

ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی و سایتوتوکسیک اکتینوما ایست های بومی ایران

آزاده علایی^۱، جواد حامدی^{۲،۳*}، فاطمه محمدی پناه^۴، سعید محمدی معتمد^۵، سید مهدی رضایت^۶

- ۱- کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
- ۲- دانشیار، بخش زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
- ۳- کلکسیون ترکیبات زیستی. مرکز پژوهشی فناوری و فرآورده های میکروبی دانشگاه تهران، تهران، ایران.
- ۴- استادیار، بخش زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
- ۵- استادیار، گروه فارماکونوزی، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
- ۶- استاد، گروه فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: از بین بیش از ۲۳۰۰۰ متابولیت ثانویه میکروبی شناخته شده، ۴۲٪ آنها از اکتینوباکترها جدا شده است. این متابولیت های ثانویه فعالیت زیستی وسیعی نظیر فعالیت های ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد انگلی، ضد ویروسی، ضد تومور، سرکوب کننده ایمنی، حشره کش، ضد التهاب، آنتی اکسیدان و دیگر فعالیت ها را دارند. در سال های گذشته پژوهش های متعددی در مورد این فعالیت های زیستی در کشور انجام شده است، با این وجود گزارشی در مورد فعالیت آنتی اکسیدانی اکتینوما ایست های کشور منتشر نشده است. هدف این پژوهش بررسی توان تولید آنتی اکسیدان های طبیعی از منابع میکروبی با منشاء بومی است.

مواد و روش: ۵۰ سویه اکتینوما ایست بومی ایران، ذخیره شده در مرکز کلکسیون میکروارگانیسم های دانشگاه تهران انتخاب شدند و پس از انجام مراحل اسپورزایی، پیش تخمیر و تخمیر، عصاره مایع تخمیر با اتیل استات استخراج شد. فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های مایع تخمیر بدون حلال، به روش DPPH با استفاده از مقایسه آنتی اکسیدان های اسید آسکوربیک و BHA مورد ارزیابی قرار گرفت. هم چنین سمیت عصاره ها با استفاده از تست آرمیا مورد بررسی قرار گرفت. سویه های منتخب دارای فعالیت به روش مولکولی شناسایی شدند.

یافته ها: نتایج نشان داد که در میان ۵۰ عصاره اکتینوما ایست، ۱۰٪ عصاره فاقد فعالیت آنتی اکسیدانی، ۲۰٪ دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بالا ($IC_{50} > 200$)، ۳۲٪ دارای فعالیت آنتی اکسیدانی متوسط ($400 > IC_{50} > 200$)، ۸٪ از عصاره ها دارای فعالیت آنتی اکسیدانی پایین ($IC_{50} > 600$) و ۳۰٪ عصاره ها دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بسیار پایین ($IC_{50} > 600$) بوده اند. در تست سمیت سنجی بر آرمیا مشخص شد که ۵۰٪ عصاره های اکتینوما ایست فاقد سمیت، ۳۰٪ از عصاره ها سمیت پایین، ۱۶٪ از عصاره ها سمیت بالا و ۴٪ از عصاره ها سمیت بسیار بالا داشتند. سه سویه منتخب دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بر اساس نتایج آنالیز ژن ۱۶-SrRNA متعلق به جنس Streptomyces بوده اند.

نتیجه گیری: در بررسی حاضر، از میان ۵۰ عصاره ی بررسی شده از نظر خاصیت آنتی اکسیدانی به روش DPPH و فعالیت سمی، ۲ سویه $1054UTMC$ و $1166UTMC$ دارای فعالیت آنتی اکسیدانی مشابهی نسبت به BHA و سمیتی کمتر از آن را نشان دادند. هم چنین این عصاره ها فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری نسبت به اسید آسکوربیک داشتند، بدین ترتیب امید دستیابی به ترکیبات آنتی اکسیدان موثر و فاقد اثرات سمی در میان اکتینوما ایست های بومی ایران وجود دارد. این ترکیبات به طور قابل توجهی می توانند قابل رقابت با آنتی اکسیدان های مصنوعی نظیر BHA در صنایع غذایی و دارویی باشند.

کلمات کلیدی اکتینوما ایست، آنتی اکسیدان، DPPH، تست آرمیا

مقدمه

رادیکال های آزاد و یا تبدیل آنها به اشکالی با فعالیت کمتر، تهدید رادیکال های آزاد را برای حیات سلول ها از بین می برند (۲۵). در فرایندهای التهابی در بدن، میزان زیادی رادیکال آنیون سوپراکسید توسط فاگوسیت ها تولید می شود. ماکروفاژها و نوتروفیل ها برای دفاع در برابر میکروارگانیسم ها رادیکال های آزاد سوپراکسید و H_2O_2 تولید می کنند. استرس اکسیداتیو به

آنتی اکسیدان ها ترکیباتی هستند که با جلوگیری از تولید

* نویسنده مسئول:

بخش زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم دانشگاه تهران، تهران، ایران.

پست الکترونیکی: jhamedi@at.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۴/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۵/۲۵

است. در میان اکتینومایست‌ها، استرپتومایسس‌ها غالب هستند. و اکتینومایست‌های غیر استرپتومایسیسی (non-streptomyces)، اکتینومایست‌های کمیاب نامیده می‌شوند که نزدیک ۱۰۰ جنس را شامل می‌شوند (۲۶،۲۸).

اکتینومایست‌ها باکتری‌های گرانبهایی در بیوتکنولوژی هستند که از آنها برای تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش اقتصادی بالا بهره برداری می‌شود. اکتینومایست‌ها بخاطر توانایی‌شان در تولید آنتی‌بیوتیک‌ها به خوبی شناخته شده‌اند و اخیراً به عنوان یک منبع مهم برای محصولات طبیعی با تنوع شیمیایی نادر مطرح شده‌اند (۲۷).

این باکتری‌ها به لحاظ مورفولوژی، رشد، تکثیر و فیزیولوژی متمایز از سایر باکتری‌ها هستند. بیش از ۸۵٪ از آنتی‌بیوتیک‌هایی که به طور طبیعی تولید می‌شوند و تا به حال کشف شده‌اند توسط اکتینومایست‌ها فراهم می‌شود و هنوز هم به علت تنوع در میان جمعیت‌های باکتریایی و توانایی تولید ترکیبات شیمیایی جدید، به عنوان یک منبع غنی از متابولیت‌های دارای فعالیت زیستی جدید مطرح هستند. اکتینومایست‌ها به دلیل توانمندی‌های خارق‌العاده‌ای که در تولید مواد فعال زیستی نظیر آنتی‌بیوتیک‌ها و آنزیم‌ها دارند، از لحاظ زیست فناوری بسیار حائز اهمیت می‌باشند (۳۴).

باتوجه به اینکه تولید از طریق میکروارگانیسم‌ها به واسطه داشتن پتانسیل زیاد هم در مرحله بازده تولید و هم در مرحله تنوع گونه‌های مولکولی، مقرون به صرفه‌تر از سایر منابع زیستی است، امروزه غربالگری متابولیت‌های میکروبی دارای فعالیت‌های زیستی، توجه محققین زیادی را به خود جلب کرده است. هم چنین تحقیق در زمینه کشف آنتی‌اکسیدان با کاربرد دارویی نیز حائز اهمیت است (۸).

پژوهش‌های زیادی در زمینه فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها با منشا گیاهی انجام شده است اما تحقیقات اندکی در زمینه آنتی‌اکسیدان‌های میکروبی انجام شده است. مطالعه حاضر اولین گزارش در خصوص فعالیت آنتی‌اکسیدانی اکتینومایست‌های بومی ایران می‌باشد. هدف از این مطالعه ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مضرات فیزیولوژیکی عصاره‌های اکتینومایست بومی ایران با آنتی‌اکسیدان‌های تجاری در دسترس (BHA، اسیدآسکوربیک و آلفاتوکوفرول) است.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره

دراین پژوهش ۵۰ جدایه اکتینومایست که با نشان‌های زیر به صورت منجمد در نیتروژن مایع در کلکسیون میکروارگانیسم‌ها، مرکز پژوهشی فناوری‌ها و فراورده‌های میکروبی دانشگاه تهران

وجود آمده، ناشی از گونه‌های واکنش دهنده اکسیژن (Reactive oxygen species)، نقش بسیار مهمی را در گسترش بیماری‌های مختلف نظیر بیماری‌های آلزایمر، پارکینسون و شیروزوفرنی ایفا می‌کنند، درچنین شرایطی حضور آنتی‌اکسیدان‌ها برای تعدیل واکنش‌هایی که در آن رادیکال‌های آزاد تولید شده‌اند و برای جلوگیری از اثرات مضرگونه‌های واکنش دهنده اکسیژن و جلوگیری از آسیب به سلول‌های ایمنی، ضروری می‌باشد (۲۹). آنتی‌اکسیدان‌ها به عنوان داروی ضد پیری، ضد سرطانی، درمان بیماری‌های قلبی-عروقی، بیماری‌های میتوکندریایی، بیماری هانتینگتون و بیماری‌های تخریب کننده اعصاب نظیر بیماری پارکینسون استفاده می‌شوند. به علاوه تجویز خوراکی برخی از آنتی‌اکسیدان‌ها مکمل افزایش انرژی و تقویت سیستم ایمنی می‌باشد (۲۳،۷).

مرکز کنترل و نظارت بر محصولات غذایی، آنتی‌اکسیدان‌ها را تحت عنوان افزودنی‌های غذایی طبقه‌بندی کرده است، و آنها را مواد محافظت کننده غذا، عنوان می‌کند. بیشتر مطالعات بر روی آنتی‌اکسیدان‌ها در غذاها، بر تاخیر اکسیداسیون لیپیدی تاکید می‌کند، که از طریق به تاخیر انداختن تجزیه و فساد مواد غذایی که وظیفه آنتی‌اکسیدان‌ها می‌باشد، عمل می‌نمایند (۳۳،۹). در مجموع آنتی‌اکسیدان‌ها کاربردهای فراوان دارویی و غذایی دارند (۳).

منابع اولیه آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، حبوبات، میوه‌ها و سبزیجات می‌باشد، که تحت عنوان آنتی‌اکسیدان‌های غذایی شناسایی شده‌اند و به طور بالقوه‌ای بیماری‌ها را کاهش می‌دهند. با توجه به اینکه آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی مورد استفاده نظیر BHT (Butylated hydroxytoluene) و BHA (Butylated hydroxyanisole) می‌توانند کارسینوژن و هم چنین هیپاتوتوکسیک باشند، در طول دو دهه اخیر تمایل برای استفاده از منابع طبیعی برای تولید آنتی‌اکسیدان‌ها از سوی مصرف‌کنندگان افزایش یافته و توجه بسیار زیادی را به خود معطوف داشته است (۷).

در بیش از ۷۵ سال گذشته، ترکیبات مشتق شده از محصولات طبیعی منجر به کشف داروهای زیادی برای درمان بسیاری از بیماری‌های انسانی شده است. از سویی دیگر امروزه تولید طبیعی ترکیبات شیمیایی از طریق ارگانیسم‌های زنده مانند گیاهان، حیوانات و میکروارگانیسم‌ها امکان پذیرگشته است (۲۷).

اکتینومایست‌ها باکتری‌های گرم مثبت و هتروتروف، میله‌ای شکل، هوازی و غیر متحرک هستند. محتوای بازهای نیتروژن دار سیتوزین و گوانین در DNA اغلب اکتینومایست‌ها، بیشتر از سایر باکتری‌ها و اغلب در محدوده ۶۳٪-۷۸٪

توسط عصاره ها با استفاده از روش Yamamoto مورد ارزیابی قرار گرفت (۳۵). برای این منظور، محلول هایی با رقت های متوالی $5, 10, 25, 50 \mu\text{g/ml}$ از عصاره ها و آنتی اکسیدان های سنتزی BHA و اسید آسکوربیک در متانول تهیه شد. سپس ۳ ml از محلول متانولی DPPH (با غلظت ۱ میلی مولار) به ۱ ml از عصاره افزوده و مخلوط حاصله به شدت مخلوط شد. محلول ها به مدت ۳۰ دقیقه در محلی تاریک و در دمای اتاق قرار داده شدند و بعد از این مدت جذب آنها در طول موج 517 nm قرائت شد. نمونه کنترل شامل متانول و محلول DPPH بود. این تست برای هر عصاره سه بار تکرار صورت گرفت.

ارزیابی سمیت عصاره ها توسط روش آرتیمیا

روش تکثیر و پرورش کیست آرتیمیا (*Artemia franciscana*) در آب نمک دریایی مصنوعی بر طبق دستور العمل Goldman انجام شد (۱۰). ابتدا مقادیر $23/375 \text{ g/l}$ NaCl ، $4/925 \text{ g/l}$ ، 0.25 g/l KBr ، $1/11 \text{ g/l}$ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ، 0.745 g/l KCl ، $4/625 \text{ g/l}$ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ، 0.25 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ در ۱ لیتر آب مقطر حل و استریل گردید. به بیوراكتور حاوی ۵۰۰ ml آب نمک دریایی مصنوعی، مقدار ۰/۱ گرم کیست های آرتیمیا (*Artemia franciscana*) اضافه و دمای این بیوراكتور در 28°C تنظیم شد (۲۰).

برای انجام این تست از هر عصاره مقدار رقت های متوالی $5, 10, 20, 40, 80 \text{ ml}$ با استفاده از DMSO تهیه شد، در هر چاهک ۲۰ لارو آرتیمیا اضافه شد. این تست برای هر عصاره دو بار تکرار صورت گرفت. در این تست از آلفا توکوفرول به عنوان شاهد مثبت و از BHA به عنوان شاهد منفی استفاده شد. در ابتدا، تعداد لاروهای مرده بلافاصله پس از انتقال به چاهک ها در زیر میکروسکوپ شمارش شد. هم چنین تعداد لاروهای کشته شده بعد از گذشت ۱۸ ساعت نیز شمارش شدند.

شناسایی جدایه های اکتینومیست منتخب

برای شناسایی مولکولی سویه های مورد نظر و به منظور استخراج DNA، این سویه ها در محیط LB عصاره مخمر 5 (g/l) ، تریپتون 10 (g/l) ، 5 (g/l) کلرید سدیم ، $7/3 = \text{pH}$ به مدت ۴۸ ساعت در دمای 28°C و دور 220 rpm رشد داده شدند. پس از اطمینان از عدم آلودگی و کامل بودن رشد میسلیومی باکتری ها، محیط داخل ارلن را داخل ویال های اپندورف $1/5$ ریخته و به مدت ۸ دقیقه با 8000 rpm دور سانتریفوژ شد. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب نهایی به دست آمده ۲ بار با آب مقطر استریل شسته شد (۲).

استخراج DNA، طبق روش Salting out پیشنهاد شده توسط Kieser انجام گرفت (۱۳). بر روی بیومس داخل ویال اپندورف

نگهداری می شوند به صورت تصادفی انتخاب شدند.

101 UTMC ، 102 UTMC ، 103 UTMC ، 104 UTMC ، 105 UTMC ، 106 UTMC ، 107 UTMC ، 108 UTMC ، 109 UTMC ، 110 UTMC ، 111 UTMC ، 112 UTMC ، 113 UTMC ، 114 UTMC ، 115 UTMC ، 116 UTMC ، 117 UTMC ، 118 UTMC ، 119 UTMC ، 120 UTMC ، 121 UTMC ، 122 UTMC ، 123 UTMC ، 124 UTMC ، 125 UTMC ، 126 UTMC ، 127 UTMC ، 128 UTMC ، 129 UTMC ، 130 UTMC ، 131 UTMC ، 132 UTMC ، 133 UTMC ، 134 UTMC ، 135 UTMC ، 136 UTMC ، 137 UTMC ، 138 UTMC ، 139 UTMC ، 140 UTMC ، 141 UTMC ، 142 UTMC ، 143 UTMC ، 144 UTMC ، 145 UTMC ، 146 UTMC ، 147 UTMC ، 148 UTMC ، 149 UTMC ، 150 UTMC ، 151 UTMC ، 152 UTMC ، 153 UTMC ، 154 UTMC ، 155 UTMC ، 156 UTMC ، 157 UTMC ، 158 UTMC ، 159 UTMC ، 160 UTMC ، 161 UTMC ، 162 UTMC ، 163 UTMC ، 164 UTMC ، 165 UTMC ، 166 UTMC ، 167 UTMC ، 168 UTMC ، 169 UTMC ، 170 UTMC ، 171 UTMC ، 172 UTMC ، 173 UTMC ، 174 UTMC ، 175 UTMC ، 176 UTMC ، 177 UTMC ، 178 UTMC ، 179 UTMC ، 180 UTMC ، 181 UTMC ، 182 UTMC ، 183 UTMC ، 184 UTMC ، 185 UTMC ، 186 UTMC ، 187 UTMC ، 188 UTMC ، 189 UTMC ، 190 UTMC ، 191 UTMC ، 192 UTMC ، 193 UTMC ، 194 UTMC ، 195 UTMC ، 196 UTMC ، 197 UTMC ، 198 UTMC ، 199 UTMC ، 200 UTMC ، 201 UTMC ، 202 UTMC ، 203 UTMC ، 204 UTMC ، 205 UTMC ، 206 UTMC ، 207 UTMC ، 208 UTMC ، 209 UTMC ، 210 UTMC ، 211 UTMC ، 212 UTMC ، 213 UTMC ، 214 UTMC ، 215 UTMC ، 216 UTMC ، 217 UTMC ، 218 UTMC ، 219 UTMC ، 220 UTMC ، 221 UTMC ، 222 UTMC ، 223 UTMC ، 224 UTMC ، 225 UTMC ، 226 UTMC ، 227 UTMC ، 228 UTMC ، 229 UTMC ، 230 UTMC ، 231 UTMC ، 232 UTMC ، 233 UTMC ، 234 UTMC ، 235 UTMC ، 236 UTMC ، 237 UTMC ، 238 UTMC ، 239 UTMC ، 240 UTMC ، 241 UTMC ، 242 UTMC ، 243 UTMC ، 244 UTMC ، 245 UTMC ، 246 UTMC ، 247 UTMC ، 248 UTMC ، 249 UTMC ، 250 UTMC ، 251 UTMC ، 252 UTMC ، 253 UTMC ، 254 UTMC ، 255 UTMC ، 256 UTMC ، 257 UTMC ، 258 UTMC ، 259 UTMC ، 260 UTMC ، 261 UTMC ، 262 UTMC ، 263 UTMC ، 264 UTMC ، 265 UTMC ، 266 UTMC ، 267 UTMC ، 268 UTMC ، 269 UTMC ، 270 UTMC ، 271 UTMC ، 272 UTMC ، 273 UTMC ، 274 UTMC ، 275 UTMC ، 276 UTMC ، 277 UTMC ، 278 UTMC ، 279 UTMC ، 280 UTMC ، 281 UTMC ، 282 UTMC ، 283 UTMC ، 284 UTMC ، 285 UTMC ، 286 UTMC ، 287 UTMC ، 288 UTMC ، 289 UTMC ، 290 UTMC ، 291 UTMC ، 292 UTMC ، 293 UTMC ، 294 UTMC ، 295 UTMC ، 296 UTMC ، 297 UTMC ، 298 UTMC ، 299 UTMC ، 300 UTMC ، 301 UTMC ، 302 UTMC ، 303 UTMC ، 304 UTMC ، 305 UTMC ، 306 UTMC ، 307 UTMC ، 308 UTMC ، 309 UTMC ، 310 UTMC ، 311 UTMC ، 312 UTMC ، 313 UTMC ، 314 UTMC ، 315 UTMC ، 316 UTMC ، 317 UTMC ، 318 UTMC ، 319 UTMC ، 320 UTMC ، 321 UTMC ، 322 UTMC ، 323 UTMC ، 324 UTMC ، 325 UTMC ، 326 UTMC ، 327 UTMC ، 328 UTMC ، 329 UTMC ، 330 UTMC ، 331 UTMC ، 332 UTMC ، 333 UTMC ، 334 UTMC ، 335 UTMC ، 336 UTMC ، 337 UTMC ، 338 UTMC ، 339 UTMC ، 340 UTMC ، 341 UTMC ، 342 UTMC ، 343 UTMC ، 344 UTMC ، 345 UTMC ، 346 UTMC ، 347 UTMC ، 348 UTMC ، 349 UTMC ، 350 UTMC ، 351 UTMC ، 352 UTMC ، 353 UTMC ، 354 UTMC ، 355 UTMC ، 356 UTMC ، 357 UTMC ، 358 UTMC ، 359 UTMC ، 360 UTMC ، 361 UTMC ، 362 UTMC ، 363 UTMC ، 364 UTMC ، 365 UTMC ، 366 UTMC ، 367 UTMC ، 368 UTMC ، 369 UTMC ، 370 UTMC ، 371 UTMC ، 372 UTMC ، 373 UTMC ، 374 UTMC ، 375 UTMC ، 376 UTMC ، 377 UTMC ، 378 UTMC ، 379 UTMC ، 380 UTMC ، 381 UTMC ، 382 UTMC ، 383 UTMC ، 384 UTMC ، 385 UTMC ، 386 UTMC ، 387 UTMC ، 388 UTMC ، 389 UTMC ، 390 UTMC ، 391 UTMC ، 392 UTMC ، 393 UTMC ، 394 UTMC ، 395 UTMC ، 396 UTMC ، 397 UTMC ، 398 UTMC ، 399 UTMC ، 400 UTMC ، 401 UTMC ، 402 UTMC ، 403 UTMC ، 404 UTMC ، 405 UTMC ، 406 UTMC ، 407 UTMC ، 408 UTMC ، 409 UTMC ، 410 UTMC ، 411 UTMC ، 412 UTMC ، 413 UTMC ، 414 UTMC ، 415 UTMC ، 416 UTMC ، 417 UTMC ، 418 UTMC ، 419 UTMC ، 420 UTMC ، 421 UTMC ، 422 UTMC ، 423 UTMC ، 424 UTMC ، 425 UTMC ، 426 UTMC ، 427 UTMC ، 428 UTMC ، 429 UTMC ، 430 UTMC ، 431 UTMC ، 432 UTMC ، 433 UTMC ، 434 UTMC ، 435 UTMC ، 436 UTMC ، 437 UTMC ، 438 UTMC ، 439 UTMC ، 440 UTMC ، 441 UTMC ، 442 UTMC ، 443 UTMC ، 444 UTMC ، 445 UTMC ، 446 UTMC ، 447 UTMC ، 448 UTMC ، 449 UTMC ، 450 UTMC ، 451 UTMC ، 452 UTMC ، 453 UTMC ، 454 UTMC ، 455 UTMC ، 456 UTMC ، 457 UTMC ، 458 UTMC ، 459 UTMC ، 460 UTMC ، 461 UTMC ، 462 UTMC ، 463 UTMC ، 464 UTMC ، 465 UTMC ، 466 UTMC ، 467 UTMC ، 468 UTMC ، 469 UTMC ، 470 UTMC ، 471 UTMC ، 472 UTMC ، 473 UTMC ، 474 UTMC ، 475 UTMC ، 476 UTMC ، 477 UTMC ، 478 UTMC ، 479 UTMC ، 480 UTMC ، 481 UTMC ، 482 UTMC ، 483 UTMC ، 484 UTMC ، 485 UTMC ، 486 UTMC ، 487 UTMC ، 488 UTMC ، 489 UTMC ، 490 UTMC ، 491 UTMC ، 492 UTMC ، 493 UTMC ، 494 UTMC ، 495 UTMC ، 496 UTMC ، 497 UTMC ، 498 UTMC ، 499 UTMC ، 500 UTMC ، 501 UTMC ، 502 UTMC ، 503 UTMC ، 504 UTMC ، 505 UTMC ، 506 UTMC ، 507 UTMC ، 508 UTMC ، 509 UTMC ، 510 UTMC ، 511 UTMC ، 512 UTMC ، 513 UTMC ، 514 UTMC ، 515 UTMC ، 516 UTMC ، 517 UTMC ، 518 UTMC ، 519 UTMC ، 520 UTMC ، 521 UTMC ، 522 UTMC ، 523 UTMC ، 524 UTMC ، 525 UTMC ، 526 UTMC ، 527 UTMC ، 528 UTMC ، 529 UTMC ، 530 UTMC ، 531 UTMC ، 532 UTMC ، 533 UTMC ، 534 UTMC ، 535 UTMC ، 536 UTMC ، 537 UTMC ، 538 UTMC ، 539 UTMC ، 540 UTMC ، 541 UTMC ، 542 UTMC ، 543 UTMC ، 544 UTMC ، 545 UTMC ، 546 UTMC ، 547 UTMC ، 548 UTMC ، 549 UTMC ، 550 UTMC ، 551 UTMC ، 552 UTMC ، 553 UTMC ، 554 UTMC ، 555 UTMC ، 556 UTMC ، 557 UTMC ، 558 UTMC ، 559 UTMC ، 560 UTMC ، 561 UTMC ، 562 UTMC ، 563 UTMC ، 564 UTMC ، 565 UTMC ، 566 UTMC ، 567 UTMC ، 568 UTMC ، 569 UTMC ، 570 UTMC ، 571 UTMC ، 572 UTMC ، 573 UTMC ، 574 UTMC ، 575 UTMC ، 576 UTMC ، 577 UTMC ، 578 UTMC ، 579 UTMC ، 580 UTMC ، 581 UTMC ، 582 UTMC ، 583 UTMC ، 584 UTMC ، 585 UTMC ، 586 UTMC ، 587 UTMC ، 588 UTMC ، 589 UTMC ، 590 UTMC ، 591 UTMC ، 592 UTMC ، 593 UTMC ، 594 UTMC ، 595 UTMC ، 596 UTMC ، 597 UTMC ، 598 UTMC ، 599 UTMC ، 600 UTMC ، 601 UTMC ، 602 UTMC ، 603 UTMC ، 604 UTMC ، 605 UTMC ، 606 UTMC ، 607 UTMC ، 608 UTMC ، 609 UTMC ، 610 UTMC ، 611 UTMC ، 612 UTMC ، 613 UTMC ، 614 UTMC ، 615 UTMC ، 616 UTMC ، 617 UTMC ، 618 UTMC ، 619 UTMC ، 620 UTMC ، 621 UTMC ، 622 UTMC ، 623 UTMC ، 624 UTMC ، 625 UTMC ، 626 UTMC ، 627 UTMC ، 628 UTMC ، 629 UTMC ، 630 UTMC ، 631 UTMC ، 632 UTMC ، 633 UTMC ، 634 UTMC ، 635 UTMC ، 636 UTMC ، 637 UTMC ، 638 UTMC ، 639 UTMC ، 640 UTMC ، 641 UTMC ، 642 UTMC ، 643 UTMC ، 644 UTMC ، 645 UTMC ، 646 UTMC ، 647 UTMC ، 648 UTMC ، 649 UTMC ، 650 UTMC ، 651 UTMC ، 652 UTMC ، 653 UTMC ، 654 UTMC ، 655 UTMC ، 656 UTMC ، 657 UTMC ، 658 UTMC ، 659 UTMC ، 660 UTMC ، 661 UTMC ، 662 UTMC ، 663 UTMC ، 664 UTMC ، 665 UTMC ، 666 UTMC ، 667 UTMC ، 668 UTMC ، 669 UTMC ، 670 UTMC ، 671 UTMC ، 672 UTMC ، 673 UTMC ، 674 UTMC ، 675 UTMC ، 676 UTMC ، 677 UTMC ، 678 UTMC ، 679 UTMC ، 680 UTMC ، 681 UTMC ، 682 UTMC ، 683 UTMC ، 684 UTMC ، 685 UTMC ، 686 UTMC ، 687 UTMC ، 688 UTMC ، 689 UTMC ، 690 UTMC ، 691 UTMC ، 692 UTMC ، 693 UTMC ، 694 UTMC ، 695 UTMC ، 696 UTMC ، 697 UTMC ، 698 UTMC ، 699 UTMC ، 700 UTMC ، 701 UTMC ، 702 UTMC ، 703 UTMC ، 704 UTMC ، 705 UTMC ، 706 UTMC ، 707 UTMC ، 708 UTMC ، 709 UTMC ، 710 UTMC ، 711 UTMC ، 712 UTMC ، 713 UTMC ، 714 UTMC ، 715 UTMC ، 716 UTMC ، 717 UTMC ، 718 UTMC ، 719 UTMC ، 720 UTMC ، 721 UTMC ، 722 UTMC ، 723 UTMC ، 724 UTMC ، 725 UTMC ، 726 UTMC ، 727 UTMC ، 728 UTMC ، 729 UTMC ، 730 UTMC ، 731 UTMC ، 732 UTMC ، 733 UTMC ، 734 UTMC ، 735 UTMC ، 736 UTMC ، 737 UTMC ، 738 UTMC ، 739 UTMC ، 740 UTMC ، 741 UTMC ، 742 UTMC ، 743 UTMC ، 744 UTMC ، 745 UTMC ، 746 UTMC ، 747 UTMC ، 748 UTMC ، 749 UTMC ، 750 UTMC ، 751 UTMC ، 752 UTMC ، 753 UTMC ، 754 UTMC ، 755 UTMC ، 756 UTMC ، 757 UTMC ، 758 UTMC ، 759 UTMC ، 760 UTMC ، 761 UTMC ، 762 UTMC ، 763 UTMC ، 764 UTMC ، 765 UTMC ، 766 UTMC ، 767 UTMC ، 768 UTMC ، 769 UTMC ، 770 UTMC ، 771 UTMC ، 772 UTMC ، 773 UTMC ، 774 UTMC ، 775 UTMC ، 776 UTMC ، 777 UTMC ، 778 UTMC ، 779 UTMC ، 780 UTMC ، 781 UTMC ، 782 UTMC ، 783 UTMC ، 784 UTMC ، 785 UTMC ، 786 UTMC ، 787 UTMC ، 788 UTMC ، 789 UTMC ، 790 UTMC ، 791 UTMC ، 792 UTMC ، 793 UTMC ، 794 UTMC ، 795 UTMC ، 796 UTMC ، 797 UTMC ، 798 UTMC ، 799 UTMC ، 800 UTMC ، 801 UTMC ، 802 UTMC ، 803 UTMC ، 804 UTMC ، 805 UTMC ، 806 UTMC ، 807 UTMC ، 808 UTMC ، 809 UTMC ، 810 UTMC ، 811 UTMC ، 812 UTMC ، 813 UTMC ، 814 UTMC ، 815 UTMC ، 816 UTMC ، 817 UTMC ، 818 UTMC ، 819 UTMC ، 820 UTMC ، 821 UTMC ، 822 UTMC ، 823 UTMC ، 824 UTMC ، 825 UTMC ، 826 UTMC ، 827 UTMC ، $828 \text{ UTMC}</$

DNA ننگه داشته شد. بررسی محصولات PCR، با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸٪ صورت گرفت. ژن های تکثیر شده و مشاهده شده بر روی ژل آگارز در صورت مناسب بودن باندها برای توالی یابی، به شرکت Macrogen کره جنوبی ارسال شدند.

تکرارپذیری و آنالیز آماری داده ها

هر یک از داده های ارائه شده حاصل ۳ بار تکرار است و برای آنالیز آماری از نرم افزار spss استفاده شد. برای تعیین درصد مهار رادیکال DPPH توسط عصاره از فرمول زیر استفاده گردید.

$$DPPH\text{ازادرادیکال مهار درصد} = \frac{ODc - (ODs - ODc)}{ODc} \times 100$$

در این رابطه ODc و ODs به ترتیب جذب کنترل و میزان جذب نمونه می باشند. میزان IC₅₀ هر یک از عصاره ها و اسید آسکوربیک و BHA با استفاده از نرم افزار spss (linear Regression) سنجیده شد. IC₅₀ غلظتی از عصاره است که توانایی مهار ۵۰٪ از رادیکال های آزاد موجود در محیط را دارد بنابراین هر چه میزان IC₅₀ کمتر باشد عصاره دارای ترکیب آنتی اکسیدان موثرتری می باشد (۱۸).

برای ارزیابی میزان سمیت عصاره ها بر آرتیمیا، فرمول زیرمورد استفاده قرار گرفت.

$$M = A - B - N/G - N \times 100$$

در این رابطه M، A، B، N و G به ترتیب درصد لاروهای مرده بعد از ۱۸ ساعت، تعداد لاروهای مرده بعد از ۱۸ ساعت، میانگین تعداد لارو مرده در شاهد منفی بعد از ۱۸ ساعت، تعداد لارو مرده قبل از شروع تست و تعداد کل لاروهای آرتیمیا می باشند. تحلیل نتایج تست طبق روش Manilal و Krishnaraju انجام شد: ۱۹٪-۰ لارو مرده، عصاره فاقد فعالیت سمی، ۳۹٪-۲۰٪ عصاره دارای سمیت پایین، ۵۹٪-۴۰٪ عصاره دارای فعالیت سمی و بیشتر از ۶۰٪ لارو مرده عصاره فعالیت سمی بسیار بالایی داشته است (۱۵، ۱۹).

آنالیز فیلوژنتیک توالی ژن ۱۶-SrDNA سویه های اکتینومایست منتخب

برای بررسی نتیجه توالی های ژن ۱۶-SrDNA، با استفاده از نرم افزار BioEdit ویرایش شد و سپس توسط نرم افزار Chromas pro مورد بررسی قرار گرفت. برای شناسایی مولکولی، توالی سویه های برتر با توالی های ثبت شده در پایگاه داده اطلاعات ژنومی NCBI و EZTaxon مقایسه شده و میزان شباهت آن با سویه های مختلف ثبت شده، تعیین شد و برای بررسی های بعدی ذخیره گردید (۵).

یافته ها

میزان مهار رادیکال آزاد

نتایج ارائه شده در مورد ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی ۵۰

۱/۵ استریل، به منظور تخریب سلول ها،

Tris-HCl ۲۰mM، EDTA ۲۵mM) SET buffer ۹۵۰ μl pH=۸/۲ (NaCl ۷۵mM، بر روی ویال ریخته، ورتکس شد و ۵۰ μl لیزوزیم، به آن اضافه شد. ویال ۱ ساعت در ۳۷°C قرار داده شد. سپس ۱۵۰ μl SDS ۱۰٪، اضافه و ویال ۱ ساعت در بن ماری ۶۰°C، قرار داده شد سپس ویال بادور ۱۳۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. سوپرناتانت حاوی DNA را از رسوب زیرین جدا کرده و فاز رویی به یک ویال تمیز منتقل شد. سپس هم حجم آن کلروفرم و فنل با نسبت یک به یک اضافه و ویال با دور ۱۳۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. فاز رویی به میکروتیوپ جدید منتقل شده و هم حجم آن کلروفرم اضافه شد و ویال به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۳۵۰۰ rpm سانتریفوژ شد. مایع رویی درون ویال به یک ویال تمیز منتقل شد و یک دهم حجم ویال سدیم استات اضافه شد و سه برابر حجم مایع درون ویال، الکل مطلق سرد اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰°C- قرار داده شد. سپس ویال با دور rpm ۱۳۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. الکل به آرامی خارج شد و DNA به صورت رسوب در ته ویال تشکیل شد. در پایان DNA با الکل ۷۰٪ شستشو شد و ویال با دور rpm ۱۳۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس الکل خالی شد و در نهایت ۴۰۱μl بافر TE، به درون ویال اضافه شد و در یخچال قرار داده شد (۱۴).

به منظور بررسی موفق بودن عمل استخراج DNA، الکتروفورز با ژل آگارز ۰/۸٪ به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. در نهایت ژل با محلول اتیدیوم برمایید رنگ آمیزی شده و در دستگاه ژل داک، باندها مشاهده شد.

انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)

در این پژوهش از دو پرایمر عمومی با نام های F۹ و R۱۵۴۱ برای تکثیر ژن ۱۶-SrDNA استفاده شد. این پرایمر های عمومی به منظور تکثیر ژن ۱۶-SrDNA با طول ۱۵۰۰ نوکلئوتید مورد استفاده قرار گرفتند (۱۷).

حجم نهایی برای انجام PCR ۲۵ μl است. حاوی DNA ۲μl استخراج شده، ۱ μl از هر کدام از پرایمرها، ۱۲/۵ μl آنزیم Taq master mix و در نهایت ۱/۲۵ μl DMSO اضافه شد. لازم به ذکر است استفاده از DMSO به دلیل بالا بودن در صد C+G اکتینومایست ها لازم است که این ماده سبب بهتر باز شدن باندها می شود (۱۷). دناتوره شدن اولیه در دمای ۹۵°C و به مدت ۵ دقیقه بود. ۳۵ چرخه ی تکثیر شامل ۱۰ ثانیه باز شدن باندها در ۹۸°C، ۱ دقیقه در ۵۵°C، ۵ دقیقه در ۷۲°C انجام شد. پس از این مراحل ۵ دقیقه در ۷۲°C به منظور تکمیل نهایی سنتز

۱۱۴۲	۲۸۶	۱۵۰/۳	۰	۱	۱۰/۵۵	۱۴/۶۶
۱۰۵۳	۲۸۷	۴۷۷/۹۸	۵/۸۸	۶/۶۹	۷/۷۷	۱۰/۲۲
۱۱۵۸	۲۹۷	۴۱۹/۷۳	۲/۴۱	۲/۸۹	۴/۴	۷/۵۷
۱۱۱۶	۲۹۸	۴۹/۹۷	۰	۸	۳۴/۴۸	۴۵/۸۴
۱۱۵۶	۲۹۹	۷۵۴/۸۹	۱/۳۹	۲/۲۳	۳/۲۴	۴/۶۷
۱۱۰۶	۳۰۰	۳۰۴/۵۵	۰	۱/۱۳	۲/۸	۷/۷۴
۱۱۰۷	۳۰۱	۶۵۰/۱۷	۰	۰	۰/۸	۳/۴۴
۱۱۱۵	۳۰۲	۳۰۹/۸۱	۰	۰	۲/۰۱	۷/۲۱
۱۱۳۵	۳۰۳	۷۹۸	۰	۰	۱/۸۸	۲/۶۷
۱۱۵۵	۳۰۴	۵۹۱/۳۷	۰	۱/۱	۱/۴	۴/۲
۱۱۳۸	۳۰۵	۲۹۹/۰۶	۰	۱/۶۴	۳/۴۵	۷/۹۷
۱۱۳۱	۳۰۶	۵۲۶/۳۵	۰	۱/۱۱	۲/۹۸	۴/۴۹
۱۱۰۲	۳۰۷	۲۷۲/۹	۴/۹۸	۴/۸۱	۷/۷۴	۱۲/۲۵
۱۱۳۰	۳۰۸	۲۱۲/۹۵	۰	۰/۷۱	۲/۴۳	۱۰/۹۷
۱۱۲۰	۳۰۹	۵۱/۶۷	۱/۳۵	۴/۲۸	۵/۳۹	۱۰/۰۱
۱۰۰۹	۳۱۰	۳۶۰/۷	۲/۶۷	۲/۹۴	۴/۵۷	۸/۶۳
۱۰۴۲	۳۱۱	۲۳۲/۲۹	۲/۷۱	۵/۷۲	۵/۷۶	۱۳/۰۱
۱۰۳۷	۳۱۲	۰	۰	۰	۰	۰
۱۰۲۹	۳۱۳	۱۹۹/۲۲	۴/۳۳	۶/۴۹	۷/۶	۱۵/۵۱
۱۰۱۱	۳۱۴	۱۱۵/۸۴	۰	۰	۴/۴	۲۰/۵
۱۱۳۳	۳۱۵	۱۸۹/۰۹	۱/۹۲	۵/۸۳	۱۰/۱۶	۱۴/۱۸
۱۰۳۴	۳۱۶	۳۹۰/۰۲	۰	۱/۰۵	۳/۴۲	۵/۹۴

جدول ۱- بررسی اثر آنتی اکسیدانی غلظت های مختلف عصاره های کشت

اکتینومیست ها به روش DPPH.

در این سنجش BHA و اسید آسکوربیک به عنوان شاهد مثبت مورد

استفاده قرار گرفتند.

نتایج ارزیابی سمیت عصاره های کشت اکتینومیست

در این مطالعه به منظور اندازه گیری سمیت حاد عصاره های اکتینومیست، میزان مرگ و میر آرمیا در تماس با غلظت های مختلف اندازه گیری شد. نتایج به صورت درصد کشندگی ذکر شده است. نتایج در جدول های ۵، ۴، ۳، ۲ آورده شده است و به ترتیب شامل عصاره های غیرسمی، عصاره های دارای سمیت پایین، عصاره های سمی و عصاره های بسیار سمی می باشد. در این تست آنتی اکسیدان های تجاری آلفاتوکوفرول و BHA نیز مورد ارزیابی قرار گرفتند. همان طور که مشاهده می شود، ۵۰٪ عصاره های اکتینومیست فاقد سمیت، ۳۰٪ از عصاره ها سمیت پایین، ۱۶٪ از عصاره ها سمیت بالا و ۴٪ از عصاره ها سمیت بسیار بالایی داشتند.

جدایه اکتینومیست (جدول ۱) نشان می دهد که ۱۰٪ عصاره ها فاقد فعالیت آنتی اکسیدانی، ۲۰٪ از عصاره ها دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بالا ($IC_{50} > 200$)، ۳۲٪ عصاره ها دارای فعالیت آنتی اکسیدانی متوسط ($400 > IC_{50} > 200$)، ۸٪ از عصاره ها دارای فعالیت آنتی اکسیدانی پایین ($IC_{50} > 600$) و ۳۰٪ عصاره ها دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بسیار پایین ($IC_{50} > 600$) می باشند.

UTMC number	UTBC number	IC ₅₀ (µg/ml)	%DPPH radical scavenging (dose in µg/ml)			
			۵	۱۰	۲۵	۵۰
	BHA	۴۶/۵۵	۸/۰۶	۱۵/۴۲	۳۸/۲۵	۴۹/۷۲
	Acid ascorbic	۱۰۶/۷۹	۰/۴۵	۲/۰۲	۹/۷۸	۲۲/۱۹
۱۱۶۶	۵۱	۵۰/۱۵	۳/۸	۵/۸۵	۲۹/۵۷	۴۷/۸۹
۱۱۵۹	۵۲	۲۴۰	۴/۵	۱۲/۸	۲۴/۲	۳۵/۵
۱۰۱	۵۳	۰	۰	۰	۰	۰
۱۱۵۴	۵۴	۵۲۷۸	۲/۵	۲/۶۱	۲/۷۸	۲/۹۵
۱۰۲	۵۵	۳۱۴/۷۶	۰	۱/۱۹	۳/۸۷	۵/۵۹
۱۰۳	۵۶	۳۰۲/۴۱	۱	۲/۶۴	۴/۵۸	۸/۸۹
۱۰۵۷	۸۵	۳۰۴/۷۵	۰	۱/۸۱	۲/۸۲	۷/۹۷
۱۰۵۴	۸۶	۶۳/۲۷	۸/۸۲	۹/۳۲	۱۹/۷۹	۴۱/۱۴
۱۰۵۱	۸۸	۰	۰	۰	۰	۰
۱۰۴۶	۸۹	۲۸/۱۷	۱/۰۲	۳۲/۷۸	۳۸/۷۹	۸۸/۴۹
۱۱۷۵	۹۰	۳۴۶/۶۹	۱/۸	۳/۸۳	۵/۵۵	۸/۵۸
۱۱۷۳	۹۱	۰	۰	۰	۰	۰
۱۱۷۷	۹۲	۲۲۲/۸۸	۰	۳/۶۵	۴/۷۶	۱۱/۲۵
۱۱۶۲	۹۴	۵۸۲	۰	۱	۱/۸۲	۲/۴
۱۱۲۴	۹۵	۷۵۲/۸۳	۰	۰	۱/۴۳	۲/۸۷
۱۱۶۴	۹۶	۴۷۴/۰۳	۳/۰۸	۳/۳۹	۵/۴۶	۷/۴۶
۱۰۶۳	۲۷۱	۲۴۲/۱۴	۰	۰/۵	۳/۸۵	۹/۳۲
۱۰۶۶	۲۷۲	۱۵۸/۰۵	۰	۰	۷/۰۵	۱۴/۱
۱۰۶۷	۲۷۳	۵۳۹/۸۱	۰/۵	۰/۹	۱/۴۵	۴/۷۷
۱۰۶۲	۲۷۴	۲۳۰/۲	۰	۱/۸۹	۴/۱۹	۱۰/۳۴
۱۰۶۹	۲۷۸	۵۰۰/۳۵	۰	۱/۵۷	۲/۳۵	۴/۹۷
۱۱۲۹	۲۷۹	۳۶۱/۹۵	۰	۰	۲/۵۲	۶/۰۸
۱۱۲۷	۲۸۰	۳۵۵/۰۸	۱/۵۵	۲/۸۶	۵/۴۷	۷/۹۲
۱۱۱۰	۲۸۱	۶۲۶/۶۸	۲/۲۶	۲/۴۵	۳/۵۸	۵/۶۹
۱۱۵۱	۲۸۲	۰	۰	۰	۰	۰
۱۰۵۲	۲۸۳	۳۸۹/۳۷	۳/۷۲	۳/۷۲	۴/۴۶	۹/۱۱
۱۰۵۵	۲۸۴	۹۷۶/۳۸	۱/۱۱	۱/۸۸	۲/۷	۳/۵۵
۱۰۴۵	۲۸۵	۶۳۳/۴۶	۰	۱/۰۳	۲/۱۵	۳/۸۳

UTMC number	UTBC number	Percentage of lethality (dose in µg/ml)			
		۴۰	۲۰	۱۰	۵
	BHA	۲/۲±۵۹/۲۵	۱/۳±۶۹/۱۵	۰/۱۲±۷۱/۳۵	۰/۴۶±۷۸/۴
	Acid ascorbic	۰/۲۵±۵۹/۲۵	۰	۰	۰
۱۰۳	۵۶	۰/۱۲±۵۱/۶۷	۰/۴۵±۳۹/۴۷	۰±۳۷/۲۷	۰/۲۶±۴/۲
۱۰۵۱	۸۸	۰/۳۶±۵۹/۲۵	۰/۶۲±۶۹/۱۵	۰/۱۵±۷۱/۳۵	۰/۴۷±۷۸/۴
۱۰۴۶	۸۹	۰/۲۵±۵۰	۰/۱۳±۵۹	۰/۱۵±۶۳	۰/۳±۷۱
۱۱۷۵	۹۰	۰/۲۴±۵۵/۶	۰/۷۴±۵۵/۰۵	۰/۱۲±۴۷/۲۲	۰/۶۲±۴۰/۶۵
۱۱۷۳	۹۱	۰/۸۵±۴۲/۳۵	۱/۲±۳۱/۲	۰	۰
۱۰۶۶	۲۷۲	۰/۷۵±۵۰/۷۵	۰/۲۶±۴۵/۱	۰±۲۴	۰±۵
۱۱۰۲	۳۰۷	۰/۶۴±۵۹/۲۵	۰/۴۸±۴۹/۱۷	۰/۱±۲۵/۷۵	۰/۱۴±۶/۵
۱۱۲۰	۳۰۹	۰/۲۴±۵۹/۲۵	۰/۵۸±۶۹/۱۵	۰/۱۴±۷۱/۳۵	۰/۴۵±۷۸/۴
۱۰۳۷	۳۱۲	۰/۳۱±۵۹/۲۵	۰/۱۲±۶۹/۱۵	۰/۶۵±۷۰/۱۲	۰/۴۷±۷۲/۶

جدول ۴- نتایج ارزیابی تست سمیت سنجی غلظت های مختلف عصاره های

اکتینومیست بر آرتیمیا.

عصاره های دارای فعالیت سمی (۰٪-۴۰٪) BHA به عنوان شاهد منفی

مورد استفاده قرار گرفته است.

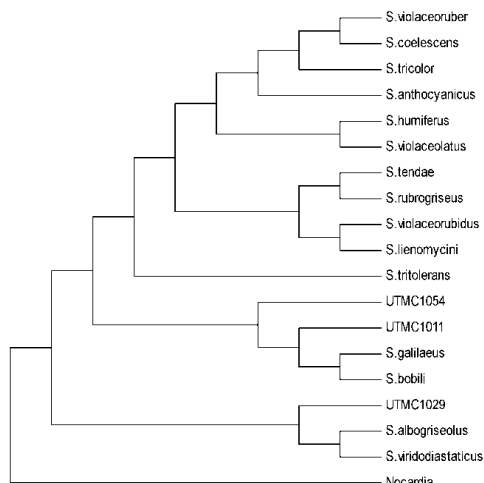
UTMC number	UTBC number	Percentage of lethality (dose in µg/ml)			
		۴۰	۲۰	۱۰	۵
۱۱۶۲	۹۴	۰/۲۵±۶۰/۲	۴۸/۴±۱/۳	۰/۴۵±۳۷/۶	۰±۱۵
۱۱۶۴	۹۶	۰/۵±۶۴/۱۵	۵۹/۲۵±۲/۴	۰/۲۱±۴۶/۳۵	۰/۲۱±۲۰/۹۵

جدول ۵- نتایج ارزیابی تست سمیت سنجی غلظت های مختلف عصاره های

کشت شده اکتینومیست بر آرتیمیا.

عصاره های دارای سمیت بسیار بالا (>۶۰٪)

بررسی فیلوژنتیکی اکتینومیست های منتخب



پس از توالی خوانی ژن SrDNA-۱۶ مربوط به اکتینومیست های منتخب و بررسی توالی ها در EZtaxon ، نتایج حاصل نشان داد که هر ۳ سویه متعلق به جنس *Streptomyces* می باشند.

بحث

آنتی اکسیدان های طبیعی مولکول هایی هستند که سلول را در

UTMC number	UTBC number	Percentage of lethality (dose in µg/ml)			
		۴۰	۲۰	۱۰	۵
	α -tocopherol	۰	۰	۰	۰
۱۱۵۹	۵۲	۰	۰	۰	۰
۱۰۳	۵۳	۰	۰	۰	۰
۱۰۵۷	۸۵	۰	۰	۰	۰
۱۰۵۴	۸۶	۰/۴±۴/۲۵	۰	۰	۰
۱۱۲۴	۹۵	۰	۰	۰	۰
۱۰۶۳	۲۷۱	۰	۰	۰	۰
۱۰۶۷	۲۷۳	۰	۰	۰	۰
۱۰۶۹	۲۷۸	۰	۰	۰	۰
۱۱۳۹	۲۷۹	۰	۰	۰	۰
۱۱۳۷	۲۸۰	۰	۰	۰	۰
۱۱۱۰	۲۸۱	۰	۰	۰	۰
۱۱۵۱	۲۸۲	۰	۰	۰	۰
۱۰۵۲	۲۸۳	۰	۰	۰	۰
۱۰۴۵	۲۸۵	۰/۰۴±۱۱/۹۷	۰/۱±۷	۰	۰
۱۰۳۴	۳۱۶	۰	۰	۰	۰
۱۱۵۸	۲۹۷	۰	۰	۰	۰
۱۱۵۶	۲۹۹	۰	۰	۰	۰
۱۱۰۶	۳۰۰	۰	۰	۰	۰
۱۱۰۷	۳۰۱	۰	۰	۰	۰
۱۱۳۱	۳۰۶	۰	۰	۰	۰
۱۰۰۹	۳۱۰	۰	۰	۰	۰
۱۰۴۲	۳۱۱	۰	۰	۰	۰
۱۰۲۹	۳۱۳	۰/۶±۱۵	۰	۰	۰
۱۰۱۱	۳۱۴	۰/۱۲±۱۹/۱۵	۰	۰	۰

جدول ۲- نتایج ارزیابی تست سمیت سنجی غلظت های مختلف عصاره های

اکتینومیست بر آرتیمیا.

عصاره های فاقد سمیت بر آرتیمیا (۰٪-۲۰٪) . آلفا-توکوفرول به عنوان شاهد

مثبت مورد استفاده قرار گرفت.

UTMC number	UTBC number	(Percentage of lethality (dose in µg/ml)			
		۴۰	۲۰	۱۰	۵
۱۱۶۶	۵۱	۰/۵۱±۲۲	۰/۱۵±۵۱/۵	۰/۴۳±۵۸/۵	۰/۲۵±۶۱/۴۵
۱۱۵۴	۵۴	۰/۱۲±۳۰/۴	۰/۲۶±۲۵/۴۲	۰/۱۲±۴/۸۷	۰
۱۰۲	۵۵	۰/۲±۳۵/۹	۰/۱۲±۳۳/۲۲	۰/۱±۲۶/۲۵	۰/۵۱±۱۵/۶
۱۱۷۷	۹۲	۰/۱۳±۳۳/۶	۰/۲۵±۲۰/۳	۰	۰
۱۱۱۵	۳۰۲	۰/۲۵±۳۷/۵۲	۰/۸۴±۲۶/۰۵	۰±۱۴/۲۵	۰
۱۰۶۲	۲۷۴	۰/۳±۲۳/۶	۰	۰	۰
۱۰۵۵	۲۸۴	۰/۱۴±۲۱/۱	۰	۰	۰
۱۱۴۲	۲۸۶	۰/۲۵±۳۷/۶	۰/۴۵±۲۴/۱	۰/۷۵±۱۰	۰
۱۱۱۶	۲۹۸	۰/۱۵±۳۰/۲	۰	۰	۰
۱۱۳۵	۳۰۳	۰/۲۱±۳۲/۶	۱/۶۵±۲۸/۸	۰	۰
۱۱۵۵	۳۰۴	۰/۴۳±۲۰/۴	۰/۴۲±۱۶/۱۷	۰/۶۱±۱۰/۲	۱/۳±۴/۴۲
۱۱۴۸	۳۰۵	۰/۲۶±۲۲/۳۲	۰	۰	۰
۱۱۳۰	۳۰۸	۰/۶۲±۲۶/۵۲	۱/۲±۱۹/۱۷	۰	۰
۱۱۳۳	۳۱۵	۰/۴۶±۲۴/۴	۰	۰	۰
۱۰۵۳	۲۸۷	۰/۱۴±۲۸۷	۰/۱۷±۶/۳۷	۰	۰

جدول ۳- نتایج ارزیابی تست سمیت سنجی غلظت های مختلف عصاره های

اکتینومیست بر آرتیمیا.

عصاره های دارای سمیت پایین بر آرتیمیا (۰٪-۴۰٪)

Streptomyces VITSVK5 بدست آمد و دارای IC_{50} برابر $8 \mu\text{g/ml}$ بود. که خاصیت کشندگی بر روی سلول های سرطانی داشت (۲۷).

نتیجه گیری

با توجه به نتایج بدست آمده در این پژوهش، ۳ جدایه منتخب $UTMC1011$ - $UTMC1054$ - $UTMC1029$ می باشد که عصاره این جدایه ها فاقد فعالیت سمی و در عین حال دارای فعالیت بالای آنتی اکسیدانی ($IC_{50} \leq 200$) هستند. جدایه $UTMC1011$ دارای IC_{50} برابر $63/27 \mu\text{g/ml}$ و $UTMC1054$ ، $115/84$ ، IC_{50} برابر $63/27 \mu\text{g/ml}$ و $UTMC1029$ دارای IC_{50} برابر $199/22 \mu\text{g/ml}$ در تست قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH بودند. BHA نیز دارای IC_{50} برابر $46/55 \mu\text{g/ml}$ بود. بنابراین جدایه $UTMC1054$ از نظر فعالیت آنتی اکسیدانی قابل رقابت با آنتی اکسیدان های مصنوعی رایج در صنایع غذایی مانند BHA است که در ضمن فاقد اثرات سمی این نوع آنتی اکسیدان هم می باشد. در ضمن عصاره های $UTMC1166$, $UTMC1116$, $UTMC1133$, $UTMC1142$ که به ترتیب دارای IC_{50} برابر $49/97 \mu\text{g/ml}$, $50/15 \mu\text{g/ml}$, $150/3 \mu\text{g/ml}$, $189/09$ بودند. این عصاره ها فعالیت کشندگی پایینی در مقایسه با BHA داشتند، در نتیجه عصاره های $UTMC1116$, $UTMC1166$ قابلیت جایگزینی با BHA را دارا می باشند. عصاره های $UTMC1066$, $UTMC1120$, $UTMC1046$ به ترتیب دارای IC_{50} برابر $51/67 \mu\text{g/ml}$, $28/17 \mu\text{g/ml}$, $151/05$ بودند که در مقایسه با BHA سمیت بالاتری داشته و غیر قابل استفاده بودند.

عصاره های مورد استفاده در این پژوهش نسبت به آنتی اکسیدان های به دست آمده از سایر اکتینوماست ها در پژوهش های مختلف، فعالیت آنتی اکسیدانی متوسطی داشتند اما این نکته حائز اهمیت است که عصاره های به کار گرفته شده، در مقایسه با دیگر آنتی اکسیدان ها، خالص سازی نشده بودند که در صورت خالص سازی میزان IC_{50} این ترکیبات نیز کاهش پیدا خواهد کرد و احتمال غیر سمی بودن این ترکیبات آنتی اکسیدانی بصورت خالص وجود دارد که این موضوع قابل توجه می باشد.

برابر اثرات مخرب رادیکال های آزاد محافظت می کنند و بدن را در شرایط بهینه نگهداری می کنند (۲۹). با به کار بردن تکنیک غربالگری، سرعت کشف ترکیبات طبیعی تا به حال متجاوز از یک میلیون می باشد. در میان ۲۲۵۰۰ ترکیب استخراج شده فعال زیستی ۴۵٪ توسط اکتینوباکترها، ۳۷٪ توسط قارچ ها، ۱۷٪ توسط سایر باکتری ها تولید شده است (۱).

باتوجه به اهمیت آنتی اکسیدان ها در درمان بیماری ها و پیشگیری از ابتلا به بیماری های مزمن و جایگزینی آنتی اکسیدان های طبیعی با آنتی اکسیدان های مصنوعی دارای عوارض جانبی در صنایع غذایی و اینکه تاکنون تحقیقی در این زمینه بر روی اکتینوماست های بومی ایران صورت نگرفته است، پژوهشی به منظور دستیابی به ترکیبات آنتی اکسیدان طبیعی فاقد اثرات سمی با منشا میکروبی و بومی بر روی اکتینوماست ها که منبع غنی از ترکیبات زیستی هستند، طرح ریزی شد.

Kawahara و همکارانش ۲ ترکیب فنولی-JBIR-۹۴JBIR-۱۲۵ از مایع فرمانتاسیون ۰۷-۵۶-*Streptomyces R* جداسازی کردند که این ترکیبات دارای فعالیت آنتی اکسیدانی و اولین نمونه هایی از هیدروکسی سینامیک اسیدهایی بودند که توسط اکتینوماست ها تولید می شدند. IC_{50} این ترکیبات آنتی اکسیدان برابر $9 \mu\text{M}$ بود (۳۱). Motohashi و همکارانش، یک اکتینوماست از اسفنج موجود در خلیج بنگال جداسازی کردند، که توانایی تولید ۲ نوع پپتید تغییر یافته حاوی اندول و دارای فعالیت آنتی اکسیدانی را داشتند. این ترکیبات JBIR-۳۴ و JBIR-۳۵ نامگذاری شدند. این ۲ ترکیب فعالیت آنتی اکسیدانی ضعیفی داشتند و IC_{50} این ترکیبات برابر $50 \mu\text{M}$ بود. با وجود اینکه این ترکیبات خاصیت آنتی اکسیدانی ضعیفی داشتند، اما این مطالعه شیمی دانان را متقاعد کرد که گونه های جدید *Streptomyces* می توانند ترکیبات دارای ساختارهای اسکلتی نادری را تولید کنند (۲۲). در سال ۲۰۱۱، Zhong و همکارانش *Streptomyces* جدیدی از ریزوسفر را شناسایی و مورد بررسی قرار دادند که به عنوان *Streptomyces Eri* ۱۲ نامگذاری شد و این سویه توانایی تولید یک ترکیب آنتی اکسیدانی با IC_{50} برابر $43 \mu\text{g/ml}$ داشت (۳۶). Meyyappan و همکارانش از عصاره n-بوتانلی یک جنس جدید *Streptomyces* مولکول ۲-آلیل اکسی فنل را استخراج کردند که دارای خاصیت آنتی اکسیدانی بود و این ترکیب به عنوان یک نگهدارنده غذایی و یک ضد عفونی کننده دستگاه گوارش پیشنهاد شد. این ترکیب دارای IC_{50} برابر $22 \mu\text{g/ml}$ بود (۲۱). در پژوهش دیگری که توسط Saurav در سال ۲۰۱۱ انجام شد ترکیب دارای ساختار ۵-۲ و ۴ دی متیل بنزیل ۲-پیرولیدین جداسازی شد. متابولیت جداسازی شده از

در این پژوهش در بررسی های مولکولی مشخص شد که ۳ سویه منتخب از جنس Streptomyces بودند که دارای بیشترین قرابت با سویه های Streptomyces galilaeus, Streptomyces tendae, Streptomyces albogriseolus می باشند. تا امروز هیچ ترکیب دارای فعالیت آنتی اکسیدانی از این سویه ها گزارش نشده است اما این سویه ها متابولیت های دارای فعالیت زیستی نظیر آنتی بیوتیک را تولید می نمایند.

Streptomyces tendae آنتی بیوتیک های نیکومایسین و جاگلومایسین را سنتز می نماید (۱۱). همچنین این سویه توانایی تولید ترکیباتی نظیر تندامیستات ، اکینوسرین، ژنوسمین، لیزولپین، نئوبلی اکسین را دارد (۱۲).

گزارش شده است که سویه MA۱۴۴-Streptomyces galilaeus M1 توانایی تولید ۱۹ ترکیب آنتراسیکلیک را دارد که ۱۲ ترکیب آن فعالیت ضد باکتریایی داشتند. توانایی تولید ترکیباتی نظیر آکلاروبیسین ، بتارودومایسینون ، رودومایسینون ، پروپیونیک اسید، آکلاوینون توسط این سویه گزارش شده است (۱۲).

همچنین Benedict تولید نئومایسین توسط Streptomyces albogriseolus را در سال ۱۹۵۴ گزارش کرد. این سویه توانایی تولید ۳۳ نوع آمفومایسین و ۳ نوع آنزیم پروتئاز خارج سلولی را دارد (۲۹). Cui و همکارانش تولید ۲ نوع ترکیب سایتوتوکسی اکینوسپورین و ۷-دئوکسی اکینوسپورین را گزارش نمودند. این ترکیبات دارای فعالیت سایتوتوکسی بر روی سلول های سرطانی بودند (۶).

این پژوهش اولین گزارش از تولید ترکیبات آنتی اکسیدان توسط اکتینومایست های بومی ایران می باشد و همچنین برای اولین بار تولید ترکیبات آنتی اکسیدان توسط این سویه ها در جهان گزارش می شود.

منابع

1. Berdy J. Bioactive microbial metabolites. J Antibiot, 2005; 58:1-26.
2. Bertani G. Studies On Lysogenesis. J Bacteriol, 1961; 62 (3): 293-300.
3. Calabrese V, Randazzo S, Catalano C, Rizza V. Biochemical Studies On A Novel Antioxidant From Lemon Oil And Its Biotechnological Application In Cosmetic Dermatology. Drugs Exp Clin Res, 1999 ; 25 (5): 219-225
4. Chan J, Hueso rodriguez J. Compound Library Management. Methods Mol Biol, 2008; 190: 117-127.
5. Chun J, Sook Bae K, Young Moon E, Jung S O, Kum Lee H, Kim S J. Nocardiosis Kunsanensis Sp. Nov., A Moderately Halophilic *Actinomycete* Isolated From A Saltern . IJSEM , 2007; 50: 1909-1913.
6. Cui C B, Liu H B, Gu J Y, Gu Q Q, Cai B, Zhang D Y, Zhu T J. Echinospirins as new cell cycle inhibitors and apoptosis inducers from marine-derived *Streptomyces albogriseolus*. Fitoterapia, 2007; 78: 238-240.
7. Dekker M, HandBook Of Antioxidant, 2, The United States Of America, Eastern Hemisphere, 2002, 56-89.
8. Dharmaraj S, Ashokkumar B, Dhevendaran K. Fermentative Production Of Carotenoids From Marine *Actinomycetes*. Iran J Microbiol, 2009; 4(1): 36-41.
9. Diraviyam T, Radhakrishnan M, Balagurunathan R. Antioxidant Activity Of Melanin Pigment From *Streptomyces* Species D5 Isolated From Desert Soil. J.DIT, 2011; 3(3): 12-13.
10. Goldman J C, Carthy, M C. Steady State Growth And Ammonium Uptake Of A Fast Growing Marine Diatom. L&O, 1978; 23: 695-703.
11. Grammel H, Wolf H, Gilles E, Huth F, Laatsch H. Carbazole Antibiotics Synthesis In A *Streptomyces* Tendae Blad Mutana, Created By Acriflavine Treatment. Z Naturforsch, 1998; 53: 325-330
12. http://www.pharmaceutical-bioinformatics.de/streptomedb/search_organisms/.
13. Jao C L, Ko W C. 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging By Protein Hydrolysates From Tuna Cooking Juice. Fish Science , 2002; 68:430-435.
14. Kieser, C R, Mahadik K R, Kadam S S, Chopade B A. Isolation, Characterization And Antimicrobial Activity Of Halophilic *Actinopolyspora* Species AH1 From The West Coast Of India. Curr. Sci, 2000; 86: 593-597.
15. Krishnaraju AV, Rao T V N, Sundararaju D, Vanisree M, Tsay H S, Subbaraju G V. Assessment Of Bioactivity Of Indian Medicinal Plants Using Brine Shrimp (*Artemia Salina*) Lethality Assay. Int J Applied Sci, 2005; 3: 125-134.
16. Kumar P, Dushenkov V, Motto H, Raskin I. Rhizofiltration The Use Of Plants To Remove Heavy Metals From Aqueous Streams. Environ Sci Technol, 1995; 29(5): 1239-1245.
17. Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3. Integrated Software For Molecular Evolutionary Genetics Analysis And Sequence Alignment. Brief Bioinform, 2004; 5(2):150-163.
18. Madhumitha G, Saral A. Free Radical Scavenging Assay Of Thevetia Neriifolia Leaf Extracts. Asian J Chem, 2009; 21:2468-2470.
19. Manilal A, Sujith S, Seghal Kiram G, Selvin J, Shaker C. Cytotoxic Potentials Of Red Alga, Laurencia Brandenii Collected From The Indian Coast. GJP, 2009; 3(2): 90-94.
20. Meyer B N, Ferrigni N, Putnam J, Jacobsen L, Nichols D, McLaughlin L. Brine Shrimp:A Convenient

- General Bioassay For Active Plant Constituents. J Med Plants Res, 1982; 45: 31-34.
21. Meyyappan A, [et al]. Isolation Of An Unusual Metabolite 2-Allyloxyphenol From A Marine *Actinobacterium* , Its Biological Activities And Applications. Appl Microbiol Biotechnol , 2010; 86: 109-117 .
 22. Motohashi K, Takagi M, Shin-ya K. Tetrapeptides Possessing A Unique Skeleton , JBIR-34 And JBIR-35, Isolated From A Sponge-Derived Actinomycete, *Streptomyces* Sp. Sp080513GE-23. J Nat Prod, 2010; 73 (2): 226-228.
 23. Neelam S, [et al]. Production Of Coenzyme Q10 From Fungi And *Actinomycetes*, National Biotechnology Seminar, 2010.20-26 May.
 24. Neves A J, Nazaré M H. Properties Growth And Applications Of Diamond, Inst of Electrical Engineers, London, 2001, 114-123.
 25. Papas A M. Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health. London, CRC Press, 1999, P. 1-20, 231-9.
 26. Pridham T G, Anderson P, Foley C, Lindenfelser L A, Hesseltine C W, Benedict R G. A Selection of Media for Maintenance and Taxonomic Study of *Streptomyces*. Antibiotics Annual, 1957: 947-53.
 27. Saurav K, Kannabiran K. Cytotoxicity And Antioxidant Activity Of 5-(2,4-Dimethylbenzyl) Pyrrolidin-2-One Extracted From Marine *Streptomyces VITSVK5 Spp*. sjbs , 2011; 19 (1): 81-86.
 28. SivaKumar K. 2001, *Actinomycetes* Of An Indian Mangrove (Pichavaram) Environment An Inventory Ph.D thesis, Annamalai University, India.
 29. Sokmen a , [et al]. The In Vitro Antimicrobial And Antioxidant Activities Of The Essential Oils And Methanol Extracts Of Endemic *Thymus Spathulifolius*. J Food Cont, 2004 ;15:627-634.
 30. Suzuki M, Taguchi S, Yamada S, Kojima S, Miura K I, Momose H. A Novel Member Of The Subtilisin-Like Protease Family From *Streptomyces Albogriseolus*. J. Bacteriol, 1997; 179 (2): 430-438.
 31. Teppei K, Miho I, Misa O, Hideki Y, Masayuki H, Motoki T, Shin-ya K. JBIR-94 And JBIR-125, Antioxidative Phenolic Compounds From *Streptomyces Sp.R56-07*. J Nat Prod, 2012; 75: 107-110.
 32. Usha Rakshanya J, Hemashenpagam N, Kanchana Devi D. Purification Of Secondary Metabolites From Soil *Actinomycetes*. IJMR, 2011; 3 (3): 148-156.
 33. Wanasundara P K J P D, Shahidi F, Science, Technology, And Applications, Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Antioxidants, 6, John Wiley & Sons, 2005, 431-489.
 34. Williams S T, Goodfellow M, Alderson G, Wellington E M, Sneath P H, Sackin M J. Numerical Classification Of *Streptomyces* And Related Genera. J Gen Microbiol, 1984;129(6): 1743-1813.
 35. Yamamoto N, Kajimoto G. Antioxidation Effect Of Gly-Gly-His On Cu(II)-Catalyzed Autooxidation And Photosensitized Oxidation Of Lipids. Agric Biol Chem, 1980; 44: 2735-2736.
 36. Zhong K, Cao X, Zheng Jun X, Fan s. Antioxidant Activity Of A Novel *Streptomyces Strain Erli2* Isolated From The Rhizosphere Of Rhizoma Curcumae Longae. curr Res Bacteriol, 2011; 4(2): 63-72.