دوره ۲۳، شماره ۷۳، بهار ۱۳۹۹، صفحات: ۳۴-۲۲

مقاله پژوهشی

جداسازی *استرپتومایسس*های آبزی تولیدکننده مواد ضد میکروبی علیه *اشریشیا کلی*های مقاوم به جنتامایسین از دریاچه بختگان (استان فارس)

محمد مسعود اسکندری[۱]، بهین امیدی[۲]*، مهدی دهقانی زاهدانی[۳]

[۱] کارشناس ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، تهران، ایران

[۲] استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، تهران، ایران

[۳] استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد یزد، یزد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۰۱ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۹/۰۱/۱۷

چکیده

مقدمه: در سال‌های اخیر به دنبال مقاومت آنتی‌بیوتیکی، شیوع سویه‌های *اشریشیا کلی* مقاوم به آنتی‌بیوتیک به عنوان چالش مهم پزشکی مطرح شده است که نیازمند توسعه آنتی‌بیوتیک‌های اثرگذار با منشأ طبیعی می‌باشد. *استرپتومایسس‌ها* به دلیل قابلیت تولید متابولیت ثانویه و آنتی‌بیوتیک معروف هستند. در این ارتباط، مطالعه حاضر با هدف جداسازی *استرپتومایسس*های آبزی تولیدکننده مواد ضد میکروبی علیه *اشریشیا کلی* مقاوم به *جنتامایسین* از دریاچه بختگان انجام شد.

مواد و روش‌ها: اولین گام در راستای بررسی اثر آنتاگونیستی *استرپتومایسس*ها بر باکتری *اشریشیا کلی* مقاوم به آنتی‌بیوتیک، نمونه‌گیری است. در این مطالعه ۱۰ نمونه آبی از دریاچه بختگان جمع‌آوری شد. کشت باکتری‌ها در محیط کشت اختصاصی (ISP2) انجام شد و جداسازی و خالص‌سازی *استرپتومایسس*های مورد نظر صورت پذیرفت. جداسازی و تعیین اثربخشی متابولیت ثانویه بر پاتوژن به روش انتشار دیسک انجام شد. به منظور بررسی مولکولی *استرپتومایسس*های اثربخش، DNA آن‌ها استخراج گردید و جهت شناسایی مولکولی به شرکت Learn Genetics فرستاده شد.

یافته‌ها: در این پژوهش ۱۷ *استرپتومایسس* از ۱۰ نمونه آب جدا شد که هفت جدایه متابولیت ترشح کردند. از میان آن‌ها یک جدایه که اثربخشی مناسب‌تری بر *اشریشیا کلی* مقاوم به جنتامایسین داشت، توالی‌یابی گردید و *Streptomyces sp. strain 11K402* شناخته شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش می‌توان گفت که محیط‌های آبی منبع مناسبی جهت یافتن و جداسازی *اکتینومایست*ها و *استرپتومایسس*های تولیدکننده مواد ضد میکروبی می‌باشند.

کلمات کلیدی: *استرپتومایسس*، *اشریشیا کلی*، مقاومت دارویی

* **نویسنده مسئول:** بهین امیدی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، تهران، ایران. تلفن: ۴۴۶۰۰۱۸۴؛ ایمیل: behin.omidi@yahoo.com

مقدمه

امروزه مقاومت‌های دارویی یکی از معضلات سیستم درمانی محسوب شده و سازمان جهانی بهداشت سطح بالایی از مقاومت باکتریایی را گزارش کرده است. باکتری‌ها به دلیل تغییرات کروموزومی و جهش‌های ژنتیکی ناشی از پلاسمیدها و ترانسپوزون‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم می‌شوند (۱). طی چند دهه گذشته آنتی‌بیوتیک‌ها به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار گرفته‌اند و استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها و فشار انتخابی بر میکروارگانیسم‌ها به تدریج باعث شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها شده است (۲،۳). افزایش مقاومت دارویی در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها تبدیل به یک نگرانی و چالش عمومی در سطح جهان شده است (۴). تخمین زده می‌شود که چنانچه روند فعلی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باقی بماند، تا سال ۲۰۵۰ عفونت‌های مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها احتمالاً باعث مرگ ۱۰ میلیون نفر در سال شود (۴)؛ به همین دلیل پژوهشگران در سراسر جهان به طور مداوم در راستای جستجوی ترکیبات آنتی‌بیوتیکی جدید برای مقابله با عواقب جدی و پویایی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها تلاش می‌کنند. در این ارتباط، نیاز به کشف ترکیبات جدید زیستی فعال بیش از پیش احساس می‌شود. برخی از میکروارگانیسم‌ها به منظور رقابت با دیگر رقبا در جهت کسب مواد مغذی و فضای رشد، مواد آنتی‌بیوتیکی را تولید می‌کنند (۷-۵). ۴۵ درصد از تمام متابولیت‌های فعال زیستی توسط *اکتینومیست*‌ها تولید می‌شود که از این میان حدود ۷۶ درصد توسط گونه‌های *استرپتومایسس* تولید می‌شوند (۸،۹). *اکتینومیست*‌ها پروکاریوت‌هایی هستند که حاوی درصد بالای گوانین و سیتوزین در DNA خود می‌باشند و با تکیه بر این قابلیت، توانایی بسیاری در فرایندهای متابولیتی دارند. تنوع متابولیسم در *اکتینومیست*‌ها به دلیل ژنوم بسیار بزرگ آن‌ها باعث می‌شود که مجهز به صدها فاکتور رونویسی گردند که که بیان ژن را کنترل نموده و به آن‌ها اجازه پاسخ‌دهی به نیازهای خاص را می‌دهند (۱۰). *استرپتومایسس*‌ها میکروارگانیسم‌های مهمی هستند که آنزیم‌های مفید و متابولیت‌های ثانویه همچون ایمونوژن‌ها، ترکیبات ضد توموری و آنتی‌بیوتیک‌ها را تولید می‌کنند (۱۷-۱۱). *استرپتومایسس*‌ها کاربردهای متنوعی از جمله در صنایع نساجی، پالایشگاه‌های زیستی، مواد غذایی، صنایع بسته‌بندی و کاغذ، کشاورزی، مواد شوینده و دارویی دارند (۱۸). *استرپتومایسس*‌ها به طور گسترده‌ای در خاک به ویژه در خاک‌های خشک و کمی اسیدی غنی از مواد آلی حضور دارند و نسبت زیادی از زیست توده میکروبی خاک را تشکیل می‌دهند (۱۹)؛ بنابراین در محیط‌های خاکی به وفور یافت می‌شوند. با وجود تنوع میکروبی آب‌ها و داشتن پتانسیل بالای میکروارگانیسم‌های ساکن آب در تولید متابولیت های ثانویه دارای خاصیت ضد میکروبی، مطالعات در مورد این گروه بسیار کمتر از میکروارگانیسم‌های خاک بوده است (۲۰). بسیاری از محیط‌های طبیعی هنوز هم ناشناخته هستند؛ از این رو می‌توانند به عنوان یک منبع ارزشمند برای جداسازی میکروارگانیسم‌های مهم از نظر پزشکی مورد مطالعه قرار بگیرند (۲۱). در پژوهش حاضر از دریاچه بختگان نمونه‌برداری شد و متابولیت‌های تولید شده توسط *استرپتومایسس*‌های جداسازی شده علیه *اشریشیا کلی*‌های مقاوم به جنتامایسین بررسی گردید. عفونت ادراری یک بیماری شایع در سطح جامعه می‌باشد. مطالعات انجام شده حاکی از آن هستند که باسیل‌های گرم منفی عامل بیشتر عفونت‌های ادراری می‌باشند که از بین آن‌ها *اشریشیا کلی* عامل ۸۰ درصد از این عفونت‌ها بوده است (۲۲). گزارش‌ها نشان می‌دهند که میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری *اشریشیا کلی* در مقایسه با دیگر

باکتری‌ها شیوع بسیار بیشتری داشته است که ممکن است حاصل درمان‌های غیر متعارف، تجویز خودسرانه و همچنین توسعه مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری باشد (۲۶-۲۳)؛ از این رو در پژوهش حاضر *استرپتومایسس‌*های تولیدکننده متابولیت‌های ضد میکروبی علیه *اشریشیا کلی* مقاوم به جنتامایسین از دریاچه بختگان جداسازی و شناسایی گردید تا به این ترتیب گامی هرچند کوچک در جهت یافتن مواد اثرگذار جدید برداشته شود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و جداسازی اولیه استرپتومایسس‌ها

دریاچه بختگان با مساحتی معادل ۷۴۵۲۵ هکتار، دومین دریاچه بزرگ ایران و از جمله دریاچه‌های آب شور کشور است که در ۱۶۰ کیلومتری شیراز، ۷۰ کیلومتری غرب شهرستان نیریز و ۴۰ کیلومتری شرق شهرستان ارسنجان قرار دارد (شکل ۱). این دریاچه به صورت یک فرورفتگی کشیده به طول تقریبی ۷۰ تا ۱۰۰ کیلومتر است که به شکلی انحنادار با جهت شمال غربی به جنوب شرقی گسترش یافته و به این ترتیب کوه‌های پیچگان را در بر گرفته است. دریاچه بختگان به دلیل شرایط اکولوژیک و زیست بوم مناسب و کمتر شناخته‌شده‌ای که دارد مکانی مناسب و قابل مطالعه جهت پژوهش، نمونه‌برداری و شناسایی انواع گونه‌های باکتریایی به ویژه *استرپتومایسس‌ها* است.

در این مطالعه نمونه‌گیری در سال ۱۳۹۷ و در فصل بهار انجام شد. ۱۰ نمونه آب به صورت برداشت آب از سطح دریاچه به میزان ۵۰ سی‌سی و انتقال به ظرف استریل در زمان‌های مختلف در فواصل پنج کیلومتر از نقاط مختلف دریاچه و فاصله ۲۰ تا ۵۰ متر نسبت به ساحل برداشت گردید و به سرعت به آزمایشگاه منتقل شد. در آزمایشگاه قبل از شروع کار با توجه به هوازی بودن باکتری مورد نظر، به منظور هوادهی به نمونه‌های آبی، به مدت دو تا سه ساعت در دستگاه شیکر با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه قرار داده شد. در ادامه برای جداسازی *استرپتومایسس‌ها* از روش سری رقت استفاده شد. به این صورت که ۱ سی‌سی از نمونه‌های جمع‌آوری شده به لوله حاوی ۹ سی‌سی آب مقطر استریل اضافه گردید و پس از مخلوط کردن ۱ سی‌سی از لوله اول به لوله دوم منتقل گردید و به همین ترتیب تا نه لوله این عمل تکرار شد. از هر لوله و به عبارت بهتر از هر رقت، ۱ سی‌سی به محیط کشت‌های اختصاصی *استرپتومایسس‌ها* (مانند ISP2 و Starch casein) اضافه گردید. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۰-۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰-۷ روز گرماگذاری شدند. مواد تشکیل‌دهنده این محیط‌ها در جدول ۱ و ۲ آورده شده است.

شناسایی اولیه استرپتومایسس‌ها

کلنی جدایه‌ها پس از گذشت ۷ تا ۱۰ روز نمایان شدند.

شکل ۱: تصویر هوایی از دریاچه بختگان

جدول ۱: مواد تشکیل‌دهنده محیط کشت ISP2

نوع مواد	مقدار بر حسب گرم
Malt extract	۱۰
Yeast extract	۴
Glucose	۴
Nacl	۱۵

جدول ۲: مواد تشکیل‌دهنده محیط کشت Starch Casein Agar

مواد شیمیایی	مقدار
Starch	۱۰ گرم
Casein	۰/۳ گرم
KNO3	۰/۲ گرم
Nacl	۲ گرم
K2HPO4	۲ گرم
Mgso4.7H2o	۰/۰۵ گرم
Caco3	۰/۰۲ گرم
FeSo4.7H20	۰/۰۱ گرم
Agar	۱۸ گرم
cyclohexamide	۱۰۰ میلی‌لیتر
Distilled water	۱۰۰۰ میلی‌لیتر

مدت زمان رشد، رنگ سطح و پشت کلنی، شکل کلنی و دیگر ویژگی‌های کلنی بررسی گردیدند و کلنی‌های برآمده و گچی شکل انتخاب شدند. برای بررسی اولیه از رنگ‌آمیزی گرم استفاده گردید. در بررسی میکروسکوپی، وجود رشته‌های نازک باکتری بررسی شد. آزمون کاتالاز نیز برای شناسایی اولیه صورت گرفت.

بررسی اثرات ضد میکروبی

به منظور انجام این مطالعه، ۵۰ نمونه باکتری *اشریشیا کلی* جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری مراجعه‌کننده به آزمایشگاه مرکزی یزد تهیه گردید و برای اطمینان بیشتر از آزمون‌های افتراقی مانند IMViC (Indole, Methyl Red, Voges-Prosakaur, Citrate) جهت شناسایی *اشریشیا کلی‌ها* استفاده شد. آنتی‌بیوگرام نیز به منظور بررسی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی آن‌ها نسبت به جنتامایسین به روش کربی بائر بررسی شد که در این میان پنج جدایه علاوه بر جنتامایسین، حداقل به سه آنتی‌بیوتیک دیگر شامل: آموکسی‌سیلین، آمپی‌سیلین، تتراسایکلین، سیپروفلوکساسین، آمیکاسین، سفتازیدیم، سفتریاکسون و سفکسیم مقاومت نشان دادند و ادامه بررسی‌ها در مورد این پنج جدایه انجام شد (جدول ۳).

برای بررسی توانایی تولید مواد ضد میکروبی علیه اشریشیا کلی مقاوم به جنتامایسین، ابتدا *استرپتومایسس‌های* جداسازی شده در مرکز محیط ISP2 agar به صورت نقطه‌ای (لکه‌ای)کشت داده شدند و به مدت ۱۰-۷ روز در دمای ۲۸ درجه گرماگذاری گردیدند. سپس محیط کشت مولر هینتون آگار به آرامی روی محیط ریخته شد و پس از بستن محیط باکتری‌های *اشریشیا کلی* روی آن‌ها به روش متراکم و چمنی کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری گردیدند. در ادامه، هاله‌های عدم رشد به دور *استرپتومایسس‌های* کشت داده شده با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری شدند و بر مبنای میلی‌متر گزارش گردیدند.

جداسازی متابولیت

به منظور تولید بهتر و بیشتر متابولیت‌های *استرپتومایسس‌های* جداسازی شده، ابتدا *استرپتومایسس‌ها* در محیط Antibiotic activity کشت داده شدند و سپس

جدول ۳: سکانس نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده

سکانس نوکلئوتیدی (۵′ ⟶ ۳′)	پرایمر	طول قطعه
AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	F۲۷	۱۴۸۶
GGTTACCTTGTTACGACTT	R۱۴۹۲	۱۴۸۶

به مدت ۷ تا ۱۰ روز در دمای ۲۸ درجه در شیکر انکوباتور با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. پس از رشد، *استرپتومایسس‌ها* به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردیدند و سوپرناتانت برای سایر آزمایشات مورد استفاده قرار گرفت. از سوپرناتانت به روش دیسک‌گذاری به روش کربی بایر جهت بررسی اثر ضد میکروبی علیه *اشریشیا کلی* استفاده شد.

شناسایی استرپتومایسس

برای شناسایی باکتری‌های جدا شده از پرایمرهای 27F و 1492R و کیت Macherey Nagel با نام و نشان تجاری MN استفاده شد. این کار در زیر هود کلاس دو و در محیطی استریل شده توسط الکل و اشعه UV (Ultraviolet) مطابق با دستورالعمل کیت انجام شد. به منظور مشاهده و بررسی محصول PCR (Polymerase Chain Reaction)، الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد انجام شد. به منظور شناسایی باکتری و تعیین سویه‌های مورد نظر، بررسی توالی اختصاصی 16srRNA انجام شد. برای این منظور، DNA نمونه‌های مورد نظر توسط کیت MN استخراج گردید و نتایج به دست آمده پس از طراحی پرایمر و محصول PCR که تکثیر قطعات ژنی است، به منظور توالی‌یابی به شرکت Learn Genetics فرستاده شد. توالی‌یابی به روش سنگر انجام شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار GSL Biotech SnapGene نسخه SnapGenn3.2.1 صورت گرفت.

نتایج

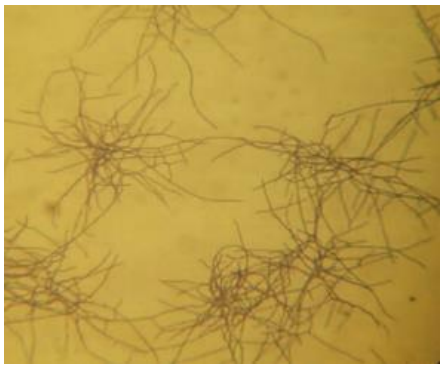
از مجموع ۱۰ نمونه آب جمع‌آوری‌شده، پس از بررسی و شناسایی ماکروسکوپی و میکروسکوپی، ۱۷ *استرپتومایسس* از آب دریاچه بختگان جداسازی شد (شکل ۲).

از باکتری‌های جداسازی شده گسترش تهیه شد و پس از رنگ‌آمیزی گرم در زیر میکروسکوپ نوری بررسی گردید (شکل ۳). این باکتری‌ها گرم مثبت و کاتالاز مثبت بودند و اغلب با رشته‌های بسیار طویل شبیه قارچ‌ها در زیر میکروسکوپ قابل مشاهده می‌باشند (شکل ۴).

به منظور تعیین حساسیت دارویی *اشریشیا کلی*‌های

شکل ۲: نمونه‌های *استرپتومایسس*‌های جدا شده از دریاچه بختگان

شکل ۳: تصویر کلنی *استرپتومایسس* جداسازی شده از دریاچه بختگان، تولیدکننده متابولیت اثرگذار بر *اشریشیا کلی*‌های مقاوم به جنتامایسین



شکل ۴: تصویر میکروسکوپی *استرپتومایسس* جداسازی شده از دریاچه بختگان، تولیدکننده متابولیت اثرگذار بر *اشریشیا کلی*‌های مقاوم به جنتامایسین

شکل ۵: دیسک‌گذاری و انجام آزمون آنتی‌بیوگرام

مورد استفاده در این پژوهش از روش انتشار دیسک (Disk diffusion) استفاده گردید (شکل ۵) و حساسیت دارویی آن‌ها در مقابل جنتامایسین، سفکسیم، سفتریاکسون، آمیکاسین، سیپروفلوکساسین، سفتازیدیم، تتراسایکلین، آمپی‌سیلین و آموکسی‌سیلین بررسی شد و با جدول استاندارد مقایسه گردید. در انتها مقاومت یا حساسیت جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها گزارش شد (جدول ۴). در بین جدایه‌ها، جدایه‌هایی که به جنتامایسین به عنوان هدف اصلی این پژوهش و حداقل سه آنتی‌بیوتیک از بین آنتی‌بیوتیک‌های ذکر شده مقاومت داشتند، برای ادامه آزمایشات انتخاب شدند. از میان ۵۰ نمونه جداسازی‌شده از آزمایشگاه مرکزی شهر یزد، پنج نمونه انتخاب شد که مهم‌ترین آن‌ها *اشریشیا کلی* شماره ۴۵ (که به تمام آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در این پژوهش مقاوم بود) و *اشریشیا کلی* شماره ۳۸ (که تنها در برابر سفکسیم، سفتریاکسون و سیپروفلوکساسین حساس بود) بود که برای ادامه آزمایشات از آن‌ها استفاده شد.

برای انتخاب مناسب‌ترین *استرپتومایسس* جداسازی شده که توان ضد میکروبی بیشتری نسبت به سایر *استرپتومایسس‌های* جدا شده داشته باشد، قطر هاله‌های عدم رشد بررسی شد و *استرپتومایسسی* که قطر هاله عدم رشد بیشتری را ایجاد کرده باشد به عنوان اثرگذارترین نوع در ایجاد ترکیبات ضد میکروبی شناخته می‌شود (شکل ۶).

از ۱۷ *استرپتومایسس* جداسازی شده از دریاچه بختگان، هفت جدایه متابولیت ترشح کردند. از این تعداد تنها دو *استرپتومایسس شماره ۵ و ۱۲* بر باکتری *اشریشیا کلی* مقاوم به جنتامایسین اثرگذار بودند که در این میان، استرپتومایسس شماره ۵ نسبت به تمامی پنج جدایه *اشریشیا کلی مقاوم به جنتامایسین* به ویژه *اشریشیا کلی* شماره ۴۵ که به تمام آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم بود، حساسیت نشان داد؛ در نتیجه این جدایه برای شناسایی مولکولی به شرکت Genetic Learn فرستاده شد. شکل ۷ این باکتری را در محیط کشت نشان می‌دهد که تحت تنش در محیط کشت متابولیت ترشح کرده است.

در آزمون بررسی خاصیت ضد میکروبی که به منظور بررسی میزان اثر و کیفیت متابولیت جدا شده انجام شد، برای به حداقل رساندن میزان خطا، هر متابولیت سه بار روی هر سویه امتحان شد. قطر هاله به دست آمده در جدول ۵ حاصل میانگین سه بار تکرار به همراه SD

شکل ۶: هاله عدم رشد باکتری پاتوژن *اشریشیا کلی* در حضور *استرپتومایسس*های جداسازی شده از دریاچه بختگان

شکل ۷: متابولیت‌های تولید شده توسط *استرپتومایسس* جداسازی شده از دریاچه بختگان به صورت قطره‌هایی روی کلنی مشاهده می‌شود

می‌باشد که با استفاده از نرم‌افزار SPSS محاسبه شده است. در این پژوهش دو مورد از متابولیت‌های جدا شده از این باکتری‌ها بر سویه‌های مختلف باکتری عفونت‌زای *اشریشیا کلی* اثربخش بودند.

توالی‌یابی و سکانس نهایی ژن حاصل از PCR

تعیین توالی حاصل از PCR به صورت گراف (شکل ۸) و فایلی با فرمت FASTA تحویل گرفته شد و نمونه توالی‌یابی شده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج دریافتی با بانک اطلاعاتی ژن مقایسه گردید و گونه مورد نظر که بیشترین میزان تشابه را داشت، شناسایی شد. در بررسی مولکولی انجام شده و توالی‌یابی و مقایسه نتایج توالی‌یابی با پایگاه داده NCBI (National Center for Biotechnology Information)، این باکتری ۹۱ درصد تشابه را با گونه *استرپتومایسس Streptomyces sp. strain 11K402* نشان داد.

جدول ۴: نتایج آنتی‌بیوگرام جدایه‌های *اشریشیا کلی*

آنتی‌بیوتیک	جنتامایسین	آموکسی‌سیلین	آمپی‌سیلین	تتراسایکلین	سیپروفلوکساسین	امیکاسین	سفتازیدیم	سفتریاکسون	سفکسیم
E.coli-34	مقاوم	مقاوم	مقاوم	نیمه حساس	نیمه حساس	نیمه حساس	حساس	حساس	حساس
E.coli-12	مقاوم	مقاوم	مقاوم	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس
E.coli 20	مقاوم	مقاوم	مقاوم	نیمه حساس	نیمه حساس	نیمه حساس	حساس	حساس	حساس
E.coli 45	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
E.coli 38	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	حساس	حساس	حساس

جدول ۵: قطر هاله عدم رشد متابولیت‌های *استرپتومایسس* آبزی علیه *اشریشیا کلی* مقاوم بر جنتامایسین

	E.coli 34	***E.coli 12***	***E.coli 20***	***E.coli 45***	***E.coli38***
استرپتومایسس ۵	۲۰±۱	۱۹±۱/۵	۱۴±۰	۱۳±۰/۵	۱۵±۱
استرپتومایسس ۱۲	۱۷±۰/۵	۱۶±۱	۱۵±۰/۷	-	-

Mean±SD

شکل ۸: بخشی از نتایج تعیین توالی قطعه ۱۱۱۲ bp

بحث

در این مطالعه به جداسازی *استرپتومایسس*ها با قدرت تولید متابولیت‌های ضد میکروبی از دریاچه بختگان پرداخته شد. به طور کلی در بین منابع طبیعی که از آن‌ها برای جداسازی *استرپتومایسس*ها تاکنون استفاده شده است، منابع آبی کمتر مورد توجه قرار گرفته است. با توجه به بررسی‌های انجام شده، تاکنون مطالعه‌ای در مورد جداسازی *استرپتومایسس*ها از دریاچه بختگان انجام نشده است؛ از این رو طی این مرحله ۱۷ جدایه از دریاچه بختگان جداسازی گردید و در بررسی اولیه، جنس *استرپتومایسس* شناخته شد. در این مطالعه از میان نمونه‌های بیمارستانی، *اشریشیا کلی*هایی انتخاب شدند که به جنتامایسین مقاوم بودند. علاوه‌براین مقاومت به آموکسی‌سیلین، آمپی‌سیلین، تتراسایکلین، سیپروفلوکساسین، آمیکاسین، سفتازیدیم، سفتریاکسون و سفکسیم نیز بررسی شدند و آن دسته از *اشریشیا کلی*هایی که به غیر از جنتامایسین حداقل به سه آنتی‌بیوتیک دیگر نیز مقاوم بودند (جدول ۴)، انتخاب شدند. در میان ۱۷ *استرپتومایسس* آبزی جداسازی شده، *استرپتومایسس‌های* ۵ و ۱۲ اثرات ضد میکروبی مناسبی را در برابر *اشریشیا کلی*های مقاوم از خود نشان دادند. این نکته از آن جهت حائز اهمیت است که ظهور و پیدایش باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، لزوم شناسایی منابع جدید آنتی‌بیوتیکی را آشکار می‌سازد. *اکتینومیست‌ها* و به طور خاص *استرپتومایسس*ها به دلیل برخورداری از قابلیت تولید بسیاری از متابولیت‌های مفید زیستی در سراسر جهان توجه زیادی را به خود معطوف نموده‌اند. جداسازی این گونه‌ها از زیستگاه‌های بکر و به ویژه منابع آبی می‌تواند امکان کشف محصولات جدید آنتی‌بیوتیکی را افزایش دهد (۲۹-۲۷). مطالعات مختلفی حضور *اشریشیاکلی* مقاوم به آنتی‌بیوتیک را گزارش کرده‌اند؛ به عنوان مثال Nontongana و همکاران (۲۰۱۴) بیان نموده‌اند که *اشریشیا کلی* جداسازی شده از رودخانه Kat در آفریقای جنوبی نسبت به آمپی‌سیلین (۹۸ درصد)، تتراسایکلین (۱۳ درصد) و استرپتومایسین (۸ درصد) مقاوم بود. Dolejská و همکاران (۲۰۰۹) نیز گزارش کردند که به طور متوسط ۱۷ درصد از نمونه‌های *اشریشیا کلی* به یک یا چند آنتی‌بیوتیک در جمهوری چک مقاوم بودند. همچنین در مطالعه Lyimo و همکاران (۲۰۱۶) شیوع مقاومت *اشریشیا کلی* به آمپی‌سیلین، استرپتومایسین، سولفامتوکسازول، تتراسایکلین و تری‌متوپریم به طور قابل توجهی بالاتر از دیگر آنتی‌بیوتیک‌های با منشأ آبی بود (۳۰).

در این مطالعه از ۵۰ نمونه تهیه شده از آزمایشگاه مرکزی شهر یزد که مقاوم به جنتامایسین بودند، پنج جدایه به حداقل سه آنتی‌بیوتیک دیگر نیز مقاوم بودند و جدایه ۴۵ به تمام آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده مقاومت نشان داد؛ بنابراین یافتن منابع دارویی جدید بسیار اهمیت دارد؛ زیرا در آینده‌ای نه چندان دور، میکروارگانیسم‌های مقاوم می‌توانند معضلات بزرگی را در سلامت جامعه ایجاد کنند. یکی از این منابع، متابولیت‌های تولیدی از *استرپتومایسس*ها می‌باشد.

در سال ۲۰۰۵ Zhang و همکاران از دریاچه قلیایی در چین *استرپتومایسس* جداسازی کردند (۳۱). همچنین در سال ۲۰۱۳ Gebreyohannes و همکاران از دریاچه Tana در اتیوپی *استرپتومیسس* جداسازی کردند و اثرات ضد میکروبی آن‌ها را بر گروهی از میکروارگانیسم‌های گرم منفی و مثبت بررسی نمودند (۳۲). علاوه‌براین، Sing و همکاران در سال ۲۰۱۸ از دریاچه Loktak در هند *استرپتومیسس* جداسازی کردند و اثرات ضد میکروبی متابولیت‌های آن‌ها را بررسی نمودند. Mabrouka و همکاران نیز در سال ۲۰۱۸ از دریاچه

Fetzara در الجزایر *استرپتومیسس* جدا کردند و به بررسی اثرات ضد میکروبی آن‌ها بر برخی از میکروارگانیسم‌های پاتوژن پرداختند (۳۳).

در تمامی این مطالعات اثرات متابولیت‌های *استرپتومیسس‌ها* بر میکروارگانیسم‌های پاتوژن کددار بررسی شده بود که هیچ‌یک مقاومت آنتی‌بیوتیکی نداشتند. در این مطالعه مقاومت آنتی‌بیوتیکی *اشرشیا کلی*‌های مقاوم به جنتامایسین انتخاب شده بر علیه آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین، آمپی‌سیلین، تتراسایکلین، سیپروفلوکساسین، آمیکاسین، سفتریاکسون و سفکسیم هم بررسی انجام شد و جدایه‌هایی برای ادامه آزمایشات انتخاب شدند که علاوه بر جنتامایسین حداقل به سه آنتی‌بیوتیک دیگر نیز مقاومت نشان دادند؛ به طور مثال نمونه *اشریشیا کلی* شماره ۴۵ به تمام آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی شامل: جنتامایسین، آموکسی‌سیلین، آمپی‌سیلین، تتراسایکلین، سیپروفلوکساسین، آمیکاسین، سفتازیدیم، سفتریاکسون و سفکسیم مقاوم بوده است؛ بنابراین مقایسه بین آن‌ها مناسب نبوده و متابولیتی که بتواند بر این میکروارگانیسم دارای مقاومت چند دارویی یا MDR (Multidrug Resistance) اثرگذار باشد، بسیار قابل توجه است. در این مطالعه از میان *استرپتومایسس‌های* جداسازی شده، ۱۷ مورد از آبزیان جداسازی شدند که از این تعداد تنها دو مورد بر باکتری *اشریشیا کلی* مقاوم به جنتامایسین اثرگذار بودند که از میان آن‌ها یک جدایه بهترین نتیجه را نشان داد و بر *اشریشیا کلی* شماره ۴۵ که در مقابل تمام آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم بود نیز اثربخش بود. در بررسی مولکولی انجام‌شده و توالی‌یابی و مقایسه نتایج، توالی‌یابی با پایگاه داده NCBI این باکتری به میزان ۹۱ درصد تشابه با گونه *استرپتومایسس* *Streptomyces sp. strain 11K402* را نشان داد.

در این ارتباط، کفیل‌زاده و همکاران در سال ۲۰۱۳ *اکتینومایست‌های* سواحل جنگل‌های حرا در جنوب ایران را جداسازی نمودند. بیش از ۸۰ درصد از سویه‌های جداسازی شده دارای فعالیت ضد باکتریایی در برابر باکتری‌های بیماری‌زای *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *پروتئوس میرابیلیس*، *اشریشیا کلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* بودند (۳۴).

علاوه‌براین، داراب‌پور و همکاران در سال ۲۰۱۲ *اکتینومایست‌های* تولیدکننده آنتی‌بیوتیک را از نمونه‌های آب و رسوبات نواحی شمالی خلیج فارس جداسازی نمودند. در این مطالعه ۵۷ درصد از سویه‌های جداسازی شده، فعالیت ضد باکتریایی در برابر حداقل یکی از باکتری‌های بررسی شده داشتند. اثر ضد باکتریایی عصاره *اکتینومایست‌ها* در باکتری‌های گرم منفی بیشتر از گرم مثبت گزارش گردید. با توجه به پژوهش‌های پیشین در زمینه جداسازی *اکتینومایست‌ها* از آب و اثرات آنتاگونیستی این جدایه‌ها، پژوهش حاضر با هدف جداسازی و شناسایی *اکتینومایست‌ها* از آب انجام شد (۳۵).

Undabarrena و همکاران نیز در سال ۲۰۱۶ جداسازی *استرپتومایسس*‌ها را از دریاچه‌ای در شیلی انجام دادند و اثرات ضد میکروبی آن‌ها را بررسی نمودند (۳۶).

از سوی دیگر در مطالعاتی که در سال ۲۰۰۳ در چین صورت گرفت، نتایج حاکی از آن بودند که *اکتینومایست*‌های آبزی مقاوم به نمک، سازگاری بسیار زیادی با یون‌های پتاسیم (K)، منیزیم (Mg) و سدیم (Na) دارند. بدیهی است که ویژگی‌های هر منطقه از اسیدیته گرفته تا میزان شوری و دیگر موارد، تأثیر مستقیمی بر فراوانی *اکتینومایست*‌ها دارد (۳۷).

نتیجه‌گیری

به طور کلی، مطالعات صورت‌گرفته در مورد

استرپتومایسس‌های جداسازی شده از منابع آبی، بسیار کمتر از منابع خاکی می‌باشند و بیشتر مطالعات در مورد محیط‌های خاص مانند دریاچه‌های نمکی و قلیایی صورت گرفته و بیشتر آنزیم‌های آن‌ها هدف بررسی بوده است؛ اما در پژوهش حاضر با استناد به نتایج به دست آمده می‌توان بیان نمود که متابولیت‌های جدا شده توان بسیار بالایی در مقابله با سویه‌های *اشریشیا کلی‌های* مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف دارند. این امر بدین‌معنا است که باکتری‌های *استرپتومایسس* تنوع و قدرت بسیار زیادی در تولید متابولیت ثانویه علیه پاتوژن‌های بیماری‌زا دارند. نتایج این پژوهش حاکی از آن بودند که آب دریاچه بختگان می‌تواند به عنوان منبع مناسبی برای استخراج *اکتینومایست* و *استرپتومایسس* باشد. با این وجود باید توجه داشت که به منظور استفاده کاربردی از *استرپتومایسس*ها و متابولیت‌های آن‌ها لازم است مطالعات بسیار گسترده‌تری انجام شود و نوع ماده تولید شده حتماً مورد بررسی شیمیایی قرار گیرد.

حمایت مالی

این مقاله حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد است که بخشی از آن توسط دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز تامین شده است.

ملاحظات اخلاقی

نمونه‌های مورد مطالعه از آزمایشگاه‌های سطح شهر شیراز تهیه شد که در آزمایشگاه میکروب‌شناسی شیراز نگه‌داری می‌شدند و با بیمار ارتباطی برقرار نشده است.

تضاد منافع

این مطالعه تضاد منافعی با هیچ مرکزی ندارد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با همکاری دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی و واحد یزد انجام شده است. بدین‌وسیله از تمامی عزیزان در بخش‌های پژوهشی تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Lepuschitz S, Huhulescu S, Hyden P, Springer B, Rattei T, Allerberger F, et al. Characterization of a community-acquired-MRSA USA300 isolate from a river sample in Austria and whole genome sequence based comparison to a diverse collection of USA300 isolates. Sci Rep. 2018; 8(1):9467.
2. Klein EY, Van Boeckel TP, Martinez EM, Pant S, Gandra S, Levin SA, et al. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. Proc Natl Acad Sci. 2018; 115(15):E3463-70.
3. Oberlé K, Capdeville MJ, Berthe T, Budzinski H, Petit F. Evidence for a complex relationship between antibiotics and antibiotic-resistant Escherichia coli: from medical center patients to a receiving environment. Environ Sci Technol. 2012; 46(3): 1859-68.
4. Rochford C, Sridhar D, Woods N, Saleh Z, Hartenstein L, Ahlawat H, et al. Global governance of antimicrobial resistance. Lancet. 2018; 391 (10134):1976-8.
5. Mohammadipanah F, Wink J. Actinobacteria from arid and desert habitats: diversity and biological activity. Front Microbiol. 2016; 6:1541.
6. Walsh CT, Wencewicz TA. Prospects for new antibiotics: a molecule-centered perspective. J Antibiot. 2014; 67(1):7-22.
7. Thevenon F, Adatte T, Wildi W, Poté J. Antibiotic resistant bacteria/genes dissemination in lacustrine sediments highly increased following cultural eutrophication of Lake Geneva (Switzerland). Chemosphere. 2012; 86(5):468-76.
8. Genilloud O. Mining actinomycetes for novel antibiotics in the omics era: are we ready to exploit this new paradigm? Antibiotics. 2018; 7(4):E85.
9. Bérdy J. Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. J Antibiot. 2012; 65(8):385-95.
10. Singh LS, Baruah I, Bora TC. Actinomycetes of Loktak habitat: isolation and screening for antimicrobial activities. Biotechnology. 2006; 5(2): 217-21.

11. Saadoun I, Al-Joubori B, Al-Khoury R. Testing of production of inhibitory bioactive compounds by soil Streptomycetes as preliminary screening programs in UAE for anti-cancer and anti-bacterial drugs. Int J Curr Microbiol Appl Sci. 2015; 4(3):446-59.
12. Cayol JL, Ollivier B, Alazard D, Amils R, Godfroy A, Piette F, et al. The extreme conditions of life on the planet and exobiology. Environ Microbiol. 2015; 2(10):353-94.
13. Ahmad MS, El-Gendy AO, Ahmed RR, Hassan HM, El-Kabbany HM, Merdash AG. Exploring the antimicrobial and antitumor potentials of Streptomyces sp. AGM12-1 isolated from Egyptian soil. Front Microbiol. 2017; 8:438.
14. Dilip CV, Mulaje SS, Mohalkar RY. A review on actinomycetes and their biotechnological application. Int J Pharm Sci Res. 2013; 4(5):1730.
15. World Health Organization. Antimicrobial resistance and primary health care. Geneva: World Health Organization; 2018.
16. Gurovic MV, Olivera NL. Antibacterial producing actinomycetes from Extra Andean Patagonia. J Arid Environ. 2017; 144:216-9.
17. Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Klenk HP, et al. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. Microbiol Mol Biol Rev. 2016; 80(1):1-43.
18. Salwan R, Sharma V. The role of actinobacteria in the production of industrial enzymes. New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering. New York: Elsevier; 2018. P. 165-77.
19. Landwehr W, Wolf C, Wink J. Actinobacteria and myxobacteria-two of the most important bacterial resources for novel antibiotics. How to overcome the antibiotic crisis. Basel, Switzerland: Springer; 2016. P. 273-302.
20. Harwani D. Biodiversity of rare thermophilic actinomycetes in the great Indian Thar desert: an overview. Ind Am J Pharm Res. 2013; 3:9349-56.
21. Tiwari K, Gupta RK. Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics. Crit Rev Biotechnol. 2012; 32(2):108-32.
22. Nontongana N, Sibanda T, Ngwenya E, Okoh AI. Prevalence and antibiogram profiling of Escherichia coli pathotypes isolated from the Kat River and the Fort Beaufort abstraction water. Int J Environ Res Public Health. 2014; 11(8):8213-27.
23. Dar OA, Hasan R, Schlundt J, Harbarth S, Caleo G, Dar FK, et al. Exploring the evidence base for national and regional policy interventions to combat resistance. Lancet. 2016; 387(10015):285-95.
24. D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WW, Schwarz C, et al. Antibiotic resistance is ancient. Nature. 2011; 477(7365):457-61.
25. Bhullar K, Waglechner N, Pawlowski A, Koteva K, Banks ED, Johnston MD, et al. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. PloS One. 2012; 7(4):e34953.
26. Yin Q, Yue D, Peng Y, Liu Y, Xiao L. Occurrence and distribution of antibiotic-resistant bacteria and transfer of resistance genes in Lake Taihu. Microbes Environ. 2013; 28(4):479-86.
27. Ser HL, Palanisamy UD, Yin WF, Abd Malek SN, Chan KG, Goh BH, et al. Presence of antioxidative agent, Pyrrolo [1, 2-a] pyrazine-1, 4-dione, hexahydro- in newly isolated Streptomyces mangrovisoli sp. nov. Front Microbiol. 2015; 6:854.
28. Baquero F, Martínez JL, Cantón R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. Curr Opin Biotechnol. 2008; 19(3):260-5.
29. Pourmand A, Mazer-Amirshahi M, Jasani G, May L. Emerging trends in antibiotic resistance: Implications for emergency medicine. Am J Emerg Med. 2017; 35(8):1172-6.
30. Lyimo B, Buza J, Subbiah M, Smith W, Call DR. Comparison of antibiotic resistant Escherichia coli obtained from drinking water sources in northern Tanzania: a cross-sectional study. BMC Microbiol. 2016; 16(1):254.
31. Li WJ, Zhang YG, Zhang YQ, Tang SK, Xu P, Xu LH, et al. Streptomyces sodiiphilus sp. nov., a novel alkaliphilic actinomycete. Int J Syst Evol Microbiol. 2005; 55(3):1329-33.
32. Gebreyohannes G, Moges F, Sahile S, Raja N. Isolation and characterization of potential antibiotic producing actinomycetes from water and sediments of Lake Tana, Ethiopia. Asian Pac J Trop Biomed. 2013; 3(6):426-35.
33. Singh LS, Sharma H, Talukdar NC. Production of potent antimicrobial agent by actinomycete, Streptomyces sannanensis strain SU118 isolated from phoomdi in Loktak Lake of Manipur, India. BMC Microbiol. 2014; 14(1):278.
34. Kafilzadeh F. Dehdari F. Namdar N. Isolation and evaluatin of marine actinomycetes from mangrove forests in south of Iran against some human bacterial pathogens. J Ardabil Univ Med Sci. 2013; 13(1):69-77 [in Persian].
35. Darabpour E, Ardakani MR, Motamedi H, Ronagh MT. Isolation of apotent antibiotic producer bacterium, especially against MRSA, from northern region of the Persian Gulf. Bosnian J Basic Med Sci. 2012; 12(2):108 [in Persian].
36. Undabarrena A, Beltrametti F, Claverías FP, González M, Moore ER, Seeger M, et al. Exploring the diversity and antimicrobial potential of marine actinobacteria from the comau fjord in Northern Patagonia, Chile.

Front Microbiol. 2016; 7:1135.
37. Tang SK, Li WJ, Dong W, Zhang YG, Xu LH, Jiang CL. Studies of the biological characteristics of some halophilic and halotolerant actinomycetes isolated from saline and alkaline soils. Actinomycetologica. 2003; 17(1):6-10.

Volume 23, Issue 73, Spring 2020, Pages: 22-34

Original Article

Detection of Aquatic *Streptomyces* with Antimicrobial Effect on Gentamycin-resistant *Escherichia coli* in Bakhtegan Lake in Fars, Iran

Mohammad Masoud Eskandari[1], Behin Omidi[2*], Mehdi Dehghani Zahedi[3]

[1] MSc in Microbial Biotechnology, Islamic Azad University, Central Tehran Branch, Tehran, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Biology, Islamic Azad University, Central Tehran Branch, Tehran, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Biology, Islamic Azad University, Yazd Branch, Yazd, Iran

Received: 22 December 2019 **Accepted:** 05 April 2020

Abstract

Introduction: Following the resistance of bacteria to antibiotics, the prevalence of antibiotic-resistant *Escherichia coli* (*E. coli*) strains has become a major medical challenge in recent years. It demands the development of effective antibiotics with natural origin. *Actinomycetes* are known for their ability to produce secondary metabolites and antibiotics. The aim of this study was to isolate aqueous *Streptomyces* species producing antimicrobial agents against gentamicin-resistant *E. coli* in Lake Bakhtegan in Fars province, Iran.

Materials and Methods: The first step was to obtain samples to evaluate the antagonistic effect of *Streptomyces* on antibiotic-resistant *E. coli*. In this study, 10 water samples were collected from Bakhtegan Lake. The bacteria were cultured in a specific culture medium (i.e., ISP2), and *Streptomyces* species were isolated and purified. The isolation and determination of the efficacy of secondary metabolites in the pathogens were performed by disk diffusion method. Deoxyribonucleic acid was extracted from effective *Streptomyces* for molecular analysis. The 16S ribosomal ribonucleic acid sequence was excised, and polymerase chain reaction was conducted using 27F and 1492R primers to identify the *Streptomyces* species.

Results: In this study, 17 *Streptomycin* isolates were recovered from 10 water samples 7 of which secreted metabolites. In addition, one isolate with a more strong effect on gentamicin-resistant *E. coli* was sequenced and identified as *Streptomyces species strain 11K402.*

Conclusion: Based on the obtained results of this study, it can be concluded that aquatic environments are considered suitable sources for the detection and isolation of *Actinomycetes* and *Streptomycetes* with antimicrobial metabolites.

Keywords: Drug resistance, *Escherichia coli*, *Streptomycetes*

**** Corresponding Author:*** Behin Omidi, Department of Biology, Islamic Azad University, Central Tehran Branch, Tehran, Iran. Tel: 44600184; Email: behin.omidi@yahoo.com