -       | +       | +       | رشد در نمک ۳٪                   |
| -       | +       | -       | رشد در نمک ۲٪                   |
| +       | +       | +       | مقاومت به پنی‌سیلین             |
| +       | +       | +       | مقاومت به آمپی‌سیلین            |

RF: Recti Flexibiles

S: spiral



شکل: سمت چپ، مشاهده هاله‌های عدم رشد در مرحله اولیه غربالگری؛ سمت راست، هاله‌های عدم رشد در مرحله ثانویه غربالگری

## بحث

*استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) یک پاتوژن عمده و مهم در ایجاد بیماری و مرگ و میر در ایران و جهان است. به دلیل شیوع روزافزون و مقاومت به اغلب آنتی‌بیوتیک‌های رایج، درمان و مبارزه علیه آن بسیار مشکل شده است. این سویه از عوامل مهم عفونت‌های شدید در بیمارستان‌ها و جامعه بوده و برای کنترل پخش عفونت لازم است که سویه‌های مقاوم توسط آنتی‌بیوتیک‌های تولیدشده توسط میکروارگانیسم‌ها، به‌خصوص اکتینومیسیت‌ها محدود شوند. بیماران مبتلا به عفونت MRSA به‌مدت طولانی در بیمارستان بستری بوده و علاوه بر هزینه گزاف و زمان بیشتر با پیشرفت عفونت، به باکتری می یا اندوکاردیت مبتلا می‌شوند (۶).

با توجه به اینکه لزوم به دست آوردن آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر، در داشتن تنوع میکروبی بالاست، لذا احتمال آن می‌رود که ایران به دلیل داشتن اکوسیستم متنوع، باکتری‌هایی با تنوع بالا را در خود داشته باشد. در همین راستا، برای جداسازی اکتینومیسیت‌های فعال، نمونه‌برداری از خاکهای شهرستان آستارا صورت گرفت. یافته‌های کنونی و اهمیت موضوع، انجام تحقیقات بیشتر را در آینده برای به دست آوردن عوامل ضدباکتریایی جدید در میان استرپتومایسس‌ها از نواحی مختلف شهرستان آستارا در مکان‌های دست‌نخورده نشان می‌دهد و مشخص‌کننده این است که تاکنون تحقیقاتی در جهت ایزوله کردن اکتینومیسیت‌های تولیدکننده آنتی‌بیوتیک قوی در این مناطق صورت نگرفته است. از ۵۱ نمونه خاک جمع‌آوری‌شده از مناطق مختلف شهرستان آستارا، ۹۶ کلنی اکتینومیسیت ایزوله شد که بیشتر اکتینومیسیت‌های جداشده در تحقیق حاضر در  $pH=7/5-8$  و رطوبت ۲۰-۱۸٪ قرار داشتند. همچنین بیشترین تعداد اکتینومیسیت‌ها به ترتیب از خاکهای زراعی، جنگلی و ساحلی ایزوله شدند. این بررسی نشان داد در خاکهای مناطق زیرکشت محصولات کشاورزی؛ تنوع جمعیتی اکتینومیسیت‌ها نسبت به دیگر خاکها زیاد است که این موضوع، تأییدکننده بررسی‌های Oskay و همکاران (سال ۲۰۰۴) که بر روی خاکهای مناطق جنگلی و کشاورزی ترکیه صورت گرفته بود، می‌باشد. محققین فوق دلیل این امر را تولید متابولیت‌های ثانویه توسط گیاهان کشت‌شده عنوان کردند که باعث تنوع

استرپتومایسس‌ها می‌شود (۷). کمترین تعداد اکتینومیسیت‌ها از خاکهای ساحلی ایزوله شده است که این امر نیز می‌تواند به دلیل رطوبت بیشتر و pH پایین خاکهای ساحلی نسبت به خاکهای زراعی و جنگلی باشد. پس از خالص‌سازی کلنی‌های ایزوله‌شده، غربالگری اکتینومیسیت‌های به دست آمده در دو مرحله انجام شد. در مرحله غربالگری اولیه با روش تلقیح نقطه‌ای، ۹ ایزوله فعال بوده و هاله تشکیل دادند، که از بین آنها، ۳ ایزوله در مرحله غربالگری ثانویه و نهایی هاله‌هایی به قطر ۱۵، ۱۷ و ۲۸mm تشکیل دادند.

غربالگری آنتی‌بیوتیک‌ها عبارت است از روش‌هایی که بتواند فعالیت آنتی‌بیوتیکی مواردی همچون فرآورده‌های میکروبی را مشخص سازد و در این رابطه از راندمان خوبی نیز برخوردار باشد. در مطالعه حاضر روش انتخابی برای غربالگری ثانویه روش انتشار در آگار (Agar Well Diffusion method) بود؛ زیرا راه معمولی تشخیص فعالیت ضدباکتریایی در نمونه‌هایی که فعالیت آنها مشخص نیست با کمک تست انتشار انجام می‌گیرد. در این روش انتشار خارجی، آنتی‌بیوتیک تلقیح‌شده از یک منبع به سطحی از محیط آگار به‌وسیله میکروبی‌های مورد آزمایش در پلیت باعث ایجاد هاله ممانعت‌گرو می‌شود. به‌علت کنترل ضعیف فاکتورهای عمل‌کننده مانند دما، تا حد کمی pH، غلظت نمک و غلظت آگار؛ روش تعیین حساسیت با کمک پلیت می‌تواند درصد خطای ۱۰-۵٪ داشته باشد (۳). در مطالعه حاضر آنالیز از غربالگری اکتینومیسیت‌ها، درجه نسبتاً خوبی از فعالیت‌های ضدباکتریایی تولیدشده به‌وسیله گونه‌های استرپتومایسس را نشان داد. همچنین در این مطالعه از روش تلقیح نقطه‌ای به‌عنوان روش غربالگری اولیه استفاده شد و تعداد ۹ ایزوله فعالیت ضد میکروبی نشان دادند. در مرحله بعد نیز از ISP2 برای تولید آنتی‌بیوتیک استفاده گردید و در روش انتشار چاهک در آگار، تعداد ایزوله‌های فعال ۳ ایزوله (۳۳/۳٪) بود که دلیل آن می‌تواند نوع محیط مورد استفاده در دو روش غربالگری برای تولید آنتی‌بیوتیک‌ها باشد. همچنین حساسیت و دقت روش تلقیح نقطه‌ای نسبت به روش انتشار چاهک در آگار خیلی کمتر بود. در روش غربالگری اولیه ممکن است متابولیت‌های غیرفعال زیستی و مواد سمی نیز تولید شده و باعث از بین رفتن میکروب‌ها شوند،



ولی در روش انتشار چاهک در آگار؛ متابولیت تولید شده، سانتی‌یفوژ و سپس وارد چاهکها شده که ممکن است هنگام سانتی‌یفوژ خیلی از ترکیباتی که در روش تلقیح نقطه‌ای تولید شده‌اند رسوب کرده و در روش انتشار مورد استفاده قرار نگیرند و فعالیت ضد میکروبی نیز نشان ندهند. در مطالعه حاضر با تعیین قدرت ضد میکروبی علیه MRSA، سویه‌های قوی از نظر تولید مواد ضد میکروبی با روش انتشار در چاهک و براساس قطر هاله عدم رشد انتخاب شدند و در مرحله آخر برای شناسایی ایزوله‌های فعال از تست‌های بیوشیمیایی مختلف مانند تست مصرف قند، اوره‌آز، مصرف سیترات و... استفاده شد. با توجه به هاله عدم رشد نمونه‌های مثبت می‌توان به این نکته اشاره نمود که نوع آنتی‌بیوتیک تولیدی توسط ایزوله‌های مختلف، متفاوت است. تنوع آنتی‌بیوتیک‌های تولیدی از استرپتومایسس‌ها، نشانگر این موضوع می‌تواند باشد که این باکتری‌ها قادر به تولید آنتی‌بیوتیک‌های جدید بوده و برای یافتن این نتایج باید مطالعات بیشتری صورت گیرد.

تفاوت در سویه باکتری‌ها می‌تواند منجر به شناسایی سویه‌های جدید گردد که بدین ترتیب به خودی خود، منبع جدیدی از متابولیت‌های ثانویه جدید می‌تواند مورد بررسی قرار گیرد. در مجموع، مطالعه حاضر نشان داد خاکهای مناطق مختلف آستارا دارای پتانسیل بالقوه‌ای از تنوع اکتینومیستی بوده و از نظر تولید مواد ضدباکتریایی بسیار فعال‌اند، لذا می‌توان با مطالعه بیشتر سویه‌های جدیدی را یافت که قدرت تولید آنتی‌بیوتیک‌های نوینی را دارا باشند. در این تحقیق که به منظور جداسازی اکتینومیست‌های دارای فعالیت ضدباکتریایی بر علیه MRSA از مناطق مختلف شهرستان آستارا صورت گرفت مشخص گردید در مناطقی که خاک دارای pH بالای ۷ باشد، جمعیت گونه‌های استرپتومایسس نسبت به جنس‌های دیگر باکتری بیشتر است. این یافته با مطالعات Basilio و همکاران که در اسپانیا (سال ۲۰۰۳) صورت گرفت، همخوانی داشت (۸). در یک مطالعه دیگر (سال ۲۰۱۱) روی نمونه خاکهای منطقه ناخن سی‌تامارات در هندوستان؛ از ۶۴ کلنی ایزوله شده، ۱۹ کلنی (۲۹/۶۸٪) در مرحله غربالگری اولیه فعالیت ضدباکتریایی بر علیه ۱۰ نمونه استاندارد

MRSA نشان دادند که از بین آنها ۵ ایزوله (۲۵٪) با استفاده از روش انتشار در چاهک، فعالیت سویه MRSA را محدود کردند (۹). همچنین در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۸ روی نمونه خاکهای منطقه مولای ترکیه انجام شد از کلنی‌های استرپتومایسس ایزوله شده، ۱۵ کلنی در مرحله غربالگری اولیه با روش تلقیح نقطه‌ای فعالیت ضدباکتریایی بر علیه MRSA نشان دادند که از بین آنها ۵ ایزوله (۳۳/۳۳٪) با استفاده از روش انتشار در چاهک در مرحله غربالگری ثانویه فعال بودند (۱۰). در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۱۰ روی نمونه خاکهای ترکیه انجام شد از ۲۹۰ کلنی اکتینومیست ایزوله شده، ۱۸۰ کلنی (۶۰٪) در مرحله غربالگری اولیه بر علیه ۴ سویه استاندارد، فعالیت ضدباکتریایی نشان دادند که از بین آنها ۷ ایزوله در مرحله غربالگری اولیه و ۴ ایزوله در مرحله غربالگری ثانویه بر علیه سویه MRSA فعال بودند (۱۱). در مطالعه‌ای دیگر (سال ۲۰۰۹) روی نمونه خاکهای Klopattar از نواحی اورست کشور نپال؛ از ۷۹ کلنی ایزوله شده، ۱۶ کلنی در مرحله غربالگری اولیه با روش تلقیح نقطه‌ای، فعالیت ضدباکتریایی بر علیه نمونه استاندارد MRSA نشان دادند که از بین آنها ۵ ایزوله (۳۱٪) با استفاده از روش انتشار در چاهک در مرحله غربالگری ثانویه فعال بودند (۱۲).

همچنین در مطالعه‌ای که روی نمونه خاکهای Western Ghats در کشور هندوستان (سال ۲۰۱۱) انجام شد از ۱۰۴ کلنی‌های اکتینومیست ایزوله شده، ۱۰ کلنی در مرحله غربالگری اولیه با روش تلقیح نقطه‌ای فعالیت ضدباکتریایی بر علیه نمونه استاندارد MRSA نشان دادند که از بین آنها ۳ ایزوله با استفاده از روش انتشار در چاهک در مرحله غربالگری ثانویه فعال بودند (۱۳).

### نتیجه‌گیری

نتایج تحقیقات بالا تقریباً با نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر همخوان بوده و نشان می‌دهد خاکهای آستارا به خصوص در نیمه غربی (به دلیل داشتن دمای بالا و رطوبت کمتر و خاکهای غنی از مواد آلی) سرشار از گونه‌های مختلف اکتینومیست تولیدکننده مواد آنتی‌باکتریال می‌باشد که نیاز به مطالعات بیشتری دارد.

## References:

1. Manivasagan P, Gnanam S, Sivakumar K, Thangaradjou T, Vijayalakshmi S, Balasubramanian T. Studies on diversity of marine actinobacteria from Tamilnadu part of bay of Bengal, India. *Libyan Agric Res Cent J Int* 2010;1(6):362-74.
2. Brooks GF, Botel GS, Mors A, Translated by: Zeyghami H, Aleboye M, Haghi F. *Jawetz Medical Microbiology*. Tehran: Entesharat Samat; 2010.
3. Salami F. Isolation and determination of Streptomyces that produce antibiotic from soil. *Pajouhesh & Sazandegi* 2004;64:41-47. [Full Text in Persian]
4. Alharbi SA, Arunachalam C, Murugan AM, Wainwright M. Antibacterial activity of actinomycetes isolated from Terrestrial Soil of Saudi Arabia. *J Food Agric Environ* 2012;10(2):1093-97.
5. Dahanad A, Bakhshi R, Parsa Yeganeh L, Montazem H, Abdi Sofiyani S. Screening of soil bacteria for the genus Streptomyces that have antibacterial activity in Iranian Azerbaijan region. *J Microbial Biotechnol, Islamic Azad University* 2008;1(1):18-22. [Full Text in Persian]
6. Rice LB. Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria. *Am J Infect Control* 2006 Jun; 34(5 Suppl 1):S11-9.
7. Oskay AM, Üsame T, Cem A. Antibacterial activity of some Actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *African J Biotechnol* 2004;3(9):441-446.
8. Basilio A, Gonzalez I, Vicente MF, Gorrochategui J, Cabello A, Gonzalez A, Genilloud O. Patterns of antimicrobial activities from soil Actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. *J Appl Microbiol* 2003;95(4):814-823.
9. Naorungrote S, Chunglok W, Lertcanawanichakul M, Bangrak P. Actinomycetes producing anti-methicillin resistant Staphylococcus aureus from soil samples in Nakhon Si Thammarat. *Walailak J Sci Technol* 2011;8(2):131-138.
10. Ceylan O, Okmen G, Ugur A. Isolation of soil Streptomyces as source antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria. *Eur Asian J Bio Sci* 2008;2(9):73-82.
11. Yücel S, Yamaç M. Selection of Streptomyces isolates from Turkish Karstic caves against antibiotic resistant bacteria. *Pak J Pharm Sci* 2010;23(1):1-6.
12. Gurung TD, Sherpa C, Agrawal VD, Lekhak B. Isolation and characterization of antibacterial actinomycetes from soil samples of Kalapatthar, Mount Everest Region. *Nepal J Sci Technol* 2009;6(2):173-182.
13. Thangapandian V, Philip Ruban AC, Prabhu D, Ligakamar K. Isolation and characterization of antibiotics producing Actinomycetes from soil samples of Senbagadaruvi in Western Ghats. *Bio Res Bull* 2011;4:258-263.