مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۱۸، دی ۱۳۹۸، ۱۰۳۴-۱۰۱۷

افزایش اثرات ضد میکروبی آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد در ترکیب با متابولیت‌های فعال جدا شده از استرپتومیست‌های 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 ضدمیکروبی ترکیبات فعال تولید شده توسط استرپتومیست‌های دریایی در ترکیب با چند آنتی‌بیوتیک 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 ضدمیکروبی برعلیه 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 دایلوشن 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 ضدمیکروبی وسیعی برعلیه MRSA، VRE، سالمونلا تیفی و سودوموناس آئروجینوزا از خود نشان دادند که از بین آن‌ها، بهترین مقدار MIC برای ایزوله MN39 با ۲۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر علیه MRSA به‌دست آمد. این عصاره‌ها در ترکیب با برخی از آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد اثرات افزاینده و در برخی موارد اثرات کاهنده قابل ملاحظه‌ای علیه پاتوژن‌های مقاوم به دارو داشتند.

نتیجه‌گیری: ترکیبات فعال تولید شده توسط اکتینومیست‌ها، می‌توانند خاصیت ضدمیکروبی قابل‌توجهی در ترکیب با آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد برعلیه پاتوژن‌های مقاوم به دارو داشته باشند که نیازمند بررسی‌های بیش‌تر در پژوهش‌های آینده می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: استرپتومیست‌های دریایی، پاتوژن مقاوم به دارو، اثر ضدمیکروبی

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: ۳۱۸۰۱۲۰۲-۰۵۱، دورنگار: ۳۸۸۲۳۲۵۱-۰۵۱، 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 منشاء طبیعی برای پژوهش‌گران فراهم آورده است [۴-۳].

در سال‌های اخیر به دلیل نیاز به داروهای جدید در درمان بیماری‌ها، به‌خصوص مقابله با پاتوژن‌های مقاوم به دارو، ترکیبات طبیعی با منشاء 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 [۱۰-۸].

متابولیت‌های ثانویه زیادی توسط میکروارگانیسم‌های دریایی تولید می‌شود که در این بین اکتینومیست‌ها 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 [۱۳-۱۱]. تعداد زیادی از این ترکیبات تولید شده توسط استرپتومیست‌های 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 منشاء 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 ضدمیکروبی جدا شده از مناطق مختلف گزارش شده است [۱۸-۷]. اما تاکنون هیچ مطالعه‌ای بر روی اثرات متقابل دارویی ترکیبات فعال تولید شده توسط استرپتومیست‌های 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 استرپتومیست‌های 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 میکروب‌شناسی دانشکده داروسازی مشهد از فروردین ماه تا شهریور ماه ۱۳۹۷ انجام گرفت. در این مطالعه از استرپتومیست‌های جدا

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 نیترات، 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 استرپتومیست‌ها) در pH=۷/۵ 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* (*Salmonella typhi*) ATCC 3311، *استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین* (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; MRSA) ATCC 33591، *سودوموناس آئروجینوزا* (*Psudomonas aeruginosa*) ATCC 2108 و *انتروکوکوس فاسیوم* (*Enterococcus faecium*) ATCC 700221 خریداری شده توسط آزمایشگاه کنترل میکروبی دانشکده داروسازی مشهد استفاده شد. سویه‌های مورد مطالعه در محیط کشت نوترینت آگار (مرک، آلمان) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری و جهت انجام مراحل بعدی استفاده شدند [۳].

برای غربال‌گری اولیه جهت انتخاب بهترین استرپتومیست‌های 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].

استرپتومیست‌های 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 منزیم 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 ۱۶۰۰۰ ×g به‌مدت ۱۰

دقیقه سانتریفوژ (پارس آزما، ساخت ایران) شد و سپس مایع بالایی جدا و فیلتر (کاغذ واتمن ۴، ساخت آمریکا) شد. با توجه به حلالیت ترکیبات ضدمیکروبی در حلال‌های آلی، برای استخراج متابولیت‌های ثانویه ضدباکتریایی از حلال آلی اتیل‌استات استفاده شد [۲۰]. یک‌برابر حجم سوپرناتانت به‌دست 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 ضدمیکروبی سویه‌های مقاوم به دارو استفاده شد [۲۰، ۳].

اندازه‌گیری مقدار تولید ماده ضدمیکروبی 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) به‌میزان ۵٪ (v/v) تلقیح شد. ارلن فاقد باکتری تلقیح شده به‌عنوان 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 سانتریفیوژ، از مایع بالایی بر روی باکتری MRSA تست ضدمیکروبی به روش دیسک دیفیوژن انجام شد. از آنتی‌بیوتیک ونکومایسین به عنوان کنترل مثبت، دیسک بلانک به عنوان کنترل منفی استفاده شد. هر تست با سه‌بار تکرار صورت گرفت و ارتباط تولید ماده ضدمیکروبی با رشد باکتری در واحد زمان به‌صورت 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)

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، به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی گزارش شد [۲۳].

بررسی اثرات متقابل عصاره خام حاصل از استرپتومیست‌های فعال جدا شده، به روش انتشار دیسک انجام شد [۲۰، ۳]. عصاره‌های خشک شده حاصل از هر سویه در ۵۰۰ میکرولیتر اتیل استات حل شد و اثرات آن ها علیه پاتوژن‌های استاندارد مقاوم به دارو شامل *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متِی 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 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 مولرهینتون 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)، دیسک های 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، به‌مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند. سپس هاله عدم رشد (Inhibition Zone Diameter; IZD) برحسب میلی‌متر اندازه‌گیری و ثبت شد [۲۰-۱۹].

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 ضدمیکروبی در واحدزمان از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۷ استفاده شد و داده‌ها برای هر مخلوط (دارو+ عصاره) جداگانه با آزمون t زوجی با سطح معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) تجزیه و تحلیل شد.

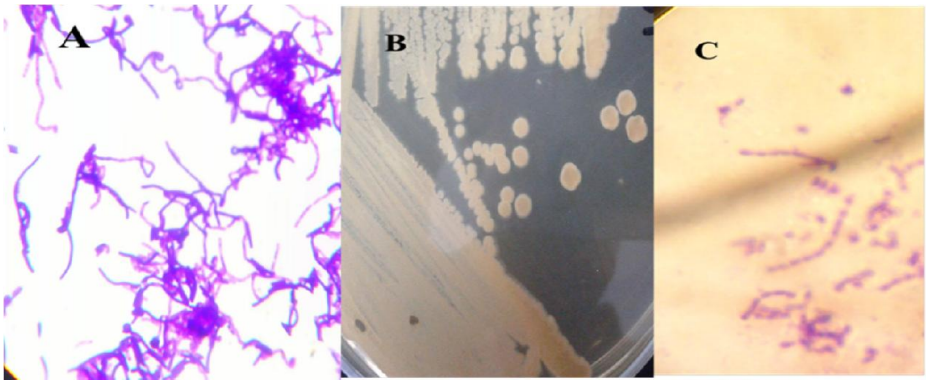
نتایج

برای شناسایی سویه‌های فعال علیه پاتوژن‌های مقاوم به دارو، از بین ۱۰ سویه جداشده از رسوبات بستر دریای مازندران، غربالگری باروش Cross Streak انجام شد. نتایج نشان داد همه سویه‌ها دارای فعالیت ضدمیکروبی علیه حداقل یک باکتری پاتوژن مقاوم به دارو بودند. نتایج فعالیت ضد باکتریایی حاصل از غربالگری اولیه در جدول ۱ نشان داده شده است. از بین این جدایه‌های فعال، تعداد ۴ جدایه با بهترین خاصیت ضدمیکروبی به نام‌های MN2، MN39، 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).

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

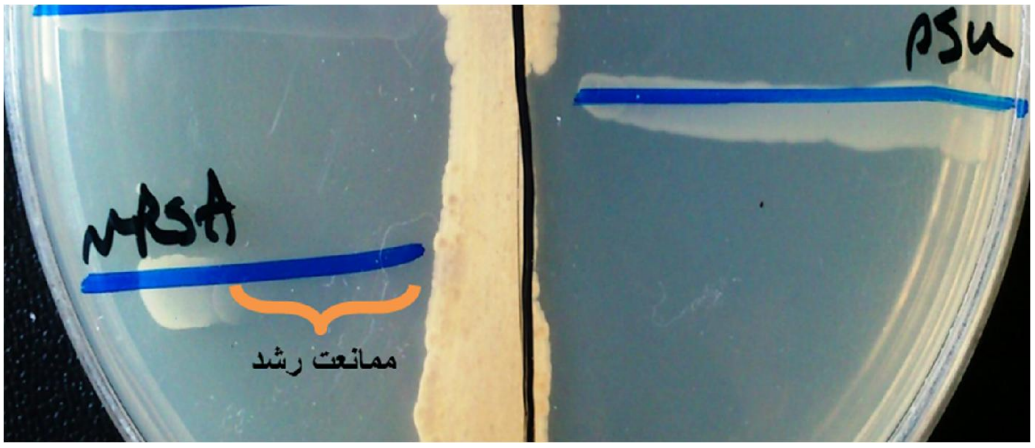
جدایه‌ها	باکتری‌های بیماری‌زا			
	Pseudomonas. aeruginosa	*Salmonella typhi*	MRSA	VRE
MN1	+	+	+	-
MN2	+	+	+	+
MN3	+	-	+	-
MN8	+	−	+	-
MN18	+	-	+	-
MN37	+	-	-	-
MN39	+	+	+	+
MN40	+	+	+	+
MN41	+	+	+	+
MN44	-	+	-	+

+: 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 استرپتومیست رشد کرده بر روی محیط کشت اختصاصی SCA (A)، تصویر میکروسکوپی میسلیوم (B) و وضعیت اسپور به شکل زنجیره‌ای (C).

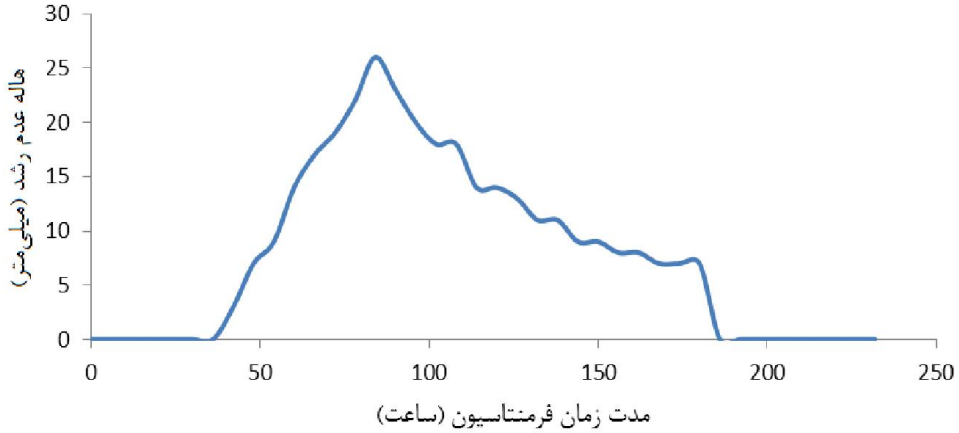
چهار جدایه منتخب توانستند اثر مهاری بر رشد تمام سویه‌های بیماری‌زا (MRSA، VRE، سالمونلا تیفی و سودوموناس آئروجینوزا) از خود به‌جای گذارند. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود متابولیت‌های تولید شده توسط جدایه MN41 از رشد باکتری‌های پاتوژن ممانعت به‌عمل آورده است و هاله عدم رشد به‌وضوح دیده می‌شود. نتایج 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 برعلیه *سودوموناس آئروجینوزا* (میلی‌متر ۰/۲±۱۷/۱) و *سالمونلا تیفی* (میلی‌متر ۰/۳±۱۸/۲) بود درحالی‌که جدایه MN39 بیش‌ترین فعالیت را علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (میلی‌متر ۰/۱±۲۴/۰) و *سالمونلا تیفی* (میلی‌متر ۰/۴±۲۳/۲) داشت. جدایه MN41 دارای فعالیت گسترده‌ای برعلیه سه میکروب *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (میلی‌متر ۰/۴±۲۸/۱)، *سودوموناس آئروجینوزا* (میلی‌متر ۰/۳±۱۷/۳) و *انتروکوکوس* مقاوم به ونکومایسین (میلی‌متر ۰/۱±۲۱/۰) بود.



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.

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 ضدمیکروبی بر حسب هاله عدم رشد ۸۴ ساعت پس از 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 ضدمیکروبی عصاره باکتریایی در ۴۲ ساعت اول صفر بوده و پس از آن تولید ماده ضد میکروبی شروع شده است که تا

۸۴ ساعت هم‌زمان با رشد باکتری میزان تولید متابولیت فعال روند افزایشی داشته و به اوج می‌رسد و پس از آن فعالیت ضدمیکروبی روندی کاهشی داشته در حالی‌که رشد میکروب تا حدود ۱۰۰ ساعت روند افزایشی پیموده و پس از آن وارد مرحله ثابت (*Stationary phase*) شده که پس از گذشت ۱۳۰ ساعت از زمان تلقیح اولیه میزان مرگ‌ومیر فزونی می‌یابد.



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

نتایج حاصل از آزمایش رقت‌سازی در چاهک (جدول ۲) بیانگر این بود که اثر مهارکنندگی و کشندگی سویه فعال MN41 در مقایشه با سایر ایزوله‌های فعال بهتر می‌باشد. بهترین MIC علیه MRSA توسط ایزوله فعال MN41 (۲۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و بهترین MBC توسط ایزوله فعال MN39 علیه VRE با مقدار ۵۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد.

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

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

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

جدول ۳- اثرات ترکیبی عصاره خام با آنتی‌بیوتیک‌ها 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)	MN41	MN40	MN39	MN2
آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد	وانکومایسین	۱۳/۰ ±۰/۳	۴۲/۱ ±۰/۳	۱۰/۱ ±۰/۱	۸/۱ ±۰/۱	۷/۱ ±۰/۱
	سفالوتین	۱۰/۱ ±۰/۴	۷/۱ ±۰/۱	۴۰/۲ ±۰/۲ (P<۰/۰۰۱)	۸/۲ ±۰/۱	۸/۰ ±۰/۱
	آمپی سیلین	۷/۰ ±۰/۲	۴۰/۰ ±۰/۳ (P<۰/۰۰۱)	۷/۳ ±۰/۱	۴۰/۰ ±۰/۲ (P<۰/۰۰۱)	۳۸/۱ ±۰/۱ (P<۰/۰۰۱)
	جنتامیسین	۱۲/۳ ±۰/۱	۴۱/۱ ±۰/۲	۸/۱ ±۰/۱	۹/۱ ±۰/۲	۱۲/۰ ±۰/۲
	اگزاسیلین	۱۱/۱ ±۰/۳	۱۱/۱ ±۰/۱	۱۱/۲ ±۰/۳	۴۰/۱ ±۰/۲ (P<۰/۰۰۱)	۹/۲ ±۰/۱
	اریترومایسین	۱۰/۱ ±۰/۱	۴۱/۲ ±۰/۳	۳۷/۱ ±۰/۲ (P<۰/۰۰۱)	۳۸/۰ ±۰/۱ (P<۰/۰۰۱)	۱۰/۰ ±۰/۲

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

همان طور 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 میانگین عصاره سویه ها در حالت تنها و مخلوط با آنتی‌بیوتیک با آزمون t زوجی با سطح معنی‌داری P<۰/۰۱ بررسی شد.

جدول ۴- اثرات ضدمیکروبی ترکیبی عصاره خام با آنتی‌بیوتیک‌ها علیه VRE با استفاده از اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد (برحسب میلی‌متر) در روش انتشار دیسک در دانشکده داوسازی مشهد در سال ۱۳۹۷

			عصاره‌های سویه‌های فعال			
		قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)	MN41	MN40	MN39	MN2
آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد	وانکومایسین	۸/۱ ±۰/۳	۳۸/۲ ±۰/۳	۳۸/۰ ±۰,۱ (P<۰/۰۰۱)	۳۹/۲ ±۰/۱ (P<۰/۰۰۱)	۳۸/۰ ±۰/۱ (P<۰/۰۰۱)
	سفالوتین	۱۴/۲ ±۰/۴	۱۰/۱ ±۰/۱	۱۰/۱ ±۰/۲	۱۴/۱ ±۰/۱	۱۰/۱ ±۰/۱
	آمپی سیلین	۱۰/۰ ±۰/۲	۳۷/۲ ±۰/۳	۳۸/۲ ±۰/۱ (P<۰/۰۰۱)	۳۸/۲ ±۰/۲ (P<۰/۰۰۱)	۷/۱ ±۰/۱
	جنتامیسین	۱۳/۱ ±۰/۱	۴۰/۱ ±۰/۲	۳۸/۱ ±۰/۱ (P<۰/۰۰۱)	۴۰/۱ ±۰/۲ (P<۰/۰۰۱)	۳۵/۲ ±۰/۲ (P<۰/۰۰۱)
	اگزاسیلین	۱۲/۰ ±۰/۳	۳۹/۲ ±۰/۱	۴۰/۰ ±۰/۳ (P<۰/۰۰۱)	۴۰/۲ ±۰/۲ (P<۰/۰۰۱)	۱۰/۱ ±۰/۱
	اریترومایسین	۱۳/۳ ±۰/۱	۱۳/۱ ±۰/۳	۳۸/۲ ±۰/۲ (P<۰/۰۰۱)	۱۰/۰ ±۰/۱	۳۸/۳ ±۰/۲ (P<۰/۰۰۱)

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

بحث

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 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].

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 ضدمیکروبی 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 مهم ترین شاخص‌های آن‌ها به‌شمار می‌آید [۱۴].

درباره اثرات ضدمیکروبی 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 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 ایزوله های 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 ضدمیکروبی 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 ضدمیکروبی 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 برعلیه پاتوژن‌های مهم کلینیکی داشتند [۳۶]. Zarina و Nanda گزارش کردند که نانوپارتیکل نقره جدا شده از سویه *Streptomyces Albaduncus* باعث افزایش ۳۸ درصدی و

۱۶/۷ درصدی اثرات ضد میکروبی اریترومایسین 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 ضدمیکروبی جداشده 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 سویه‌ی 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.

زمان تولید مواد فعال ضدمیکروبی در اکتینومیست‌های مختلف می‌تواند متفاوت باشد. Marzban و همکاران نشان دادند که بیش‌ترین مقدار تولید ترکیب فعال جدا شده از اکتینومیست 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 تکمیلی‌به همراه تشخیص دقیق ماده مؤثره پیشنهاد می‌گردد. بنابراین با استخراج، خالص‌سازی و مطالعه دقیق‌تر متابولیت‌های فعال تولید شده توسط استرپتومیست‌های رسوبات بستر دریای مازندران، امید است بتوان ترکیبات فعال جدید و مناسب برای درمان بیماری‌های عفونی ناشی از پاتوژن‌های مقاوم به دارو، معرفی کرد.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق فعالیت متقابل دارویی ترکیبات فعال استرپتومیست‌های 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 فنآوری دانشگاه علوم پزشکی مشهد و دانشگاه اصفهان به دلیل تأمین هزینه‌های مالی و پشتیبانی تجهیزات و امکانات تشکر به‌عمل می‌آید.

References

[1] Arasu MV, Duraipandiyan 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, SadicO, Gûzkan 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 penicillenols and antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *R Soc Open Sci* 2018; 5(5): 172466.

[18] Oroojalian F, Orafaee H, Azizi M. Synergistic antibaterial 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, Hamedi 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 *Psudomonas 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. Norouzi[1], M. Rabbani Khorasgani[2], 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 (µg/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