Journal of Microbial World
Volume 15, No. 3, December 2022

Original Article

The cytotoxicity of culture extracts of indigenous Actinobacteria of Iran using *Artemia urmiana*

Sanaz Imanian[1], Ali Mehrvar[2], Javad Hamedi[3], Hossein Samadi Kafil[4], Naser Eivazian Kari[2]

[1]Ph.D Candidate, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran. [2]Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran. [3]Professor, Department of Microbial Biotechnology, School of Biology and Center of Excellence in Phylogeny Living Organisms, College of Science, University of Tehran, Iran. [4]Assistant Professor, Department of Microbiology and Virology, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Actinobacteria are very important in the world in terms of the production of metabolites with various biological effects. This study was conducted with the aim of investigating the toxicity of the fermented extract obtained from Actinobacteria isolated from some biological resources of Iran on *Artemia urmiana*. These isolates were deposited in University of Tehran Microorganisms Collection (UTMC).

Materials & Methods: Forty-eight -76°C actinobacterial isolates were revived using ISP2 agar culture medium. Two bacterial discs were inoculated in ISP2 broth medium as a pre-cultivation medium. After 48 hours, 10 ml of the liquid was inoculated into the fermentation culture medium and heated for 7 days in a shaker incubator with 180 rpm, temperature of 28°C and pH of 7.2 ± 0.2. The fermentation broth was extracted using ethyl acetate, the solvent was evaporated using a low-pressure rotary evaporator. The toxicity of fermentation broth extracts was assayed against 40-hour *Artemia urmiana* nauplii.

Results: According to the toxicity classification, among the all 48 isolates, 64.58% were highly toxic, 22.91% were moderate toxic, and 12.5% were in the low toxicity compounds group.

Conclusion: The results showed that more than half of the tested extracts had very high lethality on *Artemia urmiana* in a short time. Comparing the LC_{50} and LT_{50} values of the extracts with similar studies, it was found that these extracts have a significant biological activity and can be used as a rich source in the production of metabolites with proper biological effects.

Keywords: Actinobacteria, cytotoxicity, brine shrimp, bioassay.

Received: 3 June 2022 Revised: 31 August 2022 Accepted: 21 November 2022

Correspondence to: Ali Mehrvar& Javad Hamedi
Tel: +98 4131452513, +98 2161113556
E-mail: ali.mehrvar@azaruniv.ac.ir, jhamedi@ut.ac.ir
Journal of Microbial World 2022, 15(3): 220-233
DOI:10.30495/jmw.2022.1955768.2017

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال پانزدهم شماره سوم (پیاپی ۵۲) پاییز ۱۴۰۱
صفحات ۲۳۳-۲۲۰

Original Article

سمیت سلولی عصاره کشت اکتینوباکترهای بومی ایران با استفاده از *Artemia urmiana*

ساناز ایمانیان[۱]، علی مهرور[۲]*، جواد حامدی[۳]*، حسین صمدی کفیل[۴]، ناصر عیوضیان کاری[۲]

[۱]دانشجوی دکتری، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز ایران. [۲]دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران. [۳]استاد، بخش فناوری‌های زیستی و قطب تبارزایی موجودات زنده، دانشکده زیست‌شناسی، دانشکدگان علوم، دانشگاه تهران ایران. [۴]استادیار، گروه میکروب‌شناسی و ویروس‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی و خدمات‌درمانی تبریز، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: اکتینوباکترها به لحاظ تولید متابولیت‌هایی با اثرات زیستی گوناگون اهمیت بالایی در جهان دارند. این مطالعه با هدف بررسی سمیت عصاره تخمیری حاصل از اکتینوباکترهای جداشده از برخی منابع زیستی ایران روی Artemia urmiana انجام شد. این جدایه‌ها در کلکسیون میکروارگانیسم‌های دانشگاه تهران نگه‌داری شدند.

مواد و روش‌ها: ۴۸ جدایه اکتینوباکتر موجود در دمای ۷۶- درجه سلسیوس با استفاده از محیط کشت ISP2 آگار احیا شدند. دو دیسک باکتری، در محیط ISP2 براث به عنوان محیط پیش‌کشت تلقیح شدند. پس از ۴۸ ساعت، ۱۰ میلی‌لیتر از مایع در محیط کشت تخمیر تلقیح و به مدت ۷ روز در انکوباتور شیکردار با ۱۸۰ دور در دقیقه، دمای ۲۸ درجه سلسیوس و pH معادل ۰/۲ ± ۷/۲ گرمخانه‌گذاری شد. مایع تخمیر با اتیل‌استات استخراج و حلال با دستگاه تقطیر در فشار کم حذف شد. عصاره‌های حاصل پس از تعیین غلظت برای زیست‌سنجی با استفاده از ناپلی‌های ۴۰ ساعته آرتمیا اورمیانا مورد استفاده قرار گرفتند.

یافته‌ها: بر اساس طبقه‌بندی سمیت، از میان عصاره‌های ۴۸ جدایه، ٦٤/٥٨ درصد در گروه ترکیبات بسیار سمی، ۲۲/۹۱ درصد ترکیبات با سمیت متوسط، و ۱۲/۵ درصد در گروه ترکیبات با سمیت کم قرار گرفتند.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد بیش از نیمی از عصاره‌ها کشندگی بسیار بالایی در زمان کوتاه روی آرتمیا اورمیانا داشتند. با مقایسه مقادیر LC_{50} و LT_{50} عصاره‌ها با مطالعات مشابه مشخص شد که این عصاره‌ها فعالیت زیستی قابل توجهی دارند و می‌توانند به‌عنوان منبعی غنی در تولید متابولیت‌ها با اثرات زیستی مطلوب استفاده شوند.

واژگان کلیدی: اکتینوباکتر، سمیت سلولی، میگوی آب شور، زیست‌سنجی.

دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۳/۱۳ ویرایش مقاله: ۱۴۰۱/٦/۹ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۸/۳۰

مقدمه

میگوی آب شور (Brine shrimp) با نام علمی *آرتمیا* (*Artemia* Leach, 1819)، تنها جنس خانواده آرتمیده (Artemiidae Grochowski, 1896) از شاخه بندپایان (Arthropoda von Siebold, 1848)، زیرشاخه سخت‌پوستان (Crustacea Brünnich, 1772)، رده آبشش‌پایان (Branchiopoda Latreille, 1817) و راسته (Anostraca Sars, 1867) است. این جنس در درخت تبارزایی (Phylogenetic tree) در یک گروه خواهری (Sister group) با زیرشاخه شش‌پایان (Hexapoda Latreille, 1825) قرار می‌گیرد. نخستین گزارش میگوی آب شور از دریاچه ارومیه

*) آدرس برای مکاتبه: ۱-گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران. ۲-بخش فناوری‌های زیستی و قطب تبارزایی موجودات زنده، دانشکدگان علوم، دانشگاه تهران، ایران. تلفن: ۰۴۱۳۱۴۵۲۵۱۳، ۰۲۱٦۱۱۱۳۵۵٦
پست الکترونیک: ali.mehrvar@azaruniv.ac.ir, jhamedi@ut.ac.ir

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

مربوط به نیمه اول قرن دهم پیش از میلاد (بین سال‌های ۹۳۳-۹۳۰) است (۱). این سخت‌پوست آب‌زی به‌عنوان موجود زنده مدل در بسیاری از آزمون‌های سمیت به‌منظور بررسی ترکیبات سمی موجود در گیاهان و میکروارگانیسم‌هایی هم‌چون باکتری‌ها و قارچ‌ها و سایر موجودات به‌کار می‌رود (۲-۵). ترکیبات تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها که بیش‌تر از نوع متابولیت‌های ثانویه (Secondary metabolites) هستند، دارای اثرات زیستی متعددی از قبیل ضدسلول‌های سرطانی، ضدانگل، ضدباکتری، ضدقارچ، مهارکننده سیستم ایمنی، آفت‌کش، علف‌کش و غیره هستند. میگوی آب شور به دلیل سهولت و سرعت بالای پرورش و در عین حال ارزان و در دسترس بودن، گزینه‌ای بسیار مناسب برای انجام آزمایش‌های مربوط به سمیت سلولی (Cytotoxicity) و فعالیت زنده‌کشی (Biocidal activity) ترکیبات اشاره شده با منابع طبیعی و غیرطبیعی به‌شمار می‌رود. از جمله میکروارگانیسم‌های تولیدکننده ترکیبات زیست‌فعال (Bioactive) باکتری‌های شاخه اکتینوباکترها (Actinobacteria Cavalier-Smith, 2002) هستند. اعضای این شاخه از باکتری‌ها همه‌جازی بوده و در زیستگاه‌های متنوعی از خشکی تا آب یافت می‌شوند (۶-۱۰). اکتینوباکترها در خاک‌های اقلیم‌های گوناگون به فراوانی حضور دارند و وظایف مهمی در اکوسیستم خاک از جمله تجزیه مواد آلی حیوانی و گیاهی، تجزیه سموم شیمیایی موجود در خاک و غیره را برعهده دارند. تقریبا حدود نیمی از ترکیبات میکروبی زیست‌فعال، محصول فعالیت گونه‌های موجود در این شاخه هستند. جنس *استرپتومایسس* (*Streptomyces* Waksman and Henrici, 1943) متعلق به شاخه اکتینوباکترها به‌تنهایی حدود ۳۹٪ از کل متابولیت‌های میکروبی را شامل می‌شود که در زمینه‌های مختلف از قبیل پزشکی، داروسازی، کشاورزی و غیره حایز اهمیت هستند (۱۱). فرآورده‌های با ارزشی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها (۱۲)، آنزیم‌ها (۱۳)، آنتی‌اکسیدان‌ها (۱۴)، ترکیبات ضدسرطان (۱۵)، تعدیل کننده‌های ایمنی (Immunomodulators) (۱۶)، رنگ‌ها (۱۷)، کاهنده‌های کشش سطحی (Surfactants) و غیره انواعی از این ترکیبات هستند. اکتینوباکترها با تولید مولکول‌های زیست‌فعالی که دارای ویژگی‌های مختلف از قبیل حشره‌کشی، کنه‌کشی، باکتری‌کشی، قارچ‌کشی، نماتدکشی و غیره هستند، نقش مهمی در زمینه محافظت از گیاهان نیز ایفا می‌کنند (۱۸و۱۹). با توجه به اهمیت و توانایی چشم‌گیر ترکیبات به‌دست‌آمده از این باکتری‌ها و کاربرد آن‌ها در زمینه‌های مختلف و هم‌چنین ظرفیت بالای کشور از نظر وجود اکوسیستم‌های متنوع و احتمال حضور اکتینوباکترهای با توانایی‌های زیستی بالا، در این پژوهش تاثیر عصاره مایع تخمیر (Fermentation broth extracts) به دست آمده از ۴۸ جدایه از اکتینوباکترهای بومی کشور به لحاظ میزان سمیت یوکاریوتیک هر یک از آن‌ها روی یک گونه میگوی بومی آب شور (*Artemia urmiana* Günther, 1899)، مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

الف) احیای جدایه‌های اکتینوباکترها: تعداد ۴۸ جدایه اکتینوباکتر بومی ایران از کلکسیون میکروارگانیسم‌های دانشگاه تهران (UTMC) دریافت شدند (جدول ۱) که با شمارگان ۳۲۶۶ تا ۳۵۴۴ در این کلکسیون نگه‌داری شده بودند. در ادامه این متن این جدایه‌ها با شناسه‌های چهار رقمی آن‌ها معرفی شده‌اند. به‌منظور احیای جدایه‌ها، از محیط کشت ISP2 آگار (مرک، آلمان) حاوی ۱۰ گرم عصاره مالت، ۴ گرم عصاره مخمر، ۴ گرم گلوکز، ۲ گرم کلسیم‌کربنات و ۱۸ گرم آگار برای یک لیتر محیط کشت استفاده شد. پس از توزین هر یک از این مواد، pH محیط کشت با استفاده از دستگاه pH متر (۰/۲ ± ۷/۲) تنظیم گردید. در زیر هود میکروبی و در شرایط اسپتیک، مقدار ۴۰ میکرولیتر از هر یک از جدایه‌های نگه‌داری شده در دمای ۷۶- درجه سلسیوس به داخل ظروف پتری تلقیح شدند. این ظرف‌ها در داخل انکوباتور و در دمای ۲۸±۱ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۴روز گرمخانه‌گذاری (Incubation) شدند. سپس خلوص کشت‌ها با استفاده از روش رنگ‌آمیزی گرم و تهیه اسلایدهای میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفت

و هر جدایه دوباره در ظرف پتری جدید ISP2 آگار کشت داده شد. ۱۰ تا ۱۴ روز بعد، باکتری‌های رشد یافته پس از بررسی خلوص آن‌ها برای تلقیح در محیط پیش‌کشت (Seeding) مورد استفاده قرار گرفتند (۲۰).

جدول ۱: شماره‌های دسترسی ۴۸ جدایه اکتینوباکتر مورد بررسی در پژوهش حاضر ثبت شده در NCBI (2022).

Serial No	Genus	UTMC code	NCBI final code
1	*Micromonospora* sp.	3266	ON954620
2	*Micromonospora* sp.	3267	ON954636
3	*Nocardia* sp.	3268	ON954639
4	*Nocardia* sp.	3269	ON954665
5	*Micromonospora* sp.	3273	ON954666
6	*Saccharothrix* sp.	3274	ON954669
7	*Streptomyces* sp.	3277	ON954673
8	*Streptomyces pratensis*	3278	ON954675
9	*Streptomyces* sp.	3280	ON954676
10	*Streptomyces* sp.	3282	ON954754
11	*Streptomyces* sp.	3283	ON954767
12	*Streptomyces* sp.	3284	ON954768
13	*Streptomyces* sp.	3285	ON954792
14	*Streptomyces* sp.	3286	ON954791
15	*Streptomyces tendae*	3287	ON954793
16	*Actinomadura* sp.	3288	ON954794
17	*Streptomyces* sp.	3289	ON954834
18	*Kribbella* sp.	3290	ON954835
19	*Nonomuraea* sp.	3291	ON954836
20	*Streptomyces* sp.	3292	ON954838
21	*Streptomyces* sp.	3293	ON954846
22	*Actinomadura* sp.	3294	ON954847
23	*Streptomyces* sp.	3295	ON955265
24	*Actinomadura* sp.	3296	ON955266
25	*Streptomyces* sp.	3298	ON960045
26	*Saccharothrix* sp.	3299	ON960052
27	*Saccharothrix* sp.	3300	ON960062
28	*Streptomyces* sp.	3301	ON960063
29	*Streptomyces* sp.	3302	ON960078
30	*Streptomyces* sp.	3303	ON965364
31	*Streptomyces* sp.	3304	ON965370
32	*Streptomyces albidochromogenes*	3308	ON965484
33	*Streptomyces* sp.	3325	ON982538
34	*Micromonospora* sp.	3326	ON965456
35	*Streptomyces* sp.	3449	ON965507
36	*Streptomyces* sp.	3509	ON965486
37	*Streptomyces* sp.	3527	ON965508
38	*Actinomadura* sp.	3528	ON965460
39	*Streptomyces* sp.	3529	ON965511
40	*Actinomadura* sp.	3530	ON965481
41	*Streptomyces* sp.	3531	ON965525
42	*Streptomyces* sp.	3534	ON965528
43	*Streptomyces* sp.	3536	ON965529
44	*Streptomyces* sp.	3538	ON965532
45	*Streptomyces* sp.	3539	ON965534
46	*Streptomyces* sp.	3540	ON965564
47	*Micrococcus* sp.	3542	ON965482
48	*Streptomyces* sp.	3544	ON965804

ب) آماده‌سازی محیط پیش‌کشت: برای تهیه محیط پیش‌کشت، دو دیسک ۶ میلی‌متری توسط پانچ استریل (Punch) از هر ظرف پتری جدا شدند و در فلاسک‌های ارلن‌مایر استریل ۱۰۰ میلی‌لیتری، حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت استریل ISP2 مایع (فاقد آگار و کلسیم‌کربنات) قرار گرفتند. فلاسک‌ها در داخل انکوباتور شیکردار در دمای ۱±۲۸ درجه سلسیوس و ۱۸۰ دور در دقیقه به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند (۲۱).

ج) آماده‌سازی محیط تخمیر: خلوص جدایه‌های رشد یافته در داخل فلاسک‌های ارلن‌مایر ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی محیط پیش‌کشت، پس از ۴۸ ساعت با استفاده از روش رنگ‌آمیزی گرم و تهیه اسلاید میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفت. سپس محتویات هر فلاسک در زیر هود میکروبی و شرایط اسپتیک به فلاسک‌های ارلن‌مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری درب‌پیچ‌دار (Screw cap) حاوی ۹۰ میلی‌لیتر محیط کشت استریل ISP2 مایع منتقل شد (pH= ۷/۲ ± ۰/۲). فلاسک‌ها در داخل انکوباتور شیکردار با دمای ۱±۲۸ درجه سلسیوس و ۱۸۰ دور در دقیقه به مدت هفت روز نگه‌داری شدند (۲۱).

د) استخراج متابولیت‌های ثانویه: محیط کشت‌های تخمیری پس از هفت روز از انکوباتور شیکردار خارج شدند. برای استخراج متابولیت‌ها از حلال اتیل‌استات (دکتر مجللی، ایران) استفاده شد. محتویات هر فلاسک ابتدا با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ (بهسان، ایران) شدند. محتویات رونشین (Supernatant) به فلاسک‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری درب‌پیچ‌دار منتقل شدند. هم‌حجم آن، اتیل‌استات به فلاسک‌ها اضافه شد و به مدت یک ساعت با شیکر در ۲۰۰ دور در دقیقه هم‌زده شدند. سپس فاز آلی به فلاسک‌های جدید منتقل شد. برای بار دوم، محتویات فاز آبی مرحله پیشین مطابق روش گفته شده با اتیل‌استات استخراج شد. هر دو فاز آلی با یکدیگر مخلوط شده و حلال اتیل‌استات با دستگاه تقطیر در فشار کم (هایدولف، آلمان) در دمای ۳۸ درجه سلسیوس، در فشار کم و با ۸۰ دور در دقیقه حذف شد. عصاره‌های حاصل پس از خشک شدن در دمای اتاق و در شرایط تاریکی و پس از توزین با ترازوی با دقت ۰/۱ میلی‌گرم، در ویال‌های درب‌پیچ‌دار جمع‌آوری و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری شدند (۲۱).

ه) آزمون سمیت میگوی بومی آب شور: به‌منظور پرورش

میگوهای آب شور در داخل بشر یک لیتری، میزان ۳۰ گرم از نمک دریا (فاقد ید) در یک‌لیتر آب مقطر حل شد. ۰/۵ گرم از سیست (Cyst) میگوها در داخل آب نمک ریخته شد. یک عدد لامپ ۱۶۰۰ لوکس (Lux) در کنار بشر و در ارتفاع ۳۰ سانتی‌متری تعبیه شد. هوادهی به کمک پمپ آکواریوم انجام شد. بشر در دمای آزمایشگاه به‌مدت ۴۰ ساعت نگه‌داری شد. در آزمایش‌های مقدماتی محدوده سمیت بین ۲۰ تا ۸۰ درصد هر یک از عصاره‌های رقیق شده با حلال دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO-Merck) تعیین گردید. در مجموع شش غلظت برای ارزیابی سمیت هر عصاره انتخاب و برای انجام زیست‌سنجی‌ها پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای استریل استفاده شد.

در ابتدا غلظت‌های تعیین شده برای هر یک از عصاره‌های اکتینوباکترها که مطابق جدول ۲ در چهار محدوده غلظتی ۱۰ تا ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بودند به هر یک از چاهک‌های مورد آزمایش افزوده شده و حجم نهایی آن‌ها توسط محلول آب نمک ۳ درصد به ۲۵۰ میکرولیتر رسید. سپس تعداد ۱۰ عدد ناپلی (Nauplii) ۴۰ ساعته *آرتمیا اورمیانا* به هر یک از چاهک‌ها رهاسازی شدند. برای هر یک از غلظت‌ها سه تکرار در نظر گرفته شد. دی‌متیل‌سولفوکساید و پتاسیم دی‌کرومات ($K_2Cr_2O_7$) ۰/۵ مولار به‌ترتیب به‌عنوان شاهدهای منفی و مثبت استفاده شدند. تعداد ناپلی‌های مرده آرتمیا تا ۲۴ ساعت پس از تلقیح عصاره‌ها مورد شمارش قرار گرفت (۲۱).

برای هر یک از عصاره‌ها غلظت کشنده ۵۰ درصد جمعیت (LC_{50}) با استفاده از مدل پروبیت و نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ و با سطح اطمینان ۹۵٪ (Confidence limit %95) محاسبه گردید. برای تعیین شاخص زمان کشنده ۵۰ درصد جمعیت (LT_{50})، میزان مرگ‌ومیر به‌دست‌آمده در بالاترین غلظت کاربردی برای هر عصاره پس از ۲، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت از زمان تلقیح مورد استفاده قرار گرفت (۲۲). برای این منظور از مدل پروبیت و نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ و با ۹۵٪ اطمینان استفاده شد.

جدول ۲: غلظت‌های کاربردی در آزمون سمیت عصاره‌های حاصل از ۴۸ جدایه اکتینوباکترهای بومی ایران روی ناپلی‌های *آرتمیا اورمیانا*.

گروه غلظتی	شناسه جدایه‌ها	بازه غلظت‌های کاربردی (µg/ml)
(الف)	۳۳۰۰، ۳۵۰۹، ۳۲۹۵، ۳۲۹۸، ۳۵۴۲، ۳۳۲۵، ۳۳۰۳، ۳۳۰۴، ۳۲۷۸، ۳۵۲۷، ۳۵۳۶، ۳۵۳۴، ۳۳۰۲، ۳۲۹۰، ۳۲۷۳، ۳۵۳۱، ۳۵۳۸، ۳۵۲۹، ۳۲۸۴ و ۳۲۸۵	۴۰-۱۰
(ب)	۳۲۶۷، ۳۲۸۲، ۳۵۳۰، ۳۲۸۶، ۳۲۹۳، ۳۲۹۱، ۳۵۴۴، ۳۳۲۶، ۳۴۴۹، ۳۲۹۹ و ۳۵۳۹	۱۰۰-۴۱
(ج)	۳۲۶۶، ۳۵۴۰، ۳۲۹۴، ۳۳۰۸، ۳۵۲۸، ۳۲۶۸، ۳۲۸۳، ۳۲۹۲، ۳۲۸۰، ۳۲۸۸ و ۳۲۸۹	۴۰۰-۱۰۱
(د)	۳۲۶۹، ۳۳۰۱، ۳۲۷۴، ۳۲۹۶، ۳۲۸۷ و ۳۲۷۷	۱۰۰۰-۴۰۱

برای محاسبه فعالیت نسبی عصاره تخمیر هر یک از جدایه‌های اکتینوباکتر از فرمول زیر استفاده شد (۲۳):

$$RA\ (\%) = \frac{LC_{50}(h) - LC_{50}(t)}{LC_{50}(h)} \times 100$$

که در آن:

LC_{50} (h): بالاترین غلظت کشنده ۵۰ درصد جمعیت در بین جدایه‌ها

LC_{50} (t): میزان غلظت کشنده ۵۰ درصد جمعیت هر جدایه

سرعت نسبی کشندگی عصاره تخمیر جدایه‌ها نیز از فرمول زیر محاسبه گردید (۲۳-۲۴):

$$RSK\ (\%) = 100 - \frac{LT_{50}(t) \times 100}{LT_{50}(h)}$$

که در آن:

LT_{50} (h): بالاترین زمان کشنده ۵۰ درصد جمعیت در بین جدایه‌ها

LT_{50} (t): میزان زمان کشنده ۵۰ درصد جمعیت هر جدایه

سمیت حاد عصاره‌های تخمیری جدایه‌های اکتینوباکتر بر اساس روش پیشنهادی حمیدی (Hamidi) و همکاران در سال ۲۰۱۴ گروه‌بندی شد (۲۵) (جدول ۳).

جدول ۳: گروه‌بندی میزان اثر سمی ترکیبات آلی روی *آرتمیا سالینا* (*Artemia salina*).

ردیف	بازه LC_{50} (µg/ml)	نوع سمیت	گروه سمی
۱	۱۰۰-۰	بسیار سمی	HT
۲	۵۰۰-۱۰۱	سمیت متوسط	MT
۳	۱۰۰۰-۵۰۱	سمیت کم	ST
٤	۱۰۰۱ <	غیرسمی	NT

HT: High toxicity, MT: Moderate toxicity, ST: Slight toxicity, NT: Non-toxic.

برای دخالت دادن اثر شیب خط (Slope) در مقدار کشندگی، ضریب‌های تداخل شیب در مقادیر LC_{50} و LT_{50} به ترتیب با نام‌های SIF_C (Slope intervention factor for concentration) و SIF_T (Slope intervention factor for time) با فرمول‌های زیر محاسبه شدند:

$$SIF_C = \frac{100 - Slope}{Log_{10}(Corresponding\ LC_{50}\ value)}$$

$$SIF_T = \frac{100 - Slope}{Corresponding\ LT_{50}\ value}$$

یافته‌ها

تنوع سمیت عصاره‌های اکتینوباکترهای بومی ایران روی ناپلی‌های ٤٠ ساعته *آرتمیا اورمیانا* منجر به بروز واکنش‌های متنوعی در بین آن‌ها شد. عصاره مربوط به جدایه‌های ۳۵۲۷ (از گروه غلظتی الف) و ۳۲۸۷ (از گروه غلظتی د) به ترتیب با ۲۲/۸۱ و ٦٧١ میکروگرم بر میلی‌لیتر کم‌ترین و بیش‌ترین مقادیر LC_{50} را روی ناپلی‌های این گونه ایجاد نمودند. دامنه تغییرات مقادیر LC_{50} در گروه غلظتی (الف) بین ۲۲/۸۱ تا ۲۹/۰۰ به ترتیب برای جدایه‌های ۳۵۲۷ و ۳۳۰۰ متغیر بود. نگاهی به میزان فعالیت نسبی (RA%) عصاره‌های برگرفته از جدایه‌های گروه غلظتی (الف) نشان داد که همگی بیش از ۹۵ درصد فعالیت زیستی دارند. این موضوع در خصوص جدایه‌های گروه غلظتی (ب) در حدفاصل ۹۱/٤۸ تا ۹۳/٤۷ درصد به‌دست آمد. ضریب تداخل شیب در غلظت (SIF_C) برای دخالت دادن اثر شیب خط در مقدار کشندگی هر یک از جدایه‌ها نشان داد که بیش‌ترین مقدار این شاخص به جدایه ۳۵۲۷ اختصاص دارد (جدول ٤). چون ضرایب به‌دست‌آمده هیچ تغییری در روند سمیت جدایه‌ها نشان ندادند، بنابراین، روند مورد اشاره برای مقایسه مقادیر LC_{50} در این آزمایش در سطح اطمینان ۹۵٪ قابل استناد هستند. هرچند گروه‌بندی سمیت عصاره‌ها در جدول ۳ بر اساس غلظت‌های کشنده ۵۰ درصد جمعیت (LC50) صورت گرفته است، اما در این آزمایش، گروه‌بندی مذکور بر اساس میزان فعالیت نسبی عصاره‌ها به قرار زیر به دست آمد:

گروه بسیار سمی (HT): تعداد ۳۱ جدایه با دامنه فعالیت نسبی ۹۱/۸۰ تا ۹٦/٦۰ درصد

گروه با سمیت متوسط (MT): تعداد ۱۱ جدایه با دامنه فعالیت نسبی ٦۳/۵۷ تا ۷٤/۳٦ درصد

گروه با سمیت کم (ST): تعداد ٦ جدایه با دامنه فعالیت نسبی ۰/۰۰ تا ۱۹/٤٦درصد

به عبارتی هیچ نوع هم‌پوشانی فعالیت نسبی بین گروه‌های مختلف سمی وجود نداشت. همین موضوع در خصوص مقادیر LC_{50} تمامی جدایه‌ها در سطح اطمینان ۹۵٪ نیز صادق بود (جدول ٤).

جدایه ۳۲۸۷ مشابه وضعیت مورد اشاره در خصوص غلظت‌های کشنده ۵۰ درصد جمعیت (LC_{50})، بیش‌ترین زمان کشندگی برای ۵۰ درصد جمعیت (LT_{50}) را با ۱۵/٤۱ ساعت به خود اختصاص داد. اما پایین‌ترین زمان به‌دست‌آمده که معادل ۱/٤٦ ساعت بود به وسیله جدایه ۳۳۰۸ (از گروه غلظتی ج) ایجاد شد و متعاقب آن، جدایه ۳۵۲۷ (از گروه غلظتی الف) با ۱/٦۹ ساعت قرار گرفت (جدول ۵). نگاهی به مقادیر کرانه‌های بالا و پایین LT_{50} این دو جدایه حاکی از هم‌پوشانی ۹۱/۱۷ درصدی آن‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد است. این در حالی است که سمیت LC50 عصاره حاصل از جدایه ۳۳۰۸ در گروه MT (با سمیت متوسط) طبقه‌بندی شد، اما جدایه ۳۵۲۷ با کم‌ترین مقدار عصاره کاربردی علیه گونه بومی آرتمیا، بیش‌ترین فعالیت زیستی (۹٦/٦۰٪) و سمیت (HT) را در بین همه جدایه‌ها به خود اختصاص داد (جدول ٤).

جدول ٤: تجزیه پروبیت واکنش غلظت مرگ‌ومیر ناپلی‌های *آرتمیا اورمیانا* نسبت به عصاره‌های حاصل از ٤٨ جدایه اکتینوباکترهای بومی ایران و گروه‌بندی سمیت آن‌ها (۲۵).

گروه غلظتی	شناسه جدایه	غلظت کشنده ۵۰٪ جمعیت (LC_{50} µg/ml) (95% CL)	مربع کای (χ^2) (درجه آزادی=٤)	شیب خط (β±SE)	ضریب تداخل شیب (SIF_C)	فعالیت نسبی (RA%)	گروه‌بندی سمیت
(الف)	۳۳۰۰	۲۹/۰۰ (۱۸/۸۱ – ۷۱/۵۵)	٦۹/۸	۲/۸۳ ± ۰/۵۸	٦٦/٤٥	۹۵/٦۷	HT
	۳۵۰۹	۲۷/۵۸ (۱۱/۵۱ –۲۷۵/۸۰)	۱۱/٤۱	۲/۷۵ ± ۰/٦۵	٦۷/۵۱	۹۵/۸۸	HT
	۳۲۹۵	۲۷/۲٦ (۱۳/۳٤ – ۹۵/۲۱)	۱۰/۰۰	۲/٦۸ ± ۰/٦۵	٦۷/۷۹	۹۵/۹۳	HT
	۳۲۹۸	۲۸/۲۱ (۱۵/۹۸ –۸٦/٤۹)	۱۰/۸۰	۲/۱۰ ±۰/۵۸	٦۷/۵۰	۹۵/۷۹	HT
	۳۵٤۲	۲۷/۱۱ (۱۸/۲۹– ٤۳/٤۱)	٦/۱۵	۳/۱۳ ± ۰.۵۸	٦۷/۷٤	۹۵/۹٦	HT
	۳۳۲۵	۲٦/۸۸ (۱۷/۹۲ –٤۲/۸۸)	۷/٦۵	۳/۰۰ ± ۰/۵۸	٦۷/۸٦	۹۵/۹۹	HT
	۳۳۰۳	۲۸/۹٤ (۱۷/۱۱ –۱۲۳/٦۲)	۸/۵۹	۲/۵۱ ±۰/۵۵	٦٦/۷۱	۹۵/٦۸	HT
	۳۳۰٤	۲۳/۵۸ (۱۱/۳۷ – ۳۷/۰۰)	۸/۷۱	۲/۷۸ ± ۰/٤۵	۷۰/۸۳	۹٦/٤۸	HT
	۳۲۷۸	۲۳/۳۸ (٤/۱۲ –٤۷/۷۸)	۱۰/۱۸	۲/۵۳ ± ۰/۳۵	۷۱/۲۱	۹٦/۵۱	HT
	۳۵۲۷	۲۲/۸۱ (٤/۳٦ – ٤۱/۹۱)	۱۰/۵۳	۲/٦۲ ± ۰/۵۳	۷۱/۷۰	۹٦/٦۰	HT
	۳۵۳٦	۲٤/٤۵ (۱۳/٦۹ – ۳۸/۵۵)	۷/۱۲	۲/۸۵ ± ۰/۵٤	۷۰/۱۷	۹٦/۳۵	HT
	۳۵۳٤	۲۳/۱۰ (۲/۰۰ – ٤۸/٦۲)	۱۱/۰۰	۲/٦۰ ± ۰/۵۳	۷۱/٤۳	۹٦/۵۵	HT
	۳۳۰۲	۲۳/۳۸ (٤/۱۲ –٤۷/۷۸)	۱۰/۱۸	۲/۵۳ ± ۰/۵۳	۷۱/۲۱	۹٦/۵۱	HT
	۳۲۹۰	۲۳/٦٦ (۷/۵۵ – ٤٤/٤۷)	۸/۷٤	۲/٤۳ ± ۰/۵۳	۷۱/۰۱	۹٦/٤۷	HT
	۳۲۷۳	۲۳/۵۵ (۱۲/۰٦ – ۳٦/۱۲)	۷/۹٤	۲/۷۱ ± ۰/٤۵	۷۰/۹۱	۹٦/٤۹	HT
	۳۵۳۱	۲٤/۹۱ (۱۵/۰۰ –۳۷/۹۸)	۷/٦۸	۲/۸۷ ± ۰/۵٦	٦۹/۵٦	۹٦/۲۸	HT
	۳۵۳۸	۲۳/۵۸ (۱۱/۱۸ – ۳۸/۹۱)	۸/٦۸	۲/۷۰ ± ۰/۵٤	۷۰/٦٤	۹٦/٤٤	HT
	۳۵۲۹	۲۳/۹۸ (۷/۱۸ –٤۵/۵۷)	۱۱/۰۰	۲/۸۰ ± ۰/۵۵	۷۰/۵۳	۹٦/٤۳	HT
	۳۲۸٤	۲٤/٤۷ (۱۱/٤۳ –٤۲/۸۲)	۸/٦۹	۲/٦٤ ±۰/۵٤	۷۰/۱۱	۹٦/۳۵	HT
	۳۲۸۵	۲۳/۱۸ (٤/۱۰ –٤۸/۲۷)	۱۰/۰۱	۲/٦۲ ± ۰/۵۳	۷۱/۰۸	۹٦/۵۵	HT
(ب)	۳۲٦۷	٤۸/۸٤ (٤۱/۷۰ –۵۷/٦۳)	۲/٦۷	۲/۹۷ ± ۰/٤۸	۵۷/٤٦	۹۲/۷۲	HT
	۳۲۸۲	۵۷/۱۱ (٤٦/۹۰ –۷۳/۸۲)	۱/۰۰	۲/۲۵ ± ۰/٤۵	۵۵/٦٤	۹۱/٤۸	HT
	۳۵۳۰	٤۳/۷۷ (۳٦/٤۷ – ۵۱/۸۹)	۲/۷۸	۲/۷۳ ± ۰/٤۷	۵۹/۲۷	۹۳/٤۷	HT
	۳۲۸٦	۵۲/۰۰ (٤۳/۵٤ –٦۳/۸٦)	۳/٤۹	۲/۵٤ ± ۰/٤٦	۵٦/۸۰	۹۲/۲۵	HT
	۳۲۹۳	٤۵/۰۰ (۳۷/۹۲ –۵۳/۳۳)	۲/۸۷	۲/۸۲ ± ۰/٤۷	۵۸/۷۸	۹۳/۲۹	HT
	۳۲۹۱	٤۹/٦۲ (٤۲/۱۲ – ۵۹/۰۰)	۱/٦۸	۲/۸٤ ± ۰/٤۷	۵۷/۳۰	۹۲/٦۰	HT
	۳۵٤٤	۵۰/۰۰ (٤۱/۰۰ –٦۲/۱۹)	۳/۹۰	۲/۳۲ ± ۰/٤۵	۵۷/٤۹	۹۲/۵٤	HT
	۳۳۲٦	۵۲/۱۱ (٤۳/٦٦ –٦۳/٦۵)	۰/۹۳	۲/۵۸ ± ۰/٤٦	۵٦/۷٤	۹۲/۲۳	HT
	۳٤٤۹	٤۳/۷۸ (۳۵/۱۱ –۵۳/۱٦)	۲/۵۸	۲/٦۳ ± ۰/٤۷	۵۹/٤۰	۹۳/٤٦	HT
	۳۲۹۹	۵۳/۰۰ (٤٤/۲۵ – ٦۵/۳۰)	۰/۸۹	۲/۵۱ ± ۰/٤٦	۵٦/۵٤	۹۲/۱۰	HT
	۳۵۳۹	۵۵/۰۰ (٤۵/٤۸ –٦۹/۷۳)	۰/۵۵	۲/۳۳ ± ۰/٤۵	۵٦/۱۲	۹۱/۸۰	HT
(ج)	۳۲٦٦	۲۲۸/٤۲ (۱۸۵/۷۳ – ۳۰۳/۳۳)	۳/۳۹	۲/۱۵ ±۰/٤۲	٤۱/٤۸	٦۵/۹۵	MT
	۳۵٤۰	۲٤۰/۸٦ (۱۹۲/۷٤ –۳۳٦/۱۷)	۲/۸۷	۲/۰۰ ± ۰/٤۲	٤۱/۱۵	٦٤/۱۰	MT
	۳۲۹٤	۲٤٤/٤۰ (۱۹۵/۹٤ –۳٤۱/۱۹)	۳/۰۰	۲/۰۰ ± ۰/٤۲	٤۱/۰٤	٦۳/۵۷	MT
	۳۳۰۸	۱۸۸/٦۷ (۱۵٤/۹٦ –۲۳۳/۵۳	۱/۸۱	۲/۳٤ ± ۰/٤۳	٤۲/۹۱	۷۱/۸۸	MT
	۳۵۲۸	۲۰۵/۵۲ (۱٦۷/۷۳ – ۲٦۲/۸۰)	۳/۰۰	۲/۲۱ ± ۰/٤۲	٤۲/۲۸	٦۹/۳۷	MT
	۳۲٦۸	۱۹۷/۸۷ (۱٦۲/۸۳ –۲٤۷/۳۹)	۲/٤۹	۲/۳۳ ± ۰/٤۳	٤۲/۵۳	۷۰/۵۱	MT
	۳۲۸۳	۱۹٤/۷۱ (۱٦۰/۳۲ –۲٤۲/۱۹)	۱/۹۰	۲/۳۵ ± ۰/٤۳	.٤۲/٦۵	۷۰/۹۸	MT
	۳۲۹۲	۲۰۱/۵۸ (۱٦۵/۲۲ –۲۵٤/۷۲)	۲/٦۸	۲/۲۷ ± ۰/٤۳	٤۲/٤۱	٦۹/۹۵	MT
	۳۲۸۰	۱۷۲/۰۰ (۱٤۳/۰۰ –۲۰٦/۰۰)	۱/۱۹	۲/٦۲ ± ۰/٤٤	٤۳/۵٦	۷٤/۳٦	MT
	۳۲۸۸	۱۹۲/۰۰ (۱۵۷/۰۰ –۲۳۹/۸۹)	۱/۸۸	۲/۲۸ ± ۰/٤۳	٤۲/۸۰	۷۱/۳۸	MT
	۳۲۸۹	۱۷٦/۹۲ (۱٤۷/٤۸ –۲۱۲/۵۷)	۲/۱٤	۲/٦۱ ± ۰/٤٤	٤۳/۳۳	۷۳/٦۳	MT
(د)	۳۲٦۹	۵٤۰/۳۹ (٤۵٦/۰۰ –٦۵٦/۹٦)	۱/۹۳	۲/٦۷ ± ۰/۵	۳۵/٦٦	۱۹/٤٦	ST
	۳۳۰۱	٦۲۵/۸٦ (۵۳۱/۷٤ – ۷۸۰/۸۰)	۲/۵۸	۲/۷۸ ± ۰/۵۱	۳٤/۷۷	٦/۷۲	ST
	۳۲۷٤	٦۳۰/۰۰ (۵۳۲/۲۰ –۷۹٦/۵۷)	۳/۷٤	۲/٦۷ ± ۰/۵	۳٤/۷۷	٦/۱۱	ST
	۳۲۹٦	۵۸٤/۷٦ (۵۰٤/۰۰ –۷۰۱/۸۰)	۲/۲۷	۳/۰۰ ± ۰/۵۱	۳۵/۰٦	۱۲/۸۵	ST
	۳۲۸۷	٦۷۱/۰۰ (۵٦۲/۹۵ – ۸۷۲/٦٦)	۳/۰۰	۲/٦۱ ± ۰/۵	۳٤/٤۵	۰/۰۰	ST
	۳۲۷۷	٦۵۳/۳٦ (۵٤۸/٤۲ – ۸٤۳/٤۱)	۲/۱٤	۲/۵۹ ± ۰/۵	۳٤/٦۰	۲/٦۲	ST

HT: High toxicity, MT: Moderate toxicity, ST: Slight toxicity, NT: Non-toxic.

جدول ۵: تجزیه پروبیت واکنش زمان مرگ‌ومیر ناپلی‌های *آرتمیا اورمیانا* نسبت به عصاره‌های حاصل از ۴۸ جدایه اکتینوباکترهای بومی ایران در بالاترین غلظت‌های کاربردی برای هر یک از آن‌ها.

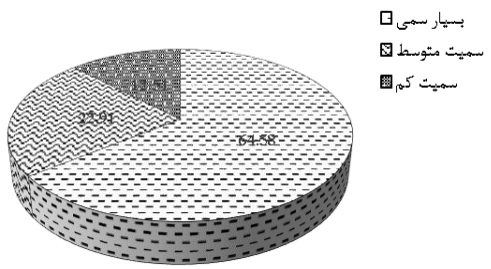
گروه غلظتی	شناسه جدایه	زمان کشنده ۵۰٪ جمعیت (LT_{50}) (h) (95% CL)	مربع کای (χ^2) (درجه آزادی=۲)	شیب خط (β±SE)	ضریب تداخل شیب (SIF_T)	سرعت نسبی کشندگی (RSK%)
(الف)	۳۳۰۰	۱۰/۳۷ (۸/۰۰ – ۱۳/۶۴)	۰/۱۲	۲/۴۲ ± ۰/۴۱	۹/۴۱	۳۲/۷۱
	۳۵۰۹	۳/۲۶ (۰/۰۹ – ۵/۵۹)	۱/۴۸	۱/۰۰ ± ۰/۳۰	۳۰/۳۷	۷۸/۸۵
	۳۲۹۵	۱۳/۶۷ (۱۱/۶۸ –۱۵/۹۷)	۲/۲۳	۵/۲۸ ± ۰/۹۰	۶/۹۳	۱۱/۲۹
	۳۲۹۸	۱۲/۶۸ (۱۰/۴۸ –۱۵/۴۸)	۰/۰۳	۳/۷۵ ± ۰/۶۴	۷/۵۹	۱۷/۷۲
	۳۵۴۲	۱۰/۶۶ (۸/۵۱ – ۱۳/۳۹)	۰/۰۸	۲/۹۷ ± ۰/۴۹	۹/۱۰	۳۰/۸۲
	۳۳۲۵	۱۳/۰۰ (۱۱/۰۰ – ۱۵/۳۸)	۱/۰۰	۴/۶۸ ±۰/۷۹	۷/۳۳	۱۵/۶۴
	۳۳۰۳	۶/۱۴ (۴/۰۰ – ۸/۶۳)	۱/۳۱	۱/۶۶ ± ۰/۳۳	۱۶/۲۰	۶۰/۱۶
	۳۳۰۴	۱۲/۴۶ (۱۰/۵۱ – ۱۴/۷۳)	۲/۳۳	۴/۶۳ ± ۰/۷۷	۷/۶۵	۱۹/۱۴
	۳۲۷۸	۳/۹۵ (۱/۸۶ – ۶/۰۰)	۱/۶۵	۱/۳۱ ± ۰/۳۱	۲۴/۹۹	۷۴/۳۷
	۳۵۲۷	۱/۶۹ (۰/۰۹ – ۳/۵۴)	۰/۴۷	۰/۹۳ ± ۰/۳۱	۵۸/۶۲	۸۹/۰۳
	۳۵۳۶	۴/۰۴ (۱/۸۶ – ۷/۰۰)	۰/۲۹	۱/۱۴ ± ۰/۳۰	۲۲/۴۷	۷۱/۴۵
	۳۵۳۴	۲/۹۹ (۰/۹۴ – ۴/۹۸)	۰/۲۶	۱/۱۵ ± ۰/۳۱	۳۳/۰۶	۸۰/۶۰
	۳۳۰۲	۲/۱۷ (۰/۲۷ – ۴/۱۵)	۰/۲۳	۰/۹۸ ±۰/۳۱	۴۶/۶۳	۸۵/۹۲
	۳۲۹۰	۸/۷۹ (۶/۰۷ – ۱۱/۴۶)	۱/۶۰	۲/۳۵ ± ۰/۳۹	۱۱/۱۱	۴۲/۹۶
	۳۲۷۳	۶/۰۰ (۴/۱۰ – ۸/۳۲)	۲/۹۵	۱/۹۷ ±۰/۳۳	۱۳/۶۷	۶۱/۰۶
	۳۵۳۱	۹/۰۹ (۷/۷۷ – ۱۲/۶۰)	۲/۲۲	۲/۶۹ ± ۰/۴۵	۹/۳۸	۳۵/۷۶
	۳۵۳۸	۵/۴۶ (۳/۶۶ – ۷/۴۷)	۱/۷۵	۱/۸۳ ± ۰/۳۳	۱۷/۹۸	۶۴/۵۷
	۳۵۲۹	۵/۰۰ (۲/۳۸ – ۷/۴۳)	۰/۴۵	۱/۴۰ ± ۰/۳۱	۱۹/۷۲	۶۷/۵۵
	۳۲۸۴	۹/۰۰ (۶/۹۳ – ۱۱/۷۶)	۱/۲۷	۲/۳۹ ± ۰/۴۰	۱۰/۸۵	۴۱/۶۰
	۳۲۸۵	۱۰/۹۳ (۸/۳۰ – ۱۵/۰۰)	۳/۵۴	۲/۱۶ ± ۰/۳۷	۸/۹۵	۲۹/۰۷
(ب)	۳۲۶۷	۵/۳۷ (۳/۸۷ – ۷/۰۰)	۱/۰۰	۲/۲۶ ± ۰/۳۷	۱۸/۲۰	۶۵/۱۶
	۳۲۸۲	۲/۱۲ (۰/۰۶ – ۴/۴۹)	۰/۶۲	۰/۸۰ ± ۰/۳۰	۴۶/۷۹	۸۶/۲۴
	۳۵۳۰	۹/۸۰ (۷/۸۵ – ۱۲/۱۷)	۲/۲۲	۳/۰۰ ± ۰/۵۱	۹/۹۰	۳۶/۴۱
	۳۲۸۶	۱۱/۱۵ (۹/۰۰ – ۱۳/۸۶)	۰/۷۸	۳/۲۲ ±۰/۴۵	۸/۶۸	۲۷/۶۴
	۳۲۹۳	۶/۹۸ (۵/۳۷ – ۸/۸۵)	۰/۴۰	۲/۶۴ ± ۰/۴۰	۱۳/۹۵	۵۴/۷۱
	۳۲۹۱	۱۲/۹۳ (۱۰/۸۷ – ۱۵/۴۸)	۰/۱۲	۴/۳۱ ± ۰/۷۳	۷/۴۰	۱۶/۰۹
	۳۵۴۴	۳/۸۹ (۲/۳۴ – ۵/۴۶)	۲/۱۵	۱/۶۷ ± ۰/۳۳	۲۵/۲۶	۷۴/۷۶
	۳۳۲۶	۱۴/۰۰ (۱۱/۷۳ – ۱۶/۹۳)	۱/۴۵	۴/۱۶ ± ۰/۷۳	۶/۸۵	۹/۱۵
	۳۴۴۹	۵/۲۱ (۳/۸۴ – ۶/۶۹)	۳/۴۳	۲/۵۰ ± ۰/۳۹	۱۸/۷۱	۶۶/۱۹
	۳۲۹۹	۱۰/۹۵ (۸/۳۸ – ۱۴/۸۳)	۰/۶۰	۲/۲۶ ± ۰/۳۹	۸/۹۳	۲۸/۹۴
	۳۵۳۹	۹/۲۶ (۶/۶۴ – ۱۳/۳۴)	۰/۲۷	۱/۷۵ ± ۰/۳۴	۱۰/۶۱	۳۹/۹۱
(ج)	۳۲۶۶	۱۲/۱۴ (۹/۸۱ – ۱۵/۲۲)	۰/۵۲	۳/۱۷ ± ۰/۴۵	۷/۹۸	۲۱/۲۲
	۳۵۴۰	۳/۱۹ (۰/۱۳ – ۶/۵۰)	۰/۴۵	۰/۷۵ ± ۰/۲۹	۳۱/۱۱	۷۹/۳۰
	۳۲۹۴	۱۲/۱۴ (۹/۷۵ – ۱۵/۴۰)	۰/۴۱	۳/۰۰ ± ۰/۵۲	۷/۹۹	۲۱/۲۲
	۳۳۰۸	۱/۴۶ (۰/۳۰ – ۳/۲۹)	۰/۲۹	۰/۸۸ ± ۰/۳۱	۶۷.۸۹	۵۳/۹۰
	۳۵۲۸	۱۱/۶۷ (۸/۹۰ – ۱۶/۰۰)	۰/۹۹	۲/۲۱ ± ۰/۳۹	۸/۳۸	۲۴/۲۷
	۳۲۶۸	۱۳/۳۵ (۱۰/۹۸ – ۱۶/۵۵)	۰/۲۵	۳/۵۵ ± ۰/۶۲	۷/۲۲	۱۳/۳۷
	۳۲۸۳	۶/۰۰ (۴/۳۰ –۸/۰۰)	۳/۳۵	۲/۰۰ ±۰/۳۵	۱۶/۳۳	۶۱/۰۶
	۳۲۹۲	۹/۵۰ (۷/۲۲ –۱۲/۶۳)	۰/۳۹	۲/۲۴ ± ۰/۳۸	۱۰/۲۹	۳۸/۳۵
	۳۲۸۰	۶/۱۹ (۴/۴۰ – ۸/۱۷)	۰/۵۳	۲/۱۲ ±۰/۳۵	۱۵/۸۱	۵۹/۸۳
	۳۲۸۸	۷/۵۵ (۵/۴۵ – ۱۰/۳۴)	۱/۶۰	۱/۰۹ ±۰/۳۴	۱۲/۹۹	۵۱/۰۱
	۳۲۸۹	۷/۹۰ (۶/۰۰ – ۱۰/۳۱)	۰/۷۱	۲/۳۲ ± ۰/۳۷	۱۲/۳۷	۷۴/۴۸
(د)	۳۲۶۹	۴/۹۷ (۳/۰۰ – ۷/۱۴)	۰/۴۳	۱/۵۵ ± ۰/۳۲	۱۹/۸۱	۶۷/۵۷
	۳۳۰۱	۵/۱۲ (۲/۵۶ – ۸/۰۹)	۳/۰۰	۱/۱۹ ± ۰/۳۰	۱۹/۳۰	۷۸/۶۶
	۳۲۷۴	۱۴/۳۸ (۱۲/۱۶ –۱۷/۱۰)	۳/۳۲	۴/۶۳ ± ۰/۸۱	۳/۶۳	۶/۶۸
	۳۲۹۶	۱۳/۰۰ (۱۰/۹۶ – ۱۵/۹۵)	۲/۲۶	۴/۳۵ ± ۰/۷۴	۷/۳۶	۱۵/۶۴
	۳۲۸۷	۱۵/۴۱ (۱۳/۰۰ –۱۸/۵۲)	۲/۴۲	۴/۵۳ ± ۰/۸۲	۶/۲۰	۰/۰۰
	۳۲۷۷	۸/۰۰ (۵/۶۲ – ۱۱/۶۴)	۰/۷۳	۱/۶۶ ± ۰/۳۳	۱۲/۲۹	۴۸/۰۹

بنابراین دامنه تغییرات LT_{50} عصاره‌های حاصل از جدایه‌های اکتینوباکترها روی ناپلی‌های ۴۰ ساعته میگوی آب شور بین ۱/۴۶ تا ۱۵/۴۱ ساعت قرار داشت که در بین آن‌ها، تعداد ۱۰ جدایه (۲۰/۸۳ درصد جدایه‌ها) LT_{50} کم‌تر از ۵ ساعت را ثبت نمودند (جدول ۵). با دخالت دادن اثر شیب خط در مقادیر LT_{50} جدایه‌ها تغییری در روند واکنش‌های زمان کشندگی آن‌ها مشاهده نشد. لذا داده‌های حاصل از این آزمایش در سطح اطمینان ۹۵ درصد قابل استناد هستند. هم‌چنین، شاخص سرعت نسبی کشندگی جدایه‌ها نشان داد که تعداد ۲۲ جدایه (۴۵/۸۳ درصد جدایه‌ها) سرعتی بیش از ۵۰ درصد برای از بین بردن ناپلی‌های ۴۰ ساعته آرتمیا نسبت به ضعیف‌ترین جدایه داشتند. با این حال، بیش‌ترین سرعت کشندگی عصاره‌ها ۹۰/۵۳ درصد به‌دست‌آمد که به جدایه ۳۳۰۸ (از گروه غلظتی ج) اختصاص داشت و جدایه ۳۵۲۷ (از گروه غلظتی الف) با ۸۹/۰۳ درصد به دنبال آن قرار گرفت (جدول ۵).

بحث

در پژوهش حاضر تعداد ۴۸ جدایه اکتینوباکتر بومی کشور نگه‌داری شده در کلکسیون میکروارگانیسم‌های دانشگاه تهران پس از احیا مجدد و پیش‌کشت مورد تخمیر قرار گرفتند. سپس فاز تخمیر استخراج شده و حلال اتیل‌استات با استفاده از دستگاه تقطیر جدا شد. اثرات سمی عصاره‌های به دست آمده از جدایه‌ها به روش زیست‌سنجی روی ناپلی‌های ۴۰ ساعته *آرتمیا اورمیانا* مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که جدایه‌های مورد مطالعه از نظر میزان کشندگی روی ناپلی‌های میگوی آب شور اثرات متفاوتی داشتند و در چند گروه مختلف سمیتی قرار گرفتند. با این‌که جدایه‌های گروه‌های غلظتی (الف) و (ب) سمیت بسیار بالایی (HT) روی ناپلی‌های ۴۰ ساعته *آرتمیا اورمیانا* ایجاد نمودند (جدول ۴)، اما جدایه‌های گروه (الف) به دلیل ایجاد سمیت بسیار بالا در غلظت‌های پایین‌تر (۴۰–۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) توانایی بیش‌تری نشان دادند. به طور کلی، مقادیر LC_{50} به دست آمده برای ۴۸ جدایه اکتینوباکتر روی ناپلی‌های ۴۰ ساعته میگوی آب شور (جدول ۴) در سه گروه اول جدول سمیت (بسیار سمی، سمیت متوسط و سمیت کم) قرار گرفتند (جدول ۳). به عبارتی، در بین عصاره‌های اکتینوباکتر مورد بررسی هیچ عصاره‌ای روی ناپلی‌های *آرتمیا اورمیانا* در محدوده غیرسمی (NT) قرار نگرفت. عصاره حاصل از ۶۴/۵۸ درصد جدایه‌ها در گروه ترکیبات بسیار سمی (HT)، ۲۲/۹۱ درصد ترکیبات با سمیت متوسط (MT) و ۱۲/۵ درصد در گروه ترکیبات با سمیت کم (ST) قرار گرفتند (نمودار ۱). در واقع، بیش از نیمی از جدایه‌های اکتینوباکتر مورد مطالعه سمیت بسیار بالایی نسبت به میگوی آب شور نشان دادند. پایین‌ترین میزان غلظت عصاره حاصل از تخمیر اکتینوباکترها، غلظت‌های ۴۰–۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (جدول ۲) که غلظت کشنده ۵۰ درصد جمعیت (LC_{50}) آن در ۱۲ جدایه بین ۲۹–۲۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید. در مطالعه صفائیان (Safaeian) و همکاران در سال ۲۰۰۵ که به بررسی فعالیت سمیت سلولی اکتینوباکترهای دریایی استخراج شده از مرجان‌ها و اسفنج‌های خلیج فارس پرداختند، ۱۴/۷۵ درصد از کل باکتری‌های جداسازی شده دارای سمیت روی دو گونه میگوی آب شور، *آرتمیا فرانسیسکانا* (*Artemia franciscana*) و *آرتمیا اورمیانا* بودند. بر اساس طبقه‌بندی در نظر گرفته شده در آن مطالعه، ۳/۲۷ درصد از باکتری‌ها فعالیت بسیار سمی ($LC_{50} \leq 50\ \mu g\ ml^{-1}$) و ۱۱/۴ درصد دارای سمیت ضعیف ($LC_{50} \leq 200\ \mu g\ ml^{-1}$) بودند (۲۰). در پژوهش حاضر همه اکتینوباکترهای مورد مطالعه سمیت کم تا زیاد روی ناپلی‌های ۴۰ ساعته *آرتمیا اورمیانا* داشتند و هیچ جدایه غیرسمی در بین آن‌ها وجود نداشت. در گروه HT (بسیار سمی) تعداد ۲۶ جدایه (۵۴/۱۶ درصد از کل جدایه‌ها) دارای LC_{50} کم‌تر از ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بودند که ۱۶/۵۶ برابر بیش‌تر از مطالعه یاد شده بود. هم‌چنین متابولیت‌های حاصل از تخمیر اکتینوباکترهای مورد بررسی در مطالعه صرامی (Sarrami) و همکاران در سال ۲۰۱۴ روی گونه *آرتمیا فرانسیسکانا* دارای LC_{50} معادل ۶۱–۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر روی این گونه آب‌زی بودند (۲۶). این تفاوت در میزان سمیت عصاره‌ها در پژوهش حاضر در مقایسه با دو

مطالعه بالا را می‌توان به نوع ترکیبات متابولیت‌های ثانوی حاصل از جدایه‌ها و هم‌چنین تفاوت در واکنش نسبت به عصاره‌ها در گونه‌های مختلف *آرتمیا* نسبت داد.



نمودار ۱: فراوانی نسبی سمیت ۴۸ جدایه اکتینوباکترهای جداشده بومی ایران روی ناپلی‌های ۴۰ ساعته *آرتمیا اورمیانا*.

اکتینوباکترها علاوه بر اکوسیستم‌هایی مانند آب و خاک، به صورت هم‌زیست با گیاهان مختلف نیز یافت می‌شوند. در مطالعه‌ای عصاره‌های حاصل از تخمیر اکتینوباکترهای اندوفیت از گیاه زنجبیل (*Zingiber officinale*) با استفاده از آزمون سمیت میگوی آب شور (*Artemia salina*) مورد ارزیابی قرار گرفت. یک مورد از عصاره‌ها بیش‌ترین میزان سمیت را نسبت به عصاره‌های دیگر با LC_{50} معادل ۳۰۹/۳۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر از خود نشان داد. میزان LT_{50} این عصاره پس از ۲۴ ساعت از زمان تلقیح از ۱۲/۴۰ ساعت (برای غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تا ۷۰/۷۷ ساعت (برای غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) متغیر بود (۲۷). در پژوهش حاضر عصاره‌های با غلظت‌های پایین‌تر (۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) میزان LT_{50} کم‌تری نسبت به مطالعه مذکور داشتند.

در کنار بسیاری از مطالعاتی که از گونه‌های مختلف *آرتمیا* به‌عنوان روشی برای غربال‌گری ترکیبات مختلف از لحاظ توانایی کاربرد در امور پزشکی از قبیل ضدسلول‌های سرطانی، ضدباکتری‌ها و قارچ‌های بیماری‌زای انسانی، ضدانگل‌های انسانی و حیوانی و غیره انجام می‌شوند، از این روش به‌عنوان آزمونی برای غربال‌گری اولیه ترکیبات دارای اثرات آفت‌کشی برای مثال بر روی حشرات و کنه‌های زیان‌آور کشاورزی و پزشکی نیز استفاده می‌شود. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۴ توسط ژیانگ و کنگ (Xiong and Kong) انجام شد، از میان ۳۳۱ جدایه اکتینوباکتر جداسازی شده از آب و رسوبات دریایی در چین، ۴۰ جدایه دارای سمیت روی *آرتمیا* بودند و ٤ جدایه سمیت بالایی را از خود نشان دادند. از میان این ٤ جدایه، جنس *Streptomyces* sp. 173 کشندگی بسیار زیادی روی کرم غوزه پنبه (*Helicoverpa armigera*) داشت، به‌طوری‌که، در غلظت مورد استفاده در ساعت اول پس از تلقیح، مرگ‌ومیر ۱۰۰ درصدی در این آفت ایجاد نمود (۲۸).

میگوی آب شور در درخت تبارزایی (Phylogeny) با رده حشرات در یک گروه خواهری قرار می‌گیرد و این خویشاوندی و نزدیکی ژنتیکی می‌تواند برای دست‌یابی به ترکیبات با اثرات زیستی روی حشرات موثر باشد. علاوه بر عصاره‌های حاصل از تخمیر میکروارگانیسم‌هایی چون باکتری‌ها، عصاره‌های گیاهان مختلف نیز دارای اثرات گوناگون زیستی و از جمله اثرات ضدسلول‌های سرطانی هستند. در پژوهشی که در سال ۲۰۱۳ توسط قوامی‌زاده (Ghavamizadeh) و همکاران با استفاده از عصاره‌های آبی، کلروفرمی و مخلوط آب و اتانولی گیاهان بیلهر (*Dorema aucheri*)، بومادران (*Achillea millefolium*) و درمنه کوهی (*Artemisia aucheri*) صورت گرفت، از *آرتمیا اورمیانا* به‌عنوان جانور آزمایشی برای بررسی سمیت سلولی این عصاره‌ها استفاده شد (۲۹). در این مطالعه کم‌ترین میزان غلظت کشنده ۵۰ درصد جمعیت (سمی‌ترین عصاره) متعلق به عصاره کلروفرمی گیاه بومادران با ٦٧/٨٠ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. این میزان سمیت با دامنه غلظتی جدایه‌های گروه (ب) در پژوهش حاضر مشابه است. علاوه بر گیاهان و میکروارگانیسم‌هایی مانند باکتری‌ها و قارچ‌ها که از اصلی‌ترین منابع تولید متابولیت‌های زیست‌فعال هستند، جانوران دیگری چون خیارها و جلبک‌های دریایی و موجودات زنده دیگر نیز به‌عنوان منابعی غنی از ترکیبات دارای اثرات زیستی به‌شمار می‌روند. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۹ توسط ماشجور و یوسف‌زادی (Mashjoor and Yousefzadi) با استفاده از عصاره‌های بخش‌های مختلف سه گونه خیار دریایی خلیج

فارس صورت گرفت، نشان داده شد که این عصاره‌ها دارای اثر سمیت سلولی روی گونه *آرتمیا سالینا* (*Artemia salina*) بودند (۳۰). کم‌ترین میزان غلظت کشنده ۵۰ درصد جمعیت مربوط به عصاره متانولی گیاه *هولوثوریا لئوکاسپیلوتا* (*Holothuria leucospilota*) به‌میزان ۵۶۷/۴۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. مقایسه این غلظت با مقادیر غلظت‌های کاربردی اکتینوباکترهای پژوهش حاضر و مطالعات مشابه انجام گرفته در این زمینه نشان می‌دهد که حتی مقادیر بسیار پایین از غلظت جدایه‌های اکتینوباکترها توانایی ایجاد سمیت بسیار بالا در گونه‌های مختلف *آرتمیا* نسبت به سایر عصاره‌ها دارد. این موضوع حاکی از توانمندی بسیار خوب و بالای اکتینوباکترها در ایجاد سمیت روی طیف وسیعی از موجودات زنده است که به‌تبع آن کاربردهای گسترده‌تری از ترکیبات آن‌ها را به‌عنوان مواد ضدسرطان، زنده‌کش و محدودکننده‌های رشدی در علوم مختلف زیستی به ویژه مهار آفات مهم کشاورزی و بهداشتی به ارمغان خواهد آورد.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش ۴۸ جدایه اکتینوباکتر بومی ایران موجود در کلکسیون میکروارگانیسم‌های دانشگاه تهران برای دست‌یابی به جدایه‌های با توانایی زیستی برتر با استفاده از گونه بومی میگوی آب شور مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج به دست آمده نشان‌دهنده پتانسیل بالای عصاره‌های اکتینوباکتر مورد مطالعه به لحاظ ایجاد سمیت روی ناپلی‌های *آرتمیا اورمیانا* بودند، به طوری‌که، بیش از ۴۰ درصد عصاره‌ها در مقادیر ۴۰-۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در کم‌ترین زمان ممکن سمیت بالایی روی ناپلی‌ها ایجاد نمودند. با توجه به طبقه‌بندی سمیت، تمامی این ترکیبات درجات متنوعی از سمیت زنده‌کشی داشتند و هیچ جدایه‌ای در گروه غیرسمی (NT) قرار نگرفت. از آن‌جایی‌که، جدایه‌های بومی توانمند در تولید ترکیبات زیست‌فعال دارای غلظت کشندگی پایین و سرعت کشندگی بالا برای تولید انبوه در کاربردهای مختلفی هم‌چون پزشکی، کشاورزی، و صنعت گزینه‌های مقرون به صرفه‌تری خواهند بود، بنابراین در بین جدایه‌های اکتینوباکتر مورد بررسی، عصاره‌های به دست آمده از جدایه‌های ۳۵۲۷، ۳۵۳۴ و ۳۳۰۲ به عنوان عصاره‌های شاخص و با سمیت زنده‌کشی برتر قابل توصیه برای بررسی‌های بیش‌تر هستند.

ملاحظات اخلاقی

نگارندگان همه موارد اخلاقی در نگارش مقاله شامل عدم سرقت علمی و ادبی، انتشار هم‌زمان و تحریف داده‌ها در این نوشته را تضمین و رعایت نموده‌اند.

تشکر و قدردانی

به این وسیله نویسندگان از گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان و کلکسیون میکروارگانیسم‌های دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه تهران به لحاظ تامین امکان این پژوهش کمال تشکر و امتنان را دارند.

تعارض در منافع

وجود ندارد.

References

1. Asem A, Eimanifar A. Updating historical record on brine shrimp Artemia (Crustacea: Anostraca) from Urmia Lake (Iran) in the first half of the10th century AD. Int J Aquatic Sci. 2016; 7: 3-5.

2. Chan W, Shaughnessy AE, van den Berg CP, Garson MJ, Cheney KL. The validity of brine shrimp (Artemia sp.) toxicity assays to assess the ecological function of marine natural products. J Chem Ecol. 2021; 47(10): 834-46.

3. Hamrun N, Nabilah T, Hasyim R, Ruslin M, Dammar I, As MA. Toxicity test of bioactive red alga extract Eucheuma spinosum on shrimp Artemia salina leach. Sys Rev Pharm. 2020; 11(5): 672-6.

4. Karchesy YM, Kelsey RG, Constantine G, Karchesy JJ. Biological screening of selected Pacific Northwest forest plants using the brine shrimp (Artemia salina) toxicity bioassay. Springerplus. 2016; 5(1): 1-9.

5. Vivekanandhan P, Swathy K, Kalaimurugan D, Ramachandran M, Yuvaraj A, Kumar AN, et al. Larvicidal toxicity of Metarhizium anisopliae metabolites against three mosquito species and non-targeting organisms. Plos One. 2020; 15(5): e0232172.

6. Kasanah N, Triyanto T. Bioactivities of halometabolites from marine actinobacteria. Biomolecules. 2019; 9(6): 225-43.

7. Dhakal D, Pokhrel AR, Shrestha B, Sohng JK. Marine rare actinobacteria: isolation, characterization, and strategies for harnessing bioactive compounds. Front Microbiol. 2017; 8: 1106.

8. Law JW-F, Pusparajah P, Ab Mutalib N-S, Wong SH, Goh B-H, Lee L-H. A review on mangrove actinobacterial diversity: the roles of Streptomyces and novel species discovery. Prog Microb Mol Biol. 2019; 2(1).

9. Tiwari K, Upadhyay DJ, Mösker E, Süssmuth R, Gupta RK. Culturable bioactive actinomycetes from the great Indian Thar Desert. Annal Microbiol. 2015; 65(4): 1901-14.

10. Borah A, Thakur D. Phylogenetic and functional characterization of culturable endophytic Actinobacteria associated with Camellia spp. for growth promotion in commercial tea cultivars. Front Microbiol. 2020; 11: 318.

11. Bérdy J. Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. J Antibiot. 2012; 65(8): 385-95.

12. Chaudhary HS, Soni B, Shrivastava AR, Shrivastava S. Diversity and versatility of Actinomycetes and its role in antibiotic production. J Appl Pharm Sci. 2013; 3(8): 83-94.

13. Ratnakomala S, Perwitasari U, editors. The amylase production by Actinobacteria isolated from rumen fluid. IOP Conference Series: Earth Environ Sci; 2020; 439(1): 012019.

14. Xiong Y-W, Ju X-Y, Li X-W, Gong Y, Xu M-J, Zhang C-M, et al. Fermentation conditions optimization, purification, and antioxidant activity of exopolysaccharides obtained from the plant growth-promoting endophytic actinobacterium Glutamicibacter halophytocola KLBMP 5180. Int J Biol Macromol. 2020; 153: 1176-85.

15. Sivalingam P, Hong K, Pote J, Prabakar K. Extreme environment Streptomyces: potential sources for new antibacterial and anticancer drug leads? Int J Microbiol. 2019; e5283948.

16. Fateh M, Habiba Z, Khaled B, Billel M, Youcef N, Abderrahmane B. Immunostimulatory activity of intracellular lectin extract from Actinomycete Micromonospora aurantiaca. Int. J. Toxicol. Pharmacol. Res. 2015; 7(6): 264-268.

17. Azimi S, Basei Salehi M, Bahador N. Isolation and identification of Streptomyces ramulosus from soil and determination of antimicrobial property of its pigment. Mod Med Lab J. 2017; 1 (1): 36-41.

18. Laassami A, Yekkour A, Meklat A, Djemouai N, Zitouni A, Mokrane S, et al. Actinobacteria associated with vineyard soils of algeria: classification, antifungal potential against grapevine trunk pathogens and plant growth-promoting features. Curr Microbiol. 2020; 77(10): 2831-40.

19. Sarwar A, Latif Z, Zhang S, Zhu J, Zechel DL, Bechthold A. Biological control of potato common scab with rare isatropolone C compound produced by plant growth promoting Streptomyces A1RT. Front Microbiol. 2018; 9: 1126.

20. Safaeian S, Nouhi AA, Oryan S. Studies on cytotoxic activity of marine Actionomycetes from Persian Gulf on Artemia franciscana and Artemia urmiana. Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology. 2005; 141(3): 133-139.

21. Hamedi J, Kafshnouchi M, Ranjbaran M. A study on actinobacterial diversity of Hampoeil cave and screening of their biological activities. Saudi J Biol Sci. 2019; 26(7): 1587-95.

22. Mensah PK, Palmer CG, Muller WJ. Lethal and sublethal effects of pesticides on aquatic organisms: the case of a freshwater shrimp exposure to Roundup®. Pesticides: Toxic Aspects, In Tech Publica-tions, Rijeka, Croatia. 2014: 163-85.

23. Mehrvar A. Studies on the nucleopolyhedrovirus of Helicoverpa armigera (Hübner): evaluation of its geographic isolates. LAP LAMBERT Academic Publishing; 2012.

24. Shapiro M, Argauer R. Relative effectiveness of selected stilbene optical brighteners as enhancers of the beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus. J Econ Entomol. 2001; 94(2): 339-43.

25. Hamidi M, Jovanova B, Panovska T. Toxicological evaluation of the plant products using brine shrimp (Artemia salina L.) model. Maced Pharm Bull. 2014; 60(1): 9-18.

26. Sarrami S, Hamedi J, Mohammadipanah F, Rezayat Sorkhabadi SM. Study of cytotoxic effects of metabolites produced by Actinomycetes. Jundishapur Sci Med J. 2014; 13(3): 347-355. [In Persian].

27. Rahayu S, Fitri L, Ismail YS. The endophytic Actinobacterial toxicity test of ginger (Zingiber officinale Roscoe) used the BSLT (Brine Shrimp Lethality Test) method. Elkawnie: J Islamic Sci Technol. 2021; 7(1): 19-29.

28. Xiong L, Li J, Kong F. Streptomyces sp. 173, an insecticidal micro-organism from marine. Lett Appl Microbiol. 2004; 38(1): 32-7.

29. Ghavamizadeh M, Mohammadi J, Mirzaei A, Sadeghi H, Akbartabar M. Cytotoxicity of Dorema auchrei, Achillea millefolium and Artemisia aucheri by Artemia. Armaghane Danesh. 2013; 18(5): 389-99.

30. Mashjoor S, Yousefzadi M. Cytotoxic effects of three Persian Gulf species of Holothurians. Iranian J Vet Res. 2019; 20(1): 19-26.