



<https://bjm.ui.ac.ir/?lang=en>

Journal of Microbial Biology

E-ISSN: 3060-7647

14<sup>th</sup> Year, Vol. 14, No. 53, Spring 2025 pp. 31-48

Received: 10/07/2024 Accepted: 23/11/2024

**(Research Paper)**

## Screening and phylogenetic analysis of native halophilic Actinomycetes producing exopolysaccharide with antimicrobial activity

**Laila Mosawi**

Department of Microbiology, Faculty of Science, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

[lila65mosavy@gmail.com](mailto:lila65mosavy@gmail.com)

**Seyed Soheil Aghaei** <sup>1</sup>

Department of Microbiology, Faculty of Science, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

[soheilaghaee@yahoo.com](mailto:soheilaghaee@yahoo.com)

**Mohammad Reza Zand Monfared**

Department of Chemistry, Faculty of Science, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

[zand.monfared@gmail.com](mailto:zand.monfared@gmail.com)

### Abstract

Exopolysaccharides (EPSs) play a crucial role in the resistance of microorganisms to various stresses, including salinity. The aim of this study was to screen the native halophilic strains of *actinomycetes*, which produce antimicrobial EPSs, isolated from the rhizosphere soils of Qom Salt Lake. *Actinomycete* isolates were obtained using ISP2 medium with different salt concentrations. A BHI liquid medium containing 2% sucrose was used for the preparation of EPS. The antimicrobial activity of the EPSs was evaluated using the agar well diffusion method, and the MIC and MBC values were determined using a 96-well microplate assay. The structure of the isolated EPS was analyzed by FTIR, HPLC and UV-Vis spectroscopy. In addition, their thermal properties and stability were evaluated by TGA. The selected isolates were identified on the basis of morphological, physiological and biochemical characteristics of EPS, as well as the 16S rRNA molecular method. A total of 30 native strains of halophilic *actinomycetes* were isolated in this study. Two of these isolates showed the ability to produce EPS with antimicrobial properties. The highest antimicrobial activity of EPS was observed against pathogenic strains at a concentration of 2% and a volume of 200  $\mu$ l. FTIR results confirmed the presence of hydroxyl groups, while HPLC analysis showed that the heteropolysaccharide structure consisted of six monomers. UV-Vis analysis confirmed the presence of carboxyl, carbonyl, amine and ester functional groups. TGA showed acceptable thermal stability. Phylogenetic analysis of the isolates confirmed that the strain belonged to the genus *Streptomyces* with 100% similarity. The results of this study suggest that the native halophilic strain of *Streptomyces* isolated from the rhizosphere soils of Qom Salt Lake could serve as an important source for the production of EPS with various biotechnological applications, particularly in the food and pharmaceutical industries.

**Keywords:** Exopolysaccharide, Actinobacteria, Halophilic native strain, Antimicrobial properties

<sup>1</sup> Corresponding Author



## Introduction

Exopolysaccharides (EPS) play a significant role in the resistance of microorganisms to various stresses, including salinity. In recent decades, microbial EPS have replaced plant polysaccharides and are produced in larger quantities and with higher purity. Screening for new sources of microbial EPSs could contribute to the development of new antibacterial compounds with multiple potentials. EPSs could be used as preservatives for long-term storage of food products. They also exhibit bioactive properties and have a wide range of potential applications in modern biotechnology, particularly in medicine and pharmaceuticals, where they can act as anti-allergic or antiviral agents, as well as in medical applications. Halophilic EPS are stable at high temperatures, elevated salinity and high pH levels. These unique properties of EPS produced by halophilic microorganisms can offer a wide range of applications in various industries. Saline environments are typically extreme habitats characterized by high salt concentrations and harsh living conditions. Consequently, to survive in these challenging environments, many halophiles produce EPS as a protective strategy to adapt to their environment. EPS are high molecular weight carbohydrate polymers, composed mainly of monosaccharides and their derivatives. These polysaccharides are secreted into the external environment to maintain the osmotic environment in the microbial cell, helping to protect bacteria and increase their survivability. In recent decades, EPS produced by halophilic bacteria have received considerable attention due to their structural and functional diversity. While many halophilic bacteria can produce EPS with different compositions, structures and functions, the majority of these EPS are heteropolysaccharides composed of mannose and glucose. The extensive chemical and structural diversity of EPS makes them suitable for a wide range of applications in a variety of industries, including food, pharmaceutical, biomedical, cosmetics, bioremediation and wastewater treatment. They can also act as gelling agents, stabilizers, emulsifiers and viscosity enhancers. In addition, certain halophilic EPSs exhibit beneficial health effects such as antioxidant, anticancer and anti-cytotoxic properties. Halophilic EPS can be used in bioremediation as EPS flocculants and heavy metal scavengers. Actinobacteria, a group of ubiquitous Gram-positive bacteria, are well known for the production of primary and secondary metabolites with a wide range of applications. These bacteria are also a promising source of important industrially produced enzymes. A significant proportion of antibiotics on the market are derived from actinobacteria. They produce enzyme inhibitors for the treatment of cancer and for improving the immune system. Actinobacteria can degrade a wide range of hydrocarbons, pesticides, aliphatic and aromatic compounds. They carry out microbial transformations of organic compounds, an area with good commercial value. Many members of the genus Actinobacteria have the potential to be used in the conversion of agricultural and urban wastes into high-value chemical products. Actinobacteria are also important in plant biotechnology, where strains with antagonistic activity against plant pathogens are useful in biocontrol. The metabolic processes of these bacteria are therefore an excellent subject for research. The main objective of this study was to isolate and screen indigenous halophilic actinomycetes producing antimicrobial EPSs from the rhizosphere soils of Salt Lake in Qom Province, Iran.

## Materials and methods:

Soil samples were collected from the rhizosphere of plants under sterile conditions. The initial isolation of actinobacterial strains was carried out using a specific ISP2 medium with salt concentrations of 5%, 10%, 15%, 20% and 25%. During the initial screening, EPS-producing strains were selected based on macroscopic (appearance of slimy colonies) and microscopic examination. Brain heart infusion liquid medium containing 2% sucrose was used for EPS production and incubation was carried out in a shaker incubator with shaking at 200 rpm at 28-30 °C for 9 days. The antimicrobial activity of EPS against pathogenic strains including *Staphylococcus aureus* ATCC 10690, *Escherichia coli* ATCC 10708, *Salmonella typhimurium* ATCC 10707, and *Bacillus subtilis* ATCC 1080 was evaluated using the agar well diffusion method. The minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration values were determined using a 96-well microplate method. The structure of the selected EPS isolates was investigated by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), high performance liquid chromatography (HPLC), and ultraviolet-visible (UV-Vis) spectrophotometry, and their thermal stability was evaluated by thermogravimetric analysis (TGA). In addition, for the initial identification of the isolated strains, their morphological, physiological and biochemical characteristics were evaluated. This evaluation included catalase, oxidase, sugar fermentation, starch hydrolysis, urease, gelatin, casein and Tween hydrolysis, as well as nitrate reduction, motility, DNase activity and indole and melanin production. The isolate with the highest EPS yield and antimicrobial activity was selected for molecular identification using the 16S rRNA gene. Molecular identification analysis was performed according to standard methods using universal primers.

### Discussion of Results & Conclusions

In the present study, 30 indigenous moderately halophilic actinomycete strains were isolated. Initial screening showed that two isolates were able to produce EPS with antimicrobial properties. The highest inhibition zone diameters resulting from the antimicrobial activity of EPS from the selected isolate, at a concentration of 2% and volume of 200  $\mu$ l against *B. subtilis*, *E. coli*, *S. typhimurium* and *S. aureus* were 20, 18, 15 and 15 ml, respectively. FTIR results indicated the presence of hydroxyl groups in the structure of EPS from the selected isolate. HPLC analysis confirmed a heteropolysaccharide structure composed of six different monomers: rhamnose, mannose, glucose, fructose, galactose and arabinose. UV-Vis analysis at a wavelength of 267 nm confirmed the presence of carboxyl, carbonyl, amine and ester functional groups. TGA showed that the EPS under investigation had an acceptable thermal stability. Phylogenetic analysis of the target isolates confirmed that the indigenous strain isolated with 100% similarity belonged to the genus *Streptomyces*. The findings of this study reveal that indigenous halophilic actinomycetes isolated from the rhizosphere soils of Qom Salt Lake could serve as a significant source for the production of safe microbial EPS with strong antimicrobial properties and diverse biotechnological applications, especially in the food and pharmaceutical industries.

## غربالگری و آنالیز فیلوژنتیکی اکتینومیسیت شورپسند بومی تولیدکننده آگزوپلی ساکارید با فعالیت ضد میکروبی

لیلا موسوی

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم.

[lila65mosavy@gmail.com](mailto:lila65mosavy@gmail.com)

سید سهیل آقائی 

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم.

[soheilaghace@yahoo.com](mailto:soheilaghace@yahoo.com)

محمد رضا زند منفرد

گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم.

[zand.monfared@gmail.com](mailto:zand.monfared@gmail.com)

### چکیده

آگزوپلی ساکاریدها نقش مهمی در مقاومت میکروارگانیسم‌ها در مقابل انواع تنش‌ها از جمله شوری دارند. هدف اصلی این تحقیق جداسازی و غربالگری سویه‌های بومی اکتینومیسیت‌های نمک‌دوست مولد آگزوپلی ساکارید ضد میکروبی از خاک ناحیه ریزوسفری گیاهان دریاچه نمک قم بود. جداسازی ابتدایی سویه‌های اکتینوباکتری با استفاده از محیط کشت ISP2 دارای غلظت نمک‌های مختلف انجام شد. برای تولید آگزوپلی ساکارید از محیط کشت مایع BHI حاوی ۲ درصد ساکارز استفاده شد. فعالیت ضد میکروبی با روش انتشار در آگار و MIC و MBC با روش میکروپلیت ۹۶ چاهکی تعیین شد. ساختار آگزوپلی ساکارید با آزمون‌های HPLC، FTIR، UV-Vis و آنالیز حرارتی و پایداری با آزمون TGA بررسی شد. جدایه‌های منتخب براساس خصوصیات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی و روش مولکولی 16S rRNA شناسایی شدند. در این تحقیق ۳۰ سویه بومی نمک‌دوست نسبی اکتینومیسیت جداسازی شد. ۲ جدایه دارای توانایی تولید آگزوپلی ساکارید با خاصیت ضد میکروبی بودند. بیشترین فعالیت ضد میکروبی آگزوپلی ساکارید علیه سویه‌های بیماری‌زا در غلظت ۲ درصد و مقدار ۲۰۰ میکرولیتر به دست آمد. نتایج حاصل از FTIR حضور عوامل هیدروکسیل و آنالیز با روش HPLC ساختار هتروپلی ساکاریدی شامل ۶ مونومر را تأیید کرد. آنالیز با روش UV-Vis وجود گروه‌های عاملی کربوکسیل، کربونیل و آمین و استری را ثابت کرد. بررسی آزمون TGA پایداری قابل قبول را نشان داد. آنالیز فیلوژنتیکی جدایه‌ها تأیید کرد سویه جداسازی شده با ۱۰۰ درصد تشابه متعلق به جنس *استرپتومایسس* بود. نتایج تحقیق حاضر نشان داد جدایه استرپتومیسیت شورزی بومی دریاچه نمک قم می‌تواند به عنوان منبع قابل ملاحظه‌ای برای تولید آگزوپلی ساکارید با کاربردهای زیست‌فناوری مختلف به‌ویژه در صنایع غذایی و دارویی مطرح باشد.

**واژگان کلیدی:** غربالگری، آگزوپلی ساکارید، اکتینوباکتری، نمک‌دوست بومی، خواص ضد میکروبی

\* نویسنده مسئول مکاتبات

موسوی، لیلا، آقایی، سید سهیل، زند منفرد، محمد رضا، غربالگری و آنالیز فیلوژنتیکی اکتینومیسیت شورپسند بومی تولیدکننده آگزوپلی ساکارید با فعالیت ضد میکروبی. زیست‌شناسی میکروبی، ۱۴۰۴؛ ۱۴(۵۳): ۳۱-۴۸. doi: 10.22108/bjm.2024.142099.1602



## مقدمه

در سال‌های اخیر توجه پژوهشگران به استفاده از متابولیت‌های باکتریایی به‌عنوان تنوع بالا، دوستدار محیط زیست بودن و قابلیت استفاده در صنایع مختلف بیشتر شده است (۱، ۲). آگزوپلی‌ساکاریدها از واحدهای قندی عمدتاً گلوکز، گالاکتوز و رامنوز در نسبت‌های مختلف تشکیل شده‌اند و در دو گروه هموپلی ساکاریدها و هتروپلی‌ساکاریدها قرار می‌گیرند (۳). در دهه‌های اخیر پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی ریزموجودات جایگزین پلی‌ساکاریدهای گیاهی شده‌اند که به مقدار فراوان و با درجه خلوص بالاتری به دست می‌آیند. توانایی تولید آگزوپلی‌ساکارید در میان باکتری‌ها بیشتر از قارچ‌ها و مخمرها است (۴). توجه ویژه به EPS (Exopolysaccharide) اغلب به‌دلیل تنوع آنها است. این تنوع، با تفاوت در تعداد و انواع عملکرد گروه‌های متصل به EPS است که پلیمرهایی با خواص مختلف ایجاد می‌کنند؛ در نتیجه، به آنها اجازه می‌دهد دارای یک طیف گسترده‌ای از عملکردهای فیزیولوژیکی درون‌ریز موجودات مانند حفظ مواد مغذی برای جلوگیری از گرسنگی، تشکیل بیوفیلم برای ایجاد روابط همزیستی یا برای محافظت در برابر خشک شدن و سموم یا آنتی‌بیوتیک‌ها در محیط اطراف آنها باشد (۵). پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی ریزموجودات هالوفیل دارای ثبات در دما، شوری و حتی pH بالا هستند. این ویژگی‌های منحصربه‌فرد EPS تولیدشده توسط هالوفیل‌ها، برنامه‌های کاربردی متنوعی را در زمینه‌های مختلف صنعت ارائه می‌دهد (۶). در سال‌های اخیر ترکیبات متعدد جدید با خواص ضد میکروبی کشف شدند که بخش عمده‌ای از آنها توسط اکتینوباکتری‌ها تولید می‌شوند. روش‌های جدید و فناوری‌های کشف محصولات طبیعی جدید نظیر پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی از منابع میکروبی موجود در نواحی شور از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. در

شرایط آزمایشگاهی پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی تولیدشده توسط *L. rhamnosus* جدا شده از شیر مادر فعالیت ضدباکتریایی چشمگیری را در برابر عوامل بیماری‌زا مانند *Salmonella enterica* سرووار تیفی موریوم و *E. coli* از خود نشان داده‌اند (۷). همچنین آگزوپلی‌ساکارید تولیدشده توسط *Bifidobacterium longum* تقسیم سلول عوامل بیماری‌زای باکتریایی یعنی *Vibrio parahaemolyticus*، *Typhimurium*، *Salmonella aureus*، *Staphylococcus aureus* و *Bacillus cereus* را مختل می‌کند. از طرف دیگر، آگزوپلی‌ساکارید *Lactobacillus gasseri hetero* فعالیت ضدباکتریایی را در برابر چندین مورد از عوامل بیماری‌زا نشان داده است؛ از جمله لیستریا مونوسایتوژنز MTCC ۶۵، که به‌طور چشمگیری بدین وسیله مهار می‌شود. آگزوپلی‌ساکارید تولیدشده توسط *L. plantarum C70* جدا شده از شیر شتر باعث کاهش رشد ۲ تا ۳ برابری باکتری‌های بیماری‌زای *E. coli* و *S. aureus* در شرایط آزمایشگاهی شدند. آگزوپلی‌ساکارید تولیدشده توسط *Lactobacillus kefiranofaciens DNI* فعالیت ضدباکتری و فعالیت‌های باکتریواستاتیک علیه *Listeria Monocytogenes* و *S. enterica serovar Enteritidis* از خود نشان می‌دهند که تأثیر آن متناسب با غلظت پلی‌ساکارید خارج سلولی است. همچنین، EPS تولیدشده از *spp Lactobacillus* اثر آنتی‌باکتریال چشمگیری را در برابر *Micrococcus luteus Ca6* و *Salmonella enterica* از خود نشان می‌دهد. پلی‌ساکارید خارج سلولی لاکتوباسیلوس حاوی چندین نوع گروه‌های عملکردی است؛ برای مثال، کربونیل، فسفات و گروه‌های هیدروکسیل که به نظر نقش اساسی در اعمال اثرات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی EPS دارند. مطالعات اخیر، اهمیت نقش آنتاگونیستی EPSها برای عوامل ضد میکروبی مانند ویروس‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌ها را

### غربالگری و شناسایی اولیه جدایه‌ها

برای جداسازی اکتینوباکترها، نمونه‌های خاک با روش رقت‌سازی متوالی رقیق شدند. ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های ۲- تا ۱۰- در محیط کشت اختصاصی ISP<sub>2</sub> (pH ۷/۲ با درصد نمک‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد) کشت داده شدند. پلیت‌ها به مدت ۱۴-۷ روز در دمای ۲۸-۳۰ درجه سانتی‌گراد در گرمخانه نگهداری شدند. سویه‌هایی با کلنی‌ها و ظاهری پودری و خشک جداسازی شدند. شناسایی اولیه براساس مشخصات ظاهری کلنی، اندازه کلنی، تولید اسپور و نیز مشخصات میکروسکوپی میسلیم هوایی، وضعیت اسپور و شکل انشعابات اسپور انجام شد (۱۰).

### ارزیابی تولید پلی ساکارید خارج سلولی در جدایه‌های اکتینومیست نمک‌دوست

جدایه‌ها در ارلن مایر حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط BHI مایع با ۲ درصد ساکارز تلقیح شدند. ارلن‌ها به مدت ۹ روز در دمای ۲۸-۳۰ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه گرم‌گذاری شدند (۱۱).

### استخراج آگزوپلی ساکارید در جدایه‌های منتخب

در این مرحله محیط کشت با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس به سوپرناتانت تری کلرو استیک اسید (۵ درصد) اضافه شد و یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده و دوباره با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس ۳ برابر حجم مایع رویی اتانول مطلق، اضافه و یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پلی ساکاریدهای رسوب داده شده با سرعت ۱۲۰۰۰ هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. دو بار با استون شسته شد و سپس در زیر هود برای خشک شدن قرار داده شد (۱۲).

آشکار کرده است. همچنین، از پلی ساکاریدهای خارج سلولی برای درمان آلودگی‌های ناشی از باکتری و ویروس، افزایش پاسخ‌های واکسیناسیون و کاهش آلرژی گزارش شده است. طول زنجیره EPS و وزن مولکولی آنها بر فعالیت‌های بیولوژیکی آنها مانند فعالیت‌های ضد میکروبی تأثیر می‌گذارند. حضور گروه‌های فسفات و آهنی می‌تواند فعالیت بیولوژیکی ضد میکروبی و ضد سرطانی EPS را بهبود ببخشد (۸).

با توجه به مطالب اشاره شده و اهمیت تنوع و خواص زیستی و دارویی پلی ساکاریدهای خارج سلولی ریز موجودات، هدف تحقیق حاضر، غربالگری و جداسازی اکتینومیست‌های شورپسند خاکزی دریاچه نمک قم با توانایی تولید EPS و ارزیابی اثرات ضدباکتری این متابولیت‌های ارزشمند است. شایان ذکر است این تحقیق برای اولین بار در کشور در رابطه با دریاچه نمک قم انجام شد. از مهم‌ترین جنبه‌های نوآوری و کاربردی این طرح تحقیقاتی دستیابی به پلی ساکاریدهای خارج سلولی با خواص ضدباکتریایی خواهد بود.

### مواد و روش‌ها

#### جمع‌آوری نمونه

برای جمع‌آوری نمونه‌های خاک، ابتدا بخش‌های سطحی (حدود ۵ سانتی‌متر) خاک‌های اطراف ریشه گیاهان و درختچه‌های (گز، سودا، پرنده، سالسولا، درمنه بیابانی، اشنان و تاغ زرد) مسیر دریاچه نمک قم (میسله) کنار زده شدند و با بیلچه کاملاً تمیز و استریل از عمق ۱۵ تا ۳۰ سانتی‌متر و به‌طور تصادفی حدود ۱۰۰ نمونه خاک برداشت شد و در بسته‌های پلی‌تن استریل قرار داده شدند. سپس تمامی نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و سپس به آزمایشگاه انتقال یافتند و تاریخ و محل نمونه‌گیری روی نمونه‌ها درج شد (۹).

### تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی به روش رقیق کردن در محیط مایع میکرو

در این مرحله از میکروپلیت‌های ۹۶ چاهک از جنس پلی‌استیرن استفاده شد. به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محیط مایع مولر هیتون برات اضافه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آگزوپلی ساکارید که با غلظت ۰/۱ گرم آگزوپلی ساکارید در ۱ میلی‌لیتر آب دیونیزه استریل تهیه شده است، درون چاهک اول هر ردیف ریخته و با چاهک‌های بعد سریال رقت شد. این کار به‌طور متوالی تا چاهک شماره ۱۰ تکرار شد و در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر اضافی دور ریخته شد. سپس ۱۵-۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون نیم مک فارلند باکتری بیماری زا (کشت ۲۴ ساعت) مدنظر به چاهک‌ها اضافه شد. چاهک برای کنترل مثبت (بدون EPS) و منفی (بدون باکتری) در نظر گرفته شد. میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، گرماگذاری و میزان رشد در دستگاه میکروپلیت ریدر (Epoch2c- آمریکا) با طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. کمترین غلظت از محلول آگزوپلی ساکارید که مانع رشد باکتری‌های مورد آزمایش شد، به‌عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی گزارش شد (۱۵).

### شناسایی بیوشیمیایی جدایه منتخب

برای شناسایی اولیه جدایه‌های منتخب از ویژگی‌های مورفولوژی کلی، رنگ‌آمیزی گرم و سایر آزمون‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی براساس کتاب مرجع برجی استفاده شد (۱۶).

### تعیین ساختار آگزوپلی ساکارید با آزمون FTIR

ساختار آگزوپلی ساکارید تولیدشده از طریق دستگاه طیف‌سنجی تبدیل فوریه- مادون قرمز (FT-IR) Rayleigh مدل WQF-510 ساخت کشور چین تجزیه و تحلیل شد.

### هیدرولیز پلی ساکارید خارج سلولی جدایه‌های منتخب

۰/۰۱ گرم پلی ساکارید خارج سلولی با ۱/۲۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۷۲ درصد حل شد و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه قرار داده شد. سپس ۱۳ میلی‌لیتر آب دیونیزه به محلول مدنظر اضافه شد. محلول به مدت ۴ ساعت داخل حمام آب گرم دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس محلول در دمای محیط قرار داده شد تا خنک شود. سپس ۳/۱ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم ۳۲ درصد و ۷/۶۵ میلی‌لیتر متانول به نمونه اضافه شد. حجم نهایی باید ۲۵ میلی‌لیتر باشد. مابقی محلول با اتانول به حجم رسانده شد (۱۳).

### بررسی فعالیت ضد میکروبی پلی ساکارید خارج سلولی جدایه‌های منتخب

برای ارزیابی خاصیت ضد میکروبی از سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران باکتری‌های بیماری‌زای *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 10690، *اشریشیا کلای* ATCC 10708، *سالمونلا تیفی* موربیوم ATCC 10707 و *باسیلوس سوبتیلیس* ATCC 1080 استفاده شد. فعالیت ضد میکروبی پلی ساکاریدهای خارج سلولی جدایه‌های منتخب (کشت ۲۴ ساعته و با غلظت نیم مک فارلند) به روش چاهک‌گذاری روی محیط مولر هیتون آگار (با اندکی تغییر) انجام شد. از آب دیونیزه به‌عنوان حلال آگزوپلی ساکارید استفاده شد و با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ درصد به مقدار ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرولیتر به چاهک‌ها اضافه شدند. یک چاهک حاوی آب دیونیزه به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، گرماگذاری و از نظر وجود هاله عدم رشد بررسی شدند (۱۴).

### شناسایی مولکولی جدایه منتخب

به منظور تکثیر ژن *16S rRNA* از پرایمرهای یونیورسال (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3') و (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') 1541R استفاده شد. پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی استفاده شده در این واکنش، سکانس نوکلئوتیدی ژن *16S rRNA* است که محصول 1520 جفت باز را ردیابی می کند. برنامه PCR با استفاده از آنزیم تک پلیمرز و به روش زیر انجام گرفت:

دنا تورا سیون اولیه در دمای 95 درجه سانتی گراد به مدت 2 دقیقه انجام شد. به منظور جدا شدن دو رشته DNA الگو از یکدیگر 30 سیکل که شامل 30 ثانیه در دمای 95 درجه سانتی گراد برای دنا تورا سیون، 30 ثانیه در دمای 52 درجه سانتی گراد به منظور اتصال پرایمرها به توالی DNA و 40 ثانیه طولی سازی در دمای 72 درجه سانتی گراد انجام شد. سپس طولی سازی نهایی در دمای 72 درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه انجام شد. نمونه در دمای 4 درجه سانتی گراد نگهداری شد. ران کردن روی ژل، برای اثبات وجود باندهای مدنظر انجام شد. باند تشکیل شده برای تشخیص این ژن روی ژل آگارز 1520 جفت باز است.

### تعیین توالی ژن

بعد از خالص سازی برای تمامی نمونه های مثبت OD هریک از نمونه ها خوانده شد. سپس ارسال محصول PCR به کمپانی میکرو سینس سوئیس برای تعیین توالی به روش سنگر از طریق شرکت توپازژن با حجم حدود 10 میکرو لیتر و غلظت (30 نانو گرم بر میکرو لیتر) از هر نمونه انجام شد؛ در نهایت بررسی سکانس ها با برنامه CLC Sequence Viewer با سکانس های اورجینال موجود در بانک اطلاعاتی NCBI ثبت شد (19).

در این آزمون باندهای جذبی مادون قرمز، اجزا و ساختارهای مولکولی خاص مشخص می شوند. برای انجام این تکنیک 1 تا 2 میلی گرم پودر آگزوپلی ساکارید خشک شده با 100 میلی گرم پتاسیم برماید سائیده شد و تحت فشار 7500 کیلوگرم به مدت 30 ثانیه در دستگاه FTIR قرار داده شد (12).

### بررسی آگزوپلی ساکارید جدایه منتخب با آزمون HPLC

برای این منظور 5 میلی گرم آگزوپلی ساکارید هیدرولیز شده در آب، حل و با فیلتر سرسرنگی 0/45 میکرون صاف شد. سپس 20 میکرو لیتر از آن را به دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) شرکت Knauer مدل Pump k-100 آشکارساز K-2301 ستون C18 با ابعاد 250x4/6 تزریق شد. کروماتوگرام به دست آمده با استانداردها برای شناسایی تحلیل شد. فاز متحرک استونیتریل / آب با نسبت 20/80 حجمی سرعت جریان 1 میلی لیتر بر دقیقه انجام شد (17).

### بررسی آگزوپلی ساکارید جدایه منتخب با آزمون حرارتی (TGA)

برای آزمون حرارتی و پایداری آگزوپلی ساکارید جدایه منتخب، نمونه در ظرف  $Al_2O_3$  قرار داده شد و با سرعت گرمایش 10 درجه سانتی گراد بر دقیقه در محدوده 30-1000 درجه، گرم و نمودار آن بررسی شد (18).

### بررسی آگزوپلی ساکارید جدایه منتخب با آزمون طیف نورسنجی (UV-Vis)

برای بررسی انتقال الکترونی و بررسی میزان متابولیت، از طیف سنجی جذبی مرئی - فرابنفش استفاده شد (11).



## نتایج

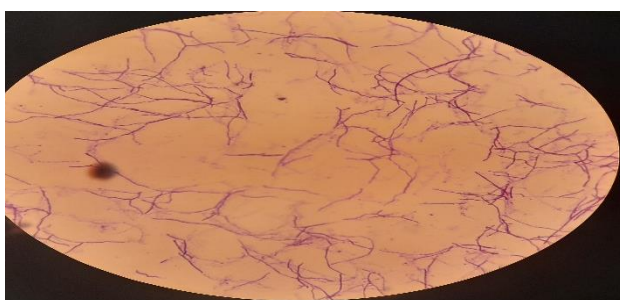
## غربالگری و جداسازی اولیه اکتینومیست‌ها از نمونه‌های خاک

در این تحقیق ۳۰ سویه اکتینوباکتر از نمونه‌های خاک جدا شدند. از این تعداد ۴ جدایه توانستند نمک ۱۰ درصد را تحمل کنند و ۳ جدایه قادر به تولید اگزوپلی‌ساکارید بودند. در مراحل بعدی جدایه‌ای

انتخاب و ارزیابی شد که اگزوپلی‌ساکارید آن خاصیت ضد میکروبی نشان داد.

## شناسایی ماکروسکوپی و میکروسکوپی

جدایه‌های اکتینوباکتر دارای کلنی‌های سفت و گچی بودند (شکل-۱). مشخصات میکروسکوپی اکتینوباکترها در شکل ۲- که حاوی میسلیم هوایی بودند و همچنین وضعیت اسپور و شکل انشعابات اسپور نشان داده شده‌اند.



شکل ۲- تصویر میکروسکوپی رنگ آمیزی گرم بزرگ‌نمایی ۱۰۰ میکروسکوپ نوری اکتینوباکتر منتخب

Figure 2-Microscopic image of gram staining, magnification of 100 optical microscopes of selected *Actinobacteria*



شکل ۱- تصویر ماکروسکوپی کلنی‌های اکتینوباکتر جدایه منتخب

Figure 1- Macroscopic image of *Actinobacteria* colonies of the selected isolate

۳۰-۲۸ درجه سانتی‌گراد با ۲۰۰ rpm مشاهده شد (شکل-۳).

## بررسی خاصیت بازدارندگی اگزوپلی‌ساکارید جدایه منتخب

نتایج خواص ضد میکروبی اگزوپلی‌ساکارید تولید شده توسط جدایه با کد شماره ۱، در غلظت ۲۰۰ درصد (۲۰۰ میکرولیتر)، هاله عدم رشد در باکتری‌های بیماری‌زای *Staphylococcus aureus* ۱۵ میلی‌متر، *Escherichia coli* ۱۸ میلی‌متر، *Bacillus subtilis* در *Typhimurium* ۱۵ میلی‌متر و غلظت‌های ۲۰۰ درصد و ۱۵۰ درصد (۲۰۰ و ۱۵۰ میکرولیتر) به ترتیب ۲۵ و ۱۵ میلی‌متر هاله عدم رشد مشاهده شد. بیشترین هاله عدم رشد در باسیلوس سوبتیلیس مشاهده شد (شکل-۴).

## ویژگی‌های بیوشیمیایی جدایه منتخب اکتینومیست

جدایه منتخب کاتالاز مثبت و محدوده رشد آن در سدیم کلراید (۱۰٪/V/W) است. محدوده دمایی جدایه در دمای ۳۰-۲۸ درجه سانتی‌گراد و بهینه pH آنها ۷/۲ بود. هیدرولیز ژلاتین و نشاسته، منفی و اوره و لستیناز مثبت بود. سایر اطلاعات در جدول-۱ آمده است. با توجه به نتایج آنالیز بیوشیمیایی نام جنس باکتری *استرپتومایسس* تعیین شد.

## تولید اگزوپلی‌ساکارید جدایه منتخب

سویه منتخب قادر به تولید ۲/۸-۳ گرم بر لیتر بیشترین تولید اگزوپلی‌ساکارید در محیط BHI برات با ۲ درصد ساکارز به مدت ۹ روز در انکوبه شیکردار در دمای

جدول ۱- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی جدایه منتخب

Table 1- Results of biochemical tests of selected isolates

نتایج	نوع آزمون	نتایج	نوع آزمون	نتایج	نوع آزمون
-	فروکتوز	-	هیدرولیز نشاسته	+	کاتالاز
+	گزیلوز	+	لستیناز	-	اکسیداز
+	رافینوز	+	احیای نترات	+	هیدرولیز اوره
+	آرابینوز	-	ژلاتیناز	-	احیا نترات
+	ساکارز	-	تولید ملاتین	-	حرکت
۷/۲	محدوده pH	-	DNase	-	اندول
		-	گلوکز	-	تجزیه نوئین



شکل ۳- آگزوپلی ساکارید خشک شده جدایه منتخب

Figure 3- Dried EPS of the selected isolate



باکتری سالمونلا تیفی موربیوم



باکتری باسیلوس سوبتیلیس



باکتری اشریشیا کلائی



باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

شکل ۴- هاله عدم رشد در سویه‌های مورد آزمون

Figure 4- Inhibition zone in the test strains

*Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*

جدول ۲- نتایج آزمون MIC آگزوپلی ساکارید جدایه منتخب  
Table 2- The results of the MIC test of the selected isolate EPS

چاهک	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	نوع ماده
غلظت آگزوپلی ساکارید	۰/۰۵ گرم بر میلی لیتر	۰/۰۲۵ گرم بر میلی لیتر	۰/۰۱۲ گرم بر میلی لیتر	۰/۰۰۶ گرم بر میلی لیتر	۰/۰۰۳ گرم بر میلی لیتر	۰/۰۰۱ گرم بر میلی لیتر	۰/۰۰۰۷ گرم بر میلی لیتر	۰/۰۰۰۳ گرم بر میلی لیتر	۰ گرم بر میلی لیتر	۰/۰۵ گرم بر میلی لیتر	آگزوپلی ساکارید
اشریشیا کلای	-	-	+	+	+	+	+	+	کنترل +	کنترل -	آگزوپلی ساکارید
باسیلوس سوبتیلیس	-	-	-	+	+	+	+	+	کنترل +	کنترل -	آگزوپلی ساکارید
سالمونلا تیفی موریوم	-	-	+	+	+	+	+	+	کنترل +	کنترل -	آگزوپلی ساکارید
استافیلوکوکوس اورئوس	-	+	+	+	+	+	+	+	کنترل +	کنترل -	آگزوپلی ساکارید

است (شکل-۵).

نوار جذبی  $3431 \text{ cm}^{-1}$  نشان‌دهنده تعداد زیادی گروه‌های هیدروکسیل (OH-) است؛ بنابراین، پلیمر خالص پلی ساکارید است. در  $2921 \text{ cm}^{-1}$ ،  $1632 \text{ cm}^{-1}$  و  $1243 \text{ cm}^{-1}$  به ترتیب مربوط به پیوند (C-H)، پیوند (C=O) و پیوند (C-O-C) است.

**آنالیز کیفی آگزوپلی ساکارید با آزمون UV-Vis**  
آگزوپلی ساکارید جدایه منتخب با آزمون طیف‌سنجی UV-Vis بررسی شد (شکل-۶).

همان‌طور که در طیف مشاهده می‌شود، طول موج ماکزیمم ۲۶۷ نانومتر است و آنالیز کمی میزان تولید آگزوپلی ساکارید است. در این محدوده احتمال انتقالات در گروه‌های کربوکسیل، کربونیل، آمین و استری وجود دارند که نشان‌دهنده کونژوگ شدن با پروتئین‌ها است. در طیف رزونانس مغناطیسی هسته مربوط به آگزوپلی ساکارید در ناحیه ۳-۲ پروتون‌های پلی ساکارید مشاهده می‌شوند و در ناحیه ۳-۴ رزونانس پروتون وضعیت آنومریک را تأیید می‌کند.

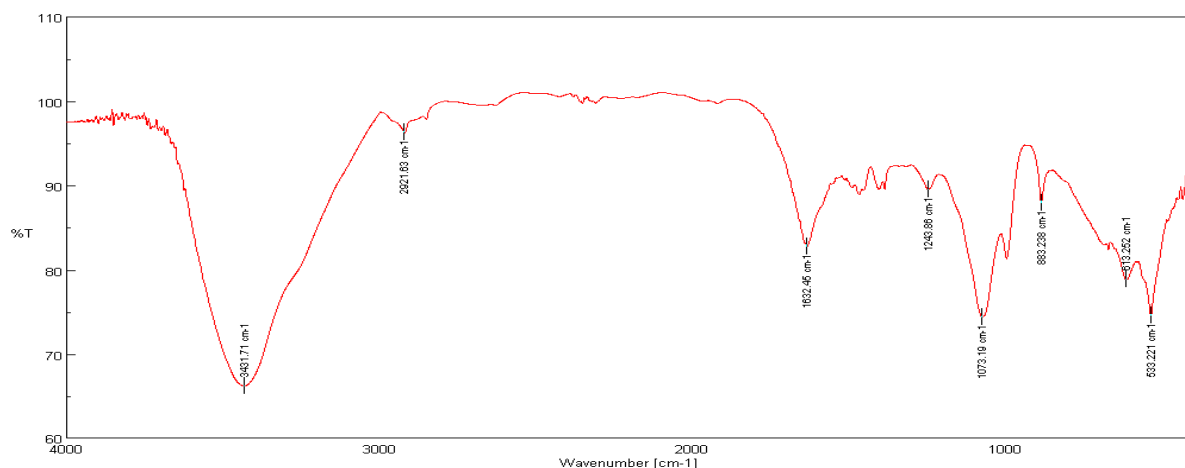
## نتایج MIC-MBC

کمترین غلظت از محلول آگزوپلی ساکارید مدنظر که مانع رشد باکتری‌های بیماری‌زا شد، به عنوان MIC گزارش شد. نتایج MIC در جدول-۲ آورده شده‌اند.

باکتری *Escherichia coli* در چاهک اول و دوم رشد نکرد و چاهک دوم (۰/۰۲۵ گرم بر میلی‌لیتر) که چاهک ماقبل چاهک رشد است، به عنوان MIC گزارش شد. *Salmonella Typhimurium* نیز مشابه *Escherichia coli* جواب داد. باکتری *Staphylococcus aureus* در چاهک اول (۰/۰۵ گرم بر میلی‌لیتر) رشد نداشت. باکتری *Bacillus subtilis* در چاهک اول رشد نداشت و چاهک سوم (۰/۰۱۲ گرم بر میلی‌لیتر) که چاهک ماقبل چاهک رشد است، به عنوان MIC گزارش شد.

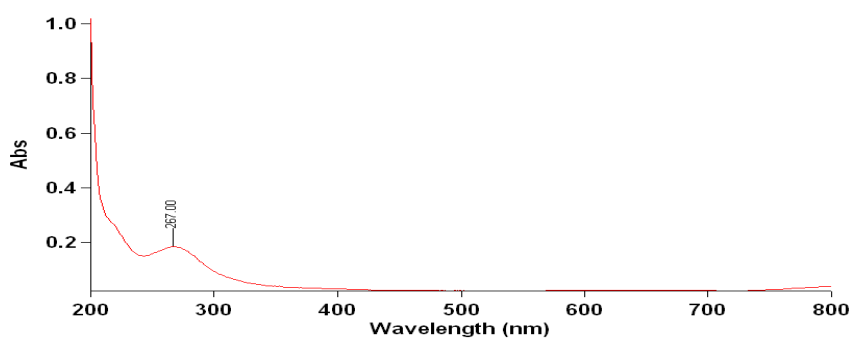
## آنالیز کمی آگزوپلی ساکارید طیف‌سنجی FTIR

بررسی ساختار متابولیت تولیدشده با آزمون FTIR انجام شد که تحلیل گراف تولیدشده تأییدکننده تولید ساختار مدنظر است. گراف به دست آمده در شکل ۵ آورده شده



شکل ۵- گراف آنالیز FTIR آگزوپلی ساکارید تولید شده توسط جدایه منتخب

Figure 5- FTIR analysis graph of the EPS produced by selected isolated



شکل ۶- طیف UV-Vis آگزوپلی ساکارید جدایه منتخب

Figure 6- UV-Vis spectrum of selected isolated EPS

کاربرد آگزوپلی ساکاریدها تا حد زیادی به رفتار حرارتی آنها بستگی دارد. تجزیه و تحلیل گرماسنجی براساس کاهش وزن مواد به عنوان تابعی از دما است؛ بنابراین، ویژگی حرارتی یک مشخصه مهم برای کاربرد تجاری پلی ساکاریدها است. همان طور که در شکل نشان داده شده است، اولین مرحله حدود ۲۴ درصد کاهش وزن در دامنه ۱۲۰-۳۰ درجه است که مربوط به کاهش وزن حذف آب و تخریب کربوکسیل است. در مرحله بعد، کاهش وزن تا ۴۰ درصد در محدوده ۵۰۰-۱۲۰ درجه اتفاق می افتد که به تخریب پلی ساکارید نسبت داده می شود. تفاوت ساختار آگزوپلی ساکاریدها تفاوت پایداری حرارتی را نشان می دهد و در صنایع غذایی اهمیت پیدا می کند.

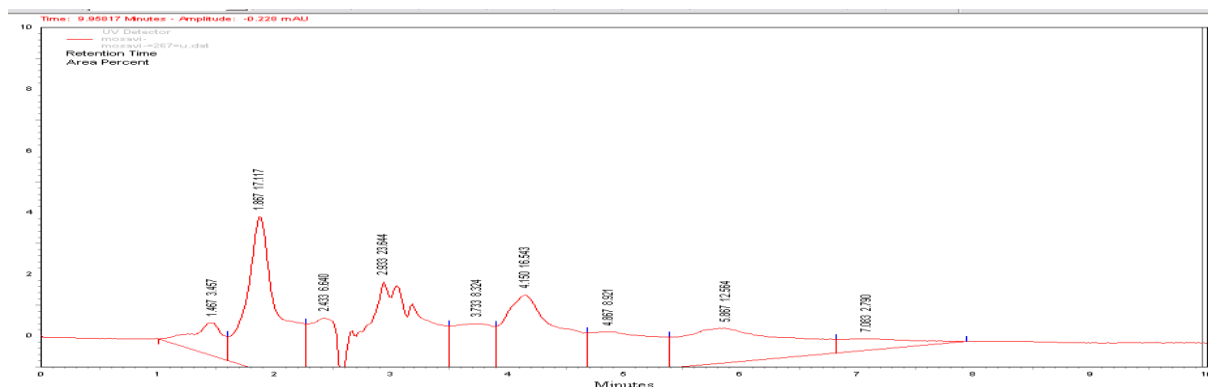
### آنالیز کیفی آگزوپلی ساکارید با آزمون HPLC

آگزوپلی ساکارید جدایه منتخب با آزمون کروماتوگرافی HPLC بررسی شد. کروماتوگرام به دست آمده در شکل ۷ آورده شده است.

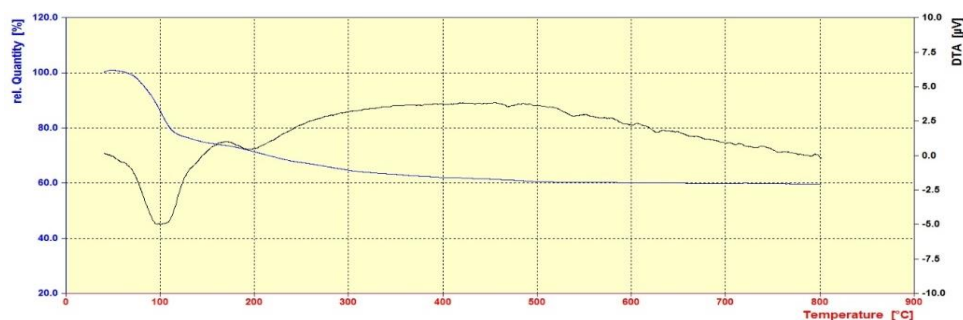
نتایج براساس استانداردها نشان دادند آگزوپلی ساکارید ۶ مونوساکارید رامینوز، مانوز، گلوکز، فروکتوز، گالاکتوز و آرابینوز است و درواقع یک هتروپلی ساکارید است.

### آنالیز ساختار مولکولی آگزوپلی ساکارید با آزمون TGA

آگزوپلی ساکارید جدایه منتخب با آزمون حرارتی TGA بررسی شد (شکل ۸).



شکل ۷- کروماتوگرام HPLC اگزوپلی ساکارید جدایه منتخب  
Figure 7- HPLC chromatogram of selected isolated EPS



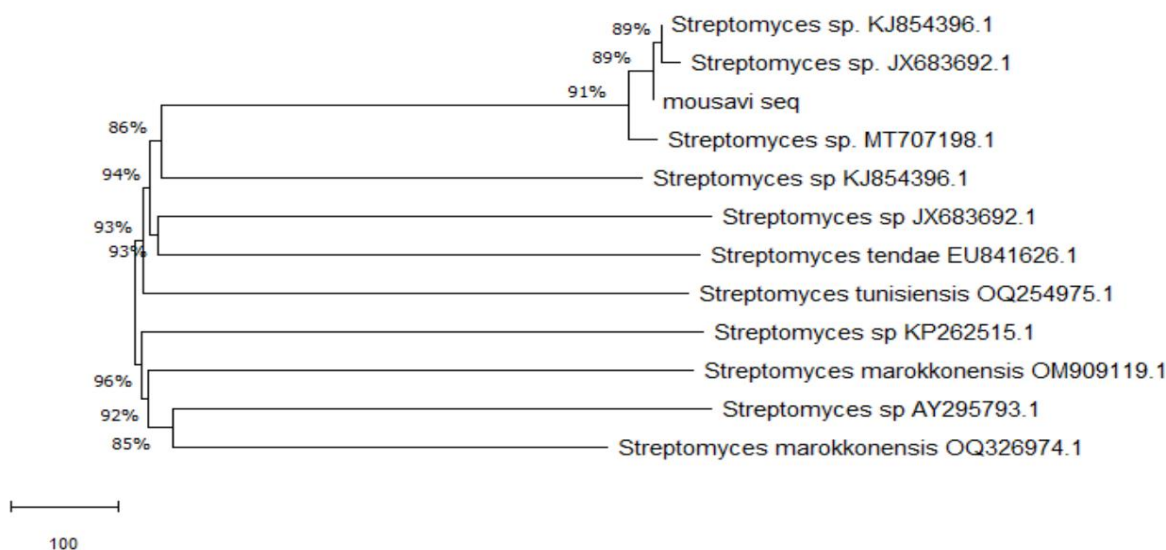
شکل ۸- گراف TGA اگزوپلی ساکارید جدایه منتخب  
Figure 8 - TGA graph of selected isolated EPS

### شناسایی مولکولی جدایه منتخب

تصویر درختچه (شکل-۹) براساس متد Neighbor joining به روش اختلاف نوکلئوتیدی رسم شد که نشان‌دهنده شباهت ۱۰۰ درصدی جدایه فوق با طول قطعه ۱۵۲۰ جفت‌باز نوکلئوتیدی با باکتری *استریپتومایسس* به شماره KJ854396 است و در رسم دندروگرام فیلوژنتیک در یک شاخه قرار می‌گیرند.

### تکثیر توالی ژن *16srRNA* توسط واکنش PCR

نتایج الکتروفورز نمونه‌ها براساس پرایمرهای استفاده‌شده برای انجام واکنش PCR باند ۱۵۲۰ جفت‌بازی روی ژل آگارز ۱ درصد است که تکثیر ژن مدنظر را نشان داد.



شکل ۹- نتایج حاصل از ترسیم دندروگرام فیلوژنتیک، تعیین توالی و درختچه فیلوژنتیک که شباهت به استرپتومیست‌ها را نشان می‌دهد. رسم درختچه براساس متد neighbor joining به روش اختلاف نوکلئوتیدی رسم شد که نشان‌دهنده میزان شباهت نوکلئوتیدها براساس نرم‌افزار MEGA X است.

Figure 9- The results of drawing the phylogenetic dendrogram and determining the sequence and the phylogenetic tree show a similarity to *Streptomyces*. The tree was drawn based on the neighbor-joining method using the nucleotide difference method, which shows the degree of nucleotide similarity based on the MEGA X software.

## بحث

بنابراین، اکتینومیست‌های کمیاب به‌عنوان منابع جدید متابولیت فعال زیستی درخور توجه قرار گرفته‌اند (۲۱). الیاکس و همکاران (۲۰۱۹) از نمونه آب‌های ساحلی جزیره موریس گونه‌های باکتریایی تولیدکننده آگزوپلی ساکارید با خواص ضدباکتریایی در برابر جنس *استیویاکتر* را جداسازی کردند و در نهایت جدایه‌ها را با آنالیز مولکولی و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک شناسایی کردند (۲۲). فاطمه نهال و همکاران (۲۰۱۹) خصوصیات تولید بالا و فعالیت ضد میکروبی آگزوپلی ساکاریدها از لاکتوکوکوس لاکتیک شیر شتر را بررسی کردند (۲۳). پالانیان سیدویا و همکاران (۲۰۱۸) سنتز سبز نانوذرات نقره به همراه آگزوپلی ساکارید به‌عنوان ماده واسط را انجام دادند و خواص ضدباکتریایی آن را بررسی کردند (۲۴). کووان کیما و همکاران (۲۰۱۳) آگزوپلی ساکارید خارج سلولی یک اکتینوباکتر دریایی را بررسی کردند که ممکن است به عنوان منبع جدیدی از آنتی‌اکسیدان طبیعی با ارزش

با توجه به استفاده بیش‌ازحد و بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها، بسیاری از عوامل بیماری‌زا به درمان آنتی‌بیوتیکی مقاوم شده‌اند. این عوامل بیماری‌زا با داشتن تعداد زیادی از ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک در بین ژنوم اصلی و پلاسمیدها سبب محدود شدن انتخاب‌های درمانی شده‌اند (۲۰). امروزه مطالعات بسیار زیادی برای کشف و توسعه آنتی‌بیوتیک‌های جدید به‌عنوان عامل مؤثر در برابر عوامل بیماری‌زای کشنده مورد نیاز است. اکتینومیست‌ها با ارزش‌ترین میکروارگانیسم‌ها برای تولید و سنتز ترکیبات درمانی و آنتی‌بیوتیک‌های جدید هستند. مطالعات زیادی توسط دانشمندان برای جداسازی اکتینومیست‌ها، به‌عنوان منبع اصلی تولیدکننده آنتی‌بیوتیک‌ها و متابولیت‌های ثانویه متنوع انجام شده است؛ اما در دو دهه گذشته میزان کشف متابولیت‌های جدید جدا شده از اکتینومیست‌های بارز اعضای جنس *استرپتومیسیس*‌ها کاهش یافته است؛

برخی ویژگی‌های اختصاصی باکتری‌ها از جمله ساختار دیواره سلولی، وجود پپتیدوگلیکان و محتوای ژنومی تک کروموزومی با درصد G+C بالا، جزء سلسله باکتری‌ها محسوب می‌شوند (۲۸). به‌عنوان یکی از بزرگ‌ترین راسته‌های باکتریایی در جدیدترین تقسیم بندی‌های فیلوژنتیکی، در ۶ کلاس و ۲۰ راسته به همراه ۶۶ خانواده قرار گرفته‌اند. مهم‌ترین و شناخته‌شده‌ترین جنس‌های اکتینوباکترها شامل نوکاردیا، مایکوباکتریوم، کورینه باکتریوم، استرپتومایسس و رودوکوکوس هستند که به دلیل کاربردهای دارویی، پزشکی، بیوتکنولوژی و صنعتی و در موارد کمتر به دلیل بیماری‌زایی شایان توجه قرار گرفته‌اند (۲۹). با توجه به توانایی اکتینوباکترها در سازگاری و زندگی در محیط‌های مختلف و پیدایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها و همچنین کاهش روزافزون منابع جدید برای جداسازی ترکیبات دارویی، توجه محققان را به خود جلب کرده‌اند (۳۰). اکثر متابولیت‌های تولیدشده توسط اکتینوباکترهای هالوفیلیک، مربوط به جنس استرپتومایسس است و حدود ۵۰ درصد از کل آنتی‌بیوتیک‌های تولیدشده را سنتز می‌کنند (۳۱). مشخصات ساختاری پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی مانند وزن مولکولی، تعداد و اتصالات ساکاریدی می‌تواند نقش مهمی در کاربرد وسیع آنها در صنایع مختلف داشته باشند. در دهه‌های اخیر، پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی ریزموجودات جایگزین پلی‌ساکاریدهای گیاهی شده‌اند که به مقدار فراوان و با درجه خلوص بالاتری به دست می‌آیند. آگروپلی‌ساکاریدها در هنگام رشد باکتری‌ها توسط باکتری‌های مختلف تولید می‌شوند. مطالعات مختلف نشان می‌دهد توانایی تولید آگروپلی‌ساکارید در میان باکتری‌ها بیشتر از قارچ‌ها و مخمرها است (۴). اثر باکتری‌های مولد آگروپلی‌ساکارید بر خصوصیات فیزیکی ریزوسفر خاک نشان می‌دهد کلنیزاسیون متراکم ریزوسفر گیاه همراه باکتری مولد

بالقوه برای سلامتی، غذا و درمان بررسی شود (۲۵). در این تحقیق هاله عدم رشد پاتوژن‌ها به نسبت دیگر پژوهش‌های انجام‌شده به مراتب بیشتر بود و هاله عدم رشد ۳۵ میلی‌متر در باکتری *E.coli* بود که مزیت مهمی در اکتینوباکترهای نمک‌دوست تولیدکننده آگروپلی‌ساکارید در این پژوهش است. همچنین، تاکنون در داخل کشور روی جداسازی و شناسایی انواع باکتری‌های تولیدکننده آگروپلی‌ساکارید در دریاچه نمک قم کار تحقیقی انجام نشده است. شناسایی و تعیین ویژگی‌های متابولیت اکتینومایسس‌ها به‌خصوص استرپتومایسس‌های نمک‌دوست، زمینه پژوهشی جدید و تازه‌ای محسوب می‌شود؛ بنابراین، انجام این تحقیق قدم‌های مؤثری در تهیه اطلاعات لازم و مفید برای به کارگیری این ریزموجودات در تولید آگروپلی‌ساکاریدهای ضد میکروبی و کاربردی کردن این محصولات زیستی در صنایع دارویی و غذایی است. گونه‌های باکتری استرپتومایسس منبع اصلی آنتی‌بیوتیک‌های مهم بالینی هستند. اکثر این ترکیبات بسیار پیچیده و توسط شیمی ترکیبی سنتز می‌شوند. از لحاظ ساختاری و عملکردی ترکیبات فعال زیستی متنوعی از اکتینومایسس‌ها به‌عنوان آنتی‌بیوتیک‌ها با عنوان ضدباکتری، ضدقارچ و ضدانگل جدا شده‌اند (۲۶). مطالعات زیادی توسط دانشمندان برای جداسازی اکتینومایسس‌ها انجام شده است؛ اما در دو دهه گذشته میزان کشف متابولیت‌های جدید جداشده از اکتینومایسس‌های بارز اعضای جنس استرپتومایسس‌ها کاهش یافته است؛ بنابراین، اکتینومایسس‌های کمیاب به عنوان منابع جدید متابولیت فعال زیستی درخور توجه قرار گرفته‌اند (۲۷). اکتینوباکترها یکی از اصلی‌ترین منابع ترکیبات زیست‌فعال طبیعی به‌ویژه آنتی‌بیوتیک‌ها هستند و نزدیک به دو سوم آنتی‌بیوتیک‌های موجود در بازار منشأ اکتینوباکتریایی دارند. اکتینوباکترها با وجود شباهت‌های مورفولوژیکی با قارچ‌ها، به دلیل داشتن

آگروپلی ساکاریدها روی عوامل بیماری‌زای میکروبی کار می‌کند و بر سیستم ایمنی ذاتی تأثیر می‌گذارد، خیلی پیچیده است و هنوز به خوبی شناخته نشده است؛ بنابراین، تحقیقات بیشتری لازم است؛ به‌ویژه روی مکانیسم‌هایی که در آن آگروپلی ساکاریدها اثرات خود را می‌گذارند (۳۳).

### نتیجه‌گیری

نتایج حاصل نشان می‌دهند خاک اطراف ریشه گیاهان دریاچه نمک قم دارای اکتینومیست‌های نمک‌دوست مولد آگروپلی ساکارید با خواص ضد میکروبی است. بررسی و مقایسه پژوهش حاضر و پژوهش‌های مشابه از جمله جداسازی سویه‌های اکتینومیست تولیدکننده آگروپلی ساکارید، آنالیز ساختاری آگروپلی ساکارید و بررسی خصوصیات ضدباکتریایی جدایه حاضر تأییدکننده صحت نتایج پژوهش حاضر و همچنین انتخاب درست نوع پژوهش و مکان نمونه‌برداری است.

آگروپلی ساکارید با خاکدانه‌سازی و پایداری خاک چسبیده به ریشه همراه بوده است. همچنین، جوانه‌زنی بذر در گیاهان همراه با کاربرد آگروپلی ساکارید باکتریایی بهبود یافته است. این باکتری‌ها در خاک‌های شور آگروپلی ساکارید بیشتری تولید می‌کنند و باعث افزایش دانه‌بندی اطراف ریشه گیاهان در خاک شور می‌شوند. در تحقیق حاضر می‌توان رشد گیاه تحت تنش شوری را توسط سویه منتخب جداسازی شده افزایش داد. همچنین، آگروپلی ساکاریدها طیف گسترده‌ای از کاربردهای بالقوه را در فناوری زیستی نوین به‌ویژه در پزشکی و داروسازی به‌عنوان عوامل ضدحساسیت دارند (۳۲). آگروپلی ساکارید باکتری‌های شورپسند دارای ثبات در درجه حرارت و همچنین آگروپلی ساکاریدهای با وزن مولکولی کم و بار منفی بیشتر می‌توانند پاسخ ایمنی را در میزان انسان نسبت به باکتری‌های بیماری‌زا بهبود بخشند. حضور گروه‌های فسفات و آهنی می‌تواند فعالیت بیولوژیکی ضد میکروبی و ضدسرطانی آگروپلی ساکارید را بهبود ببخشد. این مکانیزم که توسط

### References

- (1) Rasouli A, Aghaei SS, Zargar M. Bio-production of Single-cell Oil by *Rhodococcus Erythropolis* PTCC 1767 Bacterial using Low-cost Carbon Sources. Journal of Microbial Biology. 2020; 9(35):71-85. [In Persian] <https://doi.org/10.22108/bjm.2020.121878.1281>.
- (2) Rasouli A, Aghaei SS, Zargar M. Single-cell oil production using low-cost carbon sources by newly isolated *Kocuria* Y205. Archives of Hygiene Sciences. 2021; 10(2):143-54. <http://dx.doi.org/10.52547/ArchHygSci.10.2.143>
- (3) Moshabaki F, Tahmoorespour A, Ataabadi M, Mohamadi A. Isolation and identification of indigenous saline soil exopolysaccharide-producing bacteria. Journal of Sol Biology. 2017;5(1):37-47. [In Persian] <https://doi.org/10.22092/sbj.2017.113119>.
- (4) Larpin S, Sauvageot N, Pichereau V, Laplace J-M, Auffray Y. Biosynthesis of exopolysaccharide by a *Bacillus licheniformis* strain isolated from ropy cider. International Journal of Food Microbiology. 2002;77(1-2):1-9. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00058-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00058-2)
- (5) Harada K, Inoue H, El-Morsy MA, Itoh M, Umegaki S, Yatagai T. Holographic recording and control of diffraction efficiency using photoinduced surface deformation on azo-polymer films. Japanese Journal of Applied Physics. 2002;41(3S):1851. <https://doi.org/10.1143/JJAP.41.1851>
- (6) Wan WAAQI, Young L, Abbott GM, Clements C, Harvey LM, McNeil B. Antimicrobial properties and cytotoxicity of sulfated (1, 3)- $\beta$ -D-glucan from the mycelium of the mushroom *Ganoderma lucidum*. Journal of Microbiology and Biotechnology. 2016;26(6):999-1010. <https://doi.org/10.4014/jmb.1510.10018>



- (7) Zhao X, Zhou L, Riaz Rajoka MS, Yan L, Jiang C, Shao D, et al. Fungal silver nanoparticles: synthesis, application and challenges. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2018;38(6):817-35. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1414141>
- (8) Sadati R, Barghi A. Urmia hypersaline lake: A potential source of actinomycetes possessing. *Iranian Journal of Public Health*. 2014;43(2):149. <https://B2n.ir/h78789>
- (9) Aghaei S. Biosurfactant Production in Halotolerant *Actinomycetes* sp. Isolated from Saline Lack Soil in Qom city. *Applied Biology*. 2014;4(15):1-18.
- (10) Khalili BS, Hamed J, Haghigat S. Isolation and Identification Rare Actinobacteria from Persian Gulf and Oman Sea. *Journal of Arak University of Medical Sciences*. 2019;21(7):28-38. [In Persian] <http://jams.arakmu.ac.ir/article-1-5109-.pdf>.
- (11) Tavaneian S, Hamed J, Haghigat S. Introducing antimicrobial exopolymer-producing actinobacteria from soils of Iran. *Nova Biologica Reperta*. 2020; 7(1):55-63. [In Persian] <http://dx.doi.org/10.29252/nbr.7.1.55>.
- (12) Asker MS, El Sayed OH, Mahmoud MG, Yahya SM, Mohamed SS, Selim MS, et al. Production of exopolysaccharides from novel marine bacteria and anticancer activity against hepatocellular carcinoma cells (HepG2). *Bulletin of the National Research Centre*. 2018;42:1-9. <https://doi.org/10.1186/s42269-018-0032-3>
- (13) Kanmani P, Yuvaraj N, Paari K, Pattukumar V, Arul V. Production and purification of a novel exopolysaccharide from lactic acid bacterium *Streptococcus phocae* PI80 and its functional characteristics activity in vitro. *Bioresource Technology*. 2011; 102(7): 4827-33. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.118>
- (14) Rahnama Vosough P, Habibi Najafi MB, Edalatian Dovom MR, Javadmanesh A, Mayo B. Evaluation of antioxidant, antibacterial and cytotoxicity activities of exopolysaccharide from *Enterococcus* strains isolated from traditional Iranian Kishk. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2021;15:5221-30. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-01092-5>
- (15) Elyasifar B, Jafari S, Hallaj-Nezhadi S, Chapeland-Leclerc F, Ruprich-Robert G, Dilmaghani A. Isolation and identification of antibiotic-producing halophilic bacteria from Dagh Biarjmand and Haj Aligholi salt deserts, Iran. *Pharmaceutical Sciences*. 2019;25(1):70-7. <https://doi.org/10.15171/PS.2019.11>
- (16) Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity G. *The Proteobacteria: Part A Introductory Essays*: Springer Science+ Business Media, Incorporated; 2005.
- (17) Liu L, Salam N, Jiao J-Y, Jiang H-C, Zhou E-M, Yin Y-R, et al. Diversity of culturable thermophilic actinobacteria in hot springs in Tengchong, China and studies of their biosynthetic gene profiles. *Microbial Ecology*. 2016;72:150-62. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0756-2>
- (18) Vijayabaskar P, Babinastarlin S, Shankar T, Sivakumar T, Anandapandian K. Quantification and characterization of exopolysaccharides from *Bacillus subtilis* (MTCC 121). *Adv Biol Res*. 2011;5(2):71-6. <https://B2n.ir/r61786>
- (19) EFSA. EFSA panel on additives and products or substances used in animal feed, guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA J*. 2012;10:1-10. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2740>
- (20) Bhullar K, Waglechner N, Pawlowski A, Koteva K, Banks ED, Johnston MD, et al. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PloS one*. 2012;7(4):e34953. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034953>
- (21) Vijay V, Kavitha A, Rebecca SR. Automated brain tumor segmentation and detection in MRI using enhanced Darwinian particle swarm optimization (EDPSO). *Procedia Computer Science*. 2016;92:475-80. <https://doi.org/10.1016/j.procs.2016.07.370>
- (22) Aullybux AA, Puchooa D, Bahorun T, Jeewon R. Phylogenetics and antibacterial properties of exopolysaccharides from marine bacteria isolated from Mauritius

- seawater. *Annals of Microbiology*. 2019;69:957-72.  
<https://doi.org/10.1007/s13213-019-01487-2>
- (23) Cameron MC, Lee E, Hibler BP, Barker CA, Mori S, Cordova M, et al. Basal cell carcinoma: Epidemiology; pathophysiology; clinical and histological subtypes; and disease associations. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2019;80(2):303-17.  
<https://doi.org/10.1016/j.jaad.2018.03.060>
- (24) Sivasankar P, Seedeve P, Poongodi S, Sivakumar M, Murugan T, Sivakumar L, et al. Characterization, antimicrobial and antioxidant property of exopolysaccharide mediated silver nanoparticles synthesized by *Streptomyces violaceus* MM72. *Carbohydrate Polymers*. 2018;181:752-9.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.11.082>
- (25) Manivasagan P, Venkatesan J, Sivakumar K, Kim S-K. RETRACTED: Marine actinobacterial metabolites: Current status and future perspectives. *Microbiological Research*. 2013;168(6):311-32.  
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.02.002>
- (26) Kaur S, Kaur HP, Prasad B, Bharti T. Production and optimization of pectinase by *Bacillus* sp. isolated from vegetable waste soil. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*. 2016;6(1):4185-90.  
<https://doi.org/10.1044/1980-iajpr.160120>
- (27) Vijaymeena M, Kavitha K. A survey on similarity measures in text mining. *Machine Learning and Applications: An International Journal*. 2016;3(2):19-28.  
<https://B2n.ir/n39674>
- (28) Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Klenk H-P, et al. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2016;80(1):1-43.  
<https://doi.org/10.1128/mubr.00019-15>
- (29) Fernández-Cabezón L, Galán B, García JL. New insights on steroid biotechnology. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9:958.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00958>
- (30) Dhakal D, Pokhrel AR, Shrestha B, Sohng JK. Marine rare actinobacteria: isolation, characterization, and strategies for harnessing bioactive compounds. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8:1106.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01106>
- (31) Procópio REdL, Silva IRd, Martins MK, Azevedo Jld, Araújo JMd. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2012;16:466-71.  
<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.08.014>
- (32) Vandamme EJ, Soetaert W. Bioflavours and fragrances via fermentation and biocatalysis. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*. 2002;77(12):1323-32.  
<https://doi.org/10.1002/jctb.722>
- (33) Abdalla AK, Ayyash MM, Olaimat AN, Osaili TM, Al-Nabulsi AA, Shah NP, et al. Exopolysaccharides as antimicrobial agents: Mechanism and spectrum of activity. *Frontiers in Microbiology*. 2021;12:664395.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.664395>