

Antimicrobial evaluation of ethyl acetate and methanolic extracts of rare actinomycetes from olive orchard soils of Rudbar County

Elham Amiri¹, Mirsasan Mirpour², Khosro Essazadeh², Behnam Rasti³

¹ PhD Candidate in Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran

² Department of Microbiology, La. C., Islamic Azad University (IAU), Lahijan, Gilan, Iran

³ Department of Microbiology, La. C., Islamic Azad University (IAU), Lahijan, Gilan, Iran

Abstract

Background: Actinomycetes are among the groups of microorganisms that are widely distributed in nature. The increase in antibiotic resistance has outpaced the discovery of new antibiotics. This study aimed to evaluate the antimicrobial activity of ethyl acetate and methanol extracts of lesser-known actinomycetes from olive orchard soils in Rudbar County, located in the Alborz Mountains.

Materials and methods: The antimicrobial activity of two strains EA7 and EA6 identified based on Bergey's reference book was investigated against the studied microorganisms (*Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*) by crossover and well-plate methods in the primary screening. The antimicrobial activity of the fermentation medium, ethyl acetate and methanol extracts of the strains was investigated using sterile paper discs and well-plate methods, respectively. The diameter of the halo was reported in millimeters (mm).

Results: Strain EA7 showed greater antimicrobial activity than strain EA6 against the studied microorganisms (*Staphylococcus aureus*) in primary and secondary screening. Also, the antimicrobial activity of the extracts was greater against gram-positive bacteria than gram-negative bacteria. In comparison, ethyl acetate extract showed greater antimicrobial activity than methanol extract.

Conclusion: The difference in the antimicrobial results of the extracts is related to the difference in the cell wall structure of the two groups of bacteria studied (*Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*). The results of the study showed that strain EA7, due to its greater antimicrobial effect, can be a potential source for obtaining new bioactive compounds and antibiotics.

Keywords: Antimicrobial, Ethyl acetate extract, Methanol extract, Actinomycetes, Streptomyces, Amycolatopsis.

Cited as: Amiri E, Mirpour M, Essazadeh K, Rasti B. Antimicrobial evaluation of ethyl acetate and methanolic extracts of rare actinomycetes from olive orchard soils of Rudbar County. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2026; 36(2): 177-188.

Correspondence to: Mirsasan Mirpour

Tel: +98 9121964387

E-mail: mirsasan.mirpour@iau.ac.ir

ORCID ID: 0000-0001-7641-426x

Received: 11 Oct 2025; **Accepted:** 29 Nov 2025

ارزیابی ضد میکروبی عصاره‌های اتیل استات و متانولی اکتینومايست‌های نادر از خاک‌های باغات زيتون شهرستان رودبار

الهام امیری^۱، میرسانان میرپور^۲، خسرو عیسی زاده^۲، بهنام راستی^۳

^۱ دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

^۲ دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

^۳ دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

چکیده

سابقه و هدف: اکتینومايست‌ها از جمله میکروارگانیسم‌هایی هستند که به طور گسترده در طبیعت پراکنده شده‌اند. افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی از کشف آنتی بیوتیک‌های جدید پیشی گرفته است. این تحقیق با هدف ارزیابی ضد میکروبی عصاره‌های اتیل استات و متانولی اکتینومايست‌های کمتر شناخته شده از خاک‌های باغات زيتون شهرستان رودبار واقع در کوه‌های البرز انجام شد.

روش بررسی: بررسی فعالیت ضد میکروبی ۲ سویه EA6 و EA7 شناسایی شده بر اساس کتاب مرجع برنجی در برابر میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه (استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا) در غربالگری اولیه با روش تقاطع و چاهک گذاری بود. بررسی ضد میکروبی محیط تخمیر، عصاره‌های اتیل استات و متانولی سویه‌ها به ترتیب با استفاده از دیسک‌های کاغذی استریل و روش چاهک گذاری انجام شد. قطر هاله بر اساس میلی متر گزارش شد.

یافته‌ها: سویه EA7 فعالیت ضد میکروبی بیشتری علیه میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه (استافیلوکوکوس اورئوس) در غربالگری اولیه و ثانویه نسبت به سویه EA6 نشان داد. همچنین فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها در برابر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به گرم منفی بیشتر بود. در مقایسه عصاره اتیل استات فعالیت ضد میکروبی بیشتری را از عصاره متانولی نشان داد.

نتیجه‌گیری: تفاوت در نتایج ضد میکروبی عصاره‌ها، به تفاوت در ساختار دیواره سلولی دو گروه از باکتری‌های مورد مطالعه (استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا) مربوط می‌شود. نتایج تحقیق نشان داد که سویه EA7 با توجه به اثر ضد میکروبی بیشتر می‌تواند به عنوان یک منبع بالقوه در زمینه دستیابی به ترکیبات زیست فعال و آنتی بیوتیک‌های جدید باشد.

واژگان کلیدی: ضد میکروبی، عصاره اتیل استات، عصاره متانول، اکتینومايست، استرپتومايس، آمیکولاتوپيسيس.

مقدمه

اکتینومايست‌ها از جمله وسیع‌ترین گروه‌های میکروارگانیسمی پخش شده در طبیعت هستند. آنها غیر متحرک و گرم مثبت هستند. از لحاظ موفولوژیکی و فیزیولوژیکی از تنوع بالایی برخوردارند (۱). جمعیت آنها در یک اکوسیستم توسط عوامل

فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی متعددی تعیین می‌شود. اکتینومايست‌ها، متعلق به راسته اکتینومیسیتال‌ها هستند. علاوه بر این، اکتینومايست‌ها از نظر فیلوژنتیکی به عنوان گونه‌هایی با محتوای بالای G + C تعریف می‌شوند، که در فرآیندهای مهم در طیف وسیعی از زیستگاه‌ها نقش دارند (۲). این باکتریها مسئول ماده ای به نام ژئوسمین هستند که بوی خاصی را به خاک می‌دهند (۲،۳). جمعیت اکتینومايست‌ها به عنوان یکی از گروه‌های اصلی جمعیت خاک شناسایی شده است. به طرز چشمگیری، آنها تولیدکنندگان شاخص

آدرس نویسنده مسئول: لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، گروه میکروبیولوژی، میرسانان

میرپور (email: mirsasan.mirpour@iau.ac.ir)

ORCID ID: 0000-0001-7641-426x

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۷/۱۹

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۴/۹/۸

مواد و روشها

جمع‌آوری نمونه‌های خاک

نمونه‌های خاک از باغهای زیتون واقع در کوه‌های البرز شهرستان رودبار (جنوب غربی استان گیلان)، با مختصات جغرافیایی $49^{\circ}52'59''$ شرقی و $36^{\circ}47'36''$ شمالی، از ۳ نقطه در شهریور ماه ۱۴۰۴ جمع‌آوری شدند. پس از کنار زدن لایه‌های بالایی خاک و برداشتن گیاهان و بوته‌های روی خاک، نمونه‌های خاک با استفاده از قاشق استریل (عمق برداشت ۱۰-۱۵ سانتی متری) برداشت شد. نمونه‌های خاک در ظرف‌های پلاستیکی استریل حمل و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شدند. این نمونه‌ها در دمای اتاق تا هنگام انجام آزمایشات نگهداری شدند (۷).

اندازه‌گیری pH نمونه‌های خاک

نمونه‌های خاک به مدت یک هفته در دمای ۲۸ درجه سانتی-گراد در انکوباتور قرار گرفته و خشک شدند (۷). میزان pH نمونه‌های خاک با استفاده از دستگاه pH متر اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری pH، نمونه‌ها ۱:۳ با آب رقیق شدند (۵، ۷).

غربالگری اولیه جدایه‌ها

جداسازی سویه‌ها از نمونه‌های خاک طبق پروتکل از قبل تعریف شده انجام گرفت (۱۲). برای جداسازی از رقیق سازی متوالی استفاده شد. از محیط کشت SCA (Starch Casein Agar) و ISP2 (International Streptomyces Project-2 Medium) آگار که حاوی آنتی بیوتیک‌های تتراسایکلین (۱۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) و نیستاتین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) بود، استفاده شد. کشت به صورت خطی انجام گرفت (۷، ۸). انکوباسیون به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. سپس کلنی‌های مشکوک به اکتینومایست‌ها روی محیط ISP2 آگار که حاوی آنتی بیوتیک‌های تتراسایکلین و نیستاتین بود، در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز خالص سازی شدند (۳).

شناسایی جدایه‌های اکتینومایست

شناسایی جدایه‌های اکتینومایست با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی و تخمیر قندها طبق پژوهش قبلی انجام شد (۱۳). استفاده از منابع کربنی و آزمایش‌های بیوشیمیایی انجام شده برای جدایه‌های اکتینومایست در جدول ۱ آورده شده است. استفاده از منابع کربنی برای جدایه‌های اکتینومایست با ۱ درصد منابع کربنی (با استفاده از فیلتر غشایی با اندازه منافذ ۰/۲۲ میلی‌متر فیلتر شده) در محیط فنل رد براث بود. سپس محیط کشت به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. رشد اکتینومایست‌ها بسته به استفاده از منابع کربن مشخص شد. نتایج به دست آمده با ویژگی‌های باکتریهای اکتینومایست

آنتی‌بیوتیک‌ها و تأمین‌کنندگان اصلی مهم برای صنعت داروسازی هستند. به دلیل توانایی در تولید طیف گسترده‌ای از متابولیت‌های ثانویه، ارزش تجاری بالایی دارند (۴، ۳). پیشنهاد شده است که از غربالگری جدایه‌های خاک، اکثر آنتی‌بیوتیک‌های جدید شناسایی می‌شوند. به دلیل ظهور میکروب‌های مقاوم به چند دارو، مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها به یک نگرانی اساسی در درمان بیماری‌های انسانی تبدیل شده است. بروز عفونت با ایزوله‌های مقاوم به چند دارو، به دلیل کم بودن عوامل درمانی جدید برای کنترل پاتوژن‌های تهدید کننده زندگی افزایش یافته است (۵، ۶). اکتشاف داروهای جدید برای غلبه بر مقاومت آنتی‌بیوتیکی در پاتوژن‌های بیماری‌زا بسیار مهم است. با این حال، با ظهور باکتری‌های مقاوم به چند دارو، محققان به اکتینومایست‌های نادر روی آورده‌اند تا آنتی‌بیوتیک‌های جدیدی تولید کنند (۷). لشوالیه و همکاران در سال ۱۹۸۶، آمیکولاتوپسیس را به عنوان یک جنس جدید برای اکتینومایست‌های نوکاردیوform دارای ترکیب دیواره سلولی نوع IV و فاقد اسیدهای مایکولیک تعریف کردند (۲). آمیکولاتوپسیس، عضوی از خانواده زئودونوکاردیاسه، از اکتینومایست‌های نادر و کمیاب است که با عدم وجود اسید مایکولیک و وجود مزودی اسید آمینوپپتیدیک، قندآرابینوز و گالاکتوز در دیواره سلولی مشخص می‌شوند. از این جنس ۹۴ گونه و ۴ زیرگونه تأیید شده است (۲۰۱). شاخه‌ای منحصر به فرد در درخت تکاملی زئودونوکاردیاسه را تشکیل می‌دهد (۸). جستجوی مناطق اکولوژیکی ویژه همراه با روش‌های جدید جداسازی گونه‌های جدید اکتینوباکتری‌ها، ممکن است منجر به شناسایی محصولات جدید شود. بنابراین مطالعات بیشتری برای یافتن آنتی‌بیوتیک‌های جدید و مؤثرتر که به کنترل این مشکل کمک می‌کنند، مورد نیاز است (۸-۱۰). محصولات طبیعی مشتق شده از میکروارگانیسم‌ها در برابر بیماری‌ها مؤثر هستند. بنابراین شناسایی سیستم‌های اکولوژیکی جدید برای کشف اکتینومایست‌های جدید بسیار مهم است. (۱۱، ۱۲). مطالعات قبلی نشان داده است که تاکنون هیچ مطالعه‌ای در مورد اکتینوباکتری‌های نادر جدا شده از خاک‌های ایران به خصوص از مناطق کمتر شناخته شده، انجام نشده است. بنابراین مطالعه حاضر با هدف ارزیابی ضد میکروبی عصاره‌های اتیل استات و متانولی جدا شده از سویه‌های کمتر شناخته شده از خاکهای باغات زیتون شهرستان رودبار واقع در کوه‌های البرز انجام شد.

در کتاب برجی (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) تطبیق داده شد (۱۳-۱۵).

جدول ۱. تست‌های شناسایی انجام شده برای جدایه‌های اکتینومایست جدا شده از خاک (۱۳-۱۵)

آزمایش‌های بیوشیمیایی	ویژگی‌های مورفولوژیکی	تخمیر قند
کانالاز	رنگ‌آمیزی گرم	گلوکز
اکسیداز	رنگ‌آمیزی اسید فاست	گالاکتوز
هیدرولیز نشاسته	مسیلوم رویشی	مالتوز
هیدرولیز اوره	دیواره اسپور	لاکتوز
سیمون سیترات آگار	رنگ کلنی	فروکتوز
احیای نیتрат	رشد در شرایط مختلف	ساکارز
هیدرولیز ژلاتین	تحمل شوری (۷-۰)	رافینوز
هیدرولیز کازئین	دما (۴۵-۲۸)	مانیتول
حرکت	pH های مختلف (۱۰-۴)	زایلوز
سولفید		آرابینوز
ایندول		

بررسی فاکتورهای مختلف رشد سویه‌ها (دما، pH و غلظت‌های مختلف نمک)

همچنین توانایی رشد سویه‌ها در فاکتورهای مختلف رشد مانند دماهای مختلف (۲۷-۳۷ درجه سانتی‌گراد)، میزان pH (۴-۱۰) و رشد در غلظت‌های مختلف کلرید سدیم (۰-۱۰ درصد) نیز طبق پژوهش قبلی بررسی شد (۱۳). جدایه‌های اکتینومایست روی پلیت‌های حاوی محیط کشت نشاسته کازئین آگار به صورت خطی کشت داده شدند. سپس پلیت‌ها در دماهای مختلف ۲۸، ۳۰، ۳۵، ۳۷، ۴۰ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، رشد مثبت و منفی پلیت‌ها مشخص شد. با استفاده از سود نیم مولار، pH محیط کشت نشاسته کازئین آگار بر روی ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹ و ۱۰ تنظیم شد. از جدایه‌های اکتینومایست روی محیط کشت که با pH تنظیم شده بود، کشت داده شد. سپس به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، نتایج گزارش شد. غلظت‌های مختلف (۱-۱۰ درصد) نمک طعام به محیط کشت نشاسته کازئین آگار اضافه شد. جدایه‌های اکتینومایست به محیط کشت تلقیح شدند و به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، رشد مثبت و منفی محیط کشت مشاهده شد (۱۴-۱۶).

باکتری‌های مورد مطالعه

سویه‌های بیماری‌زای استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا از بخش‌های مختلف بیمارستان‌های شهر رشت

جمع‌آوری و سویه‌های استاندارد/استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا (P.aeruginosa PTCC 1565 و S.aureus PTCC1112) نیز از مراکز زیستی ایران تهیه شدند. این جدایه‌ها از نمونه‌های بالینی مختلف شامل زخم، ترشحات تنفسی و خون بودند. شناسایی سویه‌های بیماری‌زا طبق پروتکل ارائه شده توسط فهمی و همکارانش (۲۰۱۹) انجام گرفت (۱۲). تست‌های شناسایی طبق دستورالعمل کیت سازنده، براساس API staph (Analytical Profile Index) برای استافیلوکوکوس اورئوس و API20 NE (Analytical Profile 20 Non-Enterobacteriaceae) برای سودوموناس آئروژینوزا انجام شد. سپس به ترتیب از محیط کشت مانیتول سالت آگار و ستریماید آگار برای کشت آنها استفاده شد. تست‌های شناسایی باکتری‌های پاتوژن مورد مطالعه طبق پژوهش قبلی (۱۳) تایید شدند.

ارزیابی آنتی بیوگرام برای نمونه‌های بالینی و استاندارد

از روش دیسک دیفیوژن برای تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی استفاده شد. آنتی بیوتیک‌های ای‌می پنم، سیپروفلوکساسین، پیراسیلیلین و سفتازیدیم طبق جدول استاندارد (۲۰۲۲) CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) انتخاب شدند (۱۴). برای این منظور ابتدا از باکتری‌ها کشت تاره تهیه شد. سپس از این کشت تازه، سوسپانسیون میکروبی با کدورت نیم مک فارلند تهیه شد. کشت‌های باکتریایی با کدورت نیم مک فارلند روی صفحات مولر هینتون آگار با سواب استریل کشت داده شدند. دیسک‌های آنتی بیوتیک با استفاده از پنس استریل بر روی پلیت‌های تلقیح شده قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نتیجه گزارش شد. قطر هاله در اطراف دیسک نشان دهنده حساسیت به آنتی بیوتیک‌ها و بالعکس بود. بر حسب میلی متر اندازه گیری شد. نتایج آنتی بیوگرام برای نمونه‌های بالینی و استاندارد طبق جدول استاندارد (۲۰۲۲) CLSI تفسیر شدند (۱۴، ۱۶، ۱۷).

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی جدایه‌های اکتینومایست در غربالگری اولیه

اثر ضد میکروبی سویه‌های جدا شده بر روی نمونه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا به ۲ روش چاهک گذاری و کشت متقاطع بر روی محیط ISP2 آگار انجام شد (۱۴، ۱۸).

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی به روش کشت متقاطع

در روش کشت متقاطع جدایه‌های اکتینومایست به صورت عمودی در مرکز پلیت حاوی محیط ISP2 کشت داده شدند. سپس به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه

استفاده از سود نیم مولار روی ۷ تنظیم شد. سپس در شیکر انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد در تاریکی به مدت یک هفته با دور (۵۰ rpm) برابر با $RCF \approx 0.63g$ (Relative Centrifugal Force) انکوبه شدند (۱۷، ۱۵).

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی محیط تخمیر

ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی محیط تخمیر، با استفاده از دیسک-های کاغذی استریل انجام شد. از روز پنجم تا روز هفتم فعالیت ضد میکروبی محیط تخمیر ارزیابی شد. به این منظور از باکتری-های بالینی و استاندارد سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند تهیه شد. سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند با استفاده از سواب استریل روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. ۳۰ میکرولیتر از مایع تخمیری روی دیسک‌های کاغذی استریل داخل پلیت استریل ریخته شد. دیسک‌ها بعد از خشک شدن با استفاده از پنس استریل روی محیط مولر هینتون آگار که حاوی سوسپانسیون میکروبی باکتریهای بالینی و استاندارد بود قرار داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قطر هاله اندازه گرفته شد (۱۹، ۲۱).

استخراج عصاره با اتیل استات و متانول

کل حجم محیط کشت تخمیری با دور ۴۰۰ rpm ($447g$) (RCF) به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. مایع رویی جداسازی شد (۲۱). سپس مایع رویی به دست آمده به نسبت حجمی برابر ۱:۱ با حلال آلی اتیل استات و متانول جداگانه روی همزن مغناطیسی مخلوط شد. به مدت ۲ ساعت روی همزن مغناطیسی با دور ۱۴۰ rpm ($55g$) (RCF) در دمای اتاق همزده شد. با استفاده از قیف دکانتور فاز آبی و آلی عصاره اتیل استات از یکدیگر جدا شد. عصاره تهیه شده با حلال آلی اتیل استات و متانول برای ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها استفاده شدند (۱۹-۲۱).

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های اتیل استات و

متانولی

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های اتیل استات و متانولی به روش چاهک گذاری انجام گردید. سوسپانسیون باکتری‌های مورد مطالعه در محیط لوریا برات تهیه شد. از هر سویه پاتوژن غلظت استاندارد نیم مک فارلند تهیه شد. با کمک سواب استریل از سوسپانسیون میکروبی روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد. سپس چاهک‌هایی بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار ایجاد گردید. ۵۰ میکرولیتر از عصاره‌ها (حل شده در دی متیل سولفوکساید) داخل چاهک‌ها قرار داده شدند. انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد

شدند. پس از زمان مورد نظر، باکتری‌های مورد مطالعه (کدورت نیم مک فارلند) در موقعیت معکوس عمود بر کشت جدایه‌های اکتینومایست بر روی محیط ISP2 کشت داده شدند. به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و سپس نتیجه بررسی شد (۱۴).

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی به روش چاهک گذاری

در روش چاهک گذاری از کلنی باکتری‌های اکتینومایست رشد یافته در محیط ISP2 آگار و از باکتری‌های مورد مطالعه (بالینی و استاندارد) سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند در محیط کشت لوریا برات تهیه شد. از سوسپانسیون باکتری‌ها بر روی محیط مولر هینتون آگار با سواب استریل کشت مترام داده شد. سپس چاهک‌هایی بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار ایجاد شد. ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی جدایه-های اکتینومایست‌ها داخل چاهک‌ها قرار داده شد. انکوباسیون به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت (۱۴، ۱۸). بر اساس وجود و عدم وجود منطقه بازدارندگی، اکتینومایست با اثر ضد میکروبی بیشتر برای مطالعات بعدی انتخاب شد (۱۴، ۱۵).

شناسایی مولکولی

برای تایید شناسایی اولیه ایزوله‌های به دست آمده با روش بیوشیمیایی و رنگ آمیزی گرم، از روش مولکولی (PCR: Polymerase chain reaction) طبق پژوهش قبلی (۱۳) استفاده شد. شناسایی مولکولی با استفاده از روش ستونی و تعیین توالی ژن 16SrRNA بود (۷). همچنین برای تکثیر ژن از پرایمرهای عمومی اکتینوباکتری‌ها 27F (Forwad) و 1492R (Reverse) استفاده شد (۶). سوبه‌ها در پژوهش قبلی انجام شده (۱۳) در ژن بانک به صورت *Amycolatopsis roodepoortensis* strain EA7 و *Streptomyces microflavus* strain EA6 ثبت شده بودند.

فرایند تخمیر

برای فرایند تخمیر از روش تخمیر غوطه ور طبق پروتکل از قبل تعریف شده استفاده شد (۱۷، ۱۵). کلنی‌های خالص اکتینومایست رشد یافته در محیط ISP2 agar به مدت یک هفته در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد، در محیط ISP2 Broth کشت داده شدند. سپس کدورت نیم مک فارلند از آن تهیه کرده تا به غلظت نهایی 1×10^8 CFU/mL برسد. سپس ۱ میلی لیتر (۱۰۰۰ میکرولیتر) سوسپانسیون میکروبی تهیه شده، به محیط کشت ISP2 Broth (به حجم ۱۰۰ میلی لیتر) تلقیح شد. محیط کشت شامل ۱۰ گرم عصاره مالت، ۴ گرم عصاره مخمر، ۴ گرم گلوکز، ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر بود. pH محیط کشت با

انجام شد. فعالیت ضد باکتریایی عصاره خام پس از تکمیل فرآیند انکوباسیون با اندازه گیری ناحیه مهار (mm) تشکیل شده در اطراف هر چاهک مورد ارزیابی قرار گرفت. غلظت اولیه عصاره‌ها ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر بود (۲۲، ۱۹).

یافته‌ها

اندازه گیری pH نمونه‌های خاک

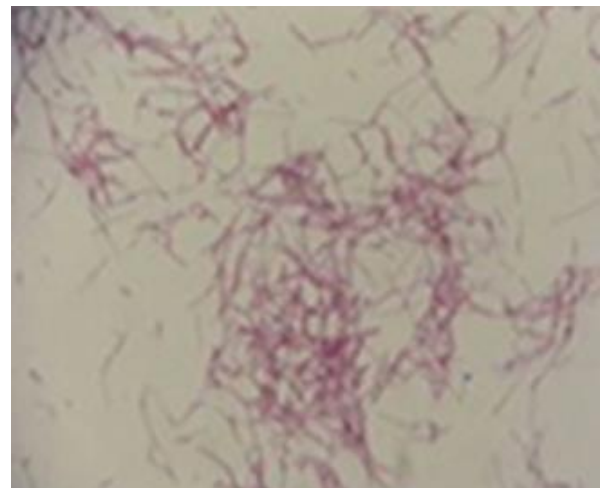
میزان pH نمونه‌های خاک با استفاده از دستگاه pH متر اندازه گیری شد. pH نمونه‌های خاک بین ۷/۳۳ تا ۸/۴۴ بود.

جداسازی جدایه‌های اکتینومایست از نمونه‌های خاک

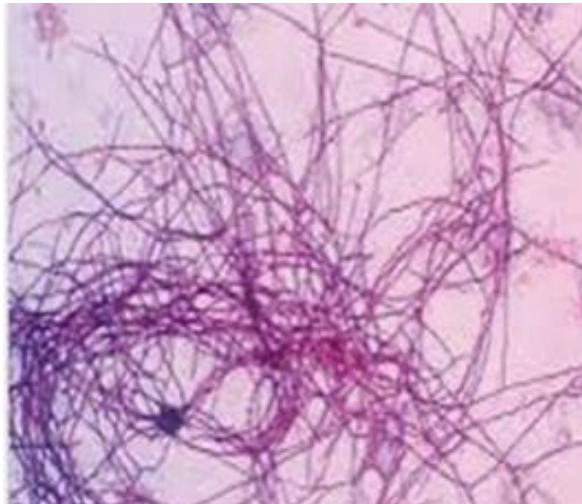
طی تحقیقات ما بر روی اکتینومایست‌ها از باغات زیتون شهرستان رودبار ۲ جدایه به نام های EA6 و EA7 با مورفولوژی اکتینومایست‌ها در مرحله غربالگری اولیه فعالیت ضد میکروبی بیشتری نشان دادند. بنابراین برای توصیف بیشتر و ارزیابی ضد میکروبی در مراحل بعدی تحقیق انتخاب شدند. سویه EA7 از اکتینومایست‌های نادر و کمتر شناخته شده است.

ویژگی‌های سویه‌های EA6 و EA7

شکل میکروسکوپی سویه EA7 و سویه EA6 به صورت رشته‌ای کوتاه (شکل ۱) و رشته ای بلند (شکل ۲) بود. وجه مشخصه سویه‌ها براساس کتاب برجی برای سویه EA7 رشته‌ای کوتاه، فاقد اسپور، فاقد میسلیوم هوایی، دارای میسلیوم رویشی، فاقد هیدرولیز نشاسته و قند تشخیصی آن آرابینوز بود. برای سویه EA6 وجه مشخصه آن دارای اسپور با کلنی‌های سفید گرد، حاوی میسلیوم هوایی، میسلیوم رویشی سفید، هیدرولیز نشاسته و قند تشخیصی آن زایلوز بود. ویژگی‌های سویه‌های EA6 و EA7 در جدول ۲ آورده شده است.



شکل ۱. تصویر میکروسکوپی رنگ آمیزی گرم سویه EA7



شکل ۲. تصویر میکروسکوپی رنگ آمیزی گرم سویه EA6

جدول ۲. ویژگی‌های تشخیصی سویه‌های EA6 و EA7 بر اساس کتاب برجی

نتایج		ویژگی‌ها
EA7	EA6	
آزمایش‌های بیوشیمیایی		
-	+	هیدرولیز نشاسته
ویژگی‌های مورفولوژیکی		
+	+	رنگ‌آمیزی گرم
-	-	رنگ‌آمیزی اسید فاست
+	+	میسلیوم رویشی
+	-	میسلیوم هوایی
+	-	دیواره اسپور
کرمی	سفید	رنگ کلنی
تخمیر قند		
+	+	زایلوز
+	-	آرابینوز

بررسی فاکتورهای مختلف رشد سویه ها (دما، pH و غلظت‌های مختلف نمک)

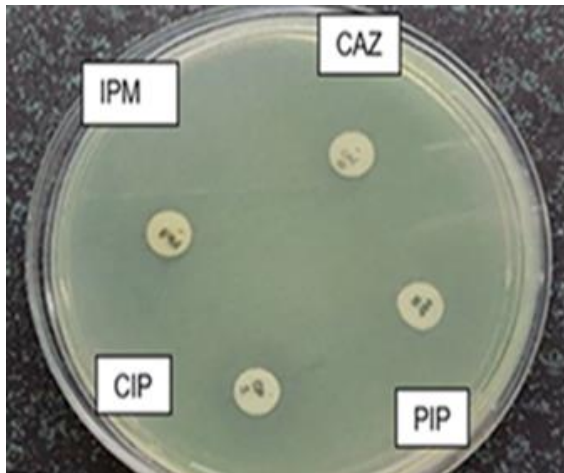
سویه ها در محدوده دمایی ۳۷ تا ۲۸ درجه سانتیگراد و محدوده pH از ۷ تا ۸ به خوبی رشد کردند. سویه های EA6 تا ۲ درصد و سویه EA7 تا ۷ درصد شوری را تحمل کردند (جدول ۳).

جدول ۳. رشد سویه ها در شرایط مختلف

سویه EA7	EA6	رشد در شرایط مختلف
۷ درصد	۲ درصد	تحمل شوری (۰-۱۰ درصد)
۲۸-۳۷	۲۸-۳۷	تحمل دما (۲۸-۴۵) برحسب درجه سانتیگراد
۴-۱۰	۴-۱۰	تحمل رشد در pH های مختلف
۷-۸	۷-۸	اپتیمم pH

جدول ۴. ارزیابی آنتی بیوگرام برای نمونه‌های بالینی و استاندارد (قطر هاله برحسب میلی متر)

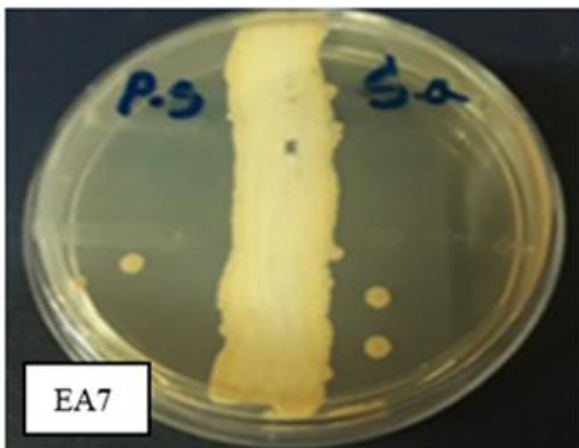
سودوموناس آئروژینوزا PTCC1565	سودوموناس آئروژینوزا (بالینی)	استافیلوکوکوس اورئوس PTCC1112	استافیلوکوکوس اورئوس (بالینی)	دیسک‌های آنتی بیوتیک
۰	۰	۰	۰	ایمی پنم ۱۰ mg
۷	۷	۶	۶	سیپروفلوکساسین ۵ mg
۰	۰	۱۳	۱۳	پیپراسیلین ۱۰۰ mg
۰	۰	۹	۹	سفتازیدیم ۱۰۰ mg



شکل ۴. تست حساسیت آنتی‌بیوتیک سودوموناس آئروژینوزا بالینی (ایمی‌پنم: IPM، سیپروفلوکساسین: CIP، سفتازیدیم: CAZ، پیپراسیلین: PIP)

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی سویه‌های EA6 و EA7

با توجه به فعالیت ضد میکروبی متمایز، سویه EA7 فعالیت ضد میکروبی بیشتری نسبت به سویه EA6 نشان داد. در نتیجه برای بررسی بیشتر فعالیت ضد میکروبی سویه‌های EA6 و EA7 در مراحل بعدی تحقیق فعالیت ضد میکروبی آن‌ها ارزیابی می‌شود (شکل ۵).

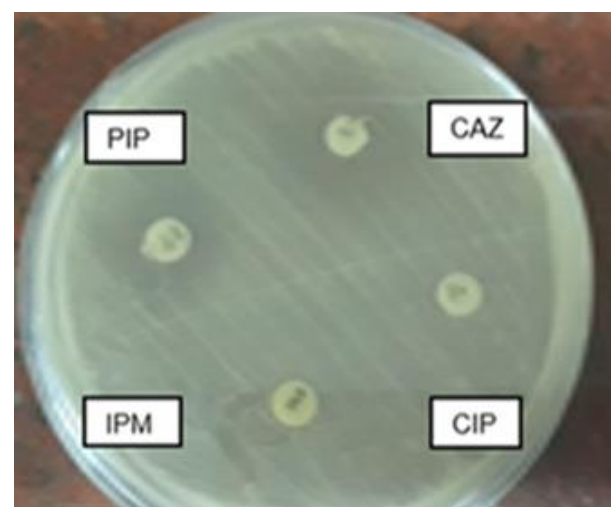


باکتری‌های مورد مطالعه

باکتری‌های مورد مطالعه طبق پژوهش قبلی (۱۹) شناسایی و تایید شدند. در مجموع ۶ باکتری بیماری‌زا شناسایی شدند. از این ۶ نمونه بالینی، ۴ نمونه از بیماران مرد و ۲ نمونه از بیماران زن جداسازی شده بودند. همچنین از این تعداد نمونه‌های بالینی، ۴ نمونه از زخم، ۱ نمونه ترشحات تنفسی و ۱ نمونه از خون بود. سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان کوکسی-های گرم مثبت و سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا به عنوان باکتری باسیلی گرم منفی بودند. مشخصه اصلی تشخیص سویه-های استافیلوکوکوس اورئوس از سایر گونه‌های آن کوآگولاز مثبت و برای سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا تولید پیوسیانین بود. در تمام مراحل با باکتری‌های استاندارد (*P.aeruginosa* PTCC 1565 و *S.aureus* PTCC1112) مقایسه شدند.

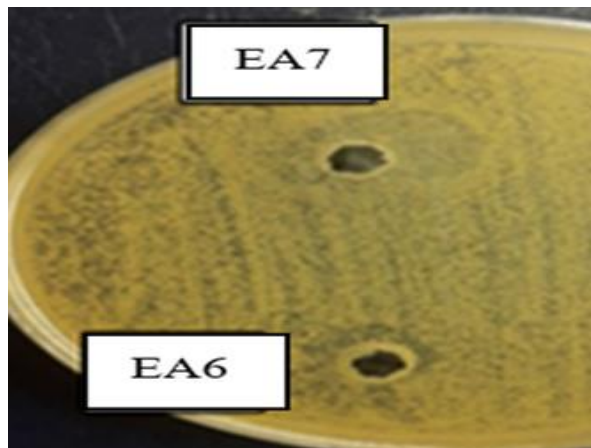
ارزیابی آنتی بیوگرام برای نمونه‌های بالینی و استاندارد

تست حساسیت آنتی بیوتیک انجام شد. طبق جدول CLSI، آزمایش حساسیت آنتی بیوتیکی گزارش شد (جدول ۴). پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، باکتری-های مورد مطالعه به تمام آنتی بیوتیک‌ها مقاومت نشان دادند (شکل‌های ۳ و ۴ و جدول ۴).



شکل ۳. تست حساسیت آنتی بیوتیک استافیلوکوکوس اورئوس بالینی

باکتری های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس*) ۱۱ میلی متر و برای باکتری های گرم منفی هاله ای مشاهده نشد (شکل ۹). اثر ضد میکروبی عصاره متانولی برای سویه EA6 در برابر باکتری های گرم مثبت خیلی کم و برای باکتری های گرم منفی هاله ای مشاهده نشد (جدول ۵).



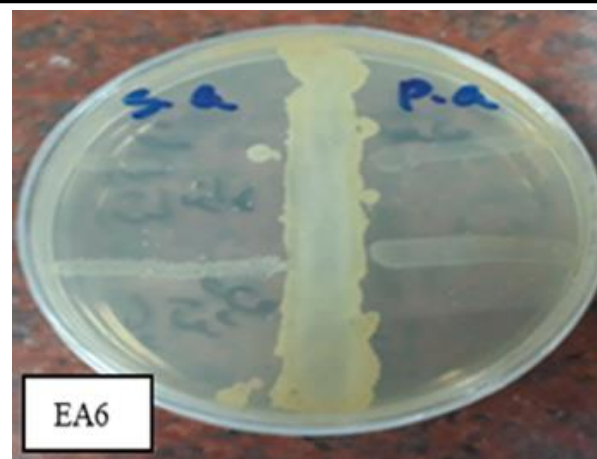
شکل ۷. اثر ضد میکروبی عصاره اتیل استات سویه EA6 و EA7 در برابر نمونه های *استافیلوکوکوس اورئوس*



شکل ۸. اثر ضد میکروبی عصاره اتیل استات سویه EA7 در برابر نمونه های *سودوموناس آئروژینوزا*



شکل ۹. اثر ضد میکروبی عصاره متانولی سویه EA7 در برابر نمونه های *استافیلوکوکوس اورئوس*



شکل ۵. ارزیابی ضد میکروبی سویه EA6 و EA7 (غربالگری اولیه)

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی محیط تخمیر

فعالیت ضد میکروبی حاصل از تخمیر در برابر باکتری های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس*) بیشتر از باکتری های گرم منفی (*سودوموناس آئروژینوزا*) برای سویه EA7 بود. برای سویه EA7 قطر هاله در برابر باکتری های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس*) ۲۳ میلی متر و برای باکتری های گرم منفی (*سودوموناس آئروژینوزا*) ۱۱ میلی متر مشاهده شد. در حالی که قطر هاله سویه EA6 برای باکتری های گرم مثبت ۱۱ میلی متر بود. برای باکتری های گرم منفی هاله ای مشاهده نشد (شکل ۶).



شکل ۶. اثر ضد میکروبی محیط تخمیر سویه های EA6 و EA7 در برابر نمونه های *استافیلوکوکوس اورئوس* (غربالگری ثانویه)

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره های اتیل استات و متانولی

از روش انتشار چاه آگار برای ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره های اتیل استات و متانولی استفاده شد. بیشترین اثر ضد میکروبی برای عصاره اتیل استات سویه EA7 به دست آمد. قطر هاله عصاره اتیل استات برای سویه های EA6 و EA7 در برابر نمونه های *استافیلوکوکوس اورئوس* ۲۵ و ۱۱ میلی متر بود (شکل ۷). قطر هاله عصاره اتیل استات سویه EA7 در برابر نمونه های بالینی گرم منفی (*سودوموناس آئروژینوزا*) ۱۱ میلی متر به دست آمد (شکل ۸). اثر ضد میکروبی عصاره متانولی سویه EA7 در برابر

جدول ۵. نتایج فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های اتیل استات و متانولی سویه‌های EA6 و EA7

باکتری	هاله عدم رشد (میلیمتر)			
	عصاره متانول		عصاره اتیل استات	
	سویه EA7	سویه EA6	سویه EA7	سویه EA6
استافیلوکوکوس اورئوس PTCC1112	۱۱	۳	۲۵	۱۱
استافیلوکوکوس اورئوس (بالینی)	۱۱	۳	۲۵	۱۱
سودوموناس آئروژینوزا PTCC1565	۰	۰	۱۱	۰
سودوموناس آئروژینوزا (بالینی)	۰	۰	۱۱	۰

بحث

در مطالعه حاضر عصاره سویه‌های EA6 و EA7 بیشترین فعالیت ضد میکروبی را در برابر باکتری‌های مورد مطالعه از خود نشان دادند. در مقایسه، سویه EA7 اثر ضد میکروبی آن نسبت به سویه EA6 بیشتر بود. در مطالعات گذشته انجام شده توسط شبان و همکارانش ۱۲ جدایه *استریپتومایسس* از خاک مناطق نزدیک به تخلیه زباله در عربستان سعودی جدا و خالص‌سازی شدند. این جدایه‌ها اثر ضد میکروبی بیشتری را در غربالگری اولیه بر روی باکتری‌های گرم مثبت نشان دادند (۲۴). همچنین کالابا و همکارانش در تحقیق خود هفت ایزوله اکتینومایست با خاصیت ضد میکروبی بیشتر از خاک‌های مناطق مختلف مصر جداسازی و شناسایی کردند (۲۳). در این مطالعه، ما سعی کردیم سویه‌های فعال و کمتر شناخته شده اکتینومایست‌ها را با اثر ضد میکروبی بیشتر بر باکتری‌های پاتوژن، که از نمونه خاک‌های باغ زیتون شهرستان رودبار واقع در کوه‌های البرز (جنوب غربی گیلان) ایران با استفاده از تکنیک‌های مختلف بیوشیمیایی و مولکولی طبق پژوهش قبلی (۱۳) شناسایی شده بودند بررسی کنیم. عوامل متمایزکننده‌ای مانند pH خاک به همراه ویژگی‌های مورفولوژیکی کلنی‌ها برای جداسازی اولیه جمعیت باکتریایی استفاده شدند. به دلیل رشد اکتینومایست‌ها در محیط‌هایی با pH خنثی تا قلیایی ما از این مناطق با pH قلیایی خاک نمونه برداری انجام دادیم. در ارزیابی آنتی بیوگرام، نمونه‌های بالینی و استاندارد (PTCC 1565 *P.aeruginosa* و PTCC1112 *S.aureus*) در برابر دیسک‌های آنتی بیوتیک مورد مطالعه مقاوم گزارش شدند.

در این تحقیق، در غربالگری اولیه سویه‌های EA6 و EA7 فعالیت ضد میکروبی بیشتری را در برابر باکتری‌های مورد مطالعه از خود نشان دادند. نتایج مطالعه ما با نتایج مطالعه شبان و همکارانش همخوانی دارد.

در مطالعه ما در روز هفتم تخمیر سویه‌ها بیشترین فعالیت ضد میکروبی را نشان دادند. سویه EA7 فعالیت ضد میکروبی بیشتری را در روز هفتم تخمیر نسبت به سویه EA6 از خود نشان داد. سویه EA7 در برابر هر دو گروه از باکتری‌های مورد مطالعه اثر مهاری داشت. اما از سویه EA6 اثر مهاری در برابر نمونه‌های بالینی و استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* مشاهده نشد.

نتایج متفاوتی از بهینه سازی محیط کشت تخمیر برای تولید ترکیبات فعال زیستی از سویه‌های مختلف اکتینومایست در مطالعات مختلف به دست آمده است (۱۴،۷). در مطالعاتی در تحقیق روی اکتینومایست‌ها، تحت هوادهی خوب در شکر انکوباتور زمان بهینه برای استخراج ترکیبات زیست فعال ۷ و ۱۱ روز گزارش شد (۱۴،۷، ۱۶، ۲۵). نتایج مطالعه ما با نتایج مطالعه انصاری و همکارانش (۱۴) همخوانی دارد. اما با نتایج مطالعه آلام و همکارانش (۲۵) همخوانی ندارد.

همچنین در مطالعات گذشته بیان شده است که کاهش تدریجی فعالیت ضد میکروبی و کاهش رشد با افزایش بیشتر زمان انکوباسیون همراه است. بهینه سازی محیط کشت عامل مهمی است که باید در فرآیند تخمیر و تولید ترکیبات زیست فعال مورد توجه قرار گیرد. در یک محیط بهینه، رشد سلولی و تولید ترکیبات ضد میکروبی افزایش می‌یابد (۳، ۴، ۲۶). فعالیت ضد میکروبی محیط کشت تخمیر در سویه EA7 نشان داد که اکتینومایست جدا شده آنتی‌بیوتیک‌های فعال و ترکیبات فعال زیستی را در محیط مغذی ISP2 براث تولید می‌کند. زیرا فعالیت ضد میکروبی گسترده‌ای را نشان می‌دهد. علت افزایش فعالیت ضد میکروبی سویه‌ها در محیط کشت تخمیر نسبت به ارزیابی ضد میکروبی در غربالگری اولیه را می‌توان به بیان ژن‌های بیوسنتزی و فعال شدن ژن‌های سنتز کننده ترکیبات زیست فعال در محیط تخمیر نسبت داد. در ارزیابی اولیه فعالیت ضد میکروبی، اکتینومایست‌های جدا شده اثر بازدارندگی پایینی نشان دادند. می‌توان این امر را به دلیل قرار داشتن سویه‌ها در فاز اولیه رشد نسبت داد. در این مرحله خوشه‌های ژنی بیوسنتزی مسئول تولید متابولیت‌های ثانویه و آنتی بیوتیک‌ها هنوز به طور کامل فعال نشده‌اند (۲۷).

همچنین در مطالعه ما عصاره اتیل استات و متانولی سویه EA6 اثر

آئروژینوز/ بیشتر گزارش کردند (۲۸). این نتایج با نتایج مطالعه ما همخوانی دارد.

جبهه و همکارانش در تحقیق خود اثر ضد میکروبی استرپتومایسس جدا شده از نمونه رسوبات غار گولدآمان الجزایر را بر باکتری‌های گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس) و گرم منفی (کولای و سودوموناس آئروژینوز) در غربالگری اولیه و ثانویه تایید کردند. این سویه فعالیت ضد میکروبی بیشتری را نسبت به پاتوژن‌های گرم مثبت نشان داد (۲۹) که با نتایج مطالعه ما همخوانی دارد.

اوساما و همکارانش در تحقیق خود ۵ ایزوله اکتینومایسس با خاصیت ضد میکروبی بیشتر از نمونه خاک‌های جمع‌آوری شده از روستای شریف پاشا در استان بنی‌سویف مصر جداسازی و شناسایی کردند (۳). این مطالعات اثر ضد میکروبی بیشتر جدایه‌های اکتینومایسس ها را در غربالگری اولیه و ثانویه بر روی باکتری‌های گرم مثبت نشان دادند که با نتایج مطالعه ما همخوانی دارد.

اگرچه اکتینومایسس‌ها به عنوان باکتری‌های تولیدکننده بالقوه آنتی‌بیوتیک شناخته شده‌اند، اما نوع ترکیبات زیست‌فعال آنها می‌تواند به عوامل محیطی، مناطق جغرافیایی و شرایط تغذیه-ای بستگی داشته باشد. به عنوان مثال، جدایه‌های استرپتومایسس از منطقه ساحلی استرالیا می‌توانند ترکیبات چند حلقه‌ای آروماتیک با فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتری‌های گرم مثبت و منفی تولید کنند (۳۱،۳۰).

در مطالعه حاضر، سویه EA7 فعالیت ضد میکروبی بیشتری را نسبت به سویه EA6 نشان داد. سویه EA7 از اکتینومایسس-های کمیاب و کمتر شناخته شده است. لازم به ذکر است که با طراحی استراتژی‌های مناسب برای جداسازی و شناسایی جنس‌های مختلف اکتینومایسس ها از گونه‌های بومی و کمتر شناخته شده در آینده، معرفی آنتی‌بیوتیک‌های جدید و بسیار مؤثرتر، می‌تواند قابل تصور باشد.

این تحقیق به منظور بررسی اثر ضد میکروبی سویه‌های فعال و کمتر شناخته شده اکتینومایسس‌ها بر روی باکتری‌های پاتوژن از نمونه خاک‌های باغ زیتون شهرستان رودبار واقع در کوه‌های البرز (مناطق بومی جنوب غربی گیلان) ایران با موفقیت انجام شد. با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق و مقایسه آن با مطالعات مشابه می‌توان گفت که عصاره خام استخراج شده از سویه‌های شناسایی شده در این مطالعه می‌تواند به عنوان یک منبع غنی از ترکیبات ضد میکروبی جدید باشد. نتایج نشان داد که خاک‌های این مناطق می‌توانند به عنوان منبع غنی از باکتری‌های فعال و کمتر

ضد میکروبی بیشتری نشان داد. اثر ضد میکروبی عصاره اتیل استات سویه EA7 در برابر هر دو گروه از باکتری‌های مورد مطالعه شامل استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوز/ بالینی و استاندارد مشاهده شد. اما عصاره متانولی سویه EA7 فقط در برابر نمونه‌های استافیلوکوکوس اورئوس بالینی و استاندارد اثر ضد میکروبی نشان داد. در برابر سودوموناس آئروژینوز/ اثر مهاری دیده نشد. در مقایسه عصاره متانولی سویه EA6 اثر مهاری در برابر باکتری‌های گرم منفی نشان نداد. اثر مهاری آن در برابر باکتری‌های گرم مثبت خیلی کم بود. در تحقیق انصاری و همکارانش فعالیت ضد میکروبی عصاره اتیل استات بیشتر از عصاره متانولی گزارش شده بود (۱۳) با نتایج مطالعه ما همخوانی دارد.

علت تفاوت در نتایج ارزیابی ضد میکروبی عصاره‌های اتیل استات و متانولی را می‌توان ماهیت متفاوت حلال‌ها دانست. عصاره اتیل استات یک حلال کم قطبی تا غیر قطبی است. در نتیجه ترکیبات کم قطبی تا غیر قطبی را استخراج می‌کند. این ترکیبات نفوذپذیری بیشتری در داخل سلول دارند. اما عصاره متانولی یک حلال قطبی است و ترکیبات قطبی را استخراج می‌کند. همچنین می‌تواند به دلیل نوع، غلظت و حجم ترکیبات استخراج شده باشد (۱۴، ۱۶).

در این تحقیق، اثر ضد میکروبی سویه‌های مورد مطالعه، در غربالگری اولیه و ثانویه بیشترین تاثیر را در برابر باکتری گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس) داشتند. اثر ضد میکروبی استرپتومایسس‌ها در برابر باکتری‌های گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس) و گرم منفی (کولای و سودوموناس آئروژینوز) در مراحل غربالگری اولیه و ثانویه در تحقیقات دیگران نشان داده شده است (۲۳، ۱۲). همچنین در مطالعات انجام شده توسط شارما و همکارانش تایید شده است که باکتری‌های گرم منفی نسبت به گرم مثبت دارای مقاومت بیشتری به اثر ضد میکروبی هستند (۲۷). نتایج آنها با نتایج مطالعه ما همخوانی دارد. علت را می‌توان به ساختار متفاوت غشای خارجی در باکتری‌های گرم منفی که دارای ترکیبات لیپوپلی ساکاریدی هستند نسبت داد. این ساختار در باکتری-های گرم منفی منجر به غیرقابل نفوذ بودن آنها در برابر مواد ضد میکروبی می‌گردد (۲۷، ۱۳). کوواری و همکارانش نشان دادند که باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با گرم مثبت، دارای مقاومت بیشتری به اثر ضد میکروبی اکتینومایسس‌ها بودند. در تحقیق خود اثر ضد میکروبی سویه‌های جدا شده را در برابر استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به سودوموناس

شناخته شده باشند. بنابراین خاک‌های این مناطق می‌توانند به عنوان منبع مهمی برای تحقیق در زمینه دستیابی به آنتی بیوتیک‌های جدید باشند. بررسی اثرات ضد میکروبی سویه-های شناسایی شده از این مناطق، مستلزم تحقیقات بیشتر هستند.

REFERENCES

1. Adamek M, Alanjary M, Sales-Ortells H, Goodfellow M, Bull A, Winkler A, et al. Comparative genomics reveals phylogenetic distribution patterns of secondary metabolites in *Amycolatopsis* species. BMC Genomics 2018;19: 1-15.
2. Song Z, Xu T, Wang J, Hou Y, Liu C, Liu S, et al. Secondary Metabolites of the Genus *Amycolatopsis*: Structures, Bioactivities and Biosynthesis. Molecules 2021;26:1-35.
3. Osama N, Bakeer W, Raslan M, Soliman HA, Abdelmohsen UR, Sebak M. Anti-cancer and antimicrobial potential of five soil *Streptomyces*: a metabolomics-based study. R Soc Open Sci 2022;9:1-17.
4. Ibnouf EO, Aldawsari MA, Waggiallah HA. Isolation and extraction of some compounds that act as antimicrobials from actinomycetes. Saudi J Biol Sci 2022;29:1-7.
5. Law JW-F, Ser H-L, Duangjai A, Saokaew S, Bukhari SI, Khan TM, et al. *Streptomyces colonosanans* sp. Nov., a novel actinobacterium isolated from Malaysia mangrove soil exhibiting antioxidative activity and cytotoxic potential against human colon cancer cell lines. Front Microbiol 2017;8:877-91.
6. Bansal H, Singla RK, Behzad S, Chopra H, Ajmer S, Shen GB. Unleashing the Potential of Microbial Natural Products in Drug Discovery: Focusing on *Streptomyces* as Antimicrobials Goldmine. Curr Top Med Chem 2021;35: 1-23.
7. Tan LT-H, Chan K-G, Pusparajah P, Yin W-F, Khan TM, Lee L-H, et al. Mangrove derived *Streptomyces* sp. MUM265 as a potential source of antioxidant and anticolon-cancer agents. BMC Microbiol 2019;19:1-16.
8. Gupta A, Singh D, Singh SK, Singh VK, Singh AV, Kumar A. Role of actinomycetes in bioactive and nanoparticle synthesis. In: Kumar A, Kishore Singh A, Kumar Choudhary K, eds. Role of Plant Growth Promoting Microorganisms in Sustainable Agriculture and Nanotechnology. Sawston, United Kingdom: Woodhead Publishing; 2019. P.163-82.
9. Sánchez R, Antoraz S, Alzate j, Santamaría R, Díaz M. Antibiotic Production and Antibiotic Resistance: The Two Sides of AbrB1/B2, a Two-Component System of *Streptomyces coelicolor*. Front Microbiol 2020;11:1-16.
10. Li R, Wang M, Ren Z, Ji Y, Yin M, Zhou H, et al. *Amycolatopsis aidingensis* sp.nov., a Halotolerant Actinobacterium, Produces New Secondary Metabolites. Front Microbiol 2021;12:1-14.
11. Nikbakht M, Omid 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 Univesity-Tehran Medical Branch 2021; 31: 367-76. [In Persian]
12. Fahmy NM, Abdel-Tawab AM. Isolation and characterization of marine sponge-associated *Streptomyces* sp. NMF6 strain producing secondary metabolites possessing antimicrobial, antioxidant, anticancer, and antiviral activities. J Genet Eng Biotechnol 2021; 19: 1-14.
13. Amiri E, Mirpour M, Essazadeh Kh, Rasti B. Isolation and Characterization of Antimicrobial Activities of Native Actinomycete Strains from Agricultural Soils in Guilan province. Biotechnological Journal of Environmental Microorganisms (BJEM) 2023; 2(5): 233-243.
14. Ansari MA, Alkubaisi N, Vijayaragavan P, Murugan P. Antimicrobial Potential of *Streptomyces* sp. To The Gram positive and Gram- negative pathogens. J Infect Public Health 2019;12:861-66.
15. Nabila MI, Kannabiran K. Biosynthesis, characterization and antibacterial activity of copper oxide nanoparticles (CuO NPs) from actinomycetes. Biocatalysis and agricultural biotechnology 2018; 15: 56-62.
16. Oliveros KM, Rosana AR, Montecillo AD, Opulencia RB, Jacildo AJ, Zulaybar TO, et al. Genomic Insights into the Antimicrobial and Anticancer Potential of *Streptomyces* sp. A1-08 Isolated from Volcanic Soils of Mount Mayon, Philippines. Philippine Journal of Science 2021; 150 (6A): 1351-77.
17. Kurnianto MA, Kusumaningrum HD, Lioe HN, Chasanah E. Antibacterial and antioxidant potential of ethyl acetate extract from *Streptomyces* AIA12 and AIA17 isolated from gut of *Chanos chanos*. Biodiversitas Journal of Biological Diversity 2021; 22: 3196-206.

18. Tistechok SI, Tymchuk IV, Korniychuk OP, Fedorenko VO, Luzhetskyy MA, Gromyko OM. Genetic Identification and Antimicrobial Activity of *Streptomyces* sp. Strain Je 1-6 Isolated from Rhizosphere Soil of *Juniperus excelsa* Bieb. Genetic Identification and Antimicrobial Activity 2021; 55: 28-35.
19. Kumar R, Jadeja V. Isolation of Actinomycetes: A Complete Approach. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 2016; 5: 606-618.
20. Singh A, Singh P. Production of bioactive compounds by *Streptomyces* sp. And their antimicrobial potential against selected MDR uropathogens. Journal of Applied Biology & Biotechnology 2021; 9: 71-79.
21. Ranjitha V, Ravishankar V. Extracellular synthesis of selenium nanoparticles from an actinomycetes *streptomyces griseoruber* and evaluation of its cytotoxicity on HT-29 cell line. Pharm Nanotechnol 2018; 6: 61-68.
22. Kisil OV, Efimenko TA, Efremenkova OV. Looking Back to *Amycolatopsis*: History of the Antibiotic Discovery and Future Prospects. Antibiotics 2021; 10: 1-25.
23. Kalaba MH, Moghannem SA, El-Hawary AS, Radwan AA, Sharaf MH, Shaban AS. Green synthesized ZnO nanoparticles mediated by *Streptomyces plicatus*: Characterizations, antimicrobial and nematocidal activities and cytogenetic effects. Plants 2021; 10:1760-86.
24. Shaaban M, El-Mahdy AM. Biosynthesis of Ag, Se, and ZnO nanoparticles with antimicrobial activities against resistant pathogens using waste isolate *Streptomyces enissocaesilis*. IET Nanobiotechnology. IET Nanobiotechnol 2019; 12: 741-747.
25. Alam M, Jha DK. Optimization of culture conditions for antimetabolite production by a rare tea garden actinobacterial isolate, *Amycolatopsis* sp. ST-28. African Journal of Clinical and Experimental Microbiology 2019; 20: 209-220.
26. Takahashi Y, Nakashima T. Actinomycetes, an Inexhaustible Source of Naturally Occurring Antibiotics (Basel) 2018; 7: 1-17.
27. Sharma M, Manhas RK. Purification and characterization of actinomycins from *Streptomyces* strain M7 active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant Enterococcus. BMC Microbiol 2019; 19: 1-14.
28. Kawuri R, Darmayasa I. Bioactive Compound from Extract Filtrat *Streptomyces* sp. As Biocontrol of Vibriosis on Larvae of *Macrobrachium Rosenbergii* shrimps. Journal of Biosciences 2019; 26: 15-25.
29. Djebbah F, Belyagoubi L, Abdelouahid D, Kherbouche F, Al-Dhabi N, Arasu d, et al. Isolation and characterization of novel *Streptomyces* strain from Algeria and its in-vitro antimicrobial properties against microbial pathogens. J Infect Public Health 2021;14: 1671-78.
30. Shaik M, Sankar G, Iswarya M, Rajitha P. Isolation and characterization of bioactivities of metabolites Producing marine *Streptomyces parvulus* Strain Sankarensis-A10. J Genet Eng Biotechnol 2017; 15: 87-94.
31. Chen C, Ye Y, Wang R, Zhang Y, Wu C, Debnath S, et al. *Streptomyces nigra* sp. Nov., is a novel actinobacterium isolated from mangrove soil and Exerts a Potent Antitumor Activity in Vitro. Front Microbiol 2018; 9: 1-14.