Medical Science Journal of Islamic Azad University Vol. 31, No. 4, Winter 2022 ORIGINAL ARTICLE

Cytotoxicity effect of secondary metabolites of *Streptomyces koyangensis* and *Streptomyces tunisiensis* isolated from saline soils of Garmsar City on human breast cancer cell line (MCF-7, IBRC C10082)

Maryam Nikbakht[1], Behin Omidi[1], Mohammad Ali Amoozegar[2], Kumarss Amini[3]
[1] PhD Candidate in Microbiology, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[3] Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, University of Tehran, Tehran, Iran.
[4] Associate Professor, Department of Microbiology, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-11]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1400.31.4.7.1]
[DOI: 10.52547/iau.31.4.367]

Abstract

Background: *Streptomyces* is one of the most important prokaryotic microorganisms, and their secondary metabolites have high antimicrobial and cytotoxic properties. Three-quarters of the antibiotics known to be produced by these bacteria. As a result, finding new effective compounds from these microorganisms can be a way to treat cancer. The aim of this study was to isolate and screen halophilic or halotolent *Streptomycetes* from Garmsar salt cave soil that have the ability to produce metabolites with cytotoxic properties against human breast cancer cell line (MCF-7, IBRC C10082).
Materials and methods: Isolation of *Streptomyces* from soil sample was done by serial dilution method and cultured on casein agar with 15% Nacl. The isolates were identified by microscopic and macroscopic examinations and the presence of diaminopalimic acid (DAP) in their cell wall. The cytotoxic effect was evaluated using MTT assay and 16SrRNA sequencing was performed to select selected *streptomycetes*.
Results: Secondary metabolites of 2 *Streptomyces* showed a 50% reduction in the concentration of human breast cancer cells. *Streptomyces sp.2* was 100% similar to *Streptomyces koyangensis* and *Streptomyces sp.25* was 95.4% similar to *Streptomyces tunisiensis*.
Conclusion: The results of this study showed that *Streptomyces sp.2* and *Streptomyces sp.25* secondary metabolites had cytotoxic effect against MCF-7 human breast cancer cell line. The metabolite produced by them can be an option for further studies and provide more effective treatment with fewer side effects in the treatment of this disease.
Keywords: *Streptomyces, Halophile, Breast cancer.*

Cited as: Nikbakht M, Omidi B, Amoozegar MA, Amini K. Cytotoxicity effect of secondary metabolites of *Streptomyces koyangensis* and *Streptomyces tunisiensis* isolated from saline soils of Garmsar City on human breast cancer cell line (MCF-7, IBRC C10082. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2022; 31(4): **367-376.**

Correspondence to: Behin Omidi
Tel: *+98 9126073427*
E-mail: behin.omidi@yahoo.com
ORCID ID: 0000-0003-0989-8569
Received: 22 Feb 2021; **Accepted:** 6 Jul 2021

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۳۱، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۰، صفحات ۳۶۷ تا ۳۷۶

Original Article

بررسی سمیت سلولی متابولیت‌های ثانویه *Streptomyces koyangensis* و *Streptomyces tunisiensis* جدا شده از خاک‌های نمکی شهرگرمسار بر روی رده سلولی سرطان پستان انسان (MCF-7,IBRC C10082)

مریم نیک بخت[۱]، بهین امیدی[۲]، محمدعلی آموزگار[۳]، کیومرث امینی[۴]

[۱]دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[۲]استادیار، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[۳]استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
[۴]دانشیار، گروه میکروبیولوژی، واحد ساوه ، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *استرپتومایسس یکی از مهم‌ترین میکروارگانیزم‌های پروکاریوتی است که متابولیت‌های ثانویه آن‌ها خواص ضدمیکروبی و ضدسرطانی بالایی دارند و سه چهارم آنتی بیوتیک‌ها توسط این باکتری‌ها تولید می‌شوند. یافتن ترکیبات موثر جدید از این میکروارگانیسم‌ها می‌تواند راهگشا در درمان سرطان‌ها هم باشد. هدف از این مطالعه، جداسازی و غربالگری استرپتومایسس‌های هالوفیل یا هالوتولرنت از خاک غار نمکی گرمسار بود که توانایی تولید متابولیت‌هایی با خاصیت سمیت سلولی برعلیه رده سلولی سرطان پستان انسان (MCF-7,IBRC C10082) دارند.*

روش بررسی: *جداسازی استرپتومایسس‌ها از نمونه خاک به روش سریال دایلوشن انجام شد و بر روی استارچ کازئین آگار با ۱۵٪ Nacl کشت داده شدند. برای شناسایی جدایه‌های استرپتومایسس بررسی میکروسکوپی و ماکروسکوپی و حضور دی آمینوپایملیک اسید (DAP) در دیواره سلولی آن‌ها انجام شد. اثر ضد سرطانی با استفاده از روش MTT/ارزیابی شد و جهت شناسایی استرپتومایسس ها منتخب تعیین توالی 16SrRNA/انجام شد.*

یافته‌ها: *متابولیت‌های ثانویه دو جدایه استرپتومایسس کاهش ۵۰٪ در غلظت ۲۰۰µg/mL در برابر سلول‌های سرطان پستان انسان MCF-7 را نشان دادند. تجزیه و تحلیل مولکولی نشان داد که جدایه‌های انتخاب شده Streptomyces sp.2 ۱۰۰ ٪ شباهت به koyangensis Streptomyces و Streptomyces sp.25 ۹۵/۴٪ شباهت به Streptomyces tunisiensis داشتند.*

نتیجه‌گیری: *نتایج این مطالعه نشان داد که متابولیت‌های ثانویه Streptomyces sp.2 و Streptomyces sp.25 دارای اثر سمیت سلولی علیه رده سلولی سرطان پستان انسان MCF-7 هستند و متابولیت تولید شده توسط آن‌ها می‌تواند گزینه‌ای برای تحقیقات بعدی و ارائه درمان موثرتر با عوارض جانبی کمتر در درمان این بیماری باشد.*

واژگان کلیدی: *استرپتومایسس، هالوفیل، سرطان پستان.*

مقدمه

اعتقاد بر این است که سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در سطح جهان است که با بروز ۱۰/۴ درصدی در بین سرطان‌ها به عنوان دومین سرطان شایع و در رتبه بندی بعد از سرطان ریه قرار دارد (۱، ۲). مطابق آمار سازمان بهداشت جهانی(WHO) میزان بروز سرطان پستان رو به افزایش است و شیوعی حدود ۲/۳ میلیون مبتلا را در سراسر جهان دارد (۳). در یک بررسی سیستماتیک که در مورد جنبه‌های اپیدمیولوژیک سرطان پستان در ایران انجام شد، میزان بروز این بیماری را ۲۲ مورد در هر ۱۰۰۰۰۰ زن ایرانی اعلام شد

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، گروه زیست شناسی، بهین امیدی (**email**: behin.omidi@yahoo.com)
ORCID ID: 0000-0003-0989-8569
تاریخ دریافت مقاله: ۹۹/۱۲/۴
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۴/۱۵

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1400.31.4.7.1]
[DOI: 10.52547/iau.31.4.367]

که در این میان گروه سنی بین ۴۰ تا ۴۹ سال بیشتر در معرض خطر قرار داشتند. در طی این تحقیق مشخص شد که از نظر سنی، زنان در ایران ۱۰ سال زودتر از زنان در سایر نقاط جهان مبتلا به این بیماری می‌شوند. متأسفانه ۷۱ درصد بیماران زمانی شناسایی شده‌اند که در مراحل پیشرفته بیماری قرار داشتند و دو سوم آن‌ها نیز نیاز به درمان‌های گسترده داشته‌اند (۴). مطالعات نشان می‌دهد که این بیماری در کشورهای در حال توسعه بیشتر دیده شده که عنوان شده عوامل محیطی و سبک زندگی می‌تواند نقش اساسی در بیماری‌زایی داشته باشد (۱). از عوامل ایجاد کننده این بیماری می‌توان غلظت لپتین پلاسما را نام برد که یک عامل مهم در تکثیر سلول‌های سرطانی است و ارتباط آماری معنی داری بین سطح لپتین با شیوع سرطان پستان در زنان قبل از دوران یائسگی وجود دارد (۹-۵). مطالعات اپیدمیولوژیک نشان می‌دهد که چاقی نیز تاثیرات زیادی بر افزایش احتمال ابتلا به سرطان پستان دارد (۱۰). غلظت گلوکز هم یک عامل مهم در تکثیر سلول‌های سرطانی پستان است و شیوع سرطان پستان در بیماران دیابتی زیاد است. در مطالعات انجام شده مشخص شده که با افزایش غلظت گلوکز در محیط کشت، تکثیر رده سلول‌های سرطانی پستان MCF-7 افزایش داشته است (۱۱). شیمی درمانی یکی از موثرترین درمان‌ها برای تومورهای متاستاتیک به شمار می‌رود، اما مقاوم شدن سلول‌های سرطانی نسبت به داروهای مختلف از موانع بزرگ بر سر راه موفقیت درمان به شمار می‌آید (۱۲). درنتیجه پیدا کردن مواد و ترکیبات جدید با خاصیت ضد سرطانی مناسب هنوز هم از واجبات درمانی به حساب می‌آید. جداسازی ترکیبات جدید از طبیعت بهترین گزینه در از بین بردن سلول‌های سرطانی است که می‌تواند عوارض جانبی شدید شیمی درمانی را کاهش داده و یک پاسخ ضدسرطانی موثر را ارائه دهند (۱۵-۱۳). در طبیعت میکروارگانیسم‌هایی حضور دارند که تولید کننده انواعی از متابولیت‌ها با خاصیت‌های درمانی بر علیه انواع عفونت‌های باکتریایی و قارچی و متابولیت‌هایی با خواص ضد سرطانی هستند. در این میان *استرپتومایسس‌ها*، از نظر زیست‌شناسی به علت توانایی بالا در تولید انواع متابولیت‌های ثانویه با فعالیت‌های ضدقارچی، ضد ویروسی، ضد توموری و ضد فشارخون بسیار مورد توجه هستند (۱۶، ۱۷). *استرپتومایسس‌ها* باکتری‌های گرم مثبت با محتوای بالای درصد G+C هستند و در دیواره سلولی خود دی آمینوپایملیک اسید (LL-(DAP دارند که اولین بار توسط واکسمن و هنریسی در سال ۱۹۴۳ شناسایی شدند (۱۸). *استرپتومایسس‌ها* بزرگترین تولیدکنندگان آنتی‌بیوتیک محسوب می‌شوند (۱۹). به همین دلیل سویه *استرپتومایسس‌ها* یک انتخاب مناسب برای جداسازی آنتی بیوتیک‌های جدید با فعالیت ضدسرطانی می‌تواند باشد (۱۴، ۲۰، ۲۱). هدف از این مطالعه جداسازی *استرپتومایسس‌های* هالوفیل و هالوتولرنت از خاک‌های غار نمکی گرمسار بود که دارای متابولیت‌های ثانویه‌ای با فعالیت سمیت سلولی بر روی رده سلولی سرطان پستان انسان MCF-7 است؛ با این دیدگاه که میکروارگانیسم‌های ساکن در محیط‌های اکستریم و خاص، متابولیت‌های متفاوت و ویژه‌ای تولید می‌کنند که ممکن است دارای اثربخشی مناسب‌تری باشند.

مواد و روشها

در مجموع ۴۷ نمونه خاک از خاک‌های غار نمکی گرمسار ایران (35°14’46” N 52° 9’19” E) جمع آوری شد. نمونه‌ها از عمق ۰ تا ۱۰ سانتی‌متری خاک جمع‌آوری شدند و در کیسه‌های استریل قرارگرفتند و بر روی قطعات یخ به آزمایشگاه منتقل شدند.۱۰ گرم از هر نمونه خاک به ۱۰۰ میلی لیترآب مقطر اضافه شد و با دور rpm ۱۹۰به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس سری رقت تهیه شد و ۱ میلی لیتر از هر سری رقت بر روی محیط کشت استارچ کازئین آگار با Nacl ۱۵٪ کشت داده شد. به همه پلیت‌های محیط کشت اختصاصی به منظور جلوگیری از رشد قارچها سیکلوهگزیمید (۵۰µg/mL) و ریفامپین (۰/۵ µg/mL) اضافه شد. پلیت‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۱ روز در انکوباتور نگهداری شدند. جدایه‌ها بر روی آگار عصاره مخمر/ مالت ISP2 (International Streptomyces Project Medium) با Nacl ۱۵٪ خالص سازی شدند و جدایه‌های خالص شده در محیط ISP2 آگار با Nacl ۱۵٪ نگهداری شدند (۱۵، ۲۱). تمام مواد و معرف‌ها از Merch (E.Merk,Darmstadt,Germany) استفاده شدند.

اندازه‌گیری درصد شوری و pH نمونه‌های خاک

درصد شوری تمام نمونه‌های خاک با استفاده از رفراکتومتر (Portable-TRANS) و میزان pH با استفاده از دستگاه pH متر (مدل Metrohm) اندازه گیری شد.

شناسایی اولیه جدایه‌ها

از نظر ماکروسکوپی کلنی‌های *استرپتومایسس* به طور معمول رنگ سفید و ظاهری خشک و گچی روی محیط کشت استارچ کازئین آگار دارند، همچنین دارای بوی خاک هستند. از این ویژگی‌ها برای شناسایی اولیه کلنی *استرپتومایسس* استفاده شد.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1400.31.4.7.1]
[DOI: 10.52547/iau.31.4.367]

در بررسی میکروسکوپی از رنگ آمیزی گرم برای شناسایی مورفولوژیکی *استرپتومایسس* استفاده شد و ساختار رشته‌ای شکل آن‌ها در زیر میکروسکوپ نوری بررسی شد.

بررسی خصوصیات بیوشیمیایی جدایه های *استرپتومایسس* با استفاده از روش‌های کاملا مطابق با مطالعه Kampfer تعیین شد (۲۲). وجود ترکیب دی آمینوپایملیک اسید (LL-(DAP در دیواره سلولی جدایه‌های *استرپتومایسس* با روش کروماتوگرافی،تکنیک TLC(Thin-layer chromatography) تایید شد (۲۳).

استخراج متابولیت ثانویه به روش اتیل استات

کلنی‌های خالص *استرپتومایسس* به ۵۰ میلی لیتر محیط پیش کشت ISP2 براث در فلاسک ۲۵۰ میلی‌لیتری تلقیح شد و در شیکر انکوباتور ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت با دور ۱۵۰rpm گهداری شد. بعد از ۴۸ ساعت محیط پیش کشت به محیط کشت تخمیری حاوی ۲۰۰ میلی‌لیتر ISP2 براث در فلاسک‌های ۵۰۰ میلی لیتری تلقیح شد و به مدت ۱۴ روز تحت همان شرایط انکوبه شد. بعد از گذشت دوره گرماگذاری کل حجم محیط کشت تخمیری با دور ۴۰۰۰rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی به دست آمده به نسبت حجمی برابر ۱:۱ با حلال آلی اتیل استات به مدت ۲ ساعت روی همزن مغناطیسی همزده شد و با استفاده از قیف دکانتور فاز آبی و آلی از یکدیگر جدا شد و اتیل استات در دستگاه اواپراتور تغلیظ شد و متابولیت خشک تهیه شد و در دمای ۲۰ - درجه سانتی‌گراد برای استفاده در آزمایش‌های بعدی نگهداری شد (۲۴).

کشت سلول انسانی و روش MTT

ارزیابی تأثیر متابولیت‌های ثانویه جدایه‌های *استرپتومایسس* بر زنده ماندن سلول MCF-7 قبل و بعد ازتیمار، با روش MTT انجام شد. رده سلولی سرطان پستان انسان (MCF-7, IBRC C10082) از مرکزملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شد و به عنوان یک لایه درمحیط کشت DMEM دارای ۱۰٪ سرم گاوی جنین (FBS)، ۱میلی مولار سدیم پیرووات سدیم و ۲ میلی‌لیتر L-گلوتامین ۱۰۰ U/mL پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر *استرپتومایسین* در۳۷ درجه سانتیگراد و CO2 ۵٪ رشد داده شد. به این منظور سلول‌های سرطانی با تراکم ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند و پس از گذشت یک شب غلظت‌های مختلف متابولیت‌های ثانویه جدایه‌های *استرپتومایسس* با غلظت‌های ۰، ۱۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر بر روی آن‌ها اثر داده شد. ازآنجایی که متابولیت‌ها در DMSO حل شده بودند، در نمونه کنترل هم حجم متابولیت اضافه شده به محیط کشت، DMSO به محیط کشت اضافه شد. همچنین محیط کشت‌های استفاده شده توسط میکروارگانیزم‌ها نیز به صورت تلقیح نشده مورد فرآیند استخراج متابولیت قرارگرفتند و ماده حاصل از آن‌ها نیز به عنوان کنترل استفاده شد. پس از انجام تست اثرات DMSO و محیط کشت میکروارگانیسم از نتایج حذف شد و اثر خالص متابولیت به دست آمد. تیمار سلول‌ها در گروه‌های مختلف به مدت ۴۸ ساعت و در تکرارهای سه‌تایی انجام شد. سپس به میزان ده درصد محیط کشت محلول MTT (Sigma, USA) با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به چاهک‌ها اضافه شد و پس از طی سه ساعت محیط رویی سلول‌ها برداشته شدند و بلورهای بنفش فورمازان در ۱۰۰میکرولیتر DMSO حل شدند و سپس جذب هر نمونه در طول موج۵۶۰ نانومتر توسط دستگاه Eliza Reader (Bio-tek Instruments,USA)، سنجیده شد و در نهایت درصد زنده مانی سلول‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد. درصد توانایی زیستی برابر است با میانگین جذب نمونه‌های تیمار شده با هر غلظت ازمتابولیت تقسیم بر میانگین جذب نمونه تیمار نشده ضربدر ۱۰۰ (۲۵).

تعیین توالی 16s rRNA جدایه‌های منتخب *استرپتومایسس*

استخراج DNA ازجدایه‌های منتخب *استرپتومایسس* با استفاده از روش Marmur انجام شد (۲۶). برای جداسازی و تکثیر ژن 16srRNA از پرایمرهای عمومی استفاده شد (جدول ۱).

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در PCR جدایه‌های منتخب *استرپتومایسس‌ها*

نام پرایمر	توالی پرایمر (۳-۵)	دمای اتصال
9F	AAGAGTTTGATCATGGCTCAG	۶۰ ℃
1541R	AGGAGGTGATCCAACCGCA	۶۸ ℃

برنامه مورد استفاده در PCR به شرح زیر بود. مرحله واسرشت (Denaturation) اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، مرحله واسرشت در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه در ۳۲ سیکل، مرحله اتصال (Annealing) در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و مرحله طویل شدن (Extension) در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه به پایان رسید. بعد از اتمام مراحل واکنش و تایید باندهای حاصل توسط الکتروفورز ژل آگارز، محصول واکنش برای تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی فرستاده شد. نتایج توالی توسط نرم افزار BioEdit ویرایش شد. سپس نتایج حاصل از همردیفی با توالی‌های ثبت شده در بانک اطلاعات NCBI با استفاده از الگوریتم BLAST مقایسه شد و شباهت‌های توالی ژن

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1400.31.4.7.1]
[DOI: 10.52547/iau.31.4.367]

جدول ۲. خصوصیات مرفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی *Streptomyces sp.2*، *Streptomyces sp.25* و گونه های مربوط به *Streptomyces*

مشخصات	*Streptomyces* sp.25	*Streptomyces tunisiensis* (22) CN-207^T	*Streptomyces* sp.2	*Streptomyces koyangensis* (23) VK-A60^T
رنگ کلنی	خاکستری	خاکستری	قهوه ای	مایل به قهوه ای پررنگ
فرم میسلیوم در ISP2	شاخه ای	شاخه ای	شاخه ای	شاخه ای
واکنش رنگ امیزی گرم	+	+	+	+
رنج درصد NaCl	۱۵-۲	۷-۰	۱۵-۲	۴-۱۰
اپتیمم NaCl (%)	۵	نا مشخص	۵	نا مشخص
اپتیمم دما (°C)	۲۸	۲۸	۲۸	نا مشخص
اپتیمم pH	۷	۷	۷	نا مشخص
واکنش نیترات	-	-	-	+
کاتالاز	+	نا مشخص	+	نا مشخص
وجود LL-diaminopimelic acid*	+	+	+	+
هیدرولیز کازیین	+	+	+	+
هیدرولیز نشاسته	+	+	+	
سیترات	+	نا مشخص	+	نا مشخص
مانیتول	-	نا مشخص	-	+
ترهالوز	+	نا مشخص	+	نا مشخص
مالتوز	-	نا مشخص	-	نا مشخص
منطقه جداسازی	گرمسار	شمال تونس	گرمسار	کره

16srRNA با استفاده از نرم افزار EzTaxon-e محاسبه شد(۲۷). درخت فیلوژنی این جدایه‌ها به روش Neighbor joining و ضریب 1000 BooT Strap و با نرم افزار MEGA6 رسم شد.

روش تحلیل داده‌ها

دراین مطالعه تمام آزمایش‌ها به صورت سه بار تکرار یا بیشترانجام شد وازشاخص mean ±SD برای نشان دادن توزیع داده‌ها و همچنین جمع‌بندی آن‌ها استفاده شد. تحلیل آماری با تست one-way ANOVA انجام شد و $p<۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

جهت جداسازی و خالص سازی *استرپتومایسس‌ها* و غربالگری جهت تعیین جدایه‌های دارای بهترین اثر سمیت سلولی در مجموع ۴۷ نمونه خاک از خاک‌های نمکی گرمسار، ایران (35º14’46” N 52º 9’19” E) جمع آوری شد. میزان شوری نمونه‌های خاک بین ۳ تا ۱۵ درصد و دامنه pH بین ۴/۹ تا ۶/۶ تعیین شد. در مجموع ۲۸ جدایه *استرپتومایسس* هالوفیل جداسازی شد و در محیط ISP2 آگار حاوی ۱۵٪ Nacl خالص سازی شدند. شکل ماکروسکوپی کلنی‌ها و شکل میکروسکوپی جدایه‌های منتخب استرپتومایسس در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده‌اند. فرم ایزومری DAP و نوع ایزومر DAP موجود در دیواره سلولی در تمام جدایه‌های استرپتومایسس تعیین شدند. برای تایید از نمونه های استاندارد هم استفاده شد. برای غربالگری اثر سمیت سلولی جدایه‌ها بر روی رده سلولی سرطان پستان انسان، تست MTT انجام شد که نتایج نشان داد که ۲ جدایه *استرپتومایسس* شماره ۲ و ۲۵ با بیشترین اثر سمیت سلولی به عنوان جدایه های منتخب در نظر گرفته شدند. تمام جدایه‌ها گرم مثبت و کاتالاز مثبت بودند. در جدول ۲ مشخصات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه‌های منتخب در کنار جدایه های مشابه بررسی شده است.

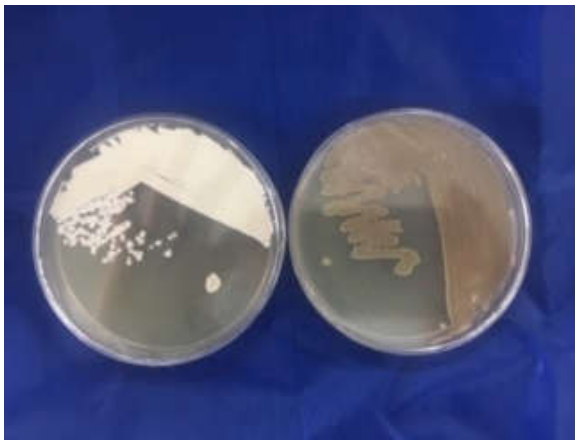
در بررسی اثر سمیت سلولی جدایه های *استرپتومایسس*، جدایه‌های شماره ۲ و ۲۵ بر روی سرطان پستان انسان MCF-7 بهترین تاثیر را داشتند. ۲ جدایه *استرپتومایسس* شماره ۲ و ۲۵ باعث کاهش معنی داری در توانایی زیستی رده سلول‌های MCF-7 در غلظت‌های µg/mL ۴۰۰ و ۸۰۰ بعد از ۴۸ ساعت شدند و همچنین کاهش ۵۰ ٪ در غلظت‌های µg/mL ۲۰۰ سلول‌های MCF-7 شدند (نمودار ۱).

شناسایی جدایه‌های منتخب *استرپتومایسس*

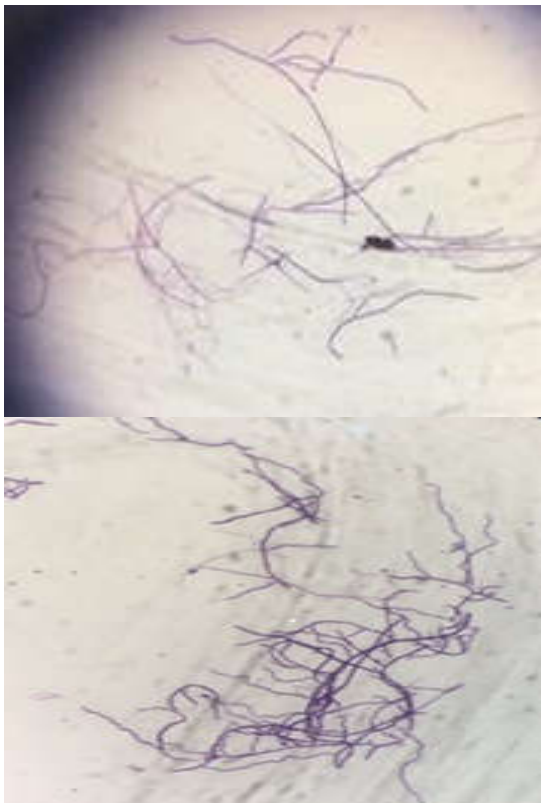
۲ جدایه *استرپتومایسس* ۲ و ۲۵ به عنوان سویه‌های فعال با اثر سمیت سلولی انتخاب شدند. موقعیت‌های فیلوژنتیکی

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1400.31.4.7.1]
[DOI: 10.52547/iau.31.4.367]

این سویه‌ها بر اساس توالی ژن 16srRNA (۱۴۴۵ جفت باز) تعیین شد.



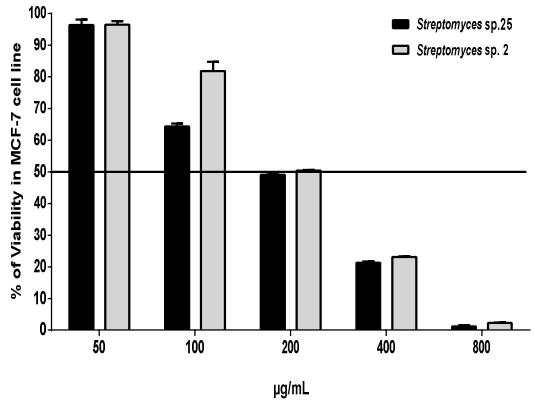
شکل ۱. شکل ماکروسکوپی کلنی‌های جدایه‌های منتخب *استرپتومایسس*



شکل ۲. شکل میکروسکوپی جدایه‌های منتخب *استرپتومایسس*

هم‌ردیفی این توالی‌ها با توالی‌های ثبت شده در بانک اطلاعات NCBI نشان داد که *استرپتومایسس* شماره ۲، ۱۰۰ ٪ شباهت به *Streptomyces koyangensis* و *استرپتومایسس* شماره ۲۵، ۹۵/۴ ٪ شباهت به *Streptomyces tunisiensis* دارد (نمودار ۲). ثبت ژن این دو جدایه هم به صورت زیر صورت گرفت:

Streptomyces koyangensis (GenBank accession number: SUB7473271 nk2 MT490244)
Streptomyces tunisiensis (GenBank accession number: SUB7473271 nk25 MT490243)

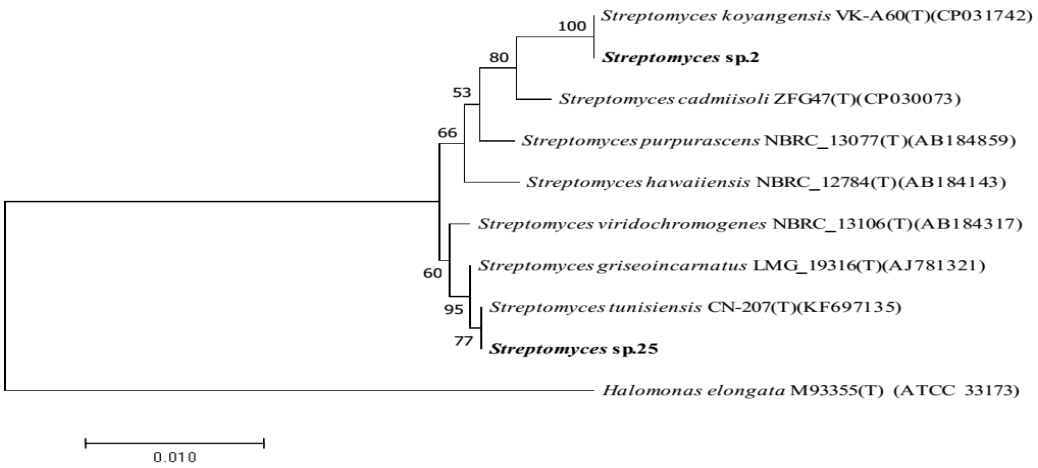


نمودار ۱. تست MTT برای رده سلول سرطان پستان MCF-7. در حضور غلظت‌های مختلف متابولیت‌های Streptomyces sp.2 و Streptomyces sp.25. زنده ماندن سلول‌های MCF-7 پس از درمان با غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر هر دو متابولیت پس از ۴۸ ساعت به ۵۰٪ کاهش یافت.

بحث

جداسازی ترکیبات جدید از طبیعت می‌تواند راهکاری برای کاهش عوارض جانبی و شدید شیمی درمانی در درمان سرطان‌ها باشد؛ همچنین باعث افزایش در بالا بردن اثر بخشی در مقاومت‌های آنتی بیوتیکی بر علیه پاتوژن‌های بالینی شود (۲۹،۲۸). در مطالعه حاضر ۲۸ جدایه *استرپتومایسس* هالوفیل از خاک‌های شور گرمسار ایران جداسازی شد و جدایه‌هایی که خاصیت سمیت سلولی موثر داشتند غربالگری شدند. اثر سمیت سلولی جدایه‌ها با تاثیر آن‌ها بر روی سلول MCF-7 سرطان پستان بررسی شدند. آزمایشMTT نشان داد که متابولیت‌های ثانویه جدایه‌های *Streptomyces sp.25* و *Streptomyces sp.2* باعث کاهش توانایی زیستی رده سلولی سرطان پستان MCF-7 در غلظت‌های بالاتر (,200-800µg/mL IC50200µg/mL) می‌شود، اما در غلظت‌های پایین (50µg/mL) بی‌اثر بود. این نتیجه نشان می‌دهد که اثرات آن‌ها ممکن است وابسته به دوز باشد (۳۰). در مطالعه‌ای که توسط Fei law و همکارانش در سال ۲۰۲۰ انجام شد نشان داده شد که در بین عصاره‌های اتیل استات جداسازی

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1400.31.4.7.1]
[DOI: 10.52547/iau.31.4.367]



نمودار ۲. درخت فیلوژنتیک جدایه های *Streptomyces sp.2* و *Streptomyces sp.25* . روابط فیلوژنتیک بین توالی 16srRNA جدایه ها و سایر توالی های باکتریایی مرتبط. نوار مقیاس مربوط به ۱۰٪ اختلاف تخمین زده شده در موقعیت های توالی نوکلئوتیدی است.

شده از *استرپتومایسس‌ها* جدایه *Streptomyces sp.* ACT01 دارای سمیت سلولی قوی در برابر سلول‌های سرطانی پستان MCF-7 با مقادیر IC_{50} ۱۹/۴۹ µg/mL است (۳۱). در تحقیقی که Kalyani BS و همکارانش در سال ۲۰۱۹ انجام دادند نشان دادند که عصاره اتیل استات از جدایه *Streptomyces sp.*NLKPB45 جدا شده از خاک درختچه‌های mangrove در هند باعث کاهش توانایی زیستی در سلول‌های MCF-7 و Hella و HT29 به ترتیب با مقادیر IC_{50} 40/917 و 37/1924 و 43/3758 µg/mL شد (۳۲). درمطالعات انجام شده توسط Sivalingam و همکارانش در سال ۲۰۱۹ آنتی بیوتیک‌های جدید از *استرپتومایسس‌ها* معرفی شدند. آنتی بیوتیک caboxamycin که از جدایه *Streptomyces sp.*NTK937 از رسوبات عمیق در جزایر قناری جمع آوری شده است، فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی و ضد سرطانی بر علیه سلول‌های MCF-7 و HepG2 و AGS دارد. Grincamycins یک آنتی بیوتیک جدید است که از جدایه *Streptomyces sp.*XZHG99 درخاک صحرای رنگی منطقه دنگپا تبت جداسازی شده است و در برابر سلول‌های سرطانی انسانی MCF-7 سمیت قابل توجهی نشان داده است (۱۴). در تحقیقی که Obeidat M در سال ۲۰۱۷ انجام داد ۴۸ *استرپتومایسس* از خاک اردن جدا کرد و فعالیت ضدسرطانی آن‌ها را در برابر سلول‌های MCF-7 مورد بررسی قرار داد و نتایج نشان داد که عصاره‌های n- بوتانوله از ۹ جدایه باعث کاهش توانایی زیستی سلول‌های MCF-7 با مقادیر IC_{50} در محدوده mg/mL ۱/۶۴ -۰/۶۸ بوده است (۳۳). همچنین Sagar و همکارانش در سال ۲۰۱۳ مشاهده کردند که عصاره باکتری‌های هالوفیل با دوز ۲۰۰ و ۵۰۰ µg/mL بر روی سلول‌های MCF-7، HeLa و DU145 سمی بود (۳۴). Schulz و همکارانش در سال ۲۰۱۲ ترکیب Silvalactam که یک آنتی بیوتیک جدید از خانواده ماکرولاکتام است را از استرپتومایسس‌های خاکزی در جنگل‌های رامرت آلمان جداسازی کردند که فعالیت ضد تکثیر قوی در برابر رده‌های سلولی مختلف سرطانی مانند تومور لوزالمعده و سلول‌های اپیتلیال مجرای پانکراس را نشان داد (۳۵). تحقیقات Chiu و همکارانش در سال ۲۰۲۱ نشان داد که اثر ضد تکثیری JBIR-100 که یک ماکرولید جدا شده و متابولیت ثانویه *Streptomyces sp.* است، رشد رده‌های سلول‌های سرطانی پستان MCF-7 و MDA-MB-213 را مهار کرده است (۳۶). در سال ۲۰۲۰ Rajivgandhi و همکارانش از جدایه *Streptomyces akiyoshiensisGRG 6 (KY457710)* که از نمونه خاک‌های دریایی جداسازی کردند، ترکیب ضد سرطانی pyrrolo [1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3 را شناسایی کردند که این ترکیب دارای فعالیت ضدسرطانی قوی در برابر سلول‌های سرطانی پستان MCF-7 با غلظت ۲۵۰ µg/mL بود (۳۷).

مطالعه‌ای در سال ۲۰۲۰ توسط Elkhateeb و همکارانش انجام شد که نشان داد که عصاره‌های اتیل استات جدا شده از جدایه *Streptomyces zaomyceticus* strain AA1 از خاک‌های غاری دورافتاده در مصر با غلظت ۲۰۰ µg/mL در دو محیط کشت ISP2 و استارچ کازئین آگار دارای فعالیت ضد

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1400.31.4.7.1]
[DOI: 10.52547/iau.31.4.367]

سرطانی در برابر رده سلولی سرطان پستان MCF-7 با سمیت سلولی به ترتیب ۰/۸± ۹۷/۰۱ درصد و ۰/۲±۹۶/۲۷ درصد در این دو محیط کشت است (۳۸).

تحقیقات ذکر شده نتایجی همسو با نتایج به دست آمده در این تحقیق داشتند؛ بنابراین می‌توان گفت اثر متابولیت جدایه‌های *Streptomyces sp.2* و *Streptomyces sp.25* بر آپوپتوز سلول سرطانی، می‌تواند رویکرد مناسبی برای تحقیقات آینده باشد و با توجه به اینکه این جدایه‌ها از خاک‌های نمکی گرمسار به عنوان محیط اکستریم جداسازی شده‌اند احتمال تولید ترکیبات متفاوتی نسبت به سایر موجودات غیرهالوفیل دارند. مطالعات کمی درباره متابولیت‌های ثانویه هالوفیل‌ها انجام شده است و به نظر می‌رسد این ترکیبات می‌توانند منبع مهمی در تولید ترکیبات جدید ضد سرطانی باشند (۲۹، ۳۹). با توجه به اینکه باکتری‌های جنس *استرپتومیسس* از نقطه نظر بیولوژیکی و تولید فراورده های دارویی بسیار اهمیت دارند و امروزه بیش از نیمی از ترکیباتی که در حوزه پزشکی و کشاورزی شناخته شده‌اند، از منشاء *استرپتومیسس*‌ها تولید می‌شوند. در نتیجه مطالعه حاضر ۲ جدایه *استرپتومایسس* هالوفیل، *استرپتومایسس* شماره ۲ و ۲۵ جدا شده از خاک‌های نمکی گرمسار ایران را معرفی می‌کند که متابولیت‌های ثانویه آن‌ها فعالیت سمیت سلولی با کاهش زنده ماندن سلولهای MCF-7 را نشان دادند. تعیین توالی ژن 16srRNA نشان داد که *استرپتومایسس* شماره ۲، ۱۰۰ درصد شباهت به *Streptomyces koyangensis* و *استرپتومایسس* شماره ۲۵، ۹۵/۴ درصد شباهت به *Streptomyces tunisiensis* دارد. مطالعات بیشتر از جمله جداسازی، خالص‌سازی *استرپتومایسس*‌ها و توصیف ترکیبات زیستی فعال متابولیت‌های آن‌ها برای تولید آنتی بیوتیک‌های جدید با فعالیت در برابر رده‌های سلول سرطانی می‌تواند مفید باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مـادی و معنـوی دانشـگاه آزاد اسـلامی واحد تهران مرکز انجام شده است که بـدین طریـق از همگـی عزیزان قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Iacoviello L, Bonaccio M, de Gaetano G, Donati MB. Epidemiology of breast cancer, a paradigm of the "common soil" hypothesis. Semin Cancer Biol 2021;72:4-10.

2-Siegel RL, Miller KD, Goding Sauer A, Fedewa SA, Butterly LF, Anderson JC, et al. Colorectal cancer statistics, 2020. CA Cancer J Clin 2020;70:145-64.

3- Hwong A, Wang K, Bent S, Mangurian C. Breast cancer screening in women with schizophrenia: a systematic review and meta-analysis. Psychiatr Serv 2020;71:263-8.

4-Mohammadi E, Aminorroaya A, Fattahi N, Azadnajafabad S, Rezaei N, Farzi Y, et al. Epidemiologic pattern of cancers in Iran; current knowledge and future perspective. J Diabets Metab Disord 2020:1-5.

5-Toh YL, Tan CJ, Yeo AH, Shwe M, Ho HK, Gan YX, et al. Association of plasma leptin, pro-inflammatory adipokines and cancer-related fatigue in early-stage breast cancer patients: A prospective cohort study. J Cell Mol Med 2019;23:4281-89.

6- Tuna BG, Cleary MP, Demirel PB, Dogan S. Leptin signaling in liver tissue of a transgenic breast cancer mouse model. Cureus 2020;12: e6737.

7-Gu L, Wang CD, Cao C, Cai LR, Li DH, Zheng YZ. Association of serum leptin with breast cancer: a meta-analysis. Medicine 2019;98: e14094.

8- Yi F, Diao S, Yuan XL, Li JY. Association of plasma leptin levels and soluble leptin receptor with breast cancer. Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi 2018;52:253-259. [In Chinese]

9-Boothby-Shoemaker W, Benham V, Paithankar S, Shankar R, Chen B, Bernard JJ. The Relationship between Leptin, the Leptin Receptor and FGFR1 in Primary Human Breast Tumors. Cells 2020;9:2224.

10- Park JW, Han K, Shin DW, Yeo Y, Chang JW, Yoo JE, et al. Obesity and breast cancer risk for pre- and postmenopausal women among over 6 million Korean women. Breast Cancer Res Treat 2021;185:495-506.

11- Wei ML, Duan P, Wang ZM, Ding M, Tu P. High glucose and high insulin conditions promote MCF-7 cell proliferation and invasion by upregulating IRS1 and activating the Ras/Raf/ERK pathway. Mol Med Rep 2017;16:6690-6696.

12- Vasan N, Baselga J, Hyman DM. A view on drug resistance in cancer. Nature 2019;575:299-309.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1400.31.4.7.1]
[DOI: 10.52547/iau.31.4.367]

13- Qu XY, Ren JW, Peng AH, Lin SQ, Lu DD, Du QQ, et al. Cytotoxic, Anti-Migration, and Anti-Invasion Activities on Breast Cancer Cells of Angucycline Glycosides Isolated from a Marine-Derived *Streptomyces* sp. Mar Drugs 2019;17:277.

14- Sivalingam P, Hong K, Pote J, Prabakar K. Extreme Environment *Streptomyces*: Potential Sources for New Antibacterial and Anticancer Drug Leads? Int J Microbiol 2019;2019:5283948.

15- Prakash B, Singh PP, Kumar A, Das S, Chaudhari AK. Microbes as a novel source of secondary metabolite products of industrial significance. In: Kumar A, Singh AK, Choudhary KK, Editors. Role of plant growth promoting microorganisms in sustainable agriculture and nanotechnology. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science; 2019. P.21-37.

16- De Lima Procópio RE, da Silva IR, Martins MK, de Azevedo JL, de Araújo JM. Antibiotics produced by Streptomyces. Braz J Infect Dis 2012;16:466-71.

17- Tangjitjaroenkun J, Pluempanupa W, Tangchitcharoenkhu R, Yahayo W, Supabpho R. Antibacterial, antioxidant, cytotoxic effects and GC-MS analysis of mangrove-derived StreptomycesachromogenesTCH4extract. Arch Biol Sci 2021;73:223-35.

18- Witt D., Stackebrandt E. Unification of the genera Streptoverticillum and *Streptomyces*, and amendation of Streptomyces Waksman and Henrici 1943, 339AL. Syst Appl Microbiol 1990: 13: 361-71.

19- Nguyen T. M., Kim J. Antifungal and antibacterial activities of *Streptomyces polymachus sp*. nov. isolated from soil. Int J Syst Evol 2015;65: 2385-90.

20- Suutari M, Lignell U, Hyvärinen A, Nevalainen A. Media for cultivation of indoor streptomycetes. J Microbial Methods 2002; 51: 411-6.

21-Nguyen HT, Pokhrel AR, Nguyen CT, Dhakal D, Lim HN, Jung HJ, et al. *Streptomyces sp. VN1*, a producer of diverse metabolites including non-natural furan-type anticancer compound. Sci Rep 2020;10:1-4.

22- Kämpfer P, Kroppenstedt RM. Probabilistic identification of streptomycetes using miniaturized physiological tests. Microbiol 1991;137:1893-902.

23- Sun Y, Wang H, Wang W, Hu B, Zhou L, Ye H, et al. Changes in molecularstructure of chickpea starch during processing treatments: a thin layer chromatography study, Food Chem 2018; 186-191.

24- Saadouli I, Zendah El Euch I, Trabelsi E, Mosbah A, Redissi A, Ferjani R, Fhoula I, et al. Isolation, Characterization and Chemical Synthesis of Large Spectrum Antimicrobial Cyclic Dipeptide (l-leu-l-pro) from *Streptomyces misionensis*V16R3Y1 Bacteria Extracts. A Novel ^{1}H NMR Metabolomic Approach. Antibiotics (Basel) 2020;9:270.

25- Safarpour A, Ebrahimi M, Shahzadeh Fazeli SA, Amoozegar MA. Supernatant Metabolites from Halophilic Archaea to Reduce Tumorigenesis in Prostate Cancer *In-vitro* and *In-vivo*. Iran J Pharm Res 2019;18:241-253.

26- Marmur J, Anderson W, Matthews L, Berns K, Gajewska E, Lane D, et al. The effects of ultraviolet light on the biological and physical chemical properties of deoxyribonucleic acids. J Cell Physiol 1961: 58.

27- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 2007;23:2947-8.

28- Schein CH. Repurposing approved drugs on the pathway to novel therapies. Med Res Rev 2020;40:586-605.

29- Dougan G, Dowson C, Overington J; Next Generation Antibiotic Discovery Symposium Participants. Meeting the discovery challenge of drug-resistant infections: progress and focusing resources. Drug Discov Today 2019;24:452-61.

30- Ser HL, Tan LTH, Tan WS, Yin WF, Chan KG. Whole-genome sequence of bioactive streptomycete derived from mangrove forest in Malaysia, Streptomyces sp. MUSC 14. Progress In Microbes & Molecular Biology 2021;1; a0000195. doi: a0000195.

31- Law JW, Law LN, Letchumanan V, Tan LT, Wong SH, Chan KG, et al. Anticancer Drug Discovery from Microbial Sources: The Unique Mangrove Streptomycetes. Molecules 2020;25:5365.

32- Kalyani BS, Krishna PS, Sreenivasulu K. Screening and identification of novel isolate *Streptomyces* sp., NLKPB45 from Nellore costal region for its biomedical applications. Saudi J Biol Sci 2019;26:1655-1660.

33- Obeidat M. Cytotoxicity of n-Butanol extracts of streptomyces against human breast cancer cells. Int J Pharmacol 2017;13:969-79.

34- Sagar S, Esau L, Holtermann K, Hikmawan T, Zhang G, Stingl U, et al. Induction of apoptosis in cancer cell lines by the Red Sea brine pool bacterial extracts. BMC Complement Altern Med 2013;13:344.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-11]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1400.31.4.7.1]
[DOI: 10.52547/iau.31.4.367]

35- Schulz D, Nachtigall J, Geisen U, Kalthoff H, Imhoff JF, Fiedler HP, et al. Silvalactam, a 24-membered macrolactam antibiotic produced by Streptomyces sp.Tu 6392. J Antibiot (Tokyo) 2012;65:369-72.

36- Chiu CF, Chiu SJ, Bai LY, Feng CH, Hu JL, Lin WY, et al. A macrolide from Streptomyces sp. modulates apoptosis and autophagy through Mcl□1 downregulation in human breast cancer cells. Environ Toxicol 2021;13.

37- Rajivgandhi GN, Ramachandran G, Li JL, Yin L, Manoharan N, Kannan MR, et al. Molecular identification and structural detection of anti-cancer compound from marine Streptomyces akiyoshiensis GRG 6 (KY457710) against MCF-7 breast cancer cells. J King Saud Univ Sci 2020;32:3463-9.

38- Elkhateeb WA, Mohamed MA, Fayad W, Emam M, Nafady IM, Daba GM. Molecular Identification, Metabolites profiling, Anti-breast cancer, Anti-colorectal cancer, and antioxidant potentials of Streptomyces zaomyceticus AA1 isolated from a remote bat cave in Egypt. Res J Pharm Technol 2020;13:3072-80.

39- Kumar P, Chauhan A, Kumar M, Kuanr B.K, Kundu A, Solanki R , et al. In vitro and in silico anticancer potential analysis of Streptomyces sp. extract against human lung cancer cell line, A549. 3 Biotech. 2021;11: 254.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-11]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1400.31.4.7.1]

[DOI: 10.52547/iau.31.4.367]