

جداسازی و شناسایی گونه‌های میکرومونسپورا از خاک و خواص ضد باکتریایی آن‌ها

سمیره آذریپرا^۱، احمد فرج زاده شیخ^۲، عبدالرزاق هاشمی شهرکی^۳

۱. کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، عضو کمیته تحقیقاتی دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، پژوهشکده سلامت، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، اهواز، ایران
۲. دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
۳. استادیار، گروه اپیدمیولوژی، انیستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: جنس میکرومونسپورا منبع پرکاربرد متابولیت‌های مختلف فعال زیستی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها و مهارکننده‌های آنزیم است. اعضای میکرومونسپورا به طور گسترده در انواع زیستگاه‌ها، به ویژه خاک غنی توزیع شده‌اند. مطالعه حاضر با هدف جداسازی، شناسایی ایزوله‌ها توسط تکثیر ژن 16S rRNA تا سطح جنس و تعیین فعالیت ضد میکروبی آنها صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها: ۶۰ نمونه خاک از نقاط مختلف ایران جمع‌آوری شد. هر نمونه خاک تحت تیمار با فنل ۱،۵ درصد در محیط کشت‌های مختلف مناسب برای جداسازی میکرومونسپورا کشت داده شد. شناسایی جنس ایزوله‌های جدا شده با استفاده از تکثیر ژن 16S rRNA با پرایمرهای اختصاصی جنس صورت گرفت. سپس عصاره متعلق به میکرومونسپورا جدا شده، در برابر تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زا برای تعیین فعالیت ضد میکروبی آنها مورد آزمایش قرار گرفت.

یافته‌ها: از ۶۰ نمونه خاک مورد بررسی ۲۰۰ اکتینومیست جدا شد، که ۱۵ ایزوله به عنوان میکرومونسپورا با استفاده از تکثیر ژن 16S rRNA با پرایمرهای اختصاصی جنس تأیید شدند. از عصاره جدا شده هر ایزوله ۵ ایزوله فعالیت ضد میکروبی روی سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین ATCC 33591، باسیلوس سرئوس ATCC 1399 داشتند.

نتیجه‌گیری: میکرومونسپورا‌های جدا شده در این مطالعه توان تولید آنتی‌باکتریال‌های مؤثر بر گونه‌های MRSA به عنوان یکی از معضلات سیستم‌های بهداشتی را دارا بودند.

واژه‌های کلیدی: میکرومونسپورا، آنتی‌بیوگرام

مقدمه

پدیدارشدن سویه‌های مقاوم در بین باکتری‌های بیماری‌زا و شایع شدن بیماری‌های نوظهور باعث تلاش روز افزون جهت جستجوی ترکیبات جدید بیولوژیکی و کشف آنتی‌بیوتیک‌ها شده است. سال‌های متوالی است که میکروارگانیزم‌های

نویسنده مسئول: سمیره آذریپرا

پست الکترونیکی: Samiraazarpira@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۰۴/۱۰

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۰۷/۱۲

استریتومایسس‌ها در محیط کشت‌های جداسازی میکرومونوسپورا می‌شود دارد (۱۶).

هم‌چنین از آنتی‌بیوتیک‌های سیکلوهمگزامید، نیستاتین، نالیدیکسیک اسید و نووبیوسین در محیط کشت‌ها که باعث تسهیل بازیابی جنس‌های اکتینومیست‌ها می‌شود استفاده می‌شود.

از مهم‌ترین کاربردهای روش‌های ذکر شده مورد استفاده در این مطالعه حذف باکتری‌های غیر میکرومونوسپورا مانند، سودوموناس، باسیلوس و دیگر باکتری‌های اسپوردار و بدون اسپور بود.

با وجود اهمیت زیاد اقتصادی گونه‌های میکرومونوسپورا، آنها به‌طور کامل بررسی نشده‌اند. این امر احتمالاً به دلیل شکل میسیلیومی، کند رشد بودن و مشکلاتی که در کشت اکثر گونه‌ها وجود دارد است (۲۱).

لذا با توجه به اهمیت این باکتری‌ها در زمینه تولید انواع آنتی‌بیوتیک‌ها، مطالعه حاضر با هدف جداسازی و تعیین هویت مولکولی ایزوله‌های محیطی میکرومونوسپورا از مناطق مختلف ایران بر اساس آنالیز توالی ژن 16S rRNA تا سطح جنس و تعیین خاصیت ضد میکروبی ایزوله‌های جدا شده بر اساس غربال‌گری اولیه و ثانویه به ترتیب با روش‌های خطی و انتشار در آگار بود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

۶۰ نمونه خاک مورد بررسی در این مطالعه در فاصله زمانی بین سال‌های ۱۳۹۱ تا ۱۳۹۳، از مناطق مختلف استان خوزستان شامل شهرهای اهواز، دزفول، شوشتر، آبادان، ایذه و خارج استان شامل ایلام، شهرکرد، خرم‌آباد، تهران، بابل، ساری، گیلان از عمق ۲۰-۱۰ سانتی‌متری در ظرف استریل جمع‌آوری شده و به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه اهواز منتقل شد. بعد از انتقال به آزمایشگاه، مشخصات هر نمونه خاک شامل منطقه جغرافیایی آن ثبت گردیده و در آزمایشگاه در تاریکی و دمای اتاق به مدت ۱ ماه قرار داده شد تا کاملاً خشک شدند و بعد وارد فرآیند زیر برای جداسازی شدند.

جداسازی و کشت دادن نمونه‌ها

خاک‌زی به ویژه باکتری‌های موجود در خاک به‌صورت جدی در حال غربال‌گری می‌باشند (۱، ۱۴).

میکرومونوسپورا^۱ جنسی از باکتری‌های گرم مثبت، کموارگانوتروف، هوازی، اسپور دار و به شکل یک میسیلیوم منشعب متعلق به خانواده میکرومونوسپوراآسه‌آ و کلاس اکتینوباکترها و راسته اکتینومیستالس می‌باشد (۲۰)، که با محتوای بالای درصد G و C ژنوم معرفی شده است. اکثر گونه‌ها اغلب به شکل کلنی‌های تیره که می‌تواند با دیگر اکتینومیست‌ها اشتباه گرفته شود دیده می‌شوند. کلنی‌ها می‌تواند انواع رنگ‌ها، از جمله سفید، نارنجی، رز، یا قهوه‌ای دیده می‌شوند. (۶، ۱۰، ۲۴).

میکرومونوسپورا به‌طور گسترده‌ای در طبیعت توزیع شده، و ساکن چندین محیط مختلف به عنوان مثال رسوبات ساحلی، رسوبات دریایی، جنگل، باتلاق، مراتع، دشت سیلابی و ریزوسفر گیاهی است. این میکروب‌ها هم‌چنین در جوامع میکروبی پیچیده و خاک رشد می‌کنند (۱۲، ۱۳، ۲۳، ۲۵، ۲۷).

جنس میکرومونوسپورا مدت زیادی است که به عنوان یک منبع قابل توجه از متابولیت‌های ثانویه برای تحقیقات زیست‌پزشکی به رسمیت شناخته شده و برخی از داده‌ها در مورد اهمیت این باکتری برای محیط زیست و خاک، هم‌چنین بر تأثیر گونه میکرومونوسپورا در رشد و توسعه گیاه خبر می‌دهد.

هم‌چنین گونه‌های متعلق به جنس میکرومونوسپورا نقش بسیار بارزی در تولید آنتی‌بیوتیک‌های مختلف دارند به طوری که گونه‌های مختلف میکرومونوسپورا منشاء تولید تقریباً تمامی آمینوگلیکوزیدها^۲ و تعدادی دیگر از ترکیبات ضد میکروبی می‌باشند که امروزه به صورت رایج در درمان‌های دارویی استفاده می‌شوند (۱، ۶، ۷، ۸، ۱۴، ۱۹، ۲۲).

از دیگر فعالیت بیولوژیکی میکرومونوسپورا سنتز مولکول‌هایی از جمله ویتامین B_{۱۲} است و اخیراً شواهدی دال بر ارتباط استفاده از آن به عنوان پروبیوتیک مشاهده شده است (۳، ۶)

موفقیت جداسازی میکرومونوسپوراها بستگی به بهره‌برداری از توانایی‌های برتر اسپور آنها به دلیل مقاومت در برابر تیمار با فنل ۱،۵٪، که به شدت باعث کاهش تعداد باکتری‌ها و

¹ *Micromonospora*

² Aminoglycoside

های M558F 5-CGGCTTGTGCGCTCGACT-3 و C1028R 5-ATGCACCACCTGTAGCCGA-3 (۱۶) با استفاده از برنامه زیر طی ۳۰ چرخه تکثیر شد.

واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر:

| PCR reagent | Volume | Final concentration |
|---------------------------|---------------------|---------------------|
| | μl | |
| 10X PCR buffer | 5 μl | 1X |
| MgCl ₂ (50 mM) | 1.5 μl | 1.5 mM |
| dNTP mix (10 mM) | 1 μl | 0.2 mM |
| Each Primer (10 Mm) | 1 μl | 0.4 μM |
| Taq DNA polymerase | 0.25 μl | 0.04 unit |
| DNA template | 5 μl | - |
| Distilled Water | 36.25 μl | - |

برنامه دمایی که برای تکثیر ژن 16S rRNA انجام

شد به شکل زیر بود

جداسازی اولیه رشته‌های DNA در ۹۴°C به مدت ۲ دقیقه: (یک چرخه)، تکثیر ژن مورد اشاره با استفاده از شرایط جداسازی در ۹۴°C یک دقیقه، اتصال ۶۰°C یک دقیقه، گسترش ۷۲°C یک دقیقه: (۳۰ چرخه)، گسترش نهایی در حرارت ۷۲°C ده دقیقه: (یک چرخه).

سپس محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ و استفاده از اتیدیوم بروماید الکتوفورز شد.

بررسی خواص ضد میکروبی ایزوله‌ها:

برای جداسازی میکرومونسپورا‌های فعال از نظر تولید مواد آنتی‌باکتریال از روش‌های متفاوتی استفاده شد، مانند روش خطی^۵ و انتشار در آگار^۶. که برای هردو روش از پاتوژهای استاندارد همچون سویه‌های استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین^۷ ATCC 33591، باسیلوس سرئوس ATCC 1399، اشریشیاکلی PTCC 1533، کلبسیلا

یک گرم از خاک با ۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل در یک لوله مخلوط گردید و سپس ۵ میلی لیتر از آن وارد یک لوله فالكون استریل حاوی ۴٫۵ میلی لیتر فسفات بافر ۵ میلی مولار دارای ۱٫۵٪ فنل شد.

سپس مخلوط خاک و فسفات بافر به مدت ۳۰ دقیقه در آزمایشگاه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت (۹).

بعد از اتمام زمان مورد اشاره، ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه بر روی محیط کشت‌های ISP2^۳، Humic acid agar، Gause's No.1 که حاوی ترکیبات ضد میکروبی نالیدیکسیک اسید، نیستاتین، نوویوسین و سیکلوگزامید با مقادیر ۵۰ میکروگرم در هر میلی لیتر بود تلقیح شد و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ هفته قرار داده شد (۵، ۲۶).

بعد از نمایان شدن کلنی‌ها، عمل رنگ‌آمیزی گرم صورت گرفت و در صورت مشاهده هایف‌های منشعب گرم مثبت، و تعیین تعلق آنها به اکتینومیسیت‌ها و احتمالاً میکرومونسپوراها، ایزوله‌ها به صورت تک‌کلون در محیط TSB حاوی گلیسرول در دمای ۸۰- نگهداری شد.

تعیین هویت ایزوله‌ها

در مقایسه با روش‌های خسته کننده مرسوم، روش‌های مولکولی مناسبی برای شناسایی دقیق جنس و گونه این گروه از باکتری‌های ارزشمند طبیعت توسعه پیدا کرده است (۶).

به دلیل اینکه ممکن است از نمونه‌های خاک جنس‌های دیگری از اکتینومایست‌ها نیز جدا گردد لازم است با یک روش ساده ایزوله‌های متعلق به جنس میکرومونسپورا را از بقیه جدا نمود، لذا بر اساس ژن 16S rRNA اختصاصی جنس در میکرومونسپوراها، ایزوله‌های میکرومونسپورا از سایر جنس‌ها تفکیک شد.

استخراج DNA ایزوله‌های میکرومونسپورا و

PCR؛ ۴:

جداسازی و تهیه DNA از ایزوله‌های مورد نظر بر اساس روش رایج جوشاندن کلنی‌ها به مدت ۱۵ دقیقه و سانتریفیوژ با دور بالا (۱۳۰۰۰ rpm) به مدت ۲-۱ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و استفاده از مایع روئی به دست آمده صورت پذیرفت (۱۶).

ژن 16S rRNA با استفاده از پرایمرهای مختص جنس (پرایمرهای یاد شده از شرکت سیناژن تهیه شدند) با نام-

⁵ Line method

⁶ disc diffusion method

⁷ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

³ International Streptomyces Project

⁴ Polymerase Chain Reaction

دیسک دیفیوژن ۳ بار تکرار شد. ایزوله‌هایی که حتی کمترین اندازه قطر هاله عدم رشد را داشتند با ارزش تلقی شده و برای مطالعات بعدی ذخیره شدند. برای گزارش فعالیت ضد میکروبی به صورت مقدماتی وجود هاله عدم رشد بر حسب mm اندازه گیری شد.

نتایج

الف. جداسازی باکتری بر اساس آزمونهای

فنتوتیپی و ژنوتیپی

در این مطالعه کلیه نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده با استفاده از روش تیمار خاک با فنل ۱.۵٪ و محیط کشت‌های ذکر شده در این مطالعه کشت داده شد. (تصویر شماره ۱)

از ۶۰ نمونه خاک مورد بررسی ۲۰۰ اکتینومیست بر اساس روش‌های استفاده شده در این مطالعه بر اساس ویژگی‌های فنتوتیپیک و رنگ‌آمیزی گرم جدا شد.



شکل شماره ۱: کشت نمونه‌های خاک بر روی محیط کشت‌های ISP2، Humic acid agar. Gause's No.1

تشخیص اولیه جنس میکرومونوسپورا بر اساس

روش‌های مولکولی

برای بررسی اولیه جنس میکرومونوسپورا از 16S rRNA اختصاصی جنس و سویه استاندارد *Micromonospora chalcea* IBRC-M10660 تهیه شده از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، استفاده گردید. نتایج نشان داد که از ۲۰۰ ایزوله مشکوک به میکرومونوسپورا (۷.۵٪) ۱۵ ایزوله باند ۴۷۰ bp را تکثیر نمودند و به عنوان جنس میکرومونوسپورا تأیید گردیدند (شکل شماره ۲).

پنومونی و باکتری‌های پاتوژن دیگر تهیه شده از آزمایشگاه-های بیمارستان‌ها مانند شیگلا فلکسنری، پرتئوس ولگاریس و سودوموناس آئروژینوزا، استفاده شد.

ایزوله‌های جدا شده در محیط کشت تریپتیکاز سوی آگار در دمای 28°C و به مدت ۱۲ روز کشت داده شد، سپس محیط کشت حاوی باکتری‌های رشد یافته به دو روش جهت استخراج مواد ضد میکروبی مورد آزمایش قرار گرفت.

۱. **روش خطی:** در روش خطی از محیط کشت خالص حاوی باکتری رشد یافته مستقیماً بر روی باکتری‌های هدف پاتوژن تأثیرگذاری گردید، به این صورت که ایزوله میکرومونوسپورا انتخاب شده به صورت یک خط میانی روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد، سپس باکتری‌های پاتوژن استاندارد به صورت جانبی به سمت این خط میانی کشت داده شدند، و پلیت‌های کشت داده شده در 30°C درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰-۷ روز انکوبه شدند. پس از این مدت در صورت فعال بودن میکرومونوسپورا برای تولید آنتی‌بیوتیک، خط رشد پاتوژن‌ها محدود شد که این حالت را میکرومونوسپورا مثبت گویند (۱۵، ۱۷).

۲. **روش انتشار در آگار:** در این روش ایزوله میکرومونوسپورا را به محیط کشت مایع تریپتیک سوی براث انتقال داده و در انکوباتور شیکر دار با دور rpm ۱۵۰ به مدت ۷ روز در دمای 28°C درجه انکوبه گردید. پس از ۷ روز محیط کشت را سانتریفوژ و مایع رویی جدا شد. سپس مایع رویی با حجم برابر با حلالی نظیر اتیل استات، مخلوط گردید و با دور rpm ۲۵۰ به مدت ۲ ساعت به شدت هم زده شد تا متابولیت یا همان آنتی‌بیوتک احتمالی وارد فاز حلال شوند، نهایتاً مایع رویی آن که حاوی عصاره باکتری و اتیل استات بود به‌وسیله قیف جدا کننده مجزا شد و بعد از قرار دادن در داخل پلیت شیشه‌ای و خشک‌شدن تحت تأثیر حرارت 40°C درجه باقی‌مانده جهت خالص‌سازی با متانول حل شد (۲، ۱۵، ۱۷).

پس از عصاره‌گیری حلال‌های تغلیظ شده به کاغذهای ۶ میلی‌متری مخصوص، به نام دیسک انتقال و پس از تبخیر حلال و جذب محتویات آن به کاغذهای دیسک، این دیسک‌ها با پنس استریل روی باکتری‌های پاتوژن کشت داده شده در محیط جامدمولر هینتون آگار (M.H.A) قرار داده شدند، سپس پلیت‌ها به مدت ۳۶ ساعت در انکوباتور 37°C انکوبه شدند و خاصیت ضد میکروبی برای هر ایزوله جدا شده پایش گردید. برای تعیین حساسیت دارویی برای هر ایزوله روش

1399 با قطر هاله عدم رشد به ترتیب ۱۸ و ۱۰ سانتی‌متر در روش انتشار در آگار بودند، هم‌چنین در روش خطی هاله عدم رشد در اطراف خط رشد میکرومونوسپورا با اندازه زون کمتر از روش انتشار در آگار بر روی ۲ باکتری مذکور مشاهده گردید. و روی سایر باکتری‌های مورد آزمایش هیچ‌گونه اثری مشاهده نگردید (شکل شماره ۴).



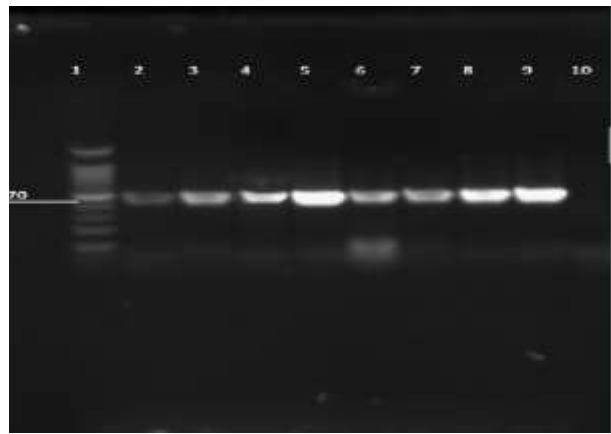
شکل شماره ۴: فعالیت ضد میکروبی عصاره خام استخراج شده از ایزوله‌های میکرومونوسپورای جدا شده از خاک به صورت هاله ممانعت از رشد علیه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین و باسیلوس سرئوس

بحث

تقاضا برای آنتی‌بیوتیک‌های جدید با توجه به ظهور سریع پاتوژن‌های مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک که عامل عفونت‌های تهدیدکننده زندگی به حساب می‌آیند به رغم پیشرفت‌های قابل توجه در زمینه سنتز شیمیایی و مهندسی از ترکیبات ضد میکروبی هم‌چنان رو به افزایش است این تغییر الگوی بیماری و ظهور باکتری مقاوم به آنتی‌بیوتیک در حال حاضر به طور مداوم دانشمندان را برای جستجوی آنتی‌بیوتیک جدید ترغیب می‌کند. از هزاران متابولیت میکروبی شناخته شده حدود ۱۶۰-۱۵۰ ترکیب (۰/۲ الی ۰/۳ درصد) عملاً به‌طور موفق به اثبات رسیده‌اند (۱۸).

جنس میکرومونوسپورا یکی از اعضای اکتینومیسیت‌ها دارای رشد آهسته از ساکنان عادی خاک و محیط‌های آبی است، که برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها که از لحاظ اقتصادی مهم هستند را تولید می‌کند (۴).

به‌طور کلی اعضاء جنس میکرومونوسپورا بر اساس مورفولوژی، ویژگی‌های بیوشیمیایی و فعالیت‌های آنزیمی به خوبی از همدیگر متمایز نمی‌شوند و حتی با سایر جنس‌های دیگر خانواده میکرومونوسپوراسه‌آ نیز اشتباه می‌شوند. علاوه بر این شناسایی بر اساس روش‌های مرسوم مورد اشاره، نیازمند آزمایشگاه‌های مجهز بوده و باید وقت و هزینه گزافی صرف گردد (۶، ۱۶). در نتیجه در این مطالعه شناسایی و تمایز



شکل شماره ۲: نتایج PCR ژن 16S rRNA در نمونه‌های میکرومونوسپورا. شماره ۱ سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی، شماره‌های ۲-۸ نمونه‌ها شماره ۹ کنترل مثبت (*Micromonospora chalcea* IBRC-M10660)، شماره ۱۰ کنترل منفی (آب مقطر).

بررسی ایزوله‌هایی که به عنوان

میکرومونوسپورا با استفاده از تکثیر این ژن

جدا شدند نشان داد که این ایزوله‌ها به صورت

کلنی‌های نارنجی، پرتقالی تیره و سفید که بعداً

سیاه رنگ می‌شدند در محیط کشت تریپتیکاز

سوی آگار دیده شدند. (شکل شماره ۳).



شکل شماره ۳: کلنی‌های میکرومونوسپورا در محیط کشت تریپتیکاز سوی آگار

بررسی فعالیت ضد میکروبی ایزوله‌های

میکرومونوسپورا

از مجموع ۱۵ ایزوله میکرومونوسپورا جدا شده ۵ ایزوله دارای اثرات ضد میکروبی روی سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین^۸ ATCC 33591، باسیلوس سرئوس ATCC

^۸ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

در آگار روش بهتری برای تشخیص فعالیت ضد میکروبی در ایزوله‌هایی که فعالیت مشخصی ندارند است. در مطالعات قبلی، اغلب ایزوله‌های اکتینومیست از خاک‌های مناطق مختلف جدا شدند. که این مطالعه به منظور بررسی فعالیت ضد میکروبی میکرومونسپورا‌های بومی ایران، برای اولین بار صورت گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که خاک مناطق مختلف ایران می‌تواند به عنوان منبعی از میکرومونسپورا‌های فعال که توانایی تولید متابولیت‌های ضد میکروبی دارند، مورد مطالعه دقیق-تری قرار گیرد. چنانچه در این مطالعه متابولیت‌های استخراج شده از این ایزوله‌ها بر گونه‌های MRSA که یکی از معضلات جامعه پزشکی است اثر داشتند بنابراین می‌توان گفت با استخراج، خالص‌سازی و مطالعه دقیق‌تر متابولی‌های فعال میکرومونسپورا‌های ساکن در خاک مناطق مختلف کشورمان شاید بتوان آنتی‌بیوتیک‌های جدید و مناسب برای درمان بیماری‌های عفونی ناشی از میکروارگانیسم‌های مقاوم، را معرفی نمود.

ایزوله‌های جنس میکرومونسپورا از بقیه اکتینومیست‌ها مبتنی روش‌های مولکولی انجام شد. ارزیابی فعالیت ضد میکروبی نشان داد که ایزوله‌های جدا شده اثر مهار بر رشد باکتری‌های گرم مثبت داشتند ولی بر باکتری‌های گرم منفی اثری نداشتند که این موضوع را می‌توان به تفاوت‌های مورفولوژیکی بین این میکروارگانیسم‌ها نسبت داد که باکتری‌های گرم منفی با داشتن یک غشای پلی ساکاریدی بیرونی حاوی اجزای لیپوپلی ساکارید ممکن است دیواره سلولی نفوذناپذیرتری نسبت به باکتری‌های گرم مثبت که تنها دارای یک لایه پپتیدوگلیکان خارجی هستند داشته باشند (۱۵).

در مطالعه مشابه مگاری و همکاران در سال ۲۰۰۴ بر اساس ترکیبی از پارامترهای فیزیولوژیک، ویژگی‌های کموتاکسونومیک و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک بر اساس ژن 16S rRNA دو جنس جدید به نامهای سویه PNG1 و سویه UMM518 که در خانواده میکرومونسپوراسه آ قرار گرفتند را جدا کردند که با تست فعالیت بیولوژیکی تخمیر محصولات این اکتینومیست‌ها چندین فعالیت بر علیه پاتوژن-های گرم مثبت مقاوم به چند دارو، سلول‌های بدخیم و تکثیر ویروس واکسینا نشان دادند (۱۱).

پاندی^{۱۰} و همکاران در سال ۲۰۰۴ فعالیت ضد میکروبی اکتینومیست‌های جدا شده از خاک را در منطقه کابو^{۱۱} مورد مطالعه دادند که از مجموع ۱۰۶ اکتینومیست جدا شده دو نمونه در برابر باکتری‌های گرم منفی، ۸ نمونه در برابر باکتری-های گرم مثبت و ۲۶ نمونه در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی فعال بودند (۱۵) که بررسی فعالیت ضد میکروبی تمام ایزوله‌های اکتینومیست جدا شده یکی از تفاوت‌های این مطالعه با مطالعه ما که فقط روی میکرومونسپوراها بود است.

هم‌چنین از مقایسه داده‌های خاصیت ضد میکروبی با دو روش خطی و انتشار در آگار مشاهده شد که در روش خطی ایزوله‌ها ممانعت کمتری نسبت به رشد پاتوژنهای مورد بررسی نسبت به روش انتشار در آگار داشتند که می‌تواند ناشی از آزادسازی کم متابولیت ایزوله‌ها بر روی محیط کشت باشد، در حالی‌که در روش استخراج با اتیل استات متابولیت‌های باکتری جدا و مورد آزمایش قرار می‌گرفتند. در نتیجه می‌توان گفت روش انتشار

⁹ Magarvey

¹⁰ Pandey

¹¹ Khumbu

منابع

1. Berdy J. Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot (Tokyo)*. 2005;58(1):1-26.
2. Carlson S, Marler L, Nam S-J, Santarsiero BD, Pezzuto JM, Murphy BT. Potential Chemopreventive Activity of a New Macrolide Antibiotic from a Marine-Derived *Micromonospora* sp. *Mar drugs*. 2013;11(4):1152-61.
3. Das S, Ward LR, Burke C. Prospects of using marine actinobacteria as probiotics in aquaculture. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008; 81(3):419-29.
4. de Menezes AB, McDonald JE, Allison HE, McCarthy AJ. Importance of *Micromonospora* spp. as Colonizers of Cellulose in Freshwater Lakes as Demonstrated by Quantitative Reverse Transcriptase PCR of 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78(9):3495-9.
5. Hayakawa M, Nonomura H. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J Ferment Technol*. 1987; 65 (5): 501-509.
6. Hirsch AM, Valdés M. *Micromonospora*: An important microbe for biomedicine and potentially for biocontrol and biofuels. *Soil Biol Biochem*. 2010;42(4):536-42.
7. Igarashi Y, Trujillo ME, Martínez-Molina E, Yanase S, Miyanaga S, Obata T, Sakurai H, Saiki I, Fujita T, Furumai T. Antitumor anthraquinones from an endophytic actinomycete *Micromonospora lupini* sp. nov. *Bioorg Med Chem Lett*. 2007; 17(13):3702-5.
8. Ismet A, Vikineswary S, Paramaswari S, Wong WH, Ward A, Seki T, Fiedler HP, Goodfellow M. Production and Chemical Characterization of Antifungal Metabolites From *Micromonospora* sp. M39 Isolated From Mangrove Rhizosphere Soil. *World J Microbiol Biotechnol*. 2004; 20(5): 523-528.
9. Kim KS, Pai HS, Lee SY, Ryu DD. Effect of intercalating dyes on the production of antibiotics by *Micromonospora rosaria* and *Micromonospora purpurea*. *Enzyme Microb Technol*. 1990;12(8):564-70.
10. Li X, Zhou X, Deng Z. Isolation and characterization of *Micromonospora* phage Φ HAU8 and development into a phasmid. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70(7):3893-7.
11. Magarvey NA, Keller JM, Bernan V, Dworkin M, Sherman DH. Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70(12):7520-9.
12. Maldonado LA, Fragosó-Yáñez D, Pérez-García A, Rosellón-Druker J, Quintana ET. Actinobacterial diversity from marine sediments collected in Mexico. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2009;95(2):111-20.
13. Merzaeva O, Shirokikh I. Colonization of plant rhizosphere by actinomycetes of different genera. *Microbiology*. 2006;75(2):226-30.
14. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *J Nat Prod* 2007;70(3):461-77.
15. Pandey B, Ghimire P, Agrawal VP. Studies on the antibacterial activity of the actinomycetes isolated from the Khumbu region of Nepal. *J Biol Sci*. 2004;23:44-53.
16. Qiu D, Ruan J, Huang Y. Selective isolation and rapid identification of members of the genus *Micromonospora*. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74(17):5593-7.
17. Saraswathi M, Mallikarjuna N. Antibacterial activity of actinomycetes against bacterial pathogens of diabetic foot ulcers. *Journal of Applied and Natural Science*. 2013;5(2):335-7.

18. Selvameenal L, Radhakrishnan M, Balagurunathan R. Antibiotic pigment from desert soil actinomycetes; biological activity, purification and chemical screening. *Indian J Pharm Sci.* 2009;71(5):499.
19. Shomura T, Nishizawa N, Iwata M, Yoshida J, Ito M, Amano S, Koyama M, Kojima M, Inouye S. Studies on a new nucleoside antibiotic, dapiramicin. I. Producing organism, assay method and fermentation. *J Antibiot.* 1983; 36(10):1300-4.
20. Stackebrandt E, Rainey FA, Ward-Rainey NL. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1997;47(2):479-91.
21. Suarez JE, Hardisson C. Morphological characteristics of colony development in *Micromonospora chalcea*. *J Bacteriol.* 1985;162(3):1342-4.
22. Taechowisan T, Peberdy JF, Lumyong S. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. *World J Microbiol Biotechnol*, 2003; 19(4):381-85.
23. Thawai C, Tanasupawat S, Itoh T, Suwanborirux K, Suzuki K-i, Kudo T. *Micromonospora eburnea* sp. nov., isolated from a Thai peat swamp forest. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2005;55(1):417-22.
24. Xie Q-y, Qu Z, Lin H-p, Li L, Hong K. *Micromonospora haikouensis* sp. nov., isolated from mangrove soil. *Antonie van Leeuwenhoek.* 2012;101(3):649-55.
25. Zenova G, Zvyagintsev D. Actinomycetes of the genus *Micromonospora* in meadow ecosystems. *Microbiology.* 2002;71(5):570-4.
26. Zhang J, Zhang L. Improvement of an Isolation Medium for Actinomycetes. *Modern Applied Science.* 2011; 5(2).
27. Zhao H, Kassama Y, Young M, Kell DB, Goodacre R. Differentiation of *Micromonospora* isolates from a coastal sediment in Wales on the basis of Fourier transform infrared spectroscopy, 16S rRNA sequence analysis, and the amplified fragment length polymorphism technique. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(11):6619-27.