مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره هشتم، شماره دوم، خرداد ـ تیر ۹۳
صفحه ۵۹ الی ٦٨

مقاله پژوهشی
(Original Article)

جداسازی اکتینومیست‌های مولد مواد آنتی‌باکتریال برعلیه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین از خاکهای منطقه آستارا

نور امیرمظفری[1*]، سهیلا درویشی ویزنه[2]، خسرو عیسی‌زاده[3]، علیرضا طاهری[4]

[1]دانشیار میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

[2]دانشجوی کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران.

[3]استادیار میکروب‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران.

[4]استادیار میکروب‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی ، واحدآستارا، 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

چکیده

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

روش بررسی: پس از نمونه‌برداری 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 ضدمیکروبی بر روی ۹۶ ایزوله انجام شد. سپس از محیط کشت اختصاصی ISP2 برای جداسازی استرپتومایسس ها در مرحله غربالگری ثانویه استفاده شد و با تعیین قدرت ضدمیکروبی علیه MRSA، سویه‌های قوی از نظر تولید مواد ضدمیکروبی 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 جمع آوری‌شده از مناطق مختلف آستارا ، ۹۶ ایزوله اکتینومیست جداسازی شد. در غربالگری اولیه، ۹ ایزوله فعالیت ضدباکتریایی 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 ایزوله های فعال در زمینه تولید مواد آنتی‌باکتریایی می‌باشد که نیازمند بررسی‌های بیشتری است.

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

لطفاً به این مقاله به‌صورت 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 Astara region. Qom Univ Med Sci J 2014;8(2):59-68. [Full Text in Persian]

مقدمه

اکتینومیست‌ها اغلب موجوداتی هتروتروف و مزوفیل که در دمای ۲۵-۳۰°C درجه سلسیوس رشد کرده و اکثراً به شرایط اسیدی حساسند . همچنین ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی متنوع ی داشته و دارای DNA با درصد بالای G+C (۵۷-۷۵٪) 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 شد ه 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 باسیل های گرم مثبت تمایل به ایجاد فیلامنت هایی دارند که در نتیجه رشد و منشعب شدن، شبکه‌ای از آنها را تشکیل می‌دهند که میسلیوم نامیده می‌شود . ایجاد حالت رشته‌ای در طبقات مختلف اکتینومیست متنوع بوده و در برخی به‌صورت اولیه است و در بقیه نیز به دو صورت میسلیوم رویشی (Substrate mycelium) و میسلیوم هوایی (Aerial mycelium) دیده می‌شود . میسلیوم هوایی ممکن است اسپور تولید کند یا به اشکال کوکوباسیلی شکسته شود . اکتینومیست‌ها نقش مهمی در تجزیه مواد آلی و تولید متابولیت های ثانویه و مواد فعال بیولوژیکی از جمله آنزیم‌های هیدرولیتیکو آنتی بیوتیک‌ها دارند. امروزه حدود ۱۴۰-۱۳۰ فرآورده میکروبی و تعداد مشابهی از مشتقات آنها در طب انسانی به‌خصوص شیمی‌درمانی و دامپزشکی کاربرد دارد و حدود ۲۰-۱۵ فرآورده نیز در بخش کشاورزی مورد استفاده قرار می گیرد (۴،۳).

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

با توجه به اینکه باکتری های پاتوژن، به‌خصوص *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 آنتی بیوتیک‌هایی هستند که این مقاومت باکتری های 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 برعلیه MRSA برای اولین بار در منطقه آستارا انجام شد. شرایط اقلیمی متفاوت ایران می تواند گونه های بسیاری از استرپتومایسس را در خود داشته باشد ، اما متأسفانه هنوز در ایران برای یافتن تنوع استرپتومایسس ها 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 جمع آوری شد و بلافاصله به آزمایشگاه جهت جداسازی اکتی نومیست‌ها و اندازه‌گیری رطوبت و pH انتقال داده شدند. برای اندازه‌گیری رطوبت، ۸g از نمونه خاک وزن و سپس در دمای ۹۰°C به مدت ۲ ساعت در داخل فور قرار گرفت که اختلاف وزن حاصله به عنوان رطوبت خاک در نظر گرفته شد. برای اندازه‌گیری pH پس از انتقال نمونه‌ها، ابتدا ۴g از نمونه خاک در ۲۰ml از آب مقطر بخوبی حل گردید، سپس با استفاده از دستگاه pHمتر، pH آنها اندازه گیری شد . برای جداسازی و خالص‌سازی اکتینومیست‌ها، ابتدا نمونه‌های خاک در درجه حرارت اتاق به مدت ۵ روز خشک شدند.

در ادامه، رقت‌های 10^{-1}-10^{-4} تهیه و روی محیط Starch Casein Agar (Biomark, India) کشت داده شد، سپس در $28^{\circ}C$ به مدت ۱۴-۱۰ روز انکوبه شدند. به محیط کشت فوق‌الذکر به جهت مهار رشد باکتری ها، ۲۵mg/l کانامایسین و برای مهار رشد قارچ‌ها ۵۰۰mg/l سیکلوهگزامید اضافه گردید. در مرحله بعد، کلنی‌های مجزا با خصوصیات مورفولوژیکی اکتینومیست‌ها (رنگ پشت و روی کلنی، سطح کلنی، شکل میکروسکوپی میسلیوم هوایی) ایزوله و به جهت خالص سازی نیز مجدداً در محیط SCA بصورت خطی کشت داده شد. این ایزوله‌ها در دمای $4^{\circ}C$ نگهداری شدند تا در مواقع لزوم پاساژ داده شود. برای غربالگری اولیه یا کشت نقطه‌ای فعالیت ضدمیکروبی، به‌طور اولیه تکنیک تلقیح نقطه‌ای (Spot) ایزوله‌های خالص اکتینومیست روی محیط Actinomycetes Isolation Agar Medium (Biomark , India) انجام شد. در ادامه، پلیت‌ها در $28^{\circ}C$ به‌مدت ۶ روز انکوبه شده و سپس معکوس شدند و به‌مدت 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 $37^{\circ}C$ به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند و قطر هاله‌های مهاری میکروارگانیسم‌های 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 برعلیه 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 ضدمیکروبی داشتند در داخل محیط ISP2 (International Streptomyces Project Broth 2) تلقیح شدند. در ادامه، محیط‌های تلقیح‌شده در $28^{\circ}C$ بر روی شیکر با دور ۱۵۰rpm به‌مدت ۷ روز قرار گرفتند، سپس این محیط کشت مایع در دور ۴۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و محلول رویی (Supernatant) به لحاظ فعالیت ضدمیکروبی خارج سلولی با روش انتشار در چاهک؛ مقابل میکروارگانیسم‌های 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 به‌صورت سفره‌ای روی محیط Mueller Hinton Agar (Biomark, India) کشت داده شد و یکسری چاهک روی محیط ذکرشده ایجاد گردید. سپس به میزان ۷۰µl از محلول رویی کشت‌های مایع اکتینومیست در داخل هر چاهک ریخته شد و این پلیت‌ها در دمای $37^{\circ}C$ به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. خواص ضدمیکروبی با اندازه‌گیری قطر هاله‌های مهاری (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 مهاری محاسبه گردید (۱۲،۱۰). کلنی‌های جداشده از نظر مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفت. همچنین از نظر مورفولوژی، رنگ میسلیوم 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

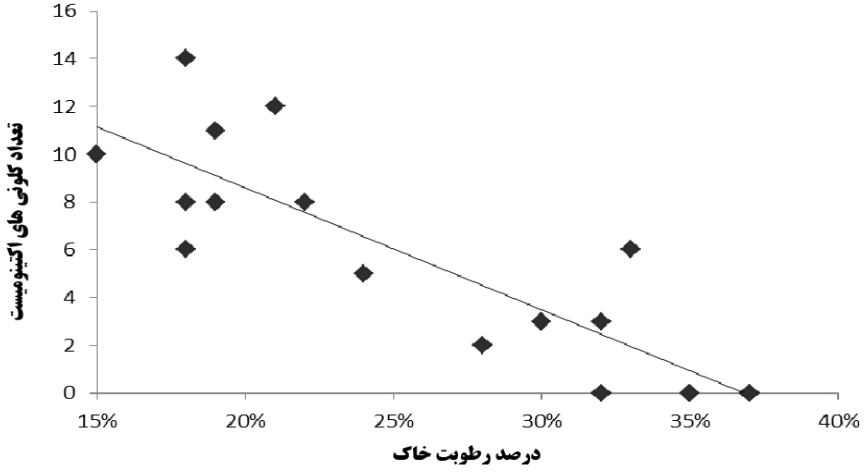
در این مطالعه از ۵۱ نمونه خاک جمع‌آوری‌شده از مکان‌های مختلف شهرستان آستارا، تعداد ۹۶ کلنی اکتینومیست جداسازی شد که میزان فراوانی اکتینومیست‌ها ۹۶٪ بود (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: فراوانی اکتینومیست‌های جداشده برحسب مکان، نوع و تعداد نمونه‌های خاک

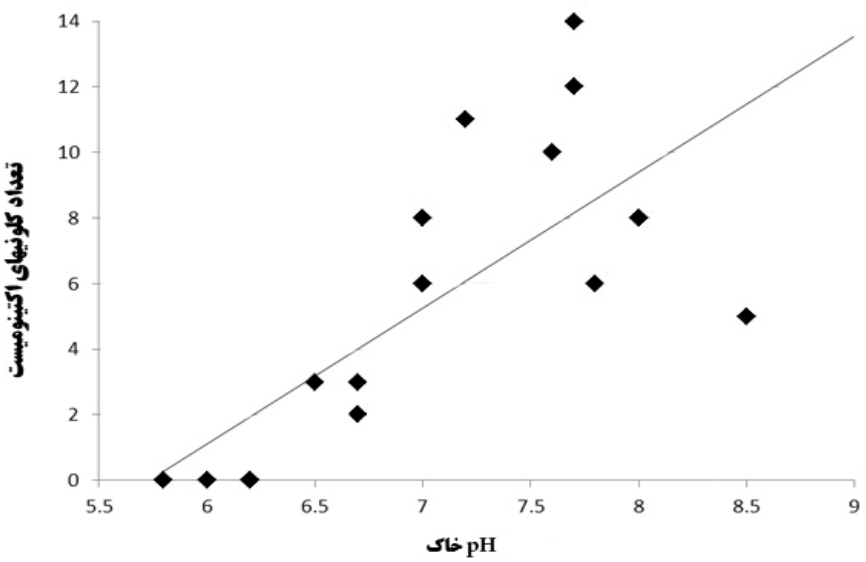
مشخصات نمونه مکان‌های نمونه‌برداری	نوع خاک	تعداد نمونه خاک	تعداد کلنی ایزوله‌شده	فراوانی ایزوله‌ها (٪)
کانرود	زراعی	۳	(AS1-AS3) 3	۳
بهارستان	زراعی	۲	(AS4-AS11) 8	۸
ویرمونی	زراعی	۳	(AS12-AS22) 11	۱۱
لوندویل	زراعی	۳	(AS23-AS28) 6	۶
قلعه	زراعی	۳	(AS29-AS42) 14	۱۴
عباس آباد	زراعی	۳	(AS43-AS52) 10	۸
عسگرآباد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

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

در این مطالعه ارتباط بین pH با تعداد کلنی ایزوله‌شده از آنها در سطح معنی‌داری بود (با افزایش pH تعدادکلنی افزایش می‌یابد) و بیشترین تعداد اکتینومیست‌ها در pH=۷/۵–۸ قرار داشتند. همچنین بین رطوبت نمونه‌های خاک با تعداد کلنی ایزوله‌شده، ارتباط معنی‌داری وجود داشت (با افزایش رطوبت تعداد کلنی کاهش می‌یابد). تعداد زیادی از اکتینومیست‌ها در رطوبت ۲۰–۱۸٪ ایزوله شدند (نمودار شماره ۱ و ۲، جدول شماره ۲).



نمودار شماره ۱: ارتباط بین رطوبت خاک و تعداد کلنی اکتینومیست‌های ایزوله‌شده از خاکهای شهرستان آستارا



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

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

مشخصات نمونه مکان‌های نمونه‌برداری	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
عباس آباد	۷/۶	۰/۲۵	۱۸	۲/۶۴
عسگرآباد	۷/۸	۰/۲۶	۱۸	۲/۶
گیلاده	۷	۰/۲	۱۹	۲/۶۴
باغچه سرا	۶/۲	۰/۲	۳۷	۱ /۷۳
بهارستان	۸/۵	۰/۴۲	۲۴	۲/۸
حیران	۷/۷	۰/۲۶	۲۱	۲/۶۴
آق چای	۸	۰/۴۳	۱۸	۴
چلوند	۶/۲	۰/۴	۳۵	۲/۶۳
سیبلی	۶	۰/۲۴	۳۲	۱/۶۳
لوندویل	۶/۷	۰/۲۶	۲۸	۲
قره سو	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 ایزوله‌شده اکتینومیست، ۹ ایزوله فعالیت ضدمیکروبی 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

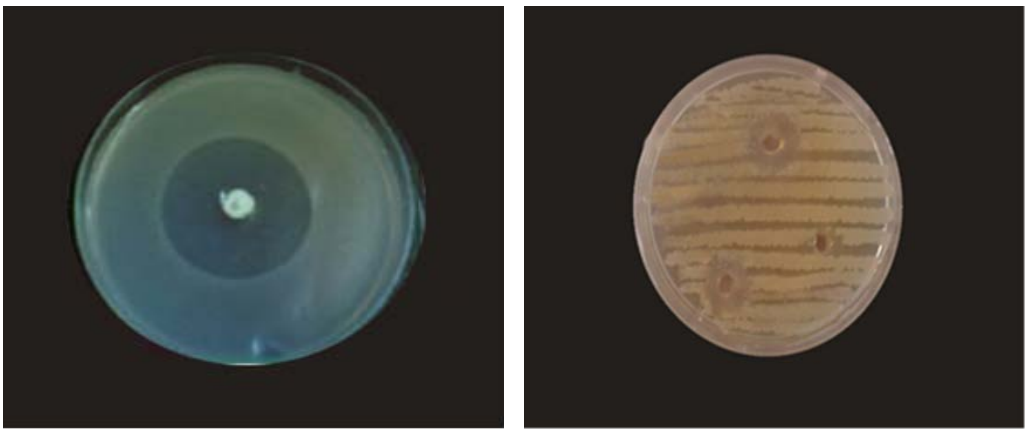
مراحل غربالگری ایزوله‌های فعال‌شده	غربالگری اولیه	غربالگری ثانویه
ایزوله‌ها	**مجموع قطر هاله عدم رشد MRSA (mm)**	**مجموع قطر هاله عدم رشد MRSA (mm)**
AS 1- 5	-	-
AS6-10	AS8	۱۲
AS 11-15	AS13	۲۰
AS 16-20	-	-
AS21-25	AS22	۳۲
AS 26-30	-	-
AS 31-35	-	-
AS 36-40	-	-
AS 41-45	AS45	۱۴
AS 46-50	-	-
AS 51-52	-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

در مرحله آخر تست‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مختلف روی ۳ ایزوله فعال (AS13, AS22, FS38) برای شناسایی گونه‌ها انجام شد که این ایزوله‌ها مربوط به جنس استرپتومایسس بود (جدول شماره ۴).

جدول شماره ٤: مشخصات مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی ایزوله‌های فعال دارای خاصیت ضدمیکروبی

ایزوله‌های فعال‌شده / ویژگی‌ها	AS22	AS13	FS38
رنگ سطح کلنی در SCA	سفید	سفید	کرم‌رنگ
رنگ پشت کلنی در SCA	سفید	کرم	قهوه‌ای
شکل اسپور	RF	S	S
رنگ‌آمیزی اسید فست	–	–	–
تخمیر گلوکز	+	+	+
تخمیر آرابینوز	+	–	+
تخمیر مانیتول	–	–	–
تخمیر گالاکتوز	+	+	+
تخمیر فروکتوز	+	+	+
تخمیر سوکروز	–	–	–
تخمیر مالتوز	–	–	–
احیای نیترات	–	+	–
اوره‌آز	+	–	+
تجزیه کازیین	+	+	+
تست نشاسته	+	+	+
TSI	alk/alk	alk/alk	alk/alk
SIM	–	–	–
متیل‌رد	–	–	–
مصرف سیترات	+	+	+
رشد در نمک ۱/۵٪	+	+	+
رشد در نمک ۳٪	+	+	–
رشد در نمک ۷٪	–	+	–
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 اکتینومیست‌ها 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 باکتریمی یا اندوکاردیت مبتلا می‌شوند (۶).

با توجه به اینکه لزوم به دست آوردن آنتی بیوتیک‌های مؤثر، در داشتن تنوع میکروبی بالاست ، لذا احتمال آن می رود که ایران به دلیل داشتن اکوسیستم متنوع، باکتری‌هایی با تنوع بالا را در خود داشته باشد. در همین راستا، برای جداسازی اکتینومیست‌های 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 دست نخورده نشان می‌دهد و مشخص‌کننده این است که تاکنون تحقیقاتی در جهت ایزوله کردن اکتینومیست‌های تولیدکننده آنتی‌بیوتیک قوی در این مناطق صورت نگرفته است . از ۵۱ نمونه خاک جمع‌آوری‌شده از مناطق مختلف شهرستان آستارا، ۹۶ کلنی اکتینومیست ایزوله شد که بیشتر اکتینومیست‌های جداشده در تحقیق حاضر در pH=۷/۵-۸ و رطوبت ۲۰-۱۸٪ قرار داشتند. همچنین بیشترین تعداد اکتینومیست‌ها به ترتیب از خاکهای زراعی، جنگلی و ساحلی ایزوله شدند. این بررسی نشان داد در خاکهای مناطق زیرکشت محصولات کشاورزی؛ تنوع جمعیتی اکتینومیست‌ها 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 اکتینومیست‌ها 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 اکتینومیست‌های 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 میکروب‌های مورد آزمایش در پلیت باعث ایجاد هاله ممانعت کروی 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 اکتینومیست ها، درجه نسبتاً خوبی از فعالیت‌های ضدباکتریایی تولیدشده به‌وسیله گونه های استرپتومایسس را نشان داد. همچنین در این مطالعه از روش تلقیح نقطه‌ای به‌عنوان روش غربالگری اولیه استفاده شد و تعداد ۹ ایزوله فعالیت ضدمیکروبی نشان دادند. در مرحله بعد نیز از ISP2 برای تولید آنتی بیوتیک استفاده گردید و در روش انتشار چاهک در آگار، تعداد ایزوله های 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 متابولیت های غیرفعال زیستی و مواد سمی نیز تولید شده و باعث از بین رفتن میکروب‌ها شوند،

ولی در روش انتشار چاهک در آگار؛ متابولیت تولیدشده، سانتریفوژ و سپس وارد چاهکها شده که ممکن است هنگام سانتریفوژ خیلی از ترکیباتی که در روش تلقیح نقطه ای تولید شده‌اند رسوب کرده و در روش انتشار مورد استفاده قرار نگیرند و فعالیت ضدمیکروبی نیز نشان ندهند. در مطالعه حاضر با تعیین قدرت ضدمیکروبی علیه MRSA، سویه های قوی از نظر تولید مواد ضدمیکروبی با روش انتشار در چاهک و براساس قطر هاله عدم رشد انتخاب شدند و در مرحله آخر برای شناسایی ایزوله‌های فعال از تست های 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 به‌خودی 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 به‌منظور جداسازی اکتینومیست‌های دارای فعالیت ضدباکتریایی برعلیه 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 ایزوله‌شده، ۱۹ کلنی (۲۹/۶۸٪) در مرحله غربالگری اولیه، فعالیت ضدباکتریایی برعلیه 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 ایزوله‌شده، ۱۵ کلنی در مرحله غربالگری اولیه با روش تلقیح نقطه‌ای فعالیت ضدباکتریایی برعلیه 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 ایزوله‌شده، ۱۸۰ کلنی (۶۰٪) در مرحله غربالگری اولیه برعلیه ۴ سویه استاندارد، فعالیت ضدباکتریایی نشان دادند که از بین آنها ۷ ایزوله در مرحله غربالگری اولیه و ۴ ایزوله در مرحله غربالگری ثانویه برعلیه سویه MRSA فعال بودند (۱۱). در مطالعه‌ای دیگر (سال ۲۰۰۹)روی نمونه خاکهای Klopatthar از نواحی اورست کشور نپال؛ از ۷۹ کلنی ایزوله‌شده، ۱۶ کلنی در مرحله غربالگری اولیه با روش تلقیح نقطه‌ای، فعالیت ضدباکتریایی برعلیه 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 ایزوله‌شده، ۱۰ کلنی در مرحله غربالگری اولیه با روش تلقیح نقطه‌ای فعالیت ضدباکتریایی برعلیه 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 به‌خصوص در نیمه‌غربی (به دلیل داشتن دمای بالا، 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.