Archive of SID

مجله علمی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
زمستان 1388 ،دوره یکم، شماره سوم، صفحه 23- 15

شناسایی مولکولی اکتینومیسیت های مولد موادضد باکتریایی علیه پاتوژن های بیماری زا از خاک های استان آذربایجان شرقی

علیرضا دهناد*[1] محمد رضا نهایی [2], لاله پارسا یگانه[1], صمد عبدی صوفیانی[3]

1- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمالغرب و غرب کشور، تبریز
2- گروه میکروبشناسی، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشکده پزشکی تبریز ،دانشگاه علوم پزشکی تبریز
3- دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور کرج
* نویسنده مسؤل: دکتر علیرضا دهناد، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمالغرب و غرب کشور، تبریز.

Adehnad@ABRII.ac.ir

دریافت: 88/4/28 پذیرش: 88/8/30

چکیده

زمینه و هدف : اکتینومیسیت ها باکتری هایی گرم مثبت و رشته ای هستند که بخش اعظم میکروارگانیسم های خاک را در بر می گیرند. بر اساس مطالعات انجام یافته، سه چهارم از کل آنتی بیوتیک های شناخته شده را اکتینو میسیت ها تولید می کنند. در همین راستا غربالگری برای فعالیت ضدباکتریایی ونیز شناسایی آنها از ژن 16SrDNA استفاده شد.
هدف این مطالعه شناسایی آکتینومیسیت های مناطق مختلف استان آذربایجانشرقی از جهت خواص آنتی باکتریائی و بررسی سویه های فعال با استفاده از ژن 16SrDNA می باشد.

روش بررسی : ایزوله های اکتینومیست از نمونه خاک های جمع آوری شده استان آذربایجانشرقی جدا سازی شد، غربالگری اولیه به روش تست دولایه (Bilayer) درمحیط کشت اگار وغربالگری ثانویه با روش انتشار در اگار(Disk Diffusion Method) در مقابل میکروارگانیسم های آزمایشی : *E. coli* ATCC 1399, *B. cereus* ATCC 1431, *Y. enterocolitica* ATCC35669, *S. aureus* ATCC 29213 انجام شدند. جهت شناسایی مولکولی، ابتدا، DNA ژنومیک از تمام باکتری های منتخب استخراج شد و سپس، ژن 16SrDNA ایزوله های مذکـــور با تکنیک PCR تکثیروتوسط شرکت Macrogene توالی یابی شد. نتایج حاصل با استفاده از برنامه های بیوانفورماتیک آنالیز شده وایزوله های مذکور شناسایی شدند.

یافته ها : از 110 نمونه خاک جمع آوری شده ، 310 ایزوله اکتینومیست جدا شدند،44 ایزوله درغربالگری اولیه و12 ایزوله در غربالگری ثانویه انتخاب شدند ، ژن 16SrDNA، 5 ایزوله توالی یابی شدند. توالی یابی نشان داد که ایزوله C91 با 97درصد به *Streptomyces sampsonii* ، G41 با 96 درصد به *Streptomyces mediolani*، F51 با82 درصد به *Streptomyces lividans* و E45با98 درصدبه *Streptomyces albogriseolus* ،شباهت دارد.

نتیجه گیری : نتایج این تحقیق نشان می دهد ایزوله های جدیدی در نمونه خاک های استان آذر بایجان شرقی وجود دارد که توانایی تولید مواد آنتی باکتریایی جدیدی دارند.

واژه های کلیدی :اکتینومیسیت ، باکتری پاتوژن، ماده ضد باکتریال، خاک، ژن 16SrDNA

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

اکتینومیسیت ها پروکاریوت هائی هستند که بصورت آزاد، ساپروفیت وگاها همزیست با گیاهان بسر می برند و می توان آنها را درهمه اکوسیستم ها از آن جمله خاک، آب، رسوبات دریائی و نیز آب های گرم مشاهده کرد اما محیط زیست اصلی آنها خاک بوده و جمعیت بزرگی از فلور طبیعی آن را تشکیل می دهند(1و2). از نظر رده بندی این باکتری ها دارای جنس های مهمی مانند: میکرومونوسپورا ، نوکاردیا و استرپتومایسس است که در بین اینها جنس استرپتومایسس به دلیل داشتن جمعیت 60 درصدی اکتینومیسیت ها ازاهمیت زیادی برخوردار است(3).

اکتینومیسیت ها بزرگترین ژنوم را در بین باکتری ها دارا هستند که درصدG+C ، بسیار بالاست این ژنوم طولانی توسط هزاران عامل نسخه برداری و بسته به نیاز خاص موجود، بیان می شود و به این دلیل هم ، توانائی تولید انواعی از متابولیت های ثانویه را دارند.که آنتی بیوتیک ها از جمله این متابولیت ها هستند بر اساس مطالعات، حدود 70درصد کل آنتی بیوتیک های شناخته شده متعلق به این باکتری هاست(3).

در حال حاضر رایج ترین روش ها برای شناسایی وطبقه بندی این باکتری ها، استفاده از ویژگی های مورفولوژیک و بیوشیمیایی ونیز مقایسه توالی ژن های مختلف آنهاست که در بین این ژن ها، ژن 16SrDNA بدلیل حفظ ترادف در طول تکامل جهت شناسایی باکتری ها بسیار مناسب است(4و5).

اکتینومیسیت ها جایگاه برجسته ای درزمینه مطالعات به منظور غربال گری جهت تولید مواد آنتی بیوتیکی، ضد سرطانی و متابولیت های غذائی و غیره دارند که سالانه ده ها ماده مفید در زمینه دارویی، کشاورزی، غذایی وصنعتی از این باکتری ها جداسازی وبه بازار مصرف ارائه می شود(6) که البته اولین قدم در راستای این امر مهم، جداسازی وشناسایی سویه های مستعد وفعال این گروه از باکتری هاست.

در کشور ما نیزمطالعات در زمینه جداسازی و شناسایی اکتینومیسیت ها از مناطق مختلف گزارش شده است(7و8). بررسی این منابع وداده ها نشان می دهد که تاکنون مطالعه جامعی در این زمینه انجام نگرفته است این مسئله زمانی بیشتر اهمیت پیدا می کند که بدانیم کشور ما دارای متنوع ترین اقلیم ها در بین کشور های منطقه است که می توان سویه های اکتینومیسیت قدرتمندی در زمینه تولید متابولیت های ثانویه بویژه آنتی بیوتیک ها ، درآن شناسایی وجداسازی کرد با عنایت به این موضوع لازم بود مطالعه جامع ودقیقی در این راستا انجام شود به همین منظور در تحقیق حاضر اکتینومیسیت های مناطق مختلف استان آذربایجانشرقی از جهت خواص آنتی باکتریائی بررسی شده وسویه های فعال را با استفاده از ژن 16SrDNA شناسایی شده اند.

روش بررسی

نمونه های خاک از مناطق مختلف استان آذربایجانشرقی از عمق 10-15 cm (افقA) برداشت شد ، سپس این نمونه ها به ظروف ویژه ی نگهداری نمونه انتقال یافت. سپس ویژگی های منطقه مانند عرض جغرافیائی، ارتفاع ، شیب محل وتیپ خاک یادداشت گردیدند. و پس از انتقال به آزمایشگاه دردمای یخچال $4\ ^oC$ نگهداری شد

جهت جداسازی اکتینومیست ها 5 گرم از نمونه های خاک کاملا خشک شده را وزن کرده واز آن رقتهای سریالی تهیه شد. از رقت 10^{-3} ، 100 میکرولیتردر محیط کشت S.C.A(Starch Casein Agar) گسترش داده شد و پلیت های حاصل در دمای $4\ ^oC$ به مدت هفت روز انکوبه شد. بعد از هفت روز کلنی های اکتینومیست براساس خصوصیات مورفولوژیک جدا شده ، وبه صورت تک کلون در دمای $4\ ^oC$ و یا به حالت استوک در دمای $80\ ^oC$- نگهداری شدند (9).

برای جداسازی اکتینومیست های فعال از نظر تولید مواد آنتی باکتریال غربالگری در دو مرحله جداگانه انجام یافت که برای هردو مرحله از پاتوژن های استاندارد زیر که از کلکسیون های میکروبی موجود در کشورتهیه شده بود استفاده شد.

E. coli ATCC 1399, *B. cereus* ATCC 1431, *Y. enterocolitica* ATCC35669 and *S. aureus* ATCC 29213

www.SID.ir

Archive of SID

جهت گزینش اولیه ازمحیط کشت S.C.A به روش دو لایه استفاده شد در این روش ابتدا ایزوله اکتینومیسیت وسپس باکتری پاتوژن بر روی ایزوله ها گسترش داده شد و برای گزینش ثانویه پس از آنکه ایزوله ها در مرحله گزینش اولیه، از نظر پتانسیل ضد باکتریائی تست شدند. نمونه های مثبت حاصل از مرحله اول برای مطالعه بیشتر به محیط کشت مایع مولر هینتون براث انتقال یافتند. پس از 36 ساعت انکوباسیون دردمای $28\ ^oC$ محیط های کشت مایع جمع شده و سانتریفوژ شدند مایع رویی با حجم های برابر از7 نوع حلال قطبی وغیر قطبی مخلوط شد و در انکوباتور شیکردار28^oC با دور 180 rpm به مدت 1 ساعت به شدت به هم زده شدند. سپس فاز حلال از فاز آبی جدا شده و حلال ها که حاوی متابولیت ها بودند توسط اوپراتور تغلیظ شد و به حجم $10\ ^{CC}$ رسانیده شدند و در درون شیشه های پنی سیلین در دمای $4\ ^oC$ نگهداری شدند(1). متابولیت های استخراج شده با روش انتشار از دیسک با دیسک های خالی 6×6mm در مقابل پاتوژن های استاندارد تست شده ونتایج آن قرائت شد.

برای استخراج DNA نمونه هایی که قدرت آنتی باکتریایی قوی داشتند بر روی محیط کشت S.C.A کشت وبه مدت سه روز در دمای $30\ ^oC$ انکوبه شدند سپس باکتری ها از روی پلیت ها برداشته شده و همراه با بافر لیز کننده به داخل ازت مایع منتقل شدند سپس در دورrpm 13000 به مدت 10دقیقه سانتریفویوژ گردیدند مایع رویی برداشته شد و با500 میکرولیتر محلول کلروفرم-ایزوامیل الکل در دورrpm 13000 به مدت 10دقیقه سانتریفویوژ گردید سپس ایزوپروپانول سرد به آن اضافه ومجددا سانتریفیوژ شد .مایع رویی دور ریخته شده و100میکرولیترآب مقطر به ویال ها اضافه شده ودر فریزر -20^oC نگهداری شد(10).

برای طراحی جفت آغازگر اختصاصی AR:
5´AAGGAGGTGATCCCAGCC3´

و 3´ AGAGTTTGATCCTGGCTC 5´ :AF توالی های 16SrDNA گونه های مختلف اکتینومیسیت ثبت شده در NCBI تهیه و با استفاده از برنامه Meg Alignment جایگاه های مشترک گونه ها شناسایی وبراساس انتها های 3´ و 5´ این قطعات با استفاده از برنامه OLIGO5 طراحی و توسط شرکت سینا ژن سنتز شد.

واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) در حجم 15 میکرولیتر

DNA 1µl
Primer F 0.5µl
Primer R 0.5µl
Master (dNTP, MgCl2, 10X PCR Buffer) 7.8µl
DDW 5.2µl

برای تکثیر ژن 16SrDNA انجام شدکه شامل این برنامه بود: دناتوراسیون اولیه 96 درجه سانتیگراد(2دقیقه)[دناتوراسیون 96 درجه (1 دقیقه) اتصال 55 درجه (1 دقیقه) بسط 72 درجه (2 دقیقه) که سه مرحله اخیر در 35 دور انجام گرفت] و بسط نهایی 72 درجه به مدت 10 دقیقه جهت تکثیر نهایی انجام گردید. برای تفکیک قطعات تکثیر یافته از ژل آگاروز 1 در صد (فرمنتاس) استفاده شد.

یافته ها

از110 نمونه خاک جمع آوری شده از مناطق مختلف استان آذربایجانشرقی 310 ایزوله اکتینومیست در فرم خالص جداسازی و فعالیت آنتی باکتریائی مورد بررسی قرار گرفت. این ایزوله ها بصورت استوک در دمای -80^oC درجه نگهداری شدند. pH و رنگ کلنی همه نمونه ها ثبت شد . در جدول1 توزیع برخی نمونه ها از نظر محل نمونه برداری، ارتفاع محل، pH و رنگ کلنی که از نظر تولید مواد آنتی باکتریال اهمیت دارند نشان داده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول 1 : توزیع نمونه های خاک حاوی آنتی باکتریال از نظر pH، محل نمونه برداری،ارتفاع محل و رنگ سطح و پشت کلنی

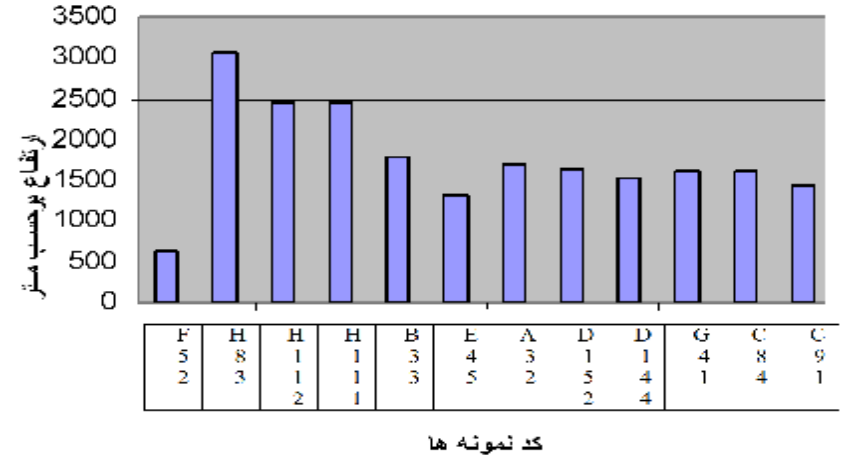
ردیف	کد ایزوله	محل نمونه برداری	ارتفاع محل نمونه برداری	pH خاک آزمایشی	رنگ سطح کلنی	رنگ پشت کلنی
1	F51	سیه رود	630	8.9	طوسی	قهوه ای روشن
2	H83	سهند	3080	7.6	صورتی	قرمز مایل نارنجی
3	H112	سهند	2450	7.7	قهوهای روشن	کرم مایل قهوه ای
4	H111	سهند	2450	7.7	قهوهای روشن	کرم مایل قهوه ای
5	B33	مرند	1800	8.5	قهوه ای	کرم
6	E45	بناب	1340	8.7	سبز زیتونی	کرم
7	A32	لیقوان	1720	8.2	کرم	سفید
8	D152	کلیبر	1650	8.3	بژ	قهوه ای سبز
9	D144	کلیبر	1530	8.5	کرم	کرم
10	G41	کلیبر(شاهوردی)	1606	7.3	سفید	کرم
11	C84	هریس	1618	8.7	اجری	اجری
12	C91	هریس	1459	8.5	کرم	زیتونی

با توجه به جدول فوق و با در نظر گرفتن نمودار1 مشاهده می شود که رابطه معنی دار ی ما بین pH خاکی که ایزوله از آن گرفته شده و قدرت ضد باکتریایی ایزوله وجود دارد. چنانکه دیده می شود 67 درصد نمونه هایی که در گزینش ثانویه مثبت قوی هستند دارای pH بالای 8 بودند همچنین همبستگی مثبتی بین قدرت ضد باکتریایی ایزوله ها وارتفاع محل برداشت آنها وجود دارد بطوری که 75 درصد نمونه های مثبت دارای ارتفاع بیش از 1500 متر بودند(نمودار1)

www.SID.ir

Archive of SID

الف



ب

نمودار1: ارتفاع محل های جداسازی(الف) وpH نمونه های دارای اثرات ضد باکتریایی قوی(ب)

در غربال گری اولیه جهت شناخت ایزوله های مثبت از بین 310 ایزوله، 44 ایزوله(14 درصد) از آنها فعالیت ضد باکتریائی در مقابل میکروارگانیسم های آزمایشی داشتند و 266 عدد ایزوله(86 درصد) هیچ فعالیتی بروز ندادند. ایزوله ها ی H21 وI82 در مقابل5 پاتوژن و ایزوله های F51 وB33 در مقابل 2 پاتوژن مثبت بودند.

از بین 44 ایزوله انتخاب شده از گزینش اولیه، 12 ایزوله(27 درصد) در گزینش ثانویه فعال تشخیص داده شدند. ایزوله های دیگر که هیچ فعالیتی نداشته و یا فعالیت شان ضعیف بود انتخاب نشدند(جدول2).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول 2: اندازه هاله های عدم رشد(m m) ایزوله های انتخاب شده در گزینش ثانویه در مقابل میکروارگانیسم آزمایشی: *S. aureus*(S) , *E. coli* (E.c) با حلال های مختلف*.

E.c(Die)	E.c(DDW)	E.c(M)	E.c(Co)	E.c(H)	E.c(Et)	E.c(Dic)	کد ایزوله
21	15	0	0	0	22	18	F51
0	0	0	0	0	0	0	H83
0	15	17	0	0	24	0	H112
0	22	18	0	0	0	0	H111
0	8	0	0	0	22	26	B33
21	19	9	0	17	18	0	E45
0	30	0	22	0	0	0	A32
20	10	0	0	0	17	0	D152
0	0	0	0	0	11	0	D144
10	9	0	0	0	29	0	G41
0	0	9	0	0	0	0	C84
0	12	0	0	0	18	0	C91
S(Die)	S(DDW)	S(M)	S(Co)	S(H)	S(Et)	S(Dic)	کد ایزوله
11	19	10	0	0	18	0	F51
0	23	0	0	16	25	0	H83
0	0	0	0	0	0	0	H112
0	0	0	0	14	24	0	H111
0	0	20	0	11	25	0	B33
0	12	0	0	0	14	0	E45
0	27	0	0	26	0	0	A32
0	0	23	0	0	19	0	D152
0	9	0	0	0	14	0	D144
17	20	0	0	0	27	17	G41
0	0	0	0	0	0	21	C84
10	23	9	0	0	24	9	C91

*: متانول (M) کلروفرم(Co) هگزان(H) اتیل استات(Et) دی کلرومتان (Dic) دی اتیل اتر(Die) وآب مقطردو بار استریل(DDW)

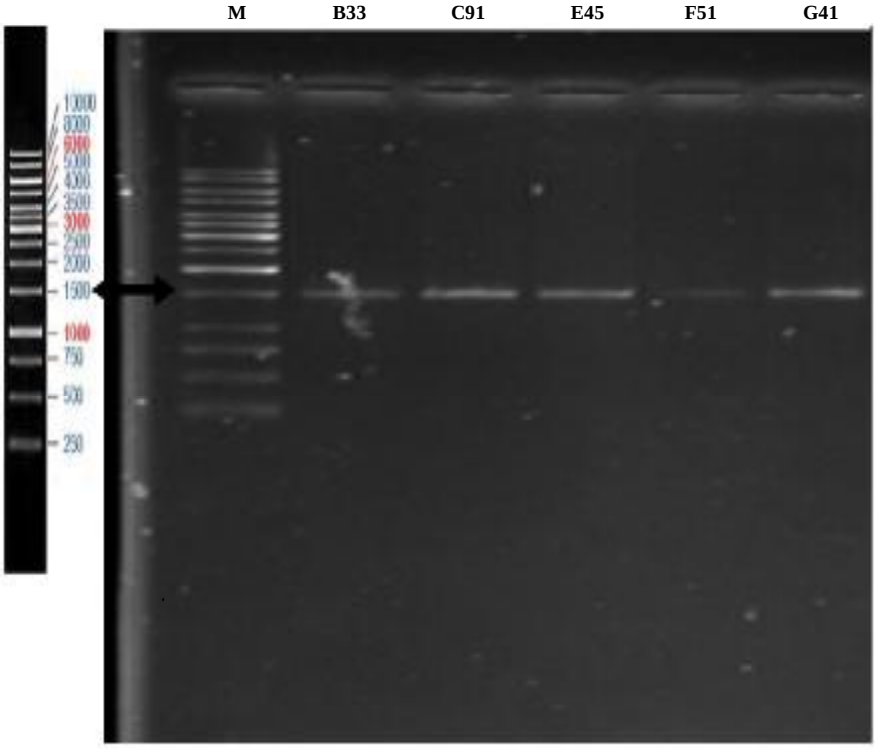
با مقایسه نتایج حاصل از گزینش اولیه وثانویه به این نتیجه رسیدیم که ایزوله های فعال گزینش اولیه (D21 و I82) وقتی در محیط کشت مایع که ارگانیسم های پاتوژن در آن وجود ندارد قرار می گیرند هیچ فعالیتی از خود نشان نمی دهند ویا ایزوله های کم فعال گزینش اولیه (F51 وB33) وقتی در محیط مایع قرار گرفتند بیشترین فعالیت را از خود نشان دادند(جدول2).

توالی های 16SrDNA بااستفاده از جفت پرایمر طراحی شده، با تکنیک PCR تکثیر شدو با توجه به اینکه آغازگر ها ازروی قسمت های ابتدایی وانتهایی توالی های 16SrDNA گونه های اکتینومیسیت موجود در NCBI طراحی شده بود ونیز با در نظر گرفتن اختصاصی بودن آغازگر ها، انتظار قطعات تکثیر یافته 1500 جفت نوکلئوتید را داشتیم که شکل1 آن را نشان میدهد. پس

www.SID.ir

Archive of SID

از تکثیر قطعات ژن 16SrDNA، مرحله بعدی توالی یابی آنهاست. که از میان همه ایزوله های با فعالیت ضد باکتریایی زیاد، فقط نمونه های B33,F51,G41 , C91,E45 جهت توالی یابی ژن 16SrDNA انتخاب شدند.



شکل1: الکتروفورز محصولات تکثیر یافته قطعات 16SrDNA ،پنج ایزوله منتخب در ژل آگاروز 1.5 درصد . M (سایز مارکر Kb DNA Ladder فرمنتاس). لاینهای بعدی محصول تکثیری ایزوله های به ترتیب: B33 ، C91، E45 ، F51 و G41 .

محصولات تکثیری ایزوله ها، بطور مستقیم و همراه جفت پرایمر ها جهت توالی یابی به شرکت ماکروژن فرستاده شد که پس از توالی یابی، داده های حاصل با برنامه کروماس و با مراجعه به داده های NCBI بررسی گردیدند که نتیجه نشان داد سویه C91 با 97درصد به *Streptomyces sampsonii* ، G41 با 96 درصد به *Streptomyces mediolani*، F51 با82 درصد به *Streptomyces lividans* وE45 با98 درصدبه *Streptomyces albogriseolus* ،شباهت دارد و ایزوله B33 نتیجه قابل قبولی نداشت .

بحث

در سال های اخیر مطالعات در زمینه جداسازی و شناسایی اکتینومیست ها از مناطق مختلف ایران گزارش شده است(7و8). بررسی این منابع وداده ها نشان می

www.SID.ir

Archive of SID

دهد که تاکنون مطالعه جامعی در این زمینه انجام نگرفته است، لذا با توجه به اهمیت این باکتری ها در زمینه تولید انواع آنتی بیوتیک ها، مطالعه حاضر با هدف جداسازی وشناسایی اکتینومیست های مستعد وفعال مولد این مواد از خاک های مناطق مختلف آذربایجان شرقی صورت پذیرفت که این مطالعه جامعترین ودرعین حال دقیق ترین آنها در منطقه شمال غرب کشور است.

بر اساس مطالعات صورت گرفته باکتری های اکتینومیست بزرگترین گروه باکتری های تولید کننده متابولیت های ثانویه، بویژه مواد ضدباکتریایی وضد قارچی هستند (2) که به منظور استحصال این مواد صدها مرکز وگروه تحقیقاتی، در گوشه و کنار دنیا بر روی این ارگانیسم ها، مطالعه وتحقیق می کنند(1و7و8و11). از طرفی این مسئله زمانی اهمیت می یابد که بدانیم باکتری های بیماری زا با گذشت زمان نسبت به آنتی بیوتیک های در دسترس از خود مقاومت نشان میدهند (7) وعملا این مواد از حیطه درمان خارج می شوند. جهت فائق آمدن به این مقاومت نیاز به آنتی بیوتیک های جدید است که به جد می توان گفت تنها ابزار و منبع موجود برای تولید آنتی بیوتیک های موثر، میکروارگانیسم ها بویژه اکتینومیست ها هستند. در همین راستا و با هدف جداسازی وغربالگری اکتینومیست های فعال، نمونه خاکهایی از مناطق مختلف آذربایجانشرقی جمع آوری و مطالعه شد .

مطالعات برروی خاک های مناطق مختلف نشان داد که مناطق بکر نظیر ارتفاعات وخاکهای دست نخورده که در آنها کشت و زرع نمی شود دارای پتانسیل جمعیتی بالا و در عین حال متنوعی از باکتری هاست که این موضوع با بررسی های Oskay وهمکاران به سال 2004 که درمناطق جنگلی وکشاورزی کشور ترکیه انجام شده بود مطابقت دارد(6).

غربالگری اولیه با روش همپوشانی صورت گرفت که یک متد بسیار مناسب برای بررسی فعالیت های آنتا گونیستی بین میکروارگانیسم هاست بطوری که با مقایسه داده های این مرحله با غربالگری ثانویه چنین به نظر می رسد نمونه هایی که در غربالگری اولیه خود را فعال نشان دادند، مانند ایزوله های D21 و I82 ، در مرحله استخراج متابولیت وبررسی آنها با میکروارگانیسم های آزمایشی غیر فعال بودند که دلیل آن عدم همجواری پاتوژن ها با این ایزوله ها واز بین رفتن فضای رقابتی میان آنهاست. به همین دلیل هم هیچ ماده محدود کننده ای از خود منتشر نمی کنند و برعکس این قضیه هم مشاهده شد برای مثال ایزوله های F51 و B33 در گزینش اولیه فعالیت قابل توجهی نداشتند اما در غربالگری ثانویه از جمله فعال ترین ایزوله ها بودند که توانستند هر چهار پاتوژن را با قدرت محدود کنند که این نتیجه با پیش بینی هایی که قبلا توسط Bushell و همکاران(1993) ارائه شده بود همخوانی دارد(11).

برای غربال گری ثانویه روش انتخابی ما، روش بهبود یافته انتشار از دیسک بود زیرا تست انتشار راهی معمول برای تشخیص فعالیت ضد باکتریایی در ایزوله هایی است که فعالیت مشخصی ندارند (7) در این روش ، انتشار خارجی آنتی بیوتیک از یک منبع به یک سطحی از محیط کشت جامد باعث ایجاد یک هاله بازدارنده رشد می شود، قطر این هاله متناسب با لگاریتم غلظت آنتی بیوتیک است(7). در هنگام استفاده ازاین روش به نکات ریزی مانند دما، pH ، غلظت نمک و غلظت اگار، باید توجه داشت تا نتیجه کاملی بدست آورد. pH از آن جهت مهم است که بعضی از مواد ضد باکتریایی در محیط اسیدی موثرند مانند نیتروفورانتوئین و برعکس موادی مانند آمینوگلیکوزیدها در محیط های قلیایی اثر خوبی دارند، همچنین باتوجه به این که محیط کشت جامد، ژله مانند بوده و دارای منافذی است که مواد ضد باکتریایی در هنگام انتشار از این منافذ عبور میکنند لذا هر چه وزن مولکولی مواد منتقله از دیسک، کم تر باشد به همان نسبت به فاصله دورتری منتشر شده وقطر هاله عدم رشد بزرگتر میشود(7). اگرچه اندازه هاله به تنهایی تعیین کننده قدرت اثر ماده ضد باکتریایی استحصال شده ویا حساسیت میکروب مورد آزمایش نیست(9)، اما با توجه به داده های جدول 2 به نظر می رسد که پاتوژن های *B.cereus* و *S. aureus* بیش از دیگرپاتوژن ها محدود شده اند که این مطلب یافته های Scherrerو Gerhardt در سال 1971 را تایید می کند که باکتری های گرم مثبت در مقابل متابولیت های تولیدی آکتینومیست ها حساسیت بیشتری دارند که دلیل آن شاید عدم وجودلیپیدهای سرشار دردیواره سلولی از جمله لیپو پلی ساکارید در این باکتری هاست(11).

www.SID.ir

Archive of SID

از مقایسه نتایج جدول 2 این نکته حاصل می شود کـه از بین حلال هایی که برای استخراج متابولیـت هـا اسـتفاده شد حلال غیـر قطبـی اتیـل اسـتات و قطبـی آب بسـیار مناسب است که احتمالا اولی متابولیت هـای غیـر قطبـی ودومی متابولیـت هـای قطبـی را از محـیط کشـت(مـایع رویی) بیرون می کشد.

در زمینـه شناسـایی استرپتومایسـس هـا از روش هـای مولکولی نظیر هیبریداسیون DNA-DNA ،بـرش آنزیمـی DNA کامل باکتری،RAP D-PCR و مقایسه توالی هـای ژنDNA16Sr استفاده میشودکه در بین روش های فـوق استفاده از ژن به دلیل دقت بالا در سالهای اخیرمعمـولتر اسـت (3)کـه مسـتندترین مـورد در سـال1991 توسـط Stackebrandt و همکـاران گـزارش شـد کـه بـرای تقسیم بندی اکتینومیست ها از این ژن بهـره جسـت کـه توسـط روش هـای دیگـر طبقـه بنـدی از جملـه تسـت بیوشیمیایی وتاکسونومی عددی هم حمایت شد(6).

دلیل برتری ژن 16SrDNA از آن جهت است که در طول تکامل، کمترین جهش وتغییر را بـه خـود دیـده اسـت از طرفـی پـنج ناحیـه α , β , γ , δ و ε در تـرادف نوکلئوتیدی آن مشـخص شـده کـه از تنـوع کـافی بـرای شناسایی اکتینومیست ها برخوردار است. بـویژه ناحیـه γ کـه بـرای رده بنـدی در سـطح سـویه پیشـنهاد شـده است(3و6و10) اهمیت منطقه γ در بین نـواحی فـوق بـه این دلیـل اسـت کـه بـه انتهـای ´5 نزدیکتـر اسـت (از نوکلئوتید(203 - 158) که این مسئله باعث می شـود در هنگام توالی یابی بطور کامل خوانده شود لذا می تـوان بـا در دست داشتن ترادف نوکلئوتیدی آن، ایزوله مورد نظر را با دقت بالایی شناسایی وثبت کرد (3).

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان می دهد که ایزوله های جدیـدی در نمونه خاک های استان آذربایجان شرقی وجود دارد که توانایی تولید مواد ضد باکتریایی جدیدی دارند.

References

1- Shantikumar L, Bora TC. Actinomycetes of Loktak habitat: isolation and screening for antimicrobial activities. *Biotech* 2006; 5(2): 217-221.

2- Bredhold H, Fjaervik E, Zotchev B. Actinomycetes from sediments the trondheim Fjord،Norway: Diversity and Biological Activity.*Mar Dru* 2008;6(1): 12-24.

3- Anderson AS,Wellington MH. The taxonomy of Streptomyces and related genera.Int *Sys and Evo Mic* 2001; 51:797-814.

4- Oskay M, Usame Tamer A, Azeri C. Antibacterial activity of some Actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *Africa Jou biotech* 2004;3(9):441-446.

5- Basilio A, Gonzalez I, Vicente MF, Gorrochategui J, Cabello A. Patterns of antimicrobial activities from soil Actinomycetes genilloud. *App Mic* 2003;95(4):814-823.

6- Stackebrandt E, Liesack W, Webb R, Wett D. Towards a molecular identification of Streptomyces species in pure culture and in environmental samples. *Actino* 1991; 5:38-44.

7-Salami F. Isolation and determination of Streptomyces that produce antibiotic from soil Pajohesh-ve-Sazandegi 2004;64:41-74.

8- Rabbani M, Mir Mohammad Sadeghi H,Karjoo Z. Molecular detection of Streptomyces griseus isolated from Isfahan Soil. *Pak Jou Bio Scie* 2007; 10(19):3374-3379.

9- Shirling E.B, Gottlieb D. Cooperative description of type cultures of Streptomyces. II. Species descriptions from first study. *Int J Syst Bac* 1968; 18: 69-189.

10- Kreuze F, Suomalainen S, Paulin L, Valkonen P.T. Phylogenetic analysis of 16S rRNA genes and PCR analysis of the nec1 gene from Streptomyces spp. *Phito* 1999;89(6):462-469.

11- Pandey B, Ghimire P, Agrawal VP. Studies on the antibacterial activity of the Actinomycetes isolated from the Khumbu Region of Nepal 2002.

www.SID.ir