تحقیقی

اثرات ضد قارچی استرپتومایسس های خاکزی جدا شده از استان گلستان

سید مسعود هاشمی
دکتری قارچ شناسی، دانشگاه آزاد واحد تنکابن

آیت الله نصرالهی عمران
دکتری قارچ شناسی ، دانشگاه آزاد واحد تنکابن

حمیدرضا پردلی
دانشجو دکتری قارچ شناسی، دانشگاه آزاد واحد گرگان

اعظم حسینیان
دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی ، دانشگاه آزاد واحد تنکابن

نویسنده مسئول: اعظم حسینیان

تلفن :09111755505
پست الکترونیک:
azam_hoseiniyan72@yahoo.com
آدرس :دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن گروه میکروب شناسی

وصول مقاله: 90/3/17
اصلاح نهایی: 90/5/10
پذیرش مقاله:90/5/23

چکیده

زمینه و هدف: *استرپتومیسس از مهمترین جنسها در خانواده اکتینومیستها می باشد و کاربرد وسیعی در صنایع مختلف و تولید آنتی بیوتیک دارد .هدف از این تحقیق جدا سازی استرپتومیسس های خاکزی تولید کننده آنتی بیوتیک از خاک استان گلستان در شمال ایران و بررسی پتانسیل تولید متابولیتهای ضد قارچی توسط این ارگانیسمها می باشد.*

روش بررسی: *نمونه های خاک از عمق 6-10 سانتی متری در منطقه جنگلی ناهار خوران گرگان ،ارتفاعات درازنو کردکوی، مناطق بیابانی آق قلا و زمینهای کشاورزی علی آباد در استان گلستان جمع آوری شدند ودر محیط های اکتینومایست ایزولاسیون آگار و نشاسته کازئین آگار کشت داده شدند وتوسط روشهای مورفولوژیکی و بیوشیمیایی شناسایی و جداسازی وخالص شدند. بررسی فعالیت ضد قارچی استرپتومیسس ها ی جدا شده علیه قارچهای کاندیدا آلبیکنس ،آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس فلاووس و مالاسزیا فور فور با استفاده از روش انتشار درآگار بررسی شد. برای دو ایزوله که بهترین اثر ضد قارچی را داشتند PCR با استفاده از پرایمر 16S rRNA انجام و با تعیین توالی شناسائی گردید.*

یافته‌ها: *از بین 120 نمونه مورد مطالعه 24 مورد استرپتومیسس (20%) شناسایی و جداسازی شد. فراوانی آن در منطقه بیابانی آق قلا ، درازنو کردکوی ، جنگل ناهار خوران و زمین های علی آباد به ترتیب 10 (41,6%) ، 8 (33,3%)، 4 (16,6%) و 2 (8,3%)مورد بوده است. از بین 24 ایزوله استرپتومیسس جداشده 2 ایزوله دارای اثرات ضد قارچی قوی و 4 ایزوله اثر متوسطی داشته است .همچنین ما دریافتیم استرپتومیسس های جدا شده از مناطق بیابانی دارای فعالیت ضد قارچی بیشتری بودند.*

نتیجه گیری *شناسائی وخالص سازی مواد ضد قارچی دو ایزوله استرپتومیسس برای مطالعات آینده پیشنهاد می ثگردد.*

واژه های کلیدی: *استرپتومایسس – فعالیت ضد قارچی- آنتی بیوتیک*

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

اکتینومیست ها حدود40 % از جمعیت باکتریایی را در محیط های خاکی تشکیل می دهند(2 و1).اکتینومیست ها مخصوصا استرپتومیسس ها دارای پتانسیل بالایی در تولید متابولیت های ثانویه مثل آنتی بیوتیک ها –آنزیم ها - مواد علف کش -مواد ضد سرطان و دیگر ترکیبات مفید می باشند که نقش مهمی در بیوکنترل و تثبیت نیتروژن درخاک ایفا می کنند(3).

استرپتومیسس ها باکتریهای گرم مثبت با نسبت مولارG+C . بالا می باشند. میسلیوم هوایی مستقیم یا پیچیده (به فرم های خمیده یا فنر مانند ویا اسپریال) تولید می نمایند.زنجیره اسپور ها یا آزاددند ویا توسط یک غلاف هیدروفوب احاطه شده اند (4).

امروزه شمار بیمارانی که از بیماریهای قارچی رنج می برند رو به افزایش است. قارچهانیز ماهیت یوکاریوتی دارند , بنابراین بدست آوردن داروهای ضد قارچی با سمیت انتخابی بر میزبان آسان نیست.(7)اغلب داروهای ضد قارچی مورد استفاده در پزشکی هم دارای اثرات جانبی هستندو شمار زیادی از موادضد قارچی از میکروارگانیسم ها بدست آمده اند که دارای اثرات سمی برای انسان هستند .امروزه فقط تعداد کمی از داروهای ضد قارچی مورد استفاده اند که اغلب از گونه های اکتینومایست بویژه جنس استرپتومیسس استخراج شده اند (7) که مهمترین آنها نیستاتین ,آمفوتریپسین ب وپیمارسین می باشد (6) . فقط تا سال 1984 حدود 3477 آنتی بیوتیک که توسط استرپتومایسس ها تولید شدند گزارش شده است(2). استرپتومیسسها گذشته از تولید آنتی بیوتیک قادر به تولید بیش از 70% مواد اولیه مورد نیاز صنعت داروسازی هستند(9) و از نظر تولید فراورده های بیولوژیک(قارچ کش ها , حشره کش ها , علف کشها و ...) که متابولیتهای ثانویه این میکروارگانیسم ها محسوب می شو ند از اهمیت خاصی برخوردارند (10). هنوز هم مطالعات برای بدست آوردن آنتی بیوتیک های جدید از استرپتومیسس ها با اثرات بهتر وسمیت کمتر بر میزبان ادامه دارد و نیاز دست یابی به این مواد احساس می شود(11).

دراین مطالعه به شناسایی استرپتومیسس های خاکزی توسط خصوصیات مورفولوژیکی , بررسی های میکروسکوپی و تست های بیوشیمیایی پرداخته وسپس فعالیت ضد قارچی باکتریهای بدست آمده را مورد بررسی قرارگرفت.

روش بررسی

الف) 120 نمونه خاک از مناطق مختلف استان گلستان شامل : شهرستان آق قلا(روستای عطا آباد – زمینهای حومه) کردکوی (منطقه درازنو) گرگان (زیارت – ناهار خوران) علی آباد(زمینهای کشاورزی- منطقه کبود وال) در سال 90-89 جمع آوری شده و به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان منتقل شدند .

ب) روش نمونه برداری

نمونه های خاک توسط یک قاشق چوبی استریل ومحکم از لایه سطحی خاک زمینهای حاصلخیز و بیابانی نواحی مختلف استان گلستان و از عمق 10-6 سانتی متر مناطق ریزوسفری و غیر ریزوسفری به میزان 100 تا 200 گرم جمع آوری شدند و داخل کیسه های نایلونی پلی اتیلن استریل ریخته ودرب آنرا محکم بسته و به آزمایشگاه منتقل شدند. مشخصات منطقه نمونه برداری، موقعیت و زمان نمونه برداری ثبت شد.سپس با مراجعه به مرکز تحقیقات خاکشناسی استان گلستان ویژگیهای خاکهای مورد مطالعه مشخص و ثبت گردید .

غربالگری و ایزولاسیون اکتینومیست ها از نمونه های خاک

نمونه های خاک جمع آوری شده از نواحی مختلف در دمای اتاق بمدت 4 روز خشک شدند(12).از نمونه های خاک ورقت 10^{-2} در سرم فیزیولوژی تهیه شد و نمونه ها بمدت 1 ساعت در بن ماری $55^{o}\ ^{c}$ قرار گرفتند تا اسپورها از فرم رویشی جدا شوند .سپس از سوسپانسیون رویی باکتری روی محیط اکتینومایست ایزولاسیون آگار و Starch casein KNO3 Agar کشت تهیه شد و در 28درجه سانتیگراد بمدت 4 روز انکوبه شدند (13).

مشاهدات مورفولوژی

1.**مشاهدات ماکروسکوپی**: کلنی ها پس از 7 تا 10 روزه نمایان شدند.مدت رشد، رنگ پشت ورنگ روی کلنی، سطح

Archive of SID

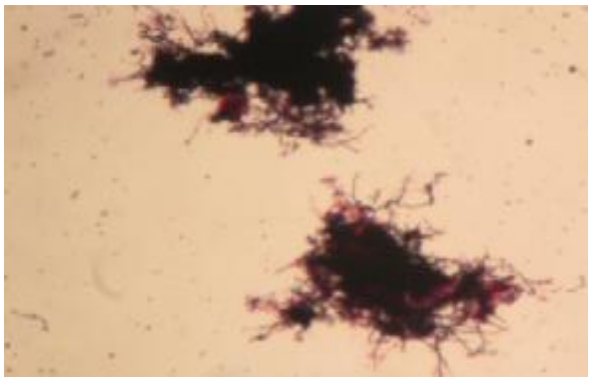
www.SID.ir

کلنی , شکل میکروسکوپی میسلیوم های هوایی (14) ودیگر خصوصیات کلنی ها بررسی شد. کلنی ها ظاهری شبیه گچ خشک شده داشته و دارای رنگهای متفاوت بودند(شکل 1). سطح تمام کلنی های استرپتومیسس پوشیده از میسلیوم های هوایی بود که یک منظره کرک مانند در سطح کلنی ایجاد می نمود.

شکل 1 : رنگ کلنیهای استرپتومایسس سویه 14

.مشاهدات میکروسکوپی

مطالعات میکرومورفولوژی کلنی ها پس از گذشت 7 تا 10 روز از کشت استرپتومیسسها بررسی شد. به منظور بررسی میسلیوم هوائی وزنجیره اسپورها رنگ آمیزی گرم از کلنی های رشد یافته روی محیط استارچ کازئین انجام شدونتایج رنگ آمیزی و بررسی میسلیوم هوایی و سوبسترایی زیر میکروسکوپ نوری در ×40 و ×100 مشاهده و ثبت شد (شکل2) .



شکل 2: تصویر میکروسکوپی میسلیوم های استرپتومایسس(انتهای اسپریال میسلیومها)

تست های بیوشیمیایی

به کمک تست های بیوشیمیایی مثل تولید پیگمان، هیدرولیز کازئین، نشاسته، ژلاتین ، تولید هیدروژن سولفوره، تست کاتالاز و بررسی خصوصیات ماکروسکوپی و میکروسکوپی , کلنی های استرپتومیسس در حد جنس شناسائی شد(15 و 16) و نمونه ها ی بدست آمده خالص شدند

پ- بررسی اثر ضد قارچی ایزوله ها

میزان فعالیت ضد قارچی استرپتومیسس علیه 4 سویه قارچی پاتوژن مورد مطالعه قرار گرفت. در این آزمایش اثر آنتاگونیسمی این ایزوله ها علیه قارچهای پاتوژن استاندارد : *Candida albicance* (ATCC 10231) , (ATCC 9029) *Aspergilus niger* , *Aspergilus flavus* (IR 6) و *Malassezia fur fur sp.* تهیه شده ازمرکز کلکسیون قارچها و باکتریهای صنعتی ایران مورد ارزیابی قرار گرفت (WWW.IROST.IR). این قارچ ها بصورت آمپول لیوفلیزه تهیه وروی محیط توصیه شده از سمت مرکز احیا گردید.

تهیه سوسپانسیون باکتریایی

به ایزوله ها اجازه داده شد بمدت 4-3 روز روی محیط کازئین نیترات نشاسته آگار رشد نمایند.سپس یک تک کلنی از هر سویه را در داخل فلاسک ارلن مایر 250 ml حاوی 50-40 میلی لیتر ازمحیط مایع YME که شامل :{3 گرم / Yest extrsct 3 گرم Malt extract / گلوکز 10 گرم /پپتون 5 گرم ($g \cdot l^{-1}$)} بود تلقیح شد . سپس ارلن های حاوی محیط مایع تلقیح شده با استرپتومایسس را روی یک انکوباتور Sheaker با دور 150rpm و در 28 درجه برای مدت 6 روز کامل (144 ساعت) قرار گرفت تا در این مدت رشد کرده و به فاز تولید آنتی بیوتیک برسند. پس از گذشت این مدت همه سویه ها در این محیط رشد کردند و کدورت حاصل شد. کدورت معادل نیم مک فارلند تهیه شد سپس توسط سانتریفیکاسیون 5000 rpm در 10 دقیقه کشت مایع از میسلیوم ها جدا شد. سپس از سوپرناتانت بدست آمده برای فعالیت ضد قارچی سویه ها استفاده نمودیم (13).

به منظور بررسی اثرات آنتاگونیسمی و تولید آنتی بیوتیک حاصل از استرپتومیسس های خالص شده بر علیه قارچ ها ی

Archive of SID

www.SID.ir

مورد آزمایش به سه روش کشت انجام شد که عبارتند از :

الف : کشت خطی

در گوشه ای از پلیت 1 60 از سوپرناتانت استرپتومیسس های خالص شده را به طور خطی کشت داده و سپس عمود بر این خط و نزدیک به آن سویه قارچی انتخاب شده بطور خطی کشت داده شد و پس از انکوباسیون بمدت 3روز در 28 درجه فاصله بین خط کشت استرپتومیسس و سویه قارچی بررسی شد.

ب : روش کشت نقطه ای

در این روش یک کلنی استرپتومیسس را روی محیط استارچ کازئین آگاربه صورت نقطه ای تلقیح میکنیم وبمدت 4 روز در 28 درجه انکوبه می کنیم تا رشد کند. سپس سوسپانسیون قارچی را روی آن پخش میکنیم و در 28 درجه انکوبه شد.پس از 3 روز انکوباسیون در 28 درجه هاله های عدم رشد نمایان شد.

ج : روش دیسک گذاری

در این روش دیسک های کاغذی(6,4 میلیمتری) استریل آغشته به 1 60 سوسپانسیون استرپتومیسس ها را روی سطح محیطی که توسط یک لایه نازک قارچی پوشیده شده قرار دادیم . بمنظور ثبت و اندازه گیری قطر دقیق هاله های عدم رشد از روش دیسک گذاری استفاده شد. دیسک ها درمرکز روی محیط PDA حاوی سوسپانسیون قارچی قرار گرفتند . پلیت ها در 28^0 بمدت 3 روز انکوبه شدند.پس از این مدت هاله عدم رشد اندازه گیری شد (هاله های عدم رشد بیش از10میلیمتر ثبت شد). در تمامی این سه روش از محیط های اکتینومایست ایزولاسیون اگار- استارچ کازئین نیترات پتاسیم آگار و PDA استفاده شد (17 و 18) .

آنالیز ژنتیکی PCR

دو سویه فعال 12 و 14 بدلیل اثرات ضد قارچی مناسب نسبت به سایر سویه های بدست آمده در این مطالعه مورد شناسائی ملکولی قرار گرفتند. پس از انجام CR , 45µl از محصولات نهائی PCR به همراه پرایمر فوروارد برای تعیین توالی جهت شناسائی ملکولی بر اساس 16SrDNA به شرکت ماکروژن کره جنوبی (www.macrogen.com) ارسال شدند .

شناسائی ملکولی

سکانس های حاصل از تعیین توالی با استفاده از نرم افزار Blast با توالی های موجود در بانک ژنی مرکز ملی بیوتکنولوژی (www.ncbi.nlm.nih.gov) مقایسه شدند . این کار جهت شناسائی ایزوله ها به روش ملکولی و با استفاده از توالی 16SrDNAموجود در سطح جنس و گونه انجام گرفت (شکل 3).

یافته ها

در این مطالعه از هر منطقه 30 نمونه مورد بررسی قرار گرفت. از بین 120 نمونه مورد مطالعه 24 مورد استرپتومیسس(20%) شناسایی و جداسازی شد. بیشترین استرپتومیسس جدا شده به ترتیب مربوط به مناطق بیابانی آق قلا (10 مورد 33,3%)، ارتفاعات درازنودر کردکوی (8مورد 26,6%)، منطقه ناهارخوران گرگان(4 مورد 13,3%) و دشت علی آباد(در2 مورد6,66%) می باشد(جدول 1).

آنالیز آماری spss (Anova) نشان می دهد بین تعداد استرپتومیسس ها و میزان شوری خاک استان تفاوت معنی داری وجود دارد(PValue < 0.05).

از بین 24 ایزوله استرپتومیسس تست شده 6 استرپتومیسس قادر به تولید آنتی بیوتیک بودند و هاله ممانعت از رشد علیه هر 4 قارچ مورد بررسی ایجاد کردند و از بین آنها فعالیت آنتی بیوتیکی 2 ایزوله 12 و 14 بیش از سایر ایزوله ها بود. این ایزوله ها برای شناسائی قطعی انتخاب گردیدند.جداول 2و3

این ایزوله ها برای شناسائی قطعی انتخاب گردیدند.جداول 2و3 اثر مهاری آنها بر قارچ های مورد بررسی، ویژگی های محل جداسازی و خواص بیوشیمائی آنها را نشان میدهد. در جدول 2 فعالیت آنتی بیوتیکی این 2 سویه مهم نشان داده شده است . همچنین در جدول 4 خصوصیات بیوشیمیایی سویه های مولد آنتی بیوتیک بررسی شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول1: توزیع فراوانی ایزولاسیون استرپتومیسس از خاک مناطق مختلف استان گلستان در سال 90-1389

محل نمونه برداری	تعداد کل نمونه های خاک	تعداد نمونه های مثبت	درصد فراوانی	میـــــــزان شوری ds/m
منطقه بیابانی آق قلا	30	10	%33,33	9/5
درازنو کردکوی	30	8	% 26,6	1
ناهارخوران گرگان	30	4	%13,3	1
دشت علی آباد	30	2	% 6,66	0/5
مجموع	120	24	%20	

جدول2 : اثر مهاری ایزوله های منتخب استرپتومایسس بر روی قارچ های مورد مطالعه

	سویه های قارچی استاندارد			
سویه های منتخب استرپتومایسس	کاندیدا آلبیکنس 10231ATCC:	آسپرژیلوس نایجر 9092ATCC:	آسپرژیلوس فلاووس ATCC: IR6	مالاسزیا فور فور *Spp.*
12	14	21	11	4
14	16	12/5	10	3

جدول 3:ویژگی خاکهای محل جداسازی ایزوله های استرپتومایسس با بهترین اثر ضد قارچی

شماره نمونه و محل جداسازی	درصد رس	درصد آهک	کربن آلی%	PH	درصد شوری%
12- آق قلا	14	12,5	1/6	7/5	9/4
14 - آ ق قلا	14	12,8	1/7	7/5	9/5

Archive of SID

www.SID.ir

جدول4: ویژگی های بیوشیمیائی ایزوله های استرپتومایسس منتخب تولید کننده آنتی بیوتیک

ویژگیهای بیوشیمیایی	14	12
تست کاتالاز	+	+
هیدرولیز نشاسته	+	+
هیدرولیز کازیین	+	+
تولید اندول	-	-
هیدرولیز ژلاتین	+	+
تولید H_2S	-	-
تولید پیگمان	+	-
اوره آز	-	+
SIM	-	-
رشد در 28 درجه سانتیگراد	+	+
رشد در 37 درجه سانتیگراد	-	+
رشد در 50 درجه سانتیگراد	-	-
رنگ روی کلنی	قرمز	گل بهی
(روی محیط استارچ کازئین نیترات پتاسیم آگار)		
رنگ پشت کلنی	قرمز	کرم
رنگ میسلیوم هوائی	خاکستری	سفید
شکل انشعابات میکروسکوپی میسلیومها	خطی	خطی
رنگ توده اسپور پس از 14روز	سفید	یشمی
رشد در نمک 6,5 %	+	+

در بلاست محصول PCRژن 16S rRNA ایزوله شماره 12و 14 با سویه استاندارد استرپتومیسس در NCBI میزان تشابه به ترتیب 100% و 99% می باشد (جدول 5).

جدول 5 : نتایج شناسائی ملکولی در سطح جنس و گونه

نمونه ارسالی	باکتری مرجع در NCBI	درصد همولوژی	شناسایی ملکولی نهایی	سطح شناسایی
	HQ438283.1 Streptomyces sp.YSEE-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		Streptomyces	جنس
12		100%	*Streptomyces sp.YSEE-1*	گونه
14	GU045528.1 Streptomyces sp. SXY37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99 %	*Streptomyces sp.* . SXY37	گونه

Archive of SID

www.SID.ir

شکل ۳ : آنالیز ژنی سویه ها

الف) سویه 12

```
>gb|HQ438283.1|  Streptomyces sp. YSEE-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=334

 Score =  466 bits (252),  Expect = 3e-128
 Identities = 252/252 (100%), Gaps = 0/252 (0%)
 Strand=Plus/Plus

      Query  1    ATGAGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGG  60
                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
      Sbjct  41   ATGAGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGG  100

      Query  61   GGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGC  120
                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
      Sbjct  101  GGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGC  160

      Query  121  GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACAC  180
                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
      Sbjct  161  GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACAC  220

      Query  181  CCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTCGAAGGTGGGACTGGCGATTG  240
                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
      Sbjct  221  CCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTCGAAGGTGGGACTGGCGATTG  280

      Query  241  GGACGAAGTCGT  252
                  ||||||||||||
      Sbjct  281  GGACGAAGTCGT  292
```

ب) سویه 14

>gb|GU045528.1| Streptomyces sp. SXY37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1524
Score = 507 bits (274), Expect = 2e-140
Identities = 281/284 (99%), Gaps = 1/284 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 1     ACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTC      60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1239  ACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTC      1298

Query 61    GACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTT      120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1299  GACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTT      1358

Query 121   CCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTG      180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1359  CCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTG      1418

Query 181   GCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTCGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGT      240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1419  GCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTCGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGT      1478

Query 241   AACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGTTGGAAGCACCTCCTT      284
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1479  AACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGAT-CACCTCCTT      1521
```

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

بررسی های اخیر حاکی از آنست که سیستمهای ژنتیکی هوشیار در سلولهای زنده میکروارگانیسمها قادر به برنامه ریزی در جهت مقابله با عوامل تهدید کننده حیات سلول هستند و بر این اساس گونه های مقاوم شناخته شده هر روز در حال ایجاد و گسترش اند. این موضوع می تواند بشر را در آستانه ورود به یک فاجعه پزشکی قرار دهد و چه بسا یک عفونت کوچک بدلیل نبودن داروهای موثر تبدیل به بیماری مرگباری شود.

از سوی دیگر هنوز تعدادی از بیماری های قارچی – باکتریای –ویروسی و انگلی وجود دارد که داروی موثر بر علیه آنها شناخته نشده است.از این رو حتی در آغاز قرن 21 با آنکه عصر طلایی آنتی بیوتیک ها سپری شده است اما هنوز متابولیسم ثانویه میکروبی زمینه مناسبی برای تحقیقات کاربردی بشمار می رود و در این میان کشف و توسعه عوامل ضد قارچی جدید از بین متابولیتهای ثانویه جایگاه خود را حفظ کرده است.

از بین موجودات زنده میکروارگانیسمها بطور عام و دسته استرپتومیستها بطور خاص از جهت اهمیتی که در تولید آنتی بیوتیکها دارند همواره مورد توجه بوده اند وبرخی تولید آنتی بیوتیک بوسیله این میکروارگانیسمها را مهمترین ویژگی آنها می دانند که رابطه تنگاتنگی با اسپورولاسیون داشته و مکانیسمی برای مهار رشد سایر میکروارگانیسمها در رقابت کسب مواد مغذی محیط بشمار می رود.از این رو در بین مطالعات هدفداری که برای یافتن میکروارگانیسمهای تولید کننده عوامل ضد قارچی موثر بر علیه قارچهای بیماریزای استاندارد تهیه شده از مرکز پژوهشهای علمی و صنعتی ایران انجام شد 2 گونه **k** 12 و **j 14** بعنوان گونه های موفق در تولید مواد آنتی بیوتیکی موثر علیه سویه های پاتوژن قارچی (4سویه مورد آزمایش) از بین تعداد زیادی از میکروارگانیسمهای تولید کننده جدا و شناسایی گردید وپس از تعیین جنس و گونه جهت مطالعات بعدی نگهداری و ذخیره شد. هدف اصلی جداسازی استرپتومیسسها از خاک و بدست آوردن فراورده آنها در محیط مایع و غربال کردن استرپتومیسسهای تولید کننده آنتی بیوتیک بوده است.

روش انتخابی ما Difiossen agar بود . زیرا راه معمول در تشخیص فغالیت ضد میکروبی نمونه هائی که میزان فعالیت نمی باشد با کمک تست انتشار آگار انجام می شود (19) . روش انتشار یک روش فیزیکو شیمیائی است که در آن میکروارگانیسم بعنوان اندیکاتور غلظت ترکیب فعال بکار برده می شود(19). میزان قطر هاله در روش تلقیح نقطه ای استرپتومیسس بیشتر از روش دیسک گذاری نشان داده شد که می تواند بدلیل انتشار مستقیم ماده در آگار باشد ولی در دیسک های آغشته به سوسپانسیون بدلیل اینکه این سوسپانسیون علاوه بر ماده آنتی بیوتیکی حامل مقداری از محیط مایع نیز می باشد قطر هاله ایجاد شده کمتر گزارش می شود.

در مقایسه نتایج تحقیقات این مطالعه با تحقیقات قبل باید گفت در سال 2009 در ترکیه از بین 16 نمونه خاک ریزوسفری گیاهان داروئی مورد مطالعه27 استرپتومیسس ایزوله شد که 1 سویه فعالیت ضد قارچی علیه چند قارچ پاتوژن نشان داد که *استرپتومیسس سپکتابیلیس* معرفی شد(20).در سال 2009 در هند از بین 100 اکتینومایست مورد مطالعه جدا شده از محیطهای نمکی 3 ایزوله دارای فعالیت ضد درماتوفیتی بودند (21).در بانکوک سال 2008 از مطالعه 146 نمونه اکتینومیست 10 سویه فعالیت ضد قارچی علیه 3 قارچ پاتوژن داشتند(22). در سال 2002 در ترکیه از 46 نمونه خاک 74 مورد اکتینومایست بدست آمد 34 مورد فعالیت ضد قارچی مثبت داشتند (17).در مطالعه دیگری از 11نمونه خاک 15 استرپتومیسس متفاوت بدست آمد که12 سویه فعالیت ضد کاندیدائی نشان دادند (18). در ترکیه (2009) از بین 16 استرپتومیسس مورد مطالعه علیه چند قارچ فیلامنتوس انسانی و گیاهی نهایتا یک سویه بعنوان سویه فعال انتخاب گردید (23).

در اصفهان نیز در سال 1376 با مطالعه 800 نمونه خاک موفق به جدا سازی 153 نمونه اکتینومیست هوازی شدند (24).

Archive of SID

www.SID.ir

ما در این مطالعه مقطعی از بین 120 نمونه خاک مورد بررسی موبوط به نواحی مختلف گرگان موفق به جدا سازی 24 نمونه استرپتومیسس شدیم که 20 % از کل مجموع ایزوله هاست. این تعداد ایزوله استرپتومیسس جداشده از منطقه مورد مطالعه در بین مطالعات انجام شده دارای نتیجه بسیار خوبی بوده است . برای بررسی اثرات ضد قارچی از دو سویه قارچ مخمری و دو سویه قارچ فیلامنتوس استفاده شد.این اولین باریست که خاک منطقه گرگان به منظور بررسی اثرات ضد قارچی میکروارگانیسم های بومی خاک مانند اکتینومیست ها و مخصوصا استرپتومیسس مورد بررسی قرار گرفته است . تعداد استرپتومیسس های جدا شده در مقایسه با مطالعات مشابه کم نظیر است. همچنین از مجموع استرپتومیسس ها 6 نمونه دارای اثرات ضد قارچی مثبت بودند و در نهایت از بین این تعداد موفق به جداسازی 2 سویه بعنوان سویه های منتخب شدیم شناسائی نهائی جنس و گونه توسط شرکت ماکروژن کره انجام شد ونمونه ها برای ادامه تحقیقات ذخیره شد.

در مطالعات قبلی اغلب ایزوله هااسترپتومیسس از خاکهای ریزوسفری بدست آمده بودند در حالیکه ما در این مطالعه 33,33% از مجموع استرپتومیسسها را از مناطق غیر ریزوسفری و زمینهای بایردر منطقه آق قلاجدا نمودیم.درمقایسات دیگر دریافتیم اغلب ایزوله ها از خاکهای قلیائی با اسیدیته 9-7 جداشدند که ما نیز به نتایج مشابه ای رسیدیم.همچنین در یافتیم استرپتومیسسها را براحتی می توان از محیطهای نمکی با در صد نمک بین 7%-5 جدا نمود. هم چنین این مطالعه نشان می دهد استرپتومیسسها در محیطهای خشک و با درجه رطوبت متوسط فراوانترند.فراوانی استرپتومیسسهای بدست آمده در این پروژه نسبت به فراوانی استرپتومیسسهای بدست آمده دربرخی مطالعات بیشتر و در برخی کمتر است که می توان این امر را به عواملی مانند در صد بالای رطوبت خاک و اسیدیته بالای خاکهای کشاورزی منطقه که سطح وسیعی از استان را پوشش داده است مرتبط دانست . اما در مقایسه نتیجه نهایی بدست آمده در این بررسی نشان می دهد که از بین مجموع ایزوله های بدست آمده در صد قابل توجهی از استرپتومیسسها دارای اثر ضد قارچی بوده اند. 25 % از سویه های استرپتومایسس (6 مورد)دارای فعالیت ضد قارچی است که 8,3 %(2 مورد) به عنوان سویه های قوی و منتخب معرفی شدند. و این در حالیست که این نتایج نسبت به نتایج اعلام شده در مطالعات مشابه که برای بدست آوردن سویه های موثر ضد قارچی(3 تا 10 درصد) و برای معرفی سویه منتخب (1 تا 3 درصد)گزارش شده اند بالاتر می باشد .

به طور خلاصه باید گفت دراین پروژه تعیین حساسیت به روش انتشار روشی بود برای بدست آوردن سریع فعالیت و نمی تواند جهت بدست آوردن اندازه مطلق حساسیت قارچ و یا فعالیت آنتی بیوتیک استفاده شود.روش تعیین حساسیت با کمک پلیت می تواند 10-5 درصد خطا داشته باشد.روش های تعیین حساسیت روش های محدود به رشد می باشند و هر چیز موثر بر رشد بر روی میزان تولید آنتی بیوتیک نیز موثر است . هدف ما در این مطالعه شناسائی میکروارگانیسمها ی مولد آنتی بیوتیک ضد قارچی بود .بنابراین می توانیم در مطالعات بعدی با استخراج و خالص سازی و بهینه سازی شرایط تولید آنتی بیوتیکهای استرپتومیسسها ی ذخیره شده در این مطالعه نتایج بهتر و قویتری را شاهد باشیم.

Archive of SID

www.SID.ir

References

1-.Atlas. R . M and R. Bartha. *Microbial ecology (Fundamentals and application*).2nd edition. 1987;101 129.

2- David A. Hopwood. Handbook *STREPTO MYCES in Nature and Medicine* 2007.

3-Sanglier J J, Haag H, Huck TA ,Fehr T. *Novel bioactive compounds from actinomycetes*. A Short review.

(1988-1992);144:633-642.

4-Anderson A S ,Wellington E M. *The taxonomy of Streptomyces and related genera*.. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2001; 51:797–814..

5- Silver LL, Bostain KA. *Discovery and development of new antibiotics: The problem of antibiotic resistance*.Antimicrob.Agents Chemoter. 1966;37:377-383.

6- Shadzi SH.*The handbook Medical Mycology*. 2009.

7- Zeyini F. *The handbook Medical Mycology*.1989.

8- Zolfaghari M. *The survey novel antibiotic agent recictance phatogenic* .Thesis (M.Sc) Islamic Azad University Ghom Branch. 1996.

9- Good fllow M, Cross T. *In the biology of the Actinomycetes* . Good fllow , M.;Mordarski , ST.; Williams eds.London academic .1983;42-56.

10- Brock TD, Madigan MT.*Biology of microorganisms.* 8th edition. 1997:16-29 ,413-33

11- Henckel T ,Zeeck A. *Secondary metabolites by chemical screening* . J Antibio.1991;44(6):665-669.

12-Numura H, Hayakakawa M. *New methods for the sekective isolation of soil actinomycetes*. Biology of actinomycetes, Japanese Scientific Socieyy Press, Tokyo. 1988; 88:288-293.

13- Krishna Kumari K, Ponmurugan P, Kannan N .*Isolation and characterization of streptomyces sp. From soil sample forsecondary metabolite production*.Biotecnology.2006;5(4):478-480.

14- Yun NR , Lee YN. *Identification of soil Streptomyces spp. Producing Antifungal Substance.* Department of Microbiology, Chungbuk National University. 1994;32(6),449-454.

15- Jayalakshmi T, Krishnamoorthy P, Rameshkumar G, Sivamani P . *Characterisation and Identification of Feather - Degrading Streptomyces sp From Chick Feather Wastes.* New York Science Journal. 2009;4(1).

16-Holt JG. *Bergey's determination bacteriology*. 1989;145-9.

17- Nurettin S. *Investigation of the Antimicrobial Activity of Some Streptomyces Isolates*. Turk J Biol 2002;27:79-84.

18- Ceylan O, Okmen G, Ugur A. *Isolation of soil Streptomyces as source antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria*. EurAsian Journal of BioSciences. 2008;2: 73-82 .

19-Hewitt W.*Theory and application of microbiological assay*. Capter(4). 1988.

20- Khamna S. . *Antifungal activity of streptomyces spp. Isolated from rhzospher of Thai medicine plants*.A jurnal for biology beyond border. 2009

21- Deepika T. *Lakshmipathy and Krishnan Kannabiran. A Morphological, Biochemical and Biological Studies of Halophilic Streptomyces sp. Isolated from Saltpan Environment*. American Journal of Infectious Diseases. 2009;5 (3): 200-206.

22-Prapagdee B , Kuekulvong Ch, Mongkolsuk S . *Antifungal Potential of Extracellular Metabolites Produced by Streptomyces hygroscopicus against Phytopathogenic Fungi*. Int J Biol Sci .Ivyspring International Publisher. 2008; 4:330-337

23- Oskay M .*Antifungal and antibacterial compounds from Streptomyces strains*. African Journal of Biotechnology . 2009;8 (13):3007-3017.

24- Emami M , Babaii GH , kachuii R ,Geramishear M. *Isolation and Identification Aerobic Actinomycetes from Isfehan*.1997

Archive of SID

www.SID.ir