Archive of SID

مجله علمی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
تابستان ۱۳۸۸، دوره یکم، شماره اول، صفحه ۲۲ -۱۸

غربال باکتری‌های جنس استرپتومایسس دارای فعالیت آنتی‌باکتریال از خاک‌های منطقه آذربایجان ایران

علیرضا دهناد[۱]، روح‌الله بخشی[۲]، لاله پارسایگانه[۱]، علیرضا منادی‌سفیدان[۳]، سیدحسن منتظم[۴]،صمد عبدی‌صوفیانی[۱]

۱- پژوهشکده بیوتکنولوژی، منطقه شمال‌غرب و غرب کشور (تبریز)
۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، گروه میکروبیولوژی، زنجان
۳- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، گروه میکروبیولوژی، تبریز
۴-دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بناب، گروه میکروبیولوژی، بناب

نویسنده مسؤول: دکتر علیرضا دهناد، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی (تبریز). Adehnad@abrii.ac.ir

دریافت: ۸۸/۴/۱۵ پذیرش: ۸۸/۵/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: باکتری‌های استرپتومایسس، گرم مثبت، غیرمتحرک و رشته‌ای می‌باشند. استرپتومایسس‌ها همواره به عنوان یک منبع اصلی تولیدکننده متابولیت‌های ثانویه متنوع و آنتی‌بیوتیک‌های صنعتی جهانی مورد توجه بوده‌اند. در این تحقیق، هدف غربالگری خاک به منظور شناسایی جنس استرپتومایسس با خاصیت آنتی‌باکتریال نمونه‌های خاک از شهرستان‌های تبریز، مرند، خوی، ماکو در ایران، در فصول مختلف سال می‌باشد.

روش بررسی: نمونه‌های خاک از شهرستان‌های تبریز، مرند، خوی، ماکو در فصول مختلف سال جمع‌آوری گردید. ۱۵۰ ایزوله اکتینومایست از خاک‌های شهرهای فوق جداسازی شد. این ایزوله‌ها به طور وسیعی جهت مطالعه خاصیت ضدمیکروبی بر علیه باکتری‌های گرم مثبت و منفی در طی دو مرحله غربالگری اولیه و ثانویه مورد مطالعه قرار گرفتند.

یافته‌ها: ۲۰ ایزوله فعالیت قوی بر علیه نمونه‌های پاتوژن نشان دادند. نتایج نشان دادکه ایزوله‌های به دست آمده بر علیه باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کلی و پروتئوس ولگاریس با ناحیه بازدارندگی بیشتر از ۱۰میلی‌متر فعالیت قوی داشتند. ۱۲ ایزوله به عنوان اکتینومایست جداسازی شدند. تست‌های بیوشیمیایی و مورفولوژیکی برای شناسایی نمونه‌ها انجام شد و نتایج با استفاده از ماتریکس تعریف شده برجیز بررسی شد. نتایج حاصل از آنالیز داده‌ای بیوشیمیایی ۱۸ صفت مورد استفاده، بیانگر این موضوع بود که نمونه‌ها در ۳ گروه قرار دارند گروه اول شامل۸ نژاد، در یک گروه مشابه بود و گروه دوم۳ نمونه و یک نمونه متفاوت از بقیه بود. گروه اول با توجه به نتایج، به عنوان جنس استرپتومایسس با گونه‌های متفاوت مشخص شد.

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر نشان داد خاک‌های مناطق مختلف آذربایجان دارای پتانسیل بالقوه‌ای از تنوع اکتینومیستی می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: استرپتومایسس، فعالیت ضدمیکروبی، ویژگی‌های بیوشیمیایی.

مقدمه

استرپتومایسس‌ها در راسته باکتریایی *Actinomycetes* که باکتری‌های گرم مثبت، بدون حرکت و رشته‌ای هستند، قرار دارند. این باکتری‌ها در ساختار رشته‌ای شاخه‌شاخه خود شبیه به قارچ‌ها هستند. استرپتومایسس‌ها نیز پروکاریوت‌های گرم مثبت، تولیدکننده اندوسپور، هوازی و شیمیوارگانوتروف می‌باشند. کلونی‌های استرپتومایسس با ظاهر گچی و بوی شبیه

www.SID.ir

Archive of SID

به بوی خاک خود قابل تمایزند. این باکتری‌ها به طور وسیعی در طبیعت پراکنده‌اند و به ویژه در خاک زیست کرده و تجزیه کننده‌های بسیار مهمی هستند. در حدود ۵۰۰ گونه شناخته شده از این جنس وجود دارد که بسیاری از آنها مهم‌ترین تولید کننده‌های صنعتی آنتی‌بیوتیک‌ها و دیگر متابولیت‌های ثانویه ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضدویروسی، ضدسرطانی، ضدتوموری و نیز ایمنوسوپرسنت‌ها و آنتی‌هیپرکلسترولومیکس هستند (۱).گونه‌های باکتری استرپتومایسس از نظر متابولیکی قادرند بسیاری از ترکیبات متفاوت شامل قندها، الکل‌ها، آمینواسیدها و ترکیبات حلقوی را توسط آنزیم‌های هیدرولیتیک متابولیزه کنند (۲). این میکروارگانیسم از نظر تاکسونومی در دسته‌بندی ذیل قرار می‌گیرد:

Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria(class); Actinobacteriade; Actinomycetales; Streptomycineae; Streptomycetaceae; Streptomyces

استرپتومایسس‌ها به خاطر توانایی تولید و سنتز آنتی‌بیوتیک همواره مورد توجه بوده‌اند. اغلب گونه‌های این جنس باکتریایی در مسیر تولید آنتی‌بیوتیک منحصر به فرد هستند. این آنتی‌بیوتیک‌ها به باکتری کمک می‌کنند که در شرایط کمبود مواد غذایی محیطی با دیگر میکروارگانیسم‌های خاک رقابت کنند. این رقابت با ممانعت از رشد میکروارگانیسم‌های دیگر همراه است. بسیاری از این آنتی‌بیوتیک‌ها منحصراً سنتز پروتئین را تحت تأثیر قرار می‌دهند و به این ترتیب از رشد میکروارگانیسم ممانعت می‌کنند.

اولین آنتی‌بیوتیک کشف شده از استرپتومایسس‌ها، استرپتومایسین است که در سال ۱۹۴۰توسط واکسمن و همکاران کشف شد و به دنبال آن در ۵۰ سال بعدی حدود ۴۰۰۰ آنتی‌بیوتیک شناسایی شده است که منشاء آنها باکتری‌های شاخه اکتینومایست هستند (۳). این متابولیت‌های ثانویه تنوع وسیعی را از نظر ساختارهای شیمیایی نشان می‌دهند که این ساختارهای شیمیایی شامل گروه‌های آمینوگلیکوزیدی (آمینوسیکلیتول)، آنساماباسین، آنتروسایکلین‌ها، بتالاکتام‌ها، ماکرولیدها، نوکلئوزیدها، پپتیدها و پلی‌ان‌ها، تتراسایکلین‌ها و دیگر آنتی‌بیوتیک‌های خارج از این گروه‌های تعریف شده می‌باشند. با تحقیقات جدیدی که بر روی تعیین توالی ژنوم *Streptomyces scabies* انجام شده به نظر می‌رسد که امکان اشتقاق آنتی‌بیوتیک‌های بیشتر نیز که تاکنون کشف نشده‌اند، وجود دارد. پروژه‌های استفاده از داده‌های ژنومی در سنتز آنتی‌بیوتیک‌های جدید اکنون در حال اجرا می‌باشند. در حال حاضر مطالعات بر روی امکان استفاده از مهندسی ژنتیک به منظور ایجاد مواد شیمیایی کاملاً جدید از طریق پیرایش متفاوت mRNA های تولید شده توسط باکتری، متمرکز شده‌اند. تحقیق و مطالعه بر روی آنتی‌بیوتیک‌های جدید و سایر متابولیت‌های مبکروبی مؤثر در فعالیت‌های زیستی به دلیل دارا بودن پتانسیل استفاده در کشاورزی، مصارف دارویی و کابردهای صنعتی پیوسته رو به افزایش می‌باشد (۴) و در این میان باکتری‌های جنس استرپتومایسس همچنان به عنوان یکی از منابع اصلی تولیدکننده متابولیت‌های جدید زیستی مورد توجه هستند (۵). پر واضح است که خاک‌های مناطق مختلف ایران دارای تنوع وسیعی از این جنس باکتریایی هستند که می‌تواند به عنوان منبع بسیار خوبی از لحاظ تولید متابولیت‌های ثانویه مهم و آنتی‌بیوتیک‌های جدید مورد بررسی و مطالعه قرار گیرد.

روش بررسی

نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده با شرایط استریل به آزمایشگاه منتقل شده و با استفاده از سری رقت‌سازی، رقیق شده و پس از تست رقت‌های مختلف، از رقت 10^{-2} کشت صورت گرفت. پس از تلقیح، پلیت‌ها به درون انکوباتور با دمای 29^{oC} و به مدت ۷ روز منتقل گردید. نمونه‌های باکتریایی پس از ۷روز با توجه به مورفولوژی و ساختار میکروسکوپی جدا و از آنها تک‌کلونی تهیه شد. برای تست خاصیت آنتی‌باکتریال از گزینش اولیه و ثانویه استفاده شد. در گزینش اولیه نمونه‌های جدا شده به صورت عمود در وسط پلیت حاوی نوترینت آگار کشت و به مدت ۷ روز در دمای ۲۹ درجه رشد داده شدند. نمونه‌های باکتری اشرشیاکلی (ATCC:۱۰۵۳۶)، استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC:۹۳۴۱)، پروتئوس ولگاریس (ATCC:۸۳۲۴۱)، عمود بر نمونه باکتری کشت و پلیت‌ها به درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه منتقل شدند (۶). پس از ۲۴ ساعت عدم رشد باکتری‌های مورد تست، جواب مثبت تلقی گردید. در گزینش نهایی، نمونه‌های مثبت برای استخراج ماده آنتی‌باکتریال با اتیل استات در محیط مایع S.C.A کشت و به مدت ۷ یا ۱۴ روز در دمای ۲۹ درجه به انکوباتور منتقل گردید. پس از رشد کامل نمونه‌ها از فیلتر ۲/. عبور داده شده و به عصاره به دست آمده به میزان مساوی اتیل استات افزوده شد و به مدت ۲ ساعت در شیکر انکوباتور با دور rpm/min ۲۵۰ انکوبه شد. پس از سپری شدن زمان فوق فاز اتیل استات جدا و به مدت ۱ ساعت در دمای 80^{oC} -۷۰ قرار گرفت (۷).

www.SID.ir

Archive of SID

مایع باقی مانده پس از زمان فوق به درون چاهک‌های ایجاد شده در پلیت‌هایی که با باکتری‌های اشرشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس، پروتئوس ولگاریس تلقیح شده بود منتقل وسپس به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه منتقل شدند. هاله عدم رشد باکتری‌های تست شده ثبت گردید (۸). نمونه‌های دارای هاله عدم رشد بیش از ۱ سانتیمتر به عنوان تولیدکنندگان آنتی‌بیوتیک انتخاب و برای شناسایی از روش‌های بیوشیمیایی مختلف استفاده گردید. در روش شناسایی با استفاده از قندها و تست‌های بیوشیمیایی مجموعاً ۱۸ تست بر روی ایزوله‌ها انجام شد (جداول ۱ و ۲).

در نهایت تجزیه‌های آماری برای این صفات و روش تجزیه کلاستر با استفاده از برنامه UPGMA برای تعیین فاصله فیلوژنتیکی ایزوله ها انجام شد.

جدول ۱- ویژگی‌های بیوشیمیایی تست شده برای شناسایی نمونه‌های جداسازی شده

تست اکسیداز	تست کازئین	مصرف رامنوز	مصرف رافینوز	مصرف گالاکتوز	مصرف فروکتوز	تست کاتالاز	تجزیه نشاسته
−	+	+	+	±	+	+	+ ۹۴ R_2
−	+	+	+	+	+	+	+ ۶۷R_1
−	+	+	+	+	+	+	+ ۶۷R_3
−	+	+	+	+	+	+	+ ۳۹R_3
−	+	+	+	+	+	+	+ ۳۱R_r
−	+	+	+	+	+	+	+ ۳۲R_4
−	+	+	+	+	+	+	+ ۷۰R_3
−	+	+	+	+	+	+	+ ۱۰R_1
−	+	+	+	+	+	+	+ ۱۰R_1
−	+	+	+	+ ضعیف	+	+	+ عج$R_{5.1}$
−	+	+	+	+	+	+	+ ۳/۲۱Gr
−	+	+	+	+	+	+	+ ۷۲R_3

جدول ۲- ویژگی‌های بیوشیمیایی تست شده برای شناسایی نمونه‌های جداسازی شده

رنگ پشت کلونی	رنگ سطح کلونی	مصرف گزیلوز	مصرف اینوزیتول	مصرف آرابینوز	مصرف مانیتول	مصرف سوکروز	مصرف گلوکز	رشد در نمک ۵٪	رشد در نمک ۳٪	رشد در نمک ۱/۵٪	رشد در $45^{°C}$
albidus	albus	+	+	+	+	+ ضعیف	+	-	−	-	+ ۹۴ R_2
flavus	albus	+	+	±	+	+	+	-	+	+	− ۶۷R_1
fardia	albus	+	+	±	−	+ ضعیف	+	+	+	+	− ۶۷R_3
cinneacoloris	cinneacoloris	+	-	+	+ ضعیف	−	+	−	+	+	− ۳۹R_3
fardia	albus	±	±	+	−	−	+	+	+	+	− ۳۱R_r
cinneacoloris	albidus	+	+	+	−	+ ضعیف	+	−	+	+	− ۳۲R_4
cinneacoloris	cinneacoloris	+	+	+	+	+	+	+	-	+	− ۷۰R_3
cinneacoloris	cinneacoloris	+	+	+	−	+	+	+	−	+	+ ۱۰۸R_1
cinneacoloris	albus	+	-	+	+ ضعیف	+	+	-	−	+	− ۱۰۷R_1
albus	albus	+	+	+	+ ضعیف	-	+	+	+	+	− عج$R_{5.1}$
albus	albus	+	+	+	+	−	+	-	+	+	− ۳/۲۱Gr
cinneacoloris	cinneacoloris	+	+	+	−	−	+	−	+	+	− ۷۲R_3

Cinneacoloris: قهوه‌ای، fardia: قرمز، flavus: زرد، albidus: کرم، albus: سفید، negative: -، positive: +

یافته‌ها

از ۱۰۰ نمونه خاک مناطق مختلف شهرستان‌های تبریز و مرند در استان آذربایجان شرقی و شهرستان‌های خوی و ماکو در استان آذربایجان غربی از خاک‌های با pH قلیایی حدود ۹ -۸، بیشترین تعداد باکتری استرپتومایسس جداسازی شد. مجموعاً تعداد ۱۵۰ کلونی بر اساس مورفولوژی کلونی و رنگ‌آمیزی گرم انتخاب گردید. برای بررسی خاصیت آنتی‌باکتریال نمونه‌های به دست آمده (به دلیل کثرت نمونه‌ها)، ۲ مرحله تست برای این خاصیت انجام شد. در مرحله اول با

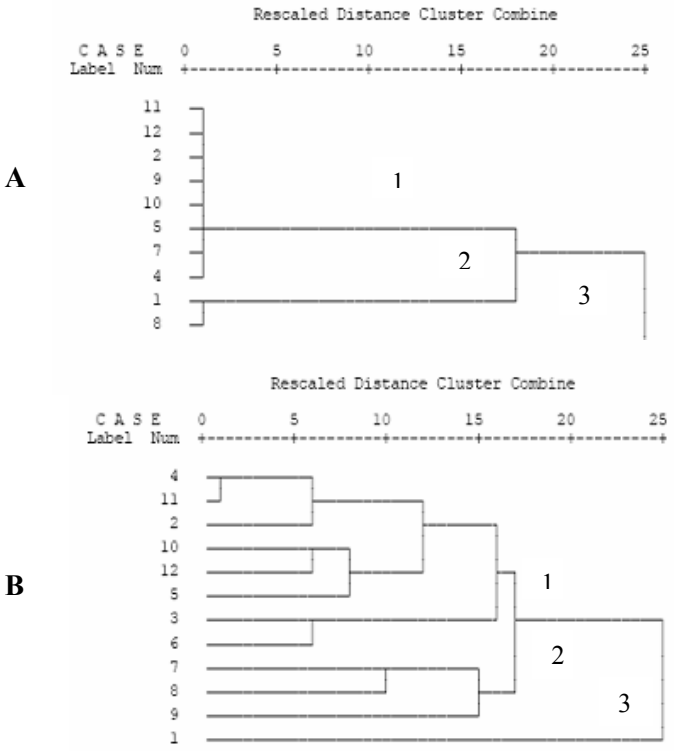
www.SID.ir

Archive of SID

توجه به این که از بین باکتری‌های اکتینومیست تمامی باکتری‌ها دارای این خاصیت نیستند، تست به صورت خطی انجام شد. پس از اثردهی باکتری‌ها میزان جلوگیری از رشد مشاهده شد و از بین ۱۵۰ نمونه باکتریایی حدود ۲۰ نمونه در این روش جواب مثبت دادند که میزان اثردهی ماده آنتی‌باکتریال موجود در نمونه‌ها فرق می‌کرد. در بین این ۲۰ نمونه حدود ۸ نمونه بر علیه باکتری‌های گرم مثبت، ۶ نمونه بر علیه باکتری‌های گرم منفی، ۸ نمونه نیز هم بر گرم مثبت و هم بر گرم منفی مؤثر شناخته شدند. پس از استخراج ماده آنتی‌باکتریال و اثردهی بر باکتری‌های مورد تست هاله عدم رشد اندازه‌گیری شد. هاله عدم رشد برای انواع باکتری‌ها (استافیلوکوکوس اورئوس ۷۵٪ ، اشرشیاکولی ۵۸/۵٪ و بر علیه پروتئوس ولگاریس ۲۵٪) و در هر کدام از سویه‌های ایزوله استرپتومایسس، متفاوت بود. در نهایت ۱۲نمونه دارای هاله عدم رشد بیش از ۱ سانتیمتر برای شناسایی انتخاب شد. به علت کثرت نمونه‌های قند بر حسب نوع نمونه که از روی شکل کلونی ورنگ آن می‌توان به جنس وگونه خاص که دارای این رنگ هستند پی برد. بعد از پی بردن به گونه مورد نظر تست‌های بیوشیمیایی مختلفی برای شناسایی گونه‌ها انجام شد. نتیجه تست‌های قند و بیوشیمیایی در جدول ۱ و ۲ آورده شده است. بعد از شناسایی گونه‌ها برای تعیین فاصله ژنتیکی میان ایزوله‌ها تجزیه کلاستر برای صفات جداول ۱ و ۲ برای تمامی نمونه‌ها با ضریب جاکارد با استفاده از نرم‌افزار UPGMA انجام شده و درخت فیلوژنتیکی ایزوله‌ها ترسیم شد (شکل۱).

مقایسه نتایج حاصل از آنالیز داده‌ای بیوشیمیایی ۵ صفت و ۱۸ صفت مورد استفاده بیانگر این موضوع بود که هر چقدر ایزوله‌ها خصوصیات مشترک بیوشیمیایی بیشتری داشتند نسبت به هم در شجره ترسیم شده فاصله کمتری داشتند. بنابراین شجره باکتری‌هایی را که بر اساس ویژگی‌های متفاوت تست شده‌اند طوری در کنار هم قرار داده است که باکتری‌های شبیه به هم در کنار هم و نزدیک به هم قرار دارند.

به طور کلی ایزوله‌ها در ۳ گروه قرار گرفتند. گروه اول شامل ۸ سویه (شماره‌های۴، ۱۱، ۲ ،۱۰، ۱۲، ۳ ،۵، ۶) و گروه دوم ۳ سویه (۷، ۸، ۹) و گروه سوم یک‌سویه (۱) متفاوت از بقیه بود. گروه اول با توجه به نتایج به عنوان جنس استرپتومایسس با گونه‌های متفاوت مشخص شد.



شکل ۱- درخت فیلوژنتیکی ایزوله‌ها

A: تجزیه کلاستر برای ۵ صفت متفاوت

B: تجزیه کلاستر برای ۱۸ صفت کلی مورد آزمایش

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

در تحقیقی که به منظور جداسازی باکتری‌های استرپتومایسس دارای فعالیت آنتی‌باکتریایی از مناطق مختلف منطقه آذربایجان انجام شد مشخص شد در مناطقی که pH خاک بالای ۷ است جمعیت گونه‌های استرپتومایسس نسبت به جنس‌های دیگر باکتری بیشتراست که این یافته با مطالعات بازیلیو و همکاران که به سال ۲۰۰۳ در اسپانیا صورت گرفت همخوانی دارد (۹). همچنین بررسی‌های ما نشان داد در خاک‌های مناطق زیر کشت محصولات کشاورزی تنوع جمعیتی اکتینومایست‌ها نسبت به دیگر خاک‌ها زیاد است که این موضوع، بررسی‌های اسکای و همکاران به سال ۲۰۰۴ که بر روی خاک‌های مناطق جنگلی و کشاورزی ترکیه صورت گرفته بود را تأیید می‌کند که دلیل آن را تولید متابولیت‌های ثانویه توسط گیاهان کشت شده عنوان کردند که تنوع استرپتومایسس‌ها را سبب می‌شود (۱۰). دهاناسکاران و همکاران، به سال ۲۰۰۵ اکتینومیسیت خاک‌های مناطق مختلف هندوستان را مطالعه کردند. برای غربالگری ثانویه در جهت استخراج متابولیت‌های فعال ضدباکتریایی از محیط کشت مایع، از حلال‌های اتیل استات، انیلین، کلروفرم و پریدین استفاده کردند و نشان دادند که اتیل استات بهترین حلال برای استخراج این مواد است که مطالعه حاضر این مسأله را تأیید می‌کند (۶). باکتری‌های پاتوژن مورد استفاده در تحقیق حاضر باکتری‌های بیماریزای انسان و حیوان بودند که پاسخ ایزوله‌های استرپتومایسس بر روی این پاتوژن‌ها همان طوری که اشاره گردید متفاوت بود. با توجه به هاله عدم رشد نمونه‌های مثبت می‌توان به این نکته اشاره کرد که نوع آنتی‌بیوتیک تولیدی توسط ایزوله‌های مختلف، متفاوت است. تنوع آنتی‌بیوتیک‌های تولیدی از استرپتومایسس‌ها نشانگر این موضوع می‌تواند باشد که این باکتری‌ها قادر به تولید آنتی‌بیوتیک‌های جدید می‌باشند که برای یافتن این نتایج باید مطالعات زیادی صورت گیرد. تفاوت در سویه باکتری‌ها می‌تواند منجر به شناسایی سویه‌های جدید گردد که به خودی خود می‌تواند منبع جدیدی از متابولیت‌های ثانویه جدید مورد بررسی قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

در مجموع مطالعه حاضر نشان می‌دهد خاک‌های مناطق مختلف آذربایجان دارای پتانسیل بالقوه‌ای از تنوع اکتینومیسیتی داشته که از نظر تولید مواد ضدباکتریایی بسیار فعال‌اند که می‌توان با مطالعه بیشتر سویه‌های جدیدی را یافت که قدرت تولید آنتی‌بیوتیک‌های نوینی را دارند.

تشکر و قدردانی

با تشکر فراوان از پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی مدیریت شمال‌غرب و غرب کشور که با حمایت مالی و علمی برای انجام و اتمام این پروژه یاری رساندند.

References

1- Keiser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. *General Introduction to Actinomycetes Biology*. In: Practical *Streptomyces* Genetics. The John Innes Foundation, Crowes.Norwich, England.2000; 1- 21.

2- Cross T. *Growth and Examination of Actinomycetes Some Guidelines*. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriol. Williams &Wilkins Company: Baltimore.1989; 4: 2340- 2343.

3- Berdy J. *Recent developments of antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure*. Adv. Appl. Microbiol. 1984;18: 309- 406.

4- Hayakawa M. *Studies on the Isolation and Distribution of Rare Actinomycetes in Soil*. *Actinomycetologica*. 2008; 22: 12– 19.

5- Takahashi Y, Omura S. *Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds*. J. Gen. Appl. Microbiol. 2003; 49: 141– 154.

6- Dhanasekaran D, Raja-Kumar G, Sivamani P, Sivamani N, Paneerselvam A, Thajuddin N. *Screening Of Salt Pans Actinomycetes for Antibacterial Agents*. Int. J. Micro. 2005;1 (2): 6- 12.

7- Athalye M, Lacey J, Goodfellow M. *Selective Isolation and Enumeration of Actinomycetes using Rifampicin*. J. Appl. Bacteriol. 1981; 51: 289- 29.

8- Beaur AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. *Antibiotics susceptibility testing by a standardized single disc method*. Am. J. Clin. Pathol. 1966; 45: 493- 496.

9- Basilio A, Gonzalez I, Vicente MF, Gorrochategui J, Cabello A. *Patterns of antimicrobial activities from Soil actinomycetes Genilloud*. Apl. Micro. 2003; 95(4): 814- 823.

10- Oskay M, Üsame T, Azeri AC. *Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey*. Afri. J. Biotech. 2004; 3 (9): 441- 446.

www.SID.ir