

مقاله پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

دوره ۱۸، دی ۱۳۹۸، ۱۰۳۴-۱۰۱۷

افزایش اثرات ضد میکروبی آنتی بیوتیک‌های استاندارد در ترکیب با متابولیت‌های فعال جدا شده از استرپتومیسیت‌های دریایی: یک مطالعه آزمایشگاهی

حامد نوروزی^۱، محمد ربانی خوراسگانی^۲، ابوالقاسم دانش^۳

دریافت مقاله: ۹۷/۸/۱۹ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۷/۱۱/۱۵ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۸/۳/۲۶ پذیرش مقاله: ۹۸/۴/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: استفاده از مخلوط داروها به عنوان یکی از راه‌های غلبه بر مشکل مقاومت میکروبی مدنظر است. در این تحقیق اثرات ضد میکروبی ترکیبات فعال تولید شده توسط استرپتومیسیت‌های دریایی در ترکیب با چند آنتی بیوتیک استاندارد علیه پاتوژن‌های مقاوم به دارو بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در مطالعه آزمایشگاهی حاضر، قابلیت سویه‌های جدا شده از دریای مازندران در تولید مواد ضد میکروبی بر علیه پاتوژن‌های مقاوم به دارو با روش دیسک دیفیوژن ارزیابی شد. سپس گونه‌های تولیدکننده در محیط کشت مایع مناسب کشت داده شدند. آنگاه حداقل غلظت مهارکنندگی (Minimum inhibitory concentration; MIC) و حداقل غلظت کشندگی (Minimum bactericidal concentration; MBC) عصاره‌های اتیل استاتی با روش میکروبراث دایلوژن بر روی سویه‌های مقاوم به داروی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سلین (MRSA) و انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین (VRE) تعیین شد. داده‌ها با استفاده از آزمون t زوجی آنالیز شدند.

یافته‌ها: در غربال‌گری اولیه، سویه‌های MN2، MN39، MN40 و MN41 فعالیت ضد میکروبی وسیعی بر علیه MRSA، VRE، سالمونلا تیفی و سودوموناس آئروژینوزا از خود نشان دادند که از بین آن‌ها، بهترین مقدار MIC برای ایزوله MN39 با ۲۸۰ میکروگرم بر میلی لیتر علیه MRSA به دست آمد. این عصاره‌ها در ترکیب با برخی از آنتی بیوتیک‌های استاندارد اثرات افزایشنده و در برخی موارد اثرات کاهنده قابل ملاحظه‌ای علیه پاتوژن‌های مقاوم به دارو داشتند.

نتیجه‌گیری: ترکیبات فعال تولید شده توسط اکتینومیسیت‌ها، می‌توانند خاصیت ضد میکروبی قابل توجهی در ترکیب با آنتی بیوتیک‌های استاندارد بر علیه پاتوژن‌های مقاوم به دارو داشته باشند که نیازمند بررسی‌های بیشتر در پژوهش‌های آینده می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: استرپتومیسیت‌های دریایی، پاتوژن مقاوم به دارو، اثر ضد میکروبی

۱- دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۳- نویسنده مسئول) استادیار مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم نوین دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

تلفن: ۰۵۱-۳۱۸۰۱۲۰۲، دورنگار: ۰۵۱-۳۸۸۲۳۲۵۱، پست الکترونیکی: DaneshA@mums.ac.ir

مقدمه

امروزه افزایش مقاومت باکتری‌های بیماری‌زا به درمان توسط آنتی‌بیوتیک‌های رایج به یک مشکل جهانی تبدیل شده است. در نتیجه ارائه راهکار مناسب برای مقابله با پدیده پاتوژن‌های مقاوم به دارو در جهت درمان مؤثرتر از اهمیت زیادی برخوردار است [۳-۱]. اهمیت بالای این مسئله، انگیزه زیادی برای جستجو و ارائه ترکیبات ضد میکروبی به‌ویژه با منشأ طبیعی برای پژوهش‌گران فراهم آورده است [۳-۴].

در سال‌های اخیر به دلیل نیاز به داروهای جدید در درمان بیماری‌ها، به‌خصوص مقابله با پاتوژن‌های مقاوم به دارو، ترکیبات طبیعی با منشأ باکتری‌های دریایی به عنوان منبع جدید با پتانسیل بالا در تولید متابولیت‌های فعال، مورد توجه قرار گرفته‌اند [۷-۵]. بروز مقاومت دارویی در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *انتروکوکوس فکالیس* باعث بروز مشکلات جدی در سراسر جهان شده است. لذا نیاز به داروهای ضدباکتریایی جدید و مؤثر به یک چالش عمده در صنعت داروسازی تبدیل شده است [۸-۱۰].

متابولیت‌های ثانویه زیادی توسط میکروارگانیسم‌های دریایی تولید می‌شود که در این بین اکتینومیسیت‌ها و به‌خصوص جنس *استرپتومایسس*، قابلیت بالایی در تولید متابولیت‌های ثانویه فعال دارند و به عنوان یک منبع جدید از متابولیت‌های زیستی در بیوتکنولوژی و داروسازی معرفی شده است [۱۱-۱۳]. تعداد زیادی از این ترکیبات تولید شده

توسط *استرپتومیسیت‌های دریایی* به عنوان منابع جدید

دارویی در نظر گرفته می‌شوند [۱۶-۱۴].

یکی از روش‌های درمان، بررسی اثرات متقابل دارویی و کشف روابط بین آن‌ها می‌باشد. در مجموع استفاده از ترکیبات فعال تولید شده با منشأ طبیعی توسط باکتری برای کنترل و درمان عفونت‌های باکتریایی می‌تواند چه به‌صورت تنها یا همراه با آنتی‌بیوتیک‌های موجود، باعث کاهش مصرف داروهای شیمیایی و عوارض ناشی از آن گردد [۱۷]. در کشور ما نیز مطالعات زیادی برای بررسی اثرات متقابل دارویی (اثرات سینرژیستی و آنتاگونیستی) آنتی‌بیوتیک‌های موجود با ترکیبات فعال ضد میکروبی جدا شده از مناطق مختلف گزارش شده است [۷-۱۸]. اما تاکنون هیچ مطالعه‌ای بر روی اثرات متقابل دارویی ترکیبات فعال تولید شده توسط *استرپتومیسیت‌های بستر دریای مازندران* بر روی میکروب‌های بیماری‌زای مقاوم به دارو صورت نگرفته است. هدف از این تحقیق، تعیین اثرات متقابل دارویی آنتی‌بیوتیک‌های موجود با ترکیبات فعال تولید شده توسط *استرپتومیسیت‌های رسوبات بستر دریای مازندران*، بر روی پاتوژن‌های مقاوم به دارو مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر یک مطالعه آزمایشگاهی است که بر روی پاتوژن‌های مقاوم به دارو در آزمایشگاه میکروبی‌شناسی دانشکده داروسازی مشهد از فروردین ماه تا شهریور ماه ۱۳۹۷ انجام گرفت. در این مطالعه از *استرپتومیسیت‌های جدا*

آلمان) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری و جهت انجام مراحل بعدی استفاده شدند [۳]. برای غربال‌گری اولیه جهت انتخاب بهترین استرپتومیسیت‌های فعال علیه پاتوژن‌های مقاوم به دارو، از روش Cross Streak استفاده شد. بدین‌صورت که هر سویه در مرکز پلیت نوترینت آگار به‌صورت یک خط مستقیم کشت داده شد و بعد پلیت‌ها به مدت ۳ روز در ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. سویه‌های بیماری‌زای مقاوم مورد مطالعه به‌صورت یک خط عمود بر خط اصلی، کشت داده شدند. پلیت‌ها دوباره به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، گرماگذاری شدند. سپس قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر با استفاده از کولیس (iInsize، ساخت اتریش) در سه جهت اندازه‌گیری شد. بهترین سویه‌ها از نظر فعالیت ضدباکتریایی برای مرحله بعد انتخاب شدند [۱۴].

استرپتومیسیت‌های دارای بهترین فعالیت در مرحله غربال‌گری اولیه جهت استخراج متابولیت‌های ضدباکتریایی، در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط مایع Actinomycete Isolation Medium (شامل ۱۵ گرم آگار، ۵ گرم گلیسرول، ۴ گرم سدیم پروپیونات، ۲ گرم سدیم کازئینات، ۰/۵ گرم پتاسیم فسفات، ۰/۱ گرم آسپارژین، ۰/۱ گرم منیزیم سولفات، ۰/۰۰۱ گرم سولفات آهن) تلقیح شدند [۱۴]. برای تولید ترکیبات ضدباکتریایی، ارلن‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در گرم‌خانه شیکردار (JTSDL40، ژال تجهیز، ساخت ایران) با سرعت ۱۸۰ دور بر دقیقه قرار داده شدند. پس از چند روز، سوسپانسیون میکروبی را در $16000 \times g$ به مدت ۱۰

شده قبلی توسط Mohseni و همکارش استفاده شد [۱۹]. از بین آن ایزوله‌ها، تعداد ۱۰ ایزوله فعال که به عنوان استرپتومایسس شناسایی شده بودند، جهت بررسی فعالیت سینرژیستی متابولیت‌های فعال تولید شده انتخاب شدند. جهت احیای جدایه‌ها از ذخیره هر ایزوله در دمای ۸۰- درجه در گرمخانه (Memmert، ساخت آمریکا)، یک لوپ در محیط کشت اختصاصی Starch Casein Agar (SCA) که محتوی ۱۵ گرم آگار، ۱۰ گرم نشاسته محلول، ۲ گرم پتاسیم فسفات، ۲ گرم پتاسیم نترات، ۲ گرم سدیم کلرید، ۰/۳ گرم کازئین، ۰/۰۵ گرم منیزیم سولفات ۷ آبه، ۰/۰۲ گرم کلسیم کربنات، ۰/۰۱ گرم سولفات آهن ۷ آبه و یک لیتر آب دریای فیلتر شده (برای افزایش احتمال جداسازی استرپتومیسیت‌ها) در $pH=7/5$ می‌باشد، به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه کشت داده شدند. پس از رشد برای مراحل بعد در سطح شیب‌دار محیط کشت SCA رشد داده و در دمای ۴ درجه نگهداری شدند [۱۹].

در این پژوهش از سویه‌های استاندارد شامل *سالمونلا تیفی* (ATCC 3311 (*Salmonella typhi*), *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; MRSA) ATCC 33591 *سودوموناس آئروجینوزا* (ATCC 2108 (*Pseudomonas aeruginosa*) و *انتروکوکوس فاسیوم* (ATCC 700221 *faecium*) خریداری شده توسط آزمایشگاه کنترل میکروبی دانشکده داروسازی مشهد استفاده شد. سویه‌های مورد مطالعه در محیط کشت نوترینت آگار (مرک،

بر روی باکتری MRSA تست ضد میکروبی به روش دیسک دیفیوژن انجام شد. از آنتی‌بیوتیک ونکوماسین به عنوان کنترل مثبت، دیسک بلانک به عنوان کنترل منفی استفاده شد. هر تست با سه بار تکرار صورت گرفت و ارتباط تولید ماده ضد میکروبی با رشد باکتری در واحد زمان به صورت یک نمودار گزارش شد [۲۱].

پاتوژن‌های مقاوم به دارو در محیط کشت نوترینت براث کشت داده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. پس از ۲۴ ساعت، کدورت هر کدام از نمونه‌ها در ۶۰۰ نانومتر (OD_{600}) با استفاده از نرمال‌سالی‌ن استریل در حدود ۰/۱۲۸ تنظیم شد. حداقل غلظت مهارکنندگی (Minimum inhibitory concentration; MIC) در پلیت ۹۶ خانه استریل و با روش میکروبراث دایلوشن (Microbroth dilution) تعیین شد [۲۲]. ابتدا از عصاره فعال خشک شده هر جدایه یک محلول استوک با غلظت ۵ تا میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در ۲۵۰ میکرولیتر حلال اتیل استات تهیه شد. پس از آن به صورت متوالی رقیق سازی دو برابر در محدوده غلظت ۵ تا ۰/۰۳۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در محیط مایع مولر هینتون (مرک، آلمان) آماده شد. از هر رقت ۱۸۰ میکرولیتر به هر چاهک (هر رقت سه تکرار) اضافه شد و در نهایت از سوسپانسیون باکتری‌های مقاوم (نیم مک فارلند با) ۲۰ میکرولیتر به هر رقت اضافه شد. از محیط کشت بدون باکتری به عنوان کنترل منفی، آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون (Memmert، ساخت آمریکا)

دقیقه سانتریفوژ (پارس آزما، ساخت ایران) شد و سپس مایع بالای جدا و فیلتر (کاغذ واتمن ۴، ساخت آمریکا) شد. با توجه به حلالیت ترکیبات ضد میکروبی در حلال‌های آلی، برای استخراج متابولیت‌های ثانویه ضدباکتریایی از حلال آلی اتیل‌استات استفاده شد [۲۰]. یک‌برابر حجم سوپرناتانت به دست آمده از هر سویه، اتیل‌استات به آن اضافه شد. فاز آلی دارای ترکیبات فعال، توسط دکانتور جدا و به کمک روتاری (دورسا، ساخت ایران) تغلیظ شد. سپس عصاره‌ها خشک شد و از عصاره خام استخراج شده برای بررسی فعالیت ضد میکروبی سویه‌های مقاوم به دارو استفاده شد [۲۰].

اندازه‌گیری مقدار تولید ماده ضد میکروبی در زمان‌های مختلف رشد باکتری در شرایط فرمانتاسیون با استفاده از روش انتشار دیسک دیفیوژن بر روی باکتری MRSA بررسی شد. ابتدا از سوسپانسیون ایزوله‌های دریایی که ۲۴ ساعت رشد کرده‌اند به محیط کشت فرمانتاسیون (شامل ۵ گرم گلیسرول، ۴ گرم سدیم پروپیونات، ۲ گرم سدیم کازئینات، ۰/۵ گرم پتاسیم فسفات، ۰/۱ گرم آسپارژین، ۰/۱ گرم منزیم سولفات، ۰/۰۰۱ گرم سولفات آهن) به میزان ۵٪ (v/v) تلقیح شد. ارلن فاقد باکتری تلقیح شده به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. ارلن‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ روز گرماگذاری شدند. در طول این مدت در بازه‌های زمانی ۶ ساعته از ارلن‌ها در شرایط استریل نمونه‌گیری شد و میزان کدورت آن‌ها در ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (OD_{600}) و پس از سانتریفوژ، از مایع بالای

آنتی‌بیوتیک هر دیسک از لحاظ وزنی در نظر گرفته شد [۲۰].

جهت بررسی اثرات متقابل دارویی عصاره خام سویه‌های فعال ابتدا از پاتوژن‌های مقاوم روی سطح محیط کشت مولر هینتون آگار یک کشت چمنی داده شد. سپس بر روی هر پلیت ۴ دیسک قرار داده شد. دیسک‌ها شامل دیسک‌های حاوی آنتی‌بیوتیک استاندارد (۶ میلی‌متر، پادتن، ایران)، دیسک‌های حاوی عصاره خام (۶ میلی‌متر، پادتن، ایران)، دیسک‌های حاوی ترکیب آنتی‌بیوتیک استاندارد و آغشته به عصاره خام هر کدام از سویه‌های فعال (قطر ۶ میلی‌متر، پادتن، ایران) و دیسک حاوی حلال اتیل استات به عنوان کنترل منفی بودند. برای هر تست سه بار تکرار در نظر گرفته شد. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند. سپس هاله عدم رشد (Inhibition Zone Diameter; IZD) برحسب میلی‌متر اندازه‌گیری و ثبت شد [۱۹-۲۰].

جهت مشخص شدن میانگین، انحراف معیار قطر هاله عدم رشد هر عصاره از نرم افزار Microsoft Excel نسخه ۲۰۱۰ استفاده شد. همچنین آنالیز و رسم منحنی تولید ماده ضد میکروبی در واحد زمان از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۷ استفاده شد و داده‌ها برای هر مخلوط (دارو+ عصاره) جداگانه با آزمون t زوجی با سطح معنی‌داری ($P < 0/05$) تجزیه و تحلیل شد.

در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، میزان رشد باکتری با استفاده از تترازولیوم کلراید (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride; TTC) بررسی شد. ۲۰ میکرولیتر از محلول ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر TTC به هر چاهک اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. غلظت آخرین چاهک که هیچ تغییر رنگ در آن وجود ندارد به عنوان MIC در نظر گرفته شد. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی (Minimum inhibitory concentration; MIC) از هر کدام از رقت‌هایی که باکتری هیچ کدورتی در آن نشان نداده بود، با کمک لوپ بر روی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت کم‌ترین غلظتی که در آن هیچ رشد باکتری مشاهده نشد، به عنوان حداقل غلظت کشندگی گزارش شد [۲۳].

بررسی اثرات متقابل عصاره خام حاصل از استرپتومیسیت‌های فعال جدا شده، به روش انتشار دیسک انجام شد [۳، ۲۰]. عصاره‌های خشک شده حاصل از هر سویه در ۵۰۰ میکرولیتر اتیل استات حل شد و اثرات آن‌ها علیه پاتوژن‌های استاندارد مقاوم به دارو شامل *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اورئوس*، *مقیوم*، *به متی سیلین* و *انتروکوکوس فاسیوم* مقاوم به ونکومایسین بررسی شد و با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک وانکومایسین (۳۰ میکروگرم)، سفالوتین (۳۰ میکروگرم)، آمپی سیلین (۱۰ میکروگرم)، جنتامیسین (۱۰ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم) و اگزاسیلین (۱ میکروگرم) اثرات ترکیبی آزمایش شد. برای این امر مقدار عصاره اضافه شده به هر دیسک برابر با مقدار

نتایج

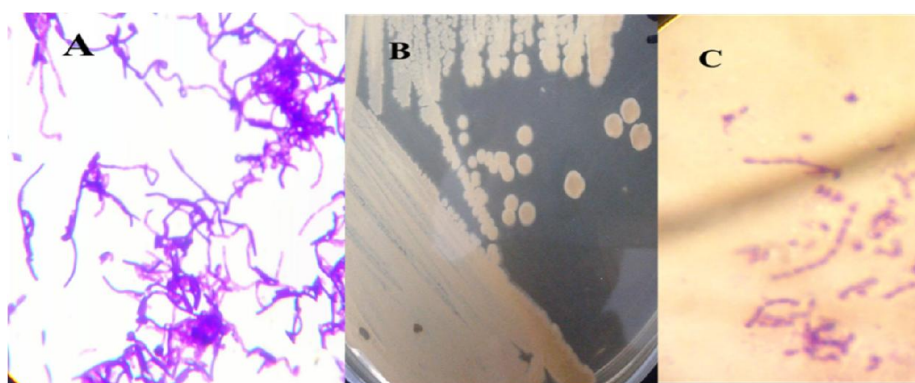
داده شده است. از بین این جدایه‌های فعال، تعداد ۴ جدایه با بهترین خاصیت ضد میکروبی به نام‌های MN39، MN2، MN40 و MN41 برای غربالگری ثانویه و ادامه کار انتخاب شدند. نتایج رنگ‌آمیزی، بررسی میکروسکوپی (میکروسکوپ نوری نیکون، ساخت ژاپن) و ماکروسکوپی (شکل و رنگ) کلنی‌ها ثبت شد (شکل ۱).

برای شناسایی سویه‌های فعال علیه پاتوژن‌های مقاوم به دارو، از بین ۱۰ سویه جدا شده از رسوبات بستر دریای مازندران، غربالگری باروش Cross Streak انجام شد. نتایج نشان داد همه سویه‌ها دارای فعالیت ضد میکروبی علیه حداقل یک باکتری پاتوژن مقاوم به دارو بودند. نتایج فعالیت ضد باکتریایی حاصل از غربالگری اولیه در جدول ۱ نشان

جدول ۱- غربالگری اولیه استرپتومیسیت‌های جدا شده از رسوبات بستر دریای خزر با روش cross-streak در سال ۱۳۹۷

جدایه‌ها	باکتری‌های بیماری‌زا			
	VRE	MRSA	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Pseudomonas. aeruginosa</i>
MN1	-	+	+	+
MN2	+	+	+	+
MN3	-	+	-	+
MN8	-	+	-	+
MN18	-	+	-	+
MN37	-	-	-	+
MN39	+	+	+	+
MN40	+	+	+	+
MN41	+	+	+	+
MN44	+	-	+	-

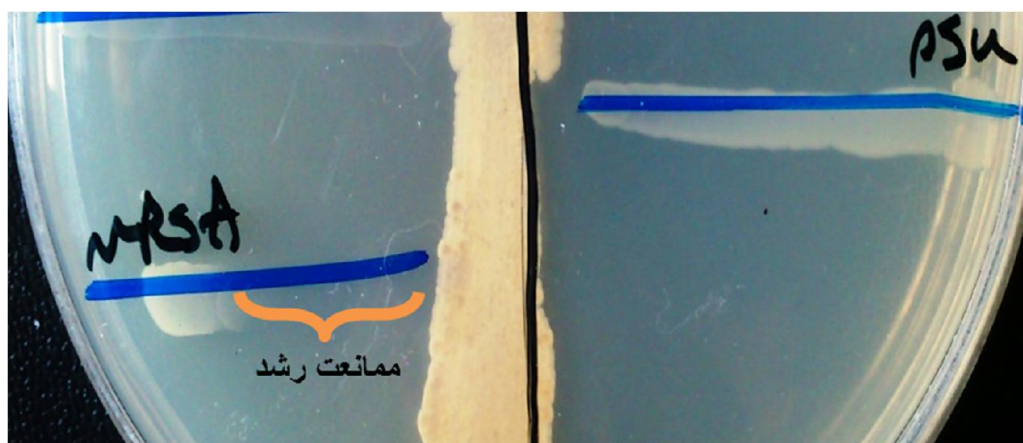
+: واجد فعالیت ضد باکتریایی؛ -: فاقد فعالیت ضد باکتریایی؛ MRSA (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*); VRE (*Vancomycin-resistant Enterococcus faecium*)



شکل ۱- سویه MN40 جدا شده از رسوبات بستر دریای مازندران: رنگ و شکل کلنی استرپتومیسیت رشد کرده بر روی محیط کشت اختصاصی SCA (A)، تصویر میکروسکوپی میسلیم (B) و وضعیت اسپور به شکل زنجیره‌ای (C).

برعلیه سودوموناس آئروجینوزا (میلی متر $17/1 \pm 0/2$) و سالمونلا تیفی (میلی متر $18/2 \pm 0/3$) بود درحالی که جدایه MN39 بیشترین فعالیت را علیه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (میلی متر $24/0 \pm 0/1$) و سالمونلا تیفی (میلی متر $23/2 \pm 0/4$) داشت. جدایه MN41 دارای فعالیت گسترده‌ای برعلیه سه میکروب استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (میلی متر $28/1 \pm 0/4$)، سودوموناس آئروجینوزا (میلی متر $17/3 \pm 0/3$) و انتروکوکوس مقاوم به ونکومایسین (میلی متر $21/0 \pm 0/1$) بود.

چهار جدایه منتخب توانستند اثر مهارى بر رشد تمام سویه‌های بیماری‌زا (MRSA، VRE، سالمونلا تیفی و سودوموناس آئروجینوزا) از خود به‌جای گذارند. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود متابولیت‌های تولید شده توسط جدایه MN41 از رشد باکتری‌های پاتوژن ممانعت به‌عمل آورده است و هاله عدم رشد به‌وضوح دیده می‌شود. نتایج غربال‌گری اولیه نشان داد جدایه‌های فعال، دارای خاصیت ضد باکتریایی بیشتری علیه باکتری‌های گرم مثبت نسبت به گرم منفی بودند (جدول ۱). در این آزمایش جدایه MN2 و MN40 بیشترین هاله عدم رشدی که ایجاد کردند، به‌ترتیب



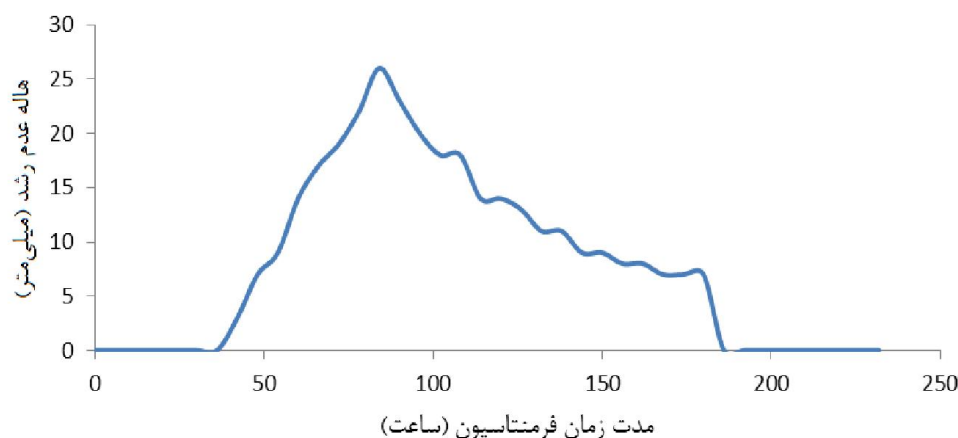
شکل ۲- غربالگری اولیه با روش cross-streak. برای جدایه MN41. ممانعت از رشد پاتوژن‌ها (MRSA و سودوموناس) با تولید متابولیت‌های ضد باکتریایی و انتشار در محیط کشت به صورت یک خط مستقیم بدون رشد باکتری پاتوژن مشاهده شد.

شروع فرمنتاسون می‌باشد که هاله عدم رشدی برابر با ۲۴ میلی‌متر ایجاد کرده است. نتایج نشان می‌دهد که پس از حدود ۱۰ ساعت میکروب شروع به رشد کرده ولی فعالیت ضد میکروبی عصاره باکتریایی در ۴۲ ساعت اول صفر بوده و پس از آن تولید ماده ضد میکروبی شروع شده است که تا

میزان تولید ماده فعال برعلیه میکروب MRSA با نمونه‌گیری از سوسپانسیون میکروبی در حال رشد در محیط مایع فرمنتاسیون در واحد زمان مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که در نمودار ۱ دیده می‌شود بیشترین مقدار تولید ماده ضد میکروبی بر حسب هاله عدم رشد ۸۴ ساعت پس از

آن وارد مرحله ثابت (*Stationary phase*) شده که پس از گذشت ۱۳۰ ساعت از زمان تلقیح اولیه میزان مرگومیر فزونی می‌یابد.

۸۴ ساعت هم‌زمان با رشد باکتری میزان تولید متابولیت فعال روند افزایشی داشته و به اوج می‌رسد و پس از آن فعالیت ضد میکروبی روندی کاهشی داشته در حالی که رشد میکروب تا حدود ۱۰۰ ساعت روند افزایشی پیموده و پس از



نمودار ۱- تولید ماده ضد میکروبی فعال بر علیه MRSA توسط سویه MN41 در واحد زمان

میکروگرم بر میلی‌لیتر) و بهترین MBC توسط ایزوله فعال MN39 علیه VRE با مقدار ۵۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.

نتایج حاصل از آزمایش رقت‌سازی در چاهک (جدول ۲) بیانگر این بود که اثر مهارکنندگی و کشندگی سویه فعال MN41 در مقایسه با سایر ایزوله‌های فعال بهتر می‌باشد. بهترین MIC علیه MRSA توسط ایزوله فعال MN41 (۲۸۰)

جدول ۲- تست MIC و MBC عصاره خام ایزوله‌های فعال علیه سویه‌های مقاوم به دارو در دانشکده داروسازی مشهد در سال ۱۳۹۷

MBC (میکروگرم بر میلی‌لیتر)		MIC (میکروگرم بر میلی‌لیتر)		عصاره ایزوله فعال
MRSA	VRE	MRSA	VRE	
۵۸۲	۶۱۵	۳۲۵	۳۲۰	MN41
۶۱۰	۶۸۵	۳۱۰	۳۳۰	MN40
۶۳۰	۵۳۰	۲۸۰	۳۰۰	MN39
۶۰۰	۷۱۰	۳۰۰	۳۸۵	MN2

MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*); VRE (Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*)

جدول ۳- اثرات ترکیبی عصاره خام با آنتی بیوتیک‌ها علیه MRSA با استفاده از اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد (برحسب میلی‌متر) در روش انتشار دیسک در دانشکده داروسازی مشهد در سال ۱۳۹۷

عصاره‌های سویه‌های فعال					قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)	
MN2	MN39	MN40	MN41			
۲۶/۰ ± ۰/۳	۲۴/۰ ± ۰/۲	۲۵/۰ ± ۰/۱	۲۸/۰ ± ۰/۲			
۷/۱ ± ۰/۱	۸/۱ ± ۰/۱	۱۰/۱ ± ۰/۱	۴۲/۱ ± ۰/۳	۱۳/۰ ± ۰/۳	وانکومايسين	
۸/۰ ± ۰/۱	۸/۲ ± ۰/۱	۴۰/۲ ± ۰/۲ (P<۰/۰۰۱)	۷/۱ ± ۰/۱	۱۰/۱ ± ۰/۴	سفالوتين	
۳۸/۱ ± ۰/۱ (P<۰/۰۰۱)	۴۰/۰ ± ۰/۲ (P<۰/۰۰۱)	۷/۳ ± ۰/۱	۴۰/۰ ± ۰/۳ (P<۰/۰۰۱)	۷/۰ ± ۰/۲	آمپي سيلين	آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد
۱۲/۰ ± ۰/۲	۹/۱ ± ۰/۲	۸/۱ ± ۰/۱	۴۱/۱ ± ۰/۲	۱۲/۳ ± ۰/۱	جنتاميسين	
۹/۲ ± ۰/۱	۴۰/۱ ± ۰/۲ (P<۰/۰۰۱)	۱۱/۲ ± ۰/۳	۱۱/۱ ± ۰/۱	۱۱/۱ ± ۰/۳	اگزاسيلين	
۱۰/۰ ± ۰/۲	۳۸/۰ ± ۰/۱ (P<۰/۰۰۱)	۳۷/۱ ± ۰/۲ (P<۰/۰۰۱)	۴۱/۲ ± ۰/۳	۱۰/۱ ± ۰/۱	اریترومايسين	

سطح معناداری (P value): میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) هر عصاره با میانگین قطر هاله عدم رشد حالت مخلوط (دارو+عصاره) با آزمون t زوجی مقایسه شده است.

میانگین عصاره سویه‌ها در حالت تنها و مخلوط با آنتی‌بیوتیک با آزمون t زوجی با سطح معنی‌داری $P<۰/۰۱$ بررسی شد.

همان‌طور که در جدول ۴ نشان داده شده است برخلاف MRSA، عصاره خام MN40 در بین سویه‌های فعال اثرات هم‌افزایی بهتری در ترکیب با بیش‌تر آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد از خود نشان داد. در این جدول نیز مقایسه

۱۰۲۶ افزایش اثرات ضد میکروبی آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد در ترکیب با متابولیت‌های فعال جدا شده ...

جدول ۴- اثرات ضد میکروبی ترکیبی عصاره خام با آنتی‌بیوتیک‌ها علیه VRE با استفاده از اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد (بر حسب میلی‌متر) در روش انتشار دیسک در دانشکده دوا سازی مشهد در سال ۱۳۹۷

عصاره‌های سوبه‌های فعال				قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)	
MN2	MN39	MN40	MN41		
۲۰/۲ ± ۰/۳	۲۷/۰ ± ۰/۲	۲۲/۱ ± ۰/۱	۲۶/۱ ± ۰/۲		
۳۸/۰ ± ۰/۱	۳۹/۲ ± ۰/۱	۳۸/۰ ± ۰/۱	۳۸/۲ ± ۰/۳	۸/۱ ± ۰/۳	وانکومايسين
(P<۰/۰۰۱)	(P<۰/۰۰۱)	(P<۰/۰۰۱)			
۱۰/۱ ± ۰/۱	۱۴/۱ ± ۰/۱	۱۰/۱ ± ۰/۲	۱۰/۱ ± ۰/۱	۱۴/۲ ± ۰/۴	سفالوتين
۷/۱ ± ۰/۱	۳۸/۲ ± ۰/۲	۳۸/۲ ± ۰/۱	۳۷/۲ ± ۰/۳	۱۰/۰ ± ۰/۲	آمپي سيلين
	(P<۰/۰۰۱)	(P<۰/۰۰۱)			
۳۵/۲ ± ۰/۲	۴۰/۱ ± ۰/۲	۳۸/۱ ± ۰/۱	۴۰/۱ ± ۰/۲	۱۳/۱ ± ۰/۱	جنتاميسين
(P<۰/۰۰۱)	(P<۰/۰۰۱)	(P<۰/۰۰۱)			
۱۰/۱ ± ۰/۱	۴۰/۲ ± ۰/۲	۴۰/۰ ± ۰/۳	۳۹/۲ ± ۰/۱	۱۲/۰ ± ۰/۳	اگزاسيلين
	(P<۰/۰۰۱)	(P<۰/۰۰۱)			
۳۸/۳ ± ۰/۲	۱۰/۰ ± ۰/۱	۳۸/۲ ± ۰/۲	۱۳/۱ ± ۰/۳	۱۳/۳ ± ۰/۱	اريتروميسين
(P<۰/۰۰۱)		(P<۰/۰۰۱)			

آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد

سطح معناداری (P value): میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) هر عصاره با میانگین قطر هاله عدم رشد حالت مخلوط (دارو+عصاره) با آزمون t زوجی مقایسه شده است.

بحث

بشر را با یک تهدید بزرگ در زمینه درمان و کنترل عوامل میکروبی مواجه کند که ممکن است یک عفونت کوچک به دلیل مقاومت میکروب به داروهای رایج و از طرفی نبودن داروهای مؤثرتر، تبدیل به یک بیماری کشنده در سراسر جهان شود [۲۵، ۲۰-۱۹].

پژوهش‌های اخیر نشان می‌دهد که تعامل سیستم‌های ژنتیکی میکروب‌ها با عوامل محیطی، قادر به برنامه‌ریزی برای حفظ حیات آن‌ها می‌باشد. در نتیجه مواجهه میکروب‌ها با آنتی‌بیوتیک‌ها، باعث ظهور گونه‌های مقاوم باکتریایی می‌شده است [۲۴، ۱۸-۱۷]. این موضوع می‌تواند

ترکیبات فعال جدا شده از استرپتومایسس‌های دریایی جدا شده از دریای سرخ اثرات آنتاگونیستی خوبی بر روی MRSA دارد. نتایج حاصل از این پژوهش در غربالگری اولیه نیز نشان دهنده این واقعیت بود [۳۱].

Gurung و همکاران گزارش کردند که بیش‌ترین قطر هاله عدم‌رشد ترکیبات تولید شده ایزوله‌های اکتینومیست‌های آن‌ها ۲۰ میلی‌متر علیه باکتری‌های پاتوژن تست شده بود، هرچند در مطالعه ما بیش‌ترین قطر هاله عدم رشد ۲۸ میلی‌متر اندازه‌گیری شد [۳۲]. Sibanda و همکاران نشان دادند که ترکیبات فعال جدا شده از ایزوله‌های استرپتومیست اثرات بهتری بر روی باکتری‌های گرم منفی نسبت به گرم مثبت دارند، درحالی‌که نتایج حاصل از غربالگری اولیه در پژوهش ما نشان داد که ترکیبات فعال زیستی تولیدشده توسط ایزوله‌های فعال، اثرات ضد میکروبی بیشتری بر روی باکتری‌های گرم‌مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی دارند [۲۶].

یکی از راه‌های غلبه بر مشکل مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، استفاده هم‌زمان از چند داروی ضد میکروبی است به‌صورتی که اثرات هم‌افزایی با هم داشته باشند [۳۵-۳۳]. Danesh و همکاران نشان دادند که ماده فعال جدا شده از باکتری‌های نمک دوست شرق آفریقا اثرات هم‌افزایی قابل ملاحظه‌ای با آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل بر علیه پاتوژن‌های مهم کلینیکی داشتند [۳۶]. Nanda و Zarina گزارش کردند که نانوپارتنیکل نقره جدا شده از سویه *Streptomyces Albaduncus* باعث افزایش ۳۸ درصدی و

با توجه به این که در سرتاسر دنیا هنوز تعدادی از بیماری‌ها با منشاء میکروبی وجود دارد که داروی مؤثری علیه آن‌ها موجود نیست، در حال حاضر هنوز هم جستجو و شناسایی متابولیت‌های فعال تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها می‌تواند در تولید آنتی‌بیوتیک‌های جدید و درمان پاتوژن‌های مقاوم زمینه مناسبی برای تحقیقات کاربردی پژوهش‌گران به‌شمار آید [۲۷-۲۶، ۳].

در این بین کشف و توسعه عوامل ضد میکروبی جدید از متابولیت‌های ثانویه تولید شده توسط باکتری‌ها و تعیین روابط دارویی آن‌ها از جایگاه ویژه‌ای برای مقابله با پاتوژن‌های مقاوم به دارو برخوردار است. شرکت‌های داروسازی در حال حاضر به دنبال انتخاب داروهای جایگزین از منابع طبیعی مثل محیط‌های دریایی و میکروارگانیسم‌های موجود در آن‌ها می‌باشند [۲۹-۲۸]. از میان میکروارگانیسم‌های دریایی، اکتینومیست‌ها و به‌خصوص استرپتومایسس‌های دریایی به‌خاطر تولید انواع مختلفی از ترکیبات فعال زیستی همواره مورد توجه بوده‌اند و تولید متابولیت‌های زیستی توسط این باکتری‌ها، از مهم‌ترین شاخص‌های آن‌ها به‌شمار می‌آید [۱۴].

درباره اثرات ضد میکروبی ترکیبات جدا شده از اکتینومیست‌ها و به‌خصوص استرپتومیسس‌ها مطالعات زیادی صورت گرفته است. Bizuye و همکاران مشاهده کردند که از بین اکتینومیست‌های جدا شده ۲۶/۷ درصد توانایی تولید ترکیبات فعال و پاسخ به رشد سویه‌های پاتوژن را دارند [۳۰]. El-Gendy و همکاران مشاهده کردند که

زمان تولید مواد فعال ضد میکروبی در اکتینومیسیت‌های مختلف می‌تواند متفاوت باشد. Marzban و همکاران نشان دادند که بیش‌ترین مقدار تولید ترکیب فعال جدا شده از اکتینومیسیت دریایی در زمان ۴۲ ساعت از منحنی رشد باکتری می‌باشد [۲۱]، ولی نتایج مطالعه رشد باکتری در این پژوهش نشان داد که تولید ماده فعال توسط ایزوله‌های جدا شده در زمان ۸۴ ساعت به اوج خود می‌رسد. اثرات ماده ضد میکروبی از ۱۸۰ ساعت به بعد از بین می‌رود که این موضوع می‌تواند به دلیل تغییر شکل و غیر فعال شدن ماده موثره در طول زمان باشد.

از آن جایی که پژوهش انجام شده یک طرح اولیه برای مشاهده اثرات متقابل دارویی عصاره‌های فعال بوده، چگونگی انجام تست‌ها و آزمایشات تأیید علمی اثرات سینرژیستی یکی از محدودیت‌های انجام مطالعه محسوب می‌شود. دسترسی به سویه‌های مقاوم به دارو در مطالعات پژوهشی دانشگاه‌ها نیز به عنوان یکی دیگر از محدودیت‌ها مطرح می‌باشد. انجام طرح‌های پژوهشی آینده جهت تکمیل و تأیید اثرات متقابل نیازمند بازه زمانی طولانی‌تر و تست‌های تکمیلی به همراه تشخیص دقیق ماده مؤثره پیشنهاد می‌گردد. بنابراین با استخراج، خالص‌سازی و مطالعه دقیق‌تر متابولیت‌های فعال تولید شده توسط استرپتومیسیت‌های رسوبات بستر دریای مازندران، امید است بتوان ترکیبات فعال جدید و مناسب برای درمان بیماری‌های عفونی ناشی از پاتوژن‌های مقاوم به دارو، معرفی کرد.

۱۶/۷ درصدی اثرات ضد میکروبی اریترومايسين و آمپی‌سیلین بر علیه پاتوژن استافیلوکوکوس اورئوس شدند که در این مطالعه هم اثرات هم‌افزایی ترکیبات جدا شده از سویه MN39 در ترکیب با آنتی‌بیوتیک‌های فوق مشاهده شد. [۳۷]. Li و همکاران اثر ترکیبی ماده ضد میکروبی جدا شده از قارچ *Penicillium biourgeianum* را همراه با آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام علیه MRSA بررسی کردند و مشخص شد ترکیب جدا شده با توجه به اثرات ترکیبی قابل توجه می‌تواند به عنوان یک روش درمانی جدید برای پاتوژن MRSA در نظر گرفته شود [۱۷].

از طرفی با بررسی‌های آینده می‌توان مشخص کرد که این فعالیت‌های قوی ثبت شده ممکن است در حضور هم‌زمان ماده فعال و آنتی‌بیوتیک استاندارد در محیط باشد یا این که ماده مؤثره در ساختار آنتی‌بیوتیک تغییراتی ایجاد کرده است. در تحقیق حاضر، چهار ایزوله فعال جدا شده از رسوبات بستر دریای مازندران فعالیت هم‌افزایی خوبی با آنتی‌بیوتیک‌ها نشان دادند که برای بررسی آن از دو سویه باکتری مقاوم به دارو استفاده شد. نتایج در مجموع نشان داد فعالیت عصاره خام جدا شده از ایزوله‌های فعال علیه MRSA در مقایسه با VRE بهتر بوده است. با توجه به وجود مشکل جهانی بیمارستان‌ها در درمان عفونت‌های ناشی از MRSA، وجود این فعالیت خوب می‌تواند امیدبخش باشد. توجه به این نکته مهم است که ما در این پژوهش از عصاره خام استفاده کرده‌ایم و خالص‌سازی ترکیبات فعال تولید شده می‌تواند در پژوهش‌های آینده مدنظر قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق فعالیت متقابل دارویی ترکیبات فعال استرپتومیسیت‌های جدا شده از رسوبات بستر دریای مازندران، مطالعه شدند. نتایج نشان داد که رسوبات بستر دریای مازندران می‌تواند به عنوان منبع غنی از ترکیبات فعال با خاصیت هم‌افزایی با آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد علیه پاتوژن‌های مقاوم به دارو محسوب شود ولی نیازمند مطالعات دقیق‌تری در آینده می‌باشد. از طرفی با توجه به این‌که

سویه‌های مورد استفاده در این پژوهش، از نوع مقاوم به دارو می‌باشند، بایستی نکات ایمنی و بهداشتی در پژوهش‌های آینده مورد توجه بیشتری قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله در حاشیه کار حاصل از پایان‌نامه دکتری می‌باشد. به این وسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مشهد و دانشگاه اصفهان به دلیل تأمین هزینه‌های مالی و پشتیبانی تجهیزات و امکانات تشکر به عمل می‌آید.

References

- [1] Arasu MV, Duraipandiyar V, Ignacimuthu S. Antibacterial and antifungal activities of polyketide metabolite from marine *Streptomyces* sp. AP-123 and its cytotoxic effect. *Chemosphere* 2013; 90(2): 479-87.
- [2] Baydar H, Sadic O, Güzkan G, Karadogan T. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food control* 2004; 15(3): 169-72.
- [3] Norouzi H, Danesh A, Mohseni M, Rabbani Khorasgani M. Marine *Actinomycetes* with Probiotic Potential and Bioactivity against Multidrug-resistant Bacteria. *Int J Mol Cell Med* 2018; 7(1): 44-52.
- [4] Chaston JM, Suen G, Tucker SL, Andersen AW, Bhasin A, Bode E, et al. The entomopathogenic bacterial endosymbionts *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: convergent lifestyles from divergent genomes. *PloS One* 2011; 6(11): e27909.
- [5] Cohen SN, Chang AC, Hsu L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972; 69(8): 2110-4.

- [6] Cragg GM, Newman DJ. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta* 2013; 18(6): 3670-95.
- [7] Daneshmandi S, Soleimani N, Pourfathollah A, Sattari M. Evaluation of the drug synergistic and antibacterial effects of cuminum cyminum essential oil. *J Arak Uni Med Sci* 2010; 13(2): 75-82. [Farsi]
- [8] Das S, Ward LR, Burke C. Screening of marine *Streptomyces* spp. for potential use as probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 2010; 305(1-4): 32-41.
- [9] De Lima Procopio RE, Da Silva IR, Martins MK, de Azevedo J, De Arajo JM. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Braz J Infect Dis* 2012; 16(5): 466-71.
- [10] Dharmaraj S. Marine *Streptomyces* as a novel source of bioactive substances. *World J Microbiol Biotechnol* 2010; 26(12): 2123-39.
- [11] Kemung HM, Tan LT, Khan TM, Chan KG, Pusparajah P, Goh BH, et al. *Streptomyces* as a Prominent Resource of Future Anti-MRSA Drugs. *Front Microbiol* 2018; 9(1): 2221.
- [12] Enright MC. The evolution of a resistant pathogen-the case of MRSA. *Curr Opin Pharmacol* 2003; 3(5): 474-9.
- [13] Hashemi SM, Pordeli HR, Hosenian A. Study of Anti-fungal Effects of Isolated *streptomyces* sp. from Gorgan Areas. *Med Lab J* 2010; 4(2): 7-16. [Farsi]
- [14] Valli S, Suvathi SS, Aysha O, Nirmala P, Vinoth KP, Reena A. Antimicrobial potential of Actinomycetes species isolated from marine environment. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012; 2(6): 469-73.
- [15] Kumar SR S, Rao KVB. In-vitro antimicrobial activity of marine actinobacteria against multidrug resistance *Staphylococcus aureus*. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012; 2(10): 787-92.
- [16] Loomba PS, Taneja J, Mishra B. Methicillin and vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* in hospitalized patients. *J Global Infect Dis* 2010; 2(3): 275.

- [17] Li S, Mou Q, Xu X, Qi S, Leung PHM. Synergistic antibacterial activity between penicillins and antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *R Soc Open Sci* 2018; 5(5): 172466.
- [18] Oroojalian F, Orafaee H, Azizi M. Synergistic antibacterial activity of medicinal plants essential oils with biogenic silver nanoparticles. *Nanomed J* 2017; 4(4): 237-44.
- [19] Mohseni M, Norouzi H. Antifungal Activity of Actinomycetes Isolated from Sediments of the Caspian Sea. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2013; 23(104): 80-7. [Farsi]
- [20] Mohseni M, Norouzi H, Hamed J, Roohi A. Screening of antibacterial producing actinomycetes from sediments of the Caspian Sea. *Int J Mol Cell Med* 2013; 2(2): 64-71.
- [21] Marzban A, Ebrahimipour G, Danesh A. Bioactivity of a Novel Glycolipid Produced by a Halophilic *Buttiauxella* sp. and Improving Submerged Fermentation Using a Response Surface Method. *Molecules* 2016; 21(10): 1256.
- [22] Salar Bashi D, Attaran Dowom S, Fazly Bazzaz BS, Khanzadeh F, Soheili V, Mohammadpour A. Evaluation, prediction and optimization the ultrasound-assisted extraction method using response surface methodology: antioxidant and biological properties of *Stachys Parviflora* L. *Iran J Basic Med Sci* 2016; 19(5): 529-41.
- [23] Soheili V, Khedmatgozar Oghaz N, Sabeti Z, Fazly Bazzaz BS. The novel effect of cis-2-decenoic acid on biofilm producing *Pseudomonas Aeruginosa*. *Microbiol Res (Pavia)* 2016; 6(1): 1.
- [24] Ouhdouch Y, Barakate M, Finance C. Actinomycetes of Moroccan habitats: isolation and screening for antifungal activities. *Eur J Soil Biol* 2001; 37(2): 69-74.
- [25] Preuss HG, Echard B, Enig M, Brook I, Elliott TB. Minimum inhibitory concentrations of herbal essential oils and monolaurin for gram-positive and gram-negative bacteria. *Mol Cell Biochem* 2005; 272(1-2): 29-34.
- [26] Sibanda T, Mabinya LV, Mazomba N, Akinpelu DA, Bernard K, Olaniran AO, et al. Antibiotic

- producing potentials of three freshwater *actinomycetes* isolated from the Eastern Cape Province of South Africa. *Int J Mol Sci* 2010; 11(7): 2612-23.
- [27] Simmons TL, Andrianasolo E, McPhail K, Flatt P, Gerwick WH. Marine natural products as anticancer drugs. *Mol Cancer Ther* 2005; 4(2): 333-42.
- [28] Singh LS, Baruah I, Bora TC. Actinomycetes of Loktak habitat: isolation and screening for antimicrobial activities. *Biotechnology* 2006; 5(2): 217-21.
- [29] Subramani R, Aalbersberg W. Marine actinomycetes: an ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbio Res* 2012; 167(10): 571-80.
- [30] Bizuye A, Moges F, Andualem B. Isolation and screening of antibiotic producing actinomycetes from soils in Gondar town, North West Ethiopia. *Asian Pac J Trop Dis* 2013; 3(5): 375-81.
- [31] El-Gendy M, Mohamed Z, Hekal N, Ali F, Yousef A. Production of bioactive metabolites from different marine endophytic Streptomyces species and testing them against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and cancer cell lines. *BioTechnologia* 2018; 99(1): 13-35.
- [32] Gurung TD, Sherpa C, Agrawal VP, Lekhak B. Isolation and characterization of antibacterial actinomycetes from soil samples of Kalapatthar, Mount Everest Region. *Nepal J Sci Technol* 2009; 10(2): 173-82.
- [33] Sujatha P, Raju KB, Ramana T. Studies on a new marine streptomycete BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant Staphylococcus aureus. *Microbiol Res* 2005; 160(2): 119-26.
- [34] Acar JF. Antibiotic Synergy and Antagonism. *Med Clin North Am* 2000; 84(6): 1391-406.
- [35] Brown D. Antibiotic resistance breakers: can repurposed drugs fill the antibiotic discovery void. *Nat Rev Drug Discov* 2015; 14(12): 821-32.

- [36] Danesh A, Ljungh A, Mattiasson B, Mamo G. Synergistic effect of haloduracin and chloramphenicol against clinically important Gram-positive bacteria. *Biotechnol Rep* 2017; 13(5): 37-41.
- [37] Zarina A, Anima N. Combined Efficacy of Antibiotics and Biosynthesised Silver Nanoparticles from *Streptomyces Albaduncus*. *Int J PharmTech Res* 2014; 6(6): 1862-9.

An Increase in Antimicrobial Effects of Standard Antibiotics in Combination with the Active Metabolites Isolated from Marine Streptomyces: A Laboratory Study

H. Norouzi¹, M. Rabbani Khorasgani², A. Danesh^{3*}

Received: 10/11/2018 Sent for Revision: 04/02/2019 Received Revised Manuscript: 16/06/2019 Accepted: 01/07/2019

Background and Objectives: Combination therapy has been considered as a potential approach to overcome antimicrobial resistance. In this study the antimicrobial effects of active compounds produced by some marine *Streptomyces spp.* in combination with some standard antibiotics against multidrug-resistant pathogens was investigated.

Materials and Methods: In this **laboratory** study, the bacteria isolated from Caspian Sea were tested for their ability to produce antimicrobial compounds active against some drug-resistant pathogens using disc diffusion methods. Then, the producer strains were cultivated in suitable liquid media. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the ethyl acetate extracts were measured against some drug-resistant species including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE) using microbroth dilution technique. Data was analysed using paired t-test.

Results: In the first screening, strains MN2, MN39, MN40 and MN41 showed a broad antimicrobial activity against MRSA, VRE, *Salmonella typhi* and *pseudomonas aeruginosa*, among which, the best MIC against MRSA was obtained from strain MN39 at 280 ($\mu\text{g/ml}$). These extracts in combination with some standard antibiotics resulted in a noticeable improved antimicrobial activity against multidrug-resistant pathogens, while in some cases the activity was decreased.

Conclusion: The bioactive compounds produced by *actinomyces* possess remarkable antimicrobial properties against drug-resistant pathogens when used in a combination therapy with standard antibiotics which requires further research in the future.

Key words: Marine *Streptomyces*, Multidrug-resistant pathogens, Antimicrobial effects

Funding: This study did not have any funds.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Mashhad University of Medical Sciences approved the study (IR.MUMS.REC.1394.556).

How to cite this article: Norouzi H, Rabbani Khorasgani M, Danesh A. An Increase in Antimicrobial Effects of Standard Antibiotics in Combination with the Active Metabolites Isolated from Marine Streptomyces: A Laboratory Study. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2020; 18 (10): 1017-34 [Farsi]

1- PhD Student, Dept. of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran, ORCID: 0000-0003-2652-5502

2-Associate Prof., Dept. of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran, ORCID: 0000-0002-4043-9216

3- Assistant Prof., Biotechnology Research Center, Pharmaceutical Technology Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran, ORCID: 000-0002-1122-6641

(Corresponding Author) Tel: (051) 31801202, Fax: (051) 38823251, E-mail: DaneshA@mums.ac.ir