Archive of SID

Original Article

Isolation, Molecular Identification, and Phylogenetic Analysis of Antimicrobial Agents Producing Actinomycetes in Farming Saline Soils of Qom City, (Iran)

Zahar Yosefi[1], *Seyed Soheil Aghaei*[1], *Abbas Morovvati*[1], *Mohammad Reza Zolfaghari*[1*]

[1]*Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.*

[*]***Corresponding Author:*** **Mohammad Reza Zolfaghari;** Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

Email: zolfaghary-mr@qom.iau.ac.ir

Received:14 Nov, 2018
Accepted: 2 Feb, 2019

Abstract

Background and Objectives: Actinomycetes are Gram-positive and filamentous bacteria that are the major microorganism in soil. According to studies, three quarters of all known antibiotics are produced by actinomycetes. The present study aimed to investigate actinomycetes in farming saline soils of different regions of Qom province in terms of antibacterial property.

Methods: In this experimental study, first, Actinomycetes were collected and isolated from farming saline soils of Qom province, then, primary screening was carried out using culture and secondary screening by agar diffusion method against pathogenic bacteria. For molecular identification, genomic DNA of all isolates was extracted, then their 16SrRNA gene was sequenced by PCR technique, replicated, and positive samples, were sequences and the obtained results were analyzed phylogenetically.

Results: In this study, out of 100 collected soil samples, 23 isolates of Actinomycetes were isolated. Also, in addition to microbiological tests, 10 samples were sequenced using the PCR method based on the 16 SrRNA, and the isolates were 100% and 99% similar to Streptomyces and Actinomycetes.

Conclusion: The results of this study revealed that new isolates exist in the soil sample of Qom province, which are able to produce new antibacterial agents and could be used in the field of industry.

Keywords: Actinomycetes; Soil; Polymerase Chain Reaction; Qom; Molecular detection; Phylogenetic analysis; Qom, Iran.

DOI: 10.29252/qums.13.3.63

www.SID.ir

International License Creative Commons Attribution License 4.0

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره سیزدهم، شماره سوم، خرداد ۹۸
صفحه ۶۳ الی ۷۳
Archive of SID

مقاله پژوهشی
(Original Article)

جداسازی، شناسایی مولکولی و آنالیز فیلوژنتیکی اکتینومیست‌های مولد مواد ضدمیکروبی علیه پاتوژن‌های بیماری‌زا از خاک‌های زراعی شور شهر قم

زهرا یوسفی[۱]، سید سهیل آقایی[۱]، عباس مروتی[۱]، محمدرضا ذوالفقاری[۱*]

چکیده

زمینه و هدف: اکتینومیست‌ها، باکتری‌های گرم مثبت و رشته‌ای هستند که بخش اعظم میکروارگانیسم‌های خاک را دربرمی‌گیرند. براساس مطالعات انجام‌شده، سه‌چهارم از کل آنتی‌بیوتیک‌های شناخته‌شده را اکتینومیست‌ها تولید می‌کنند. مطالعه حاضر با هدف بررسی اکتینومیست‌های مناطق مختلف استان قم از جهت خواص آنتی‌باکتریایی صورت گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه بنیادی، ابتدا اکتینومیست‌ها از خاک‌های زراعی شور استان قم جداسازی شدند، سپس غربالگری اولیه به روش کشت و غربالگری ثانویه با روش انتشار در آگار در برابر باکتری‌های بیماری‌زا انجام گرفت. جهت شناسایی مولکولی، DNA ژنومیک تمام جدایه‌ها استخراج شد، سپس ژن ۱۶SrRNA آن‌ها با تکنیک PCR، تکثیر و نمونه‌های مثبت سکانس شدند و نتایج حاصله، از نظر فیلوژنتیک بررسی گردید.

یافته‌ها: در این مطالعه از ۱۰۰ نمونه خاک جمع‌آوری‌شده، ۲۳ ایزوله اکتینومیست جدا شد. همچنین علاوه بر تست‌های میکروب‌شناسی، ۱۰ نمونه با استفاده از روش PCR براساس ژن ۱۶SrRNA توالی‌یابی شدند که ایزوله‌ها با میزان ۱۰۰ و ۹۹٪ به جنس استرپتومیست و اکتینومیست مشابهت داشتند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد ایزوله‌های جدیدی در نمونه خاک استان قم وجود دارد که توانایی تولید مواد آنتی‌باکتریایی جدید را دارند و می‌توان از آن‌ها در حوزه صنعت استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: اکتینومیست؛ خاک؛ واکنش زنجیره‌ای پلیمراز؛ بررسی مولکولی؛ آنالیز فیلوژنتیکی؛ قم، ایران.

[۱]گروه میکروب‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:
محمدرضا ذوالفقاری؛ گروه میکروب‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:
zolfaghary-mr@qom.iau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۷/۹/۲۳
تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۱۳

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Yosefi Z, Aghaei SS, Morovvati A, Zolfaghari MR. Isolation, molecular identification, and phylogenetic analysis of antimicrobial agents producing actinomycetes in farming saline soils of Qom City, (Iran). Qom Univ Med Sci J 2019;13(3):63-73. [Full Text in Persian]

www.SID.ir

International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

مقدمه

اکتینومیست‌ها، باکتری‌های گرم مثبت و رشته‌ای از گروه غالب جمعیت میکروبی خاک هستند که به‌صورت آزاد یا ساپروفیت در زیستگاه‌های اکولوژیک متفاوتی؛ ازجمله خاک، آب‌های گرم، رسوبات دریایی و غیره یافت می‌شوند و ازنظر رده‌بندی نیز دارای جنس‌های مهمی مانند میکرومونوسپورا، نوکاردیا و استرپتومایسس هستند که به دلیل بزرگی ژنوم، توانایی تولید انواعی از متابولیت‌های ثانویه مانند آنتی‌بیوتیک‌ها، آنزیم‌های صنعتی، مواد ضد توموری، متابولیت‌های غذایی و آفت‌کش‌ها را دارند. خاک منبع مهمی برای جداسازی اکتینومیست می‌باشد.

اکتینومیست‌ها اغلب موجوداتی هتروتروف و مزوفیل‌اند که در دمای ۳۰-۲۵ درجه سلسیوس رشد کرده و اکثراً به شرایط اسیدی حساس‌اند، همچنین ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی متنوعی داشته و دارای DNA با درصد بالای G+C (۷۵-۵۷٪) می‌باشند. این موجودات، گروه بزرگی از باسیل‌های گرم مثبت با تمایل در تشکیل زنجیره یا فیلامنت را تشکیل می‌دهند (۳). در این گروه از باکتری‌ها، دسته‌های بزرگی قرار دارند که ازنظر مورفولوژی، نیاز به اکسیژن، تشکیلات دیواره باکتری و توانایی تولید اسپور متفاوتند، اما به‌علت تشابهاتی که ازنظر مورفولوژی و بیماری‌زایی دارند، در کنار یکدیگر بررسی می‌شوند. ویژگی متشابهی که در تمامی اکتینومیست‌ها دیده می‌شود تمایل به تشکیل فیلامنت است، همچنین گاهی باسیل‌هایی که رشد می‌کنند ممکن است در هنگام تقسیم سلولی نتوانند از یکدیگر جدا شوند؛ بنابراین زنجیره‌های طویلی از سلول‌ها با قطری در حدود ۱ میکرون را ایجاد می‌کنند. این زنجیره ازنظر شکل ظاهری مشابه میسلیوم‌های قارچی است که به‌همین دلیل به آن میسلیا می‌گویند (۱-۲).

اکتینومیست‌ها کاربردهای زیادی دارند و نیمی از آنتی‌بیوتیک مصرفی و تولیدی جهان از استرپتومایسس‌ها به دست می‌آید. آنتی‌بیوتیک‌ها ازجمله مهم‌ترین متابولیت‌های ثانویه هستند که بیش از ۵۰٪ این داروها به‌وسیله اکتینومیست‌ها تولید می‌شود. ازلحاظ تاریخی نیز اکتینومیست‌ها منشأ بیشترین تعداد داروهای آنتی‌بیوتیکی جدید و مولکول‌هایی با کاربرد بسیار در زمینه‌های درمانی می‌باشند (۳-۱).

در حال حاضر، رایج‌ترین روش‌ها برای شناسایی و طبقه‌بندی این باکتری‌ها، استفاده از ویژگی‌های مورفولوژی، بیوشیمیایی، همچنین مقایسه توالی ژن‌های مختلف در آن‌ها می‌باشد، در بین ژن‌های مختلف به دلیل اینکه نواحی ۱۶SrRNA در طول تکامل باکتری‌ها بسیار محافظت‌شده هستند؛ به‌همین منظور برای شناسایی باکتری‌ها بسیار مناسب‌اند. براساس مطالعات، اکتینومیست‌ها جایگاه برجسته‌ای به‌منظور غربالگری جهت تولید مواد آنتی‌بیوتیکی، ضدسرطانی و متابولیت‌های غذایی و غیره دارند که سالانه ده‌ها ماده مفید در زمینه دارویی، کشاورزی، غذایی و صنعتی از این باکتری‌ها جداسازی و به بازار مصرف عرضه می‌شود (۴)؛ البته اولین قدم در راستای این امر مهم، جداسازی و شناسایی سویه‌های مستعد و فعال این گروه از باکتری‌ها می‌باشد. همچنین مطالعات داخلی در زمینه جداسازی و شناسایی اکتینومیست از مناطق مختلف انجام شده است. بررسی این منابع و داده‌ها نشان می‌دهد تاکنون پژوهش جامعی در این زمینه صورت نگرفته است. این مسئله زمانی بیشتر اهمیت پیدا می‌کند که بدانیم کشور دارای متنوع‌ترین اقلیم‌ها در بین کشورهای منطقه بوده که می‌توان سویه‌های اکتینومیست قدرتمندی در زمینه تولید متابولیت‌های ثانویه، به‌ویژه آنتی‌بیوتیک‌ها در آن شناسایی و جداسازی کرد (۴). بعضی از گونه‌ها در جریان رقابت خود با یکدیگر و به‌منظور محدود کردن رقبا و ادامه بقای خود، اقدام به تولید متابولیت‌های ثانویه می‌کنند. در حقیقت، بیشتر متابولیت‌های ثانویه دارای خاصیت ضدمیکروبی و دیگر عملکردهای مهاری مانند خاصیت ضد توموری، ضد قارچی و یا حتی در نقش علف‌کش هستند (۵). با توجه به اهمیت این موضوع، مطالعه حاضر با هدف جداسازی، شناسایی مولکولی و آنالیز فیلوژنتیکی اکتینومیست‌های مولد مواد ضدمیکروبی علیه پاتوژن‌های بیماری‌زا از خاک‌های زراعی شور شهر قم با استفاده از ژن ۱۶SrRNA انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه بنیادی، زمین‌های زراعی شور استان قم براساس نمونه‌گیری چندمرحله‌ای (Multistage Sampling)، به مناطق مختلف (شمال، جنوب، شرق، غرب، مرکز و حومه) تقسیم شدند و تعداد ۱۰۰ نمونه خاک جمع‌آوری شد؛ به این صورت که ابتدا لایه سطحی خاک کنار زده شد و از عمق ۱۵-۵ سانتی‌متری

www.SID.ir
International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

(به میزان ۵۰۰-۴۰۰ گرم) نمونه برداشته شد. نمونه‌های خاک بلافاصله درون پلاستیک‌های اتوکلاوشده قرار گرفتند و در زمانی کوتاه به آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم انتقال یافتند (۶). پس از جمع‌آوری نمونه‌ها، تیمار CaCo3 (مرک-آلمان) انجام گرفت و در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد به مدت ۵ روز گرماگذاری شدند. جهت جداسازی اکتینومیست‌ها از ۱۰ گرم نمونه خاک؛ ابتدا سوسپانسیون، سپس از هر نمونه رقت‌های سریالی تهیه شد. در ادامه، از هر رقت بر روی پلیت‌های محیط کشت

Inorganic Salt Starch Agar (ISP4)(مرک- آلمان) کشت داده و به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد انکوبه شدند (۷).

برای شناسایی کلنی‌های اکتینومیست با مشاهده پلیت‌ها، کلنی‌هایی با ظاهر پودری یا گچی و به رنگ‌های سفید، خاکستری، قرمز، زرد، آبی و بنفش انتخاب شدند، سپس رنگ‌آمیزی گرم از این کلنی‌ها انجام گرفت. میکروارگانیسم‌هایی که زیر میکروسکوپ دارای ویژگی‌های اکتینومیست (گرم مثبت وآرایش رشته‌ای) بودند به محیط کشت ISP2 (مرک-آلمان) منتقل شدند. فعالیت ضدمیکروبی جدایه‌ها علیه سویه‌های بیماری‌زا با روش دیسک‌گذاری صورت گرفت (۷). از سویه‌های استاندارد میکروبی بیماری‌زا شامل: *اشرشیاکلی* با شماره دسترسی ۸۹۳۷، *سودوموناس آئروژینوزا* با شماره دسترسی ۹۰۲۷، *استافیلوکوک اورئوس* با شماره ۶۵۳۸ و *کلبسیلا پنومونیا* با شماره ۱۳۸۳۳ استفاده شد.

جهت بررسی رنگ، کلنی بر روی محیط‌های ISP2,3,4,5 (مرک-آلمان) کشت داده شد و بعد از گرماگذاری ۷ روزه در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد، رنگ کلنی‌ها ثبت گردید. تمامی تست‌های مربوط به تولید پیگمان ملانین، استفاده از منابع کربن متفاوت، رشد در دماهای مختلف، هیدرولیز نشاسته، تجزیه توئین-۸۰، لیستیناز، اکسیداز، احیای نیترات، کاتالاز، H_2S، DNase برای تمامی جدایه‌ها انجام گرفت (۸). به‌منظور بررسی تولید ماده ضدمیکروبی، سویه‌های جداشده را بر روی محیط Hickey-trenser agar (مرک-آلمان) به‌صورت دایره‌ای کشت داده، سپس پلیت‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد، به مدت ۱۰ روز گرماگذاری شدند (۹).

بعد از جداسازی نمونه‌ها، تعداد ۲۳ جدایه با روش‌های میکروب‌شناسی جدا گردید که برای انجام تست مولکولی این نمونه‌ها، ابتدا کشت داده شدند. DNA با استفاده از کیت تخلیص DNP (شرکت سیناکلون-ایران) براساس دستور کیت استخراج گردید.

انجام واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل: ۱۸ میکرولیتر از مخلوط واکنش 1X، ۱ میکرولیتر از پرایمر

27Forward: 5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3'، ۱ میکرولیتر از پرایمر

1492Reverse: 5'-GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'

(توالی پرایمرهای مورداستفاده به‌صورت دژنره می‌باشند:

M: A/C, Y: C/T) (۱۰)، ۱ واحد از آنزیم Taq پلیمراز و ۵ میکرولیتر از DNA آماده براساس برنامه دمایی: ۹۵ درجه به مدت ۳ دقیقه،۹۴ درجه به مدت ۳ ثانیه، ۵۷ درجه به مدت ۳۵ ثانیه، ۷۲ درجه به مدت ۳۵ ثانیه با ۳۳ بار تکرار و درنهایت، ۷۲ درجه به‌مدت ۵ دقیقه انجام شد. (محصول PCR بایستی قطعه‌ای به طول ۱۵۰۰ جفت باز باشد.) در ادامه، نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۱٪ ران شدند.

بعد از خالص‌سازی برای تمامی نمونه‌های مثبت، میزان جذب نوری هریک از نمونه‌ها قرائت گردید، سپس محصول PCR به کمپانی Life BioScience انگلستان جهت تعیین توالی از طریق شرکت سیناکلون (با حجم حدود ۱۰ میکرولیتر و غلظت ۳۰ نانوگرم برمیکرولیتر) از هر نمونه ارسال گردید. نتایج با نرم‌افزار Finch TV نسخه 1.4.0 موردبررسی قرار گرفت. در ادامه، سکانس‌ها با یکدیگر هم‌ردیف‌سازی شدند، سپس برای مطالعه فیلوژنتیکی، تمامی سکانس‌های ثبت‌شده این ژن، از بانک اطلاعاتی NCBI دانلود و با نرم‌افزار Mega نسخه ۷ با فرمت Fast A بررسی شد. درخت ژنی (برای نمایش ارتباط ایزوله‌ها با یکدیگر) با استفاده از روش Neighbor-joining براساس مدل تعداد اختلاف نوکلئوتیدی به کمک نرم‌افزار Mega نسخه ۷ ترسیم گردید. ایزوله‌های دارای یک تیپ سکانس، در یک کلاستر قرار گرفتند و وجود حتی یک نوکلئوتید اختلاف، باعث قرارگیری ایزوله در کلاستر دیگر شد.

www.SID.ir
International License Creative Commons Attribution License 4.0

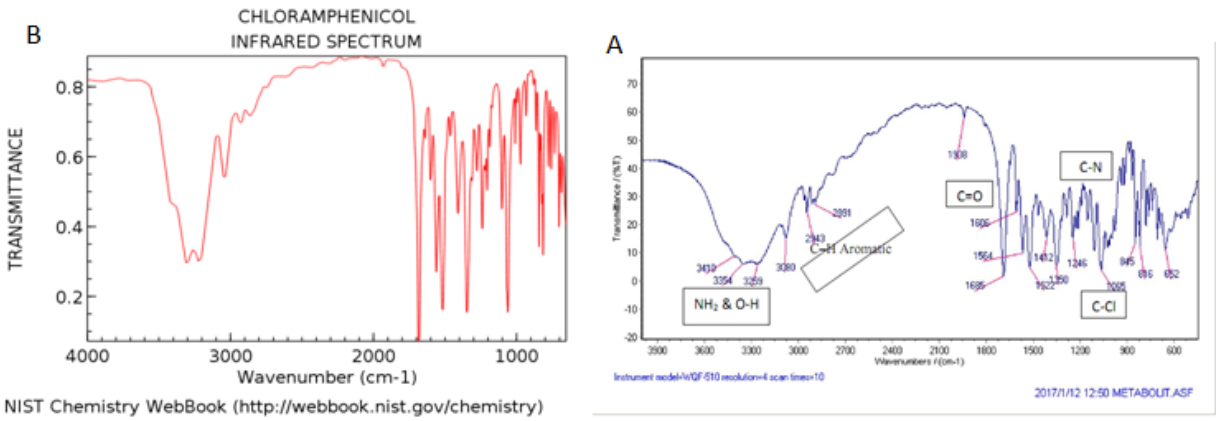
Archive of SID

برای شناسایی دقیق ماده متابولیت جداشده از اکتینومیست، روش HPLC، FTIR و اسپکتروفتومتر به کار برده شد؛ بدین ترتیب که ابتدا سوسپانسیون اسپوری از سویه موردنظر که بیشترین میزان مقاومت به سویه‌های بیماری‌زا را نشان داد تهیه گردید، سپس آن را به محیط مایع مناسب تلقیح کرده و ۱۰ روز در انکوباتور شیکردار (در دمای ۳۰ درجه و دور 200RPM) قرار گرفت. در مرحله بعد، مقداری از محیط مایع با دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و مایع رویی از فیلتر ۰/۲ میکرون عبور داده شد، سپس مقدار مساوی از مایع رویی و اتیل استات را در قیف دکانتور مخلوط کرده و فاز آلی جدا گردید. با استفاده از تیوسولفات سدیم، عمل آبگیری انجام گرفت و مایع حاصل از کاغذ صافی عبور داده شد که درنهایت، مایع به‌دست‌آمده جهت شناسایی به آزمایشگاه شیمی دانشگاه آزاد قم ارسال گردید (۱۲-۱۱).

یافته‌ها

در این مطالعه، تعداد ۱۰۰ نمونه از خاک‌های زراعی مناطق شور شهر قم و روستاهای مربوط جمع‌آوری شد که ۲۳ مورد مشکوک به گونه اکتینومیست بود و پس از انجام تست‌های مورفولوژی و بیوشیمیایی، ۱۰ مورد استرپتومایسس به دست آمد. نمونه‌های خاک از عمق ۳ الی ۱۰ سانتی‌متری برداشته شدند؛ بدین صورت که ابتدا ۳ سانتی‌متر از لایه سطحی خاک برداشته شد، سپس تا عمق ۱۰ سانتی‌متری از خاک نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها را به درون کیسه‌های زیپ‌دار استریل و ظروف پلاستیکی ریخته و به آزمایشگاه منتقل شدند.

۱۰ سویه استرپتومیست انتخاب‌شده از لحاظ تولید ماده ضدمیکروبی، روی محیط‌های ISP2 و ISP4 کشت داده شدند، سپس رنگ سطح و پشت کلنی‌ها بررسی گردید. از لحاظ شکل، کلنی‌ها به رنگ سفید و به‌صورت دایره‌ای با حاشیه‌ای نامنظم بودند. ظاهر کلنی‌ها به شکل پودری روی محیط کشت ISP4 مشاهده گردید. رنگ توده اسپوری کلنی‌های استرپتومیسس‌ها به رنگ‌های متنوع آبی، خاکستری، سبز، قرمز، بنفش، سفید، زرد و پشت کلنی‌های استرپتومیسس به رنگ‌های زرد، قهوه‌ای، آبی، سبز، قرمز، نارنجی و بنفش بود. برای بررسی فعالیت ضد میکروبی جدایه‌های موردنظر، از سویه‌های باکتریایی با شماره ATCC استفاده گردید. سویه S1 با ایجاد هاله عدم رشد مناسب، قدرت بیشتری جهت توقف رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (Methicillin-Resistant *Staphylococcus* aureus) از خود نشان داد؛ درصورتی‌که هاله عدم رشد ایجادشده توسط سایر سویه‌ها، برعلیه باکتری‌های نام‌برده مناسب نبود. جهت پی بردن به ساختار تقریبی متابولیت موجود در محیط، از طیف FT-IR استفاده شد. برای این منظور ابتدا طیف از متابولیت خشک‌شده در شرایط خلأ گرفته شد، سپس طبق نمودار A پیک ۲۹۴۳ مربوط به C-H اروماتیک، ۱۶۰۶ مربوط به C=O، ۱۰۶۴ مربوط به C-Cl به دست آمد و درنهایت، فرمول بسته شیمیایی ترکیب به‌صورت C11H12Cl2N2O5 ثبت گردید. مقایسه این داده با سایت جهانی NIST Chemistry طبق نمودار B، مطابقت متابولیت موردنظر را با داروی کلرامفنیکل بیان کرد.

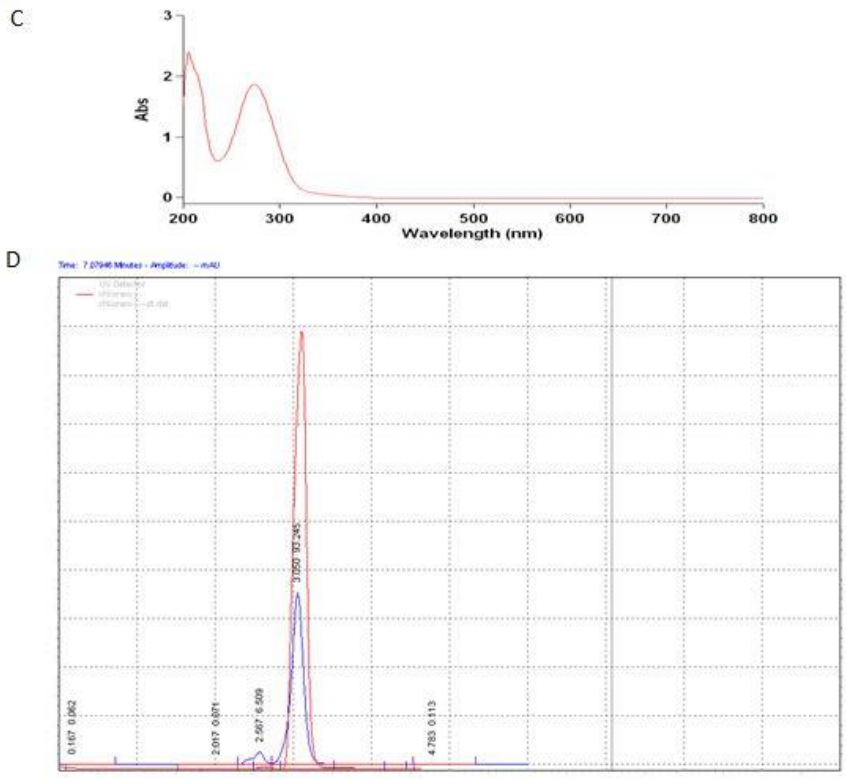


نمودار A-FT-IR متابولیت تولید شده، نمودار B - FT-IR از کلرامفنیکل استاندارد بر اساس سایت NIST

www.SID.ir
International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

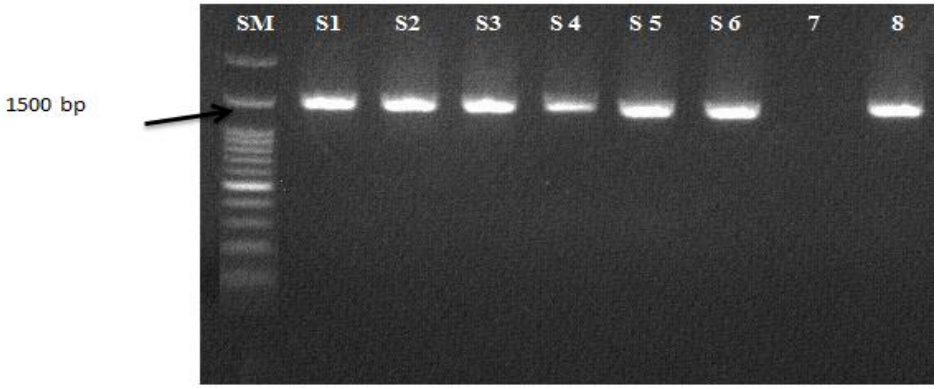
نتایج طیف اسپکتروفتومتری مرئی - فرابنفش از متابولیت با طول‌موج ماکزیمم جذب محلول حاوی متابولیت ۲۷۳ نانومتر به‌دست آمد (نمودار C). کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، (HPLC)، یکی از پرکاربردترین روش‌های کروماتوگرافی است. نمونه استاندارد کلرامفنیکل طبق نمودار D، با این دستگاه بررسی شد. سپس منحنی استاندارد با منحنی متابولیت تولیدشده نمودار D، حاصل از دستگاه HPLC موردارزیابی قرار گرفت و نتایج همخوانی این دو ثبت گردید.



نمودار C: طیف اسپکتروفتومتری از متابولیت

نمودار D: مقایسه کروماتوگرام استاندارد کلرامفنیکل با نمونه متابولیت است.

در ادامه، بر روی تمامی نمونه‌ها، استخراج DNA انجام شد و تکثیر توالی ژن ۱۶SrRNA توسط واکنش PCR بر روی آن‌ها صورت گرفت. نتایج الکتروفورز نمونه‌ها در ژل آگارز ۱٪ در واکنش PCR اولیه، باند ۱۴۹۸جفت بازی مربوط به تکثیر ژن موردنظر را نشان داد که از ۱۰۰ نمونه جمع‌آوری‌شده، ۲۰ نمونه مثبت و برای سکانس ارسال گردید.



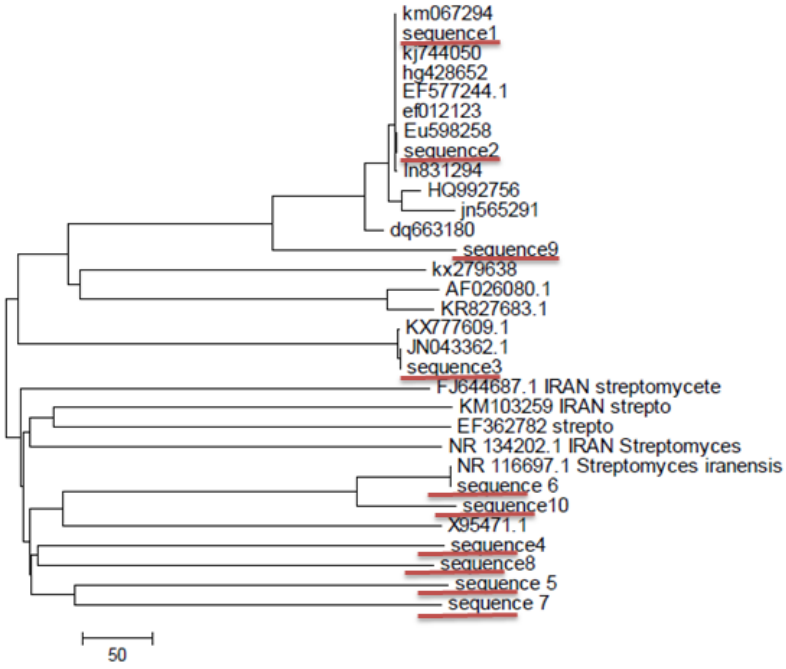
شکل شماره ۱ SM: سایز مارکر 100bp شماره‌های ٦-۱ نمونه‌های جمع‌آوری‌شده که با پرایمرهای موردنظر باند داده است.
نمونه ۷ کنترل منفی و نمونه ۸ کنترل مثبت برای پرایمرهای یونیورسال می‌باشد.

www.SID.ir
International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

برای تأیید نهایی تست PCR، ۱۰ نمونه برای بررسی سکانس به انگلستان (کمپانی Source bioscience) ارسال گردید که پس از بررسی، آنالیز شدند. برای بررسی توالی‌های ۱۶SrRNA در قسمت BLAST، بانک اطلاعاتی NCBI انجام شد و مشخص گردید توالی‌های به‌دست‌آمده با ژن‌های ثبت‌شده از این جدایه‌ها تطبیق دارد.

بعد از ویرایش سکانس (Sequence trimming) در ابتدا و انتهای آن (به دلیل کیفیت پایین)، قطعه ۱۴۵۹ نوکلئوتیدی از ژن در بین سکانس‌ها با برنامه Mega نسخه ۷ هم‌ردیف‌سازی چندگانه (Multiple sequence alignment) شد، سپس مورد آنالیز مقایسه‌ای قرار گرفت. با انجام این کار می‌توان طبق شکل شماره ۲ بررسی دقیق‌تری انجام داد.



شکل شماره ۲: دندروگرام ژنی براساس قطعه ۱۳۸۰ نوکلئوتیدی از ژن در میان سویه‌ها با متد Neighbor-joining.

اطلاعات، آنالیز ژن را به‌صورت یک‌جا ارائه داد. متوسط اختلاف سکانس بین سویه‌ها، ۵٪ بود که ۶۰٪ توالی ژن‌ها در میان سویه‌ها ثابت و ۴۰٪ آن دستخوش تغییرات شده بود. از ۲٪ متغیر، ۳۸٪ به‌صورت Informative و ۶۲٪ به‌صورت Singleto بود. (ژن ۱SrRNA به‌عنوان یک ژن معتبر مطرح است که به‌تنهایی با بررسی مقایسه‌ای توالی آن در بین سویه‌ها می‌توان ارتباط ژنتیکی آن‌ها را پیش‌بینی کرد.) میزان اختلاف مشاهده‌شده در توالی‌های ژن در بین سویه‌ها، منعکس‌کننده اختلاف ژنومی آن‌ها می‌باشد. توالی‌های ۱SrRNA موجود در بانک ژنی (حاصله از مطالعات مختلف) با پرایمرهای یونیورسال تعیین توالی شد و مجموعه‌ای از توالی‌های نسبی ژن ۱SrRNA به دست آمد. برای انجام آنالیز واحد روی تمام سویه‌ها، نیاز به داشتن ناحیه مشترک ژنی بود که بعد از انجام هم‌ردیف‌سازی چندگانه همه توالی‌های ژنی، قطعه ۱۴۵۹ جفت باز در میان تمام توالی‌ها مشترک به دست آمد.

بحث

اکثریت مردم با شنیدن نام باکتری به یاد انواع و اقسام بیماری‌ها می‌افتند؛ این در حالی است که بیشتر آن‌ها نسبتاً بی‌ضرر بوده و درنتیجه تأثیرات مفید آن‌ها بر زیانشان برتری دارد. یکی از مهم‌ترین میکروارگانیسم‌های مؤثر در زندگی بشر، اکتینوباکتریاها هستندکه جزء مهم‌ترین جمعیت میکروبی اکثر خاک‌ها به شمار می‌آیند. این باکتری‌های خاک می‌توانند در فرآیندهای تخریب، سم‌زدایی و تجزیه سوبسترایی مواد غنی شرکت کنند. همچنین اکتینوباکتریاها قادر به تولید متابولیت‌های منحصربه‌فرد و پیچیده با کاربردهای فراوان در زمینه‌های محیطی، زیست دارویی و صنعتی می‌باشند.

www.SID.ir
International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

در این مطالعه به جداسازی و بررسی مهم‌ترین جنس اکتینوباکتریا (استرپتومایسس و اکتینومیست) پرداخته شد. ازآنجایی‌که استرپتومایسس‌ها شهرت زیادی در تولید متابولیت‌های ثانویه دارند؛ به‌عنوان میکروارگانیسم مناسب برای تولید متابولیت انتخاب شدند (۱۳،۱۴).

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه، از غربالگری اکتینومیست‌های جداسازی‌شده از خاک‌های زراعی شور استان قم، از ۱۰ سویه جداشده، تنها یک‌سویه توانایی تولید ماده ضدمیکروبی علیه MRSA را دارا بود. با در نظر گرفتن این مشاهدات می‌توان عنوان کرد خاک‌های زراعی شور استان قم می‌تواند منبع خوبی برای جداسازی استرپتومیست و اکتینومیست‌های مولد ماده آنتی‌میکروبیال باشد. پس از شناسایی میکروبیولوژیک با استفاده از پرایمرهای یونیورسال ۱۶SrRNA، بر روی نمونه‌ها واکنش PCR انجام گرفت که درنهایت بر روی ۲۳ نمونه، این نتایج مثبت بود و از این تعداد، ۱۰ نمونه برای سکانس ارسال گردید. نتایج حاصل از سکانس پس از آنالیز با نرم‌افزار Mega نسخه ۷ بررسی و برای نمونه‌های ارسالی نیز با استفاده از سکانس‌های ثبت‌شده از سکانس موجود در gene bank، درختچه فیلوژنتیک رسم گردید. نتایج درختچه نشان داد نمونه‌ها بسیار مشابه به استرپتومیست‌ها و اکتینومیست‌های جداشده و ثبت‌شده از ایران هستند.

Preshant وهمکاران در سال ۲۰۱۰، جداسازی سویه‌های استرپتومیست را از نمونه‌های خاک انجام دادند. آن‌ها برای شناسایی سویه‌های جداشده به‌عنوان جنس استرپتومیست، با انجام تست‌هایی شامل: تست هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز کازئین، تست سوکروز، تست کاتالاز، تست اکسیداز، تست تولید H2S و تست لیپاز، عنوان کردند سویه‌ای‌که همه این تست‌ها را مثبت نشان داده می‌تواند از جنس استرپتومیسس‌ها باشد؛ البته باید متذکر شد شناسایی قطعی با توجه به آنالیزهای ۱۶SrRNA باید صورت می‌گرفت تا در مقایسه با این مطالعه، و بررسی بخش مولکولی در این تحقیق، نمونه‌های مثبت برای سکانس ارسال و نتایج دقیق‌تری به دست آید (۱۵). در مطالعه حاضر پس از بررسی‌های میکروب‌شناسی اولیه و جداسازی نمونه‌ها، نمونه‌ای مثبت برای تعیین سکانس، ارسال و رسم درختچه ژنتیکی انجام شد که نمونه‌های استرپتومیست و اکتینومیست‌ها در یک شاخه قرار گرفتند. در مطالعه‌ای توسط مصطفی اوسکای در سال ۲۰۰۹، گونه استرپتومیست (مولد یک ترکیب ضد قارچی) جدا شد که این سویه علیه قارچ‌های پاتوژن گیاهی و جانوری مؤثر بود و یکی از سویه‌ها نیز قدرت ضد قارچی قوی‌تری نسبت به مابقی سویه‌ها از خود نشان داد. فعالیت ضد میکروبی این سویه با روش Cross streak روی مولر هینتون آگار نشان داده شد (۱۶).

در این مطالعه، HPLC و FTIR آنالیز شدند که متابولیت حاصله مشابه کلرامفنیکل بود و براساس جداول CLSI بر روی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* خاصیت مهاری داشت و برروی باکتری‌های دیگر بی‌تأثیر بود.

مصطفی ال نگار در سال ۲۰۰۷ موفق به جداسازی سویه استرپتومیسس HAL64 از خاک‌های مصر شد. ابتدا با توجه به شکل و ساختار دیواره سلولی این استرپتومیسس، آن‌ها را به‌عنوان جنس استرپتومیسس شناسایی کرد، سپس با انجام آنالیز سکانس ژن ۱۶SrRNA مشخص گردید این باکتری همان استرپتومیسس می‌باشد که این سویه مولد ماده ضد میکروبی قوی علیه باکتری‌های گرم مثبت بیماری‌زا بود؛ درصورتی‌که اثر این ماده ضد میکروبی علیه باکتری‌های بیماری‌زای گرم منفی، کمتر گزارش شد. همچنین آنتی‌بیوتیک تولیدشده توسط این سویه با سیلیکاژل جدا گردید، سپس با Sephadex LH-20 Column خالص‌سازی شد که درنهایت، خلوص آنتی‌بیوتیک تولیدشده با روش HPLC ثابت شد. در ادامه، با شناسایی ساختار شیمیایی آنتی‌بیوتیک خالص‌سازی‌شده با استفاده از آنالیزهای اسپکتروسکوپیک، مشخص گردید این آنتی‌بیوتیک، Kosinostatin می‌باشد. این آنتی‌بیوتیک یک کوینوسیکلین است و به‌وسیله میکرومونوسپورا TP-A0468 تولید می‌شود (۱۱).

در مقایسه با مطالعه انجام‌شده جهت پی بردن به ساختار تقریبی متابولیت موجود در محیط، از طیف FT-IR استفاده شد که درنهایت، فرمول بسته شیمیایی ترکیب به‌صورت C11H12Cl2N2O5 ثبت گردید. مقایسه این داده با سایت جهانی NIST Chemistry مطابقت متابولیت موردنظر را با داروی کلرامفنیکل بیان کرد. با توجه به نتیجه آزمایش ژن ۱۶SrRNA، سویه مورد شناسایی، جزء استرپتومیسس‌ها بود که شباهت

www.SID.ir

International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

صددرصدی با استرپتومیسس تندای داشت. در مقایسه نتایج مطالعه حاضر، بخشی از جدایه‌ها به استرپتومیست و برخی نیز به اکتینومیست‌ها جداشده از ایران تشابه ۱۰۰ درصدی داشتند. در مطالعه‌ای‌که توسط حامدی و همکاران (سال ۱۳۸۶) انجام شد جنسی از خانواده اکتینومایستاسه به‌نام Nocardiopsis جداسازی شد که بعد از شناسایی با توجه به تست‌های مختلف بیوشیمیایی صورت‌گرفته، مشخص گردید این سویه، جدید بوده و *Nocardiopsis iraniensis* نام‌گذاری شد (۱۷). همچنین این سویه قادر به تولید ماده ضد میکروبی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین بود. در مطالعه فوق در پی بهینه‌سازی شرایط تولید ماده ضد میکروبی در محیط مایع، دریافتند بیشترین مقدار تولید آنتی‌بیوتیک به‌وسیله سویه مذکور در حضور ۱۰٪ نمک و pH=۷/۵ می‌باشد. آن‌ها این باکتری را هالوفیل نامیدند (۱۸). Young در سال ۲۰۰۲ در پی جداسازی سویه‌ای از اکتینومیست‌ها که بتواند مولد ماده ضد میکروبی علیه VRE (Vancomycin-Resistant Enterococcus) باشد، موفق به جداسازی و شناسایی سویه استرپتومیسس KH-614 شد که مولد ماده ضد میکروبی علیه VRE بود. همچنین در پی آنالیزهایی که روی ماده حاصل از محیط کشت مایع این سویه انجام گرفت به این نتیجه رسید که ماده حاصله علاوه بر اینکه فعالیت ضدمیکروبی دارد؛ دارای فعالیت آنتی‌توموری نیز هست (۱۹). Sing و همکاران در سال ۲۰۰۹ در پی تحقیقاتی که انجام دادند سویه استرپتومیسس آلکالوفیلی را از خاک‌های هند جداسازی کردند. این باکتری مولد یک ماده آنتی‌میکروبیال بود؛ آن‌ها روی بهینه‌سازی شرایط رشدی این باکتری (مثل pH و درصد تحمل نمک) کار کردند (شرایط بهینه برای تولید این ماده ضد میکروبی توسط این باکتری در حضور نمک ۲٪ و pH برابر ۸ می‌باشد.) در مطالعه حاضر نتایج به‌دست‌آمده از انجام آزمایش‌هایی بر روی سویه‌های جداشده از خاک نشان داد سویه‌ای که می‌تواند بیشترین اثر ضد میکروبی علیه VRE را داشته باشد، سویه E.P2 است. همچنین قطر هاله عدم رشد ایجادشده توسط این استرپتومیسس، ۲۶ میلی‌متر بود (۲۰-۲۱).

حسام و همکاران (سال ۱۳۸۸) در بررسی سویه استرپتومیسس Syaneus، ماده ضد میکروبی را از محیط کشت مایع این سویه جداسازی کردند. استخراج این ماده ضد میکروبی با حلال آلی اتیل استات، همچنین جداسازی و خالص‌سازی آن با روش‌های TLC و GC انجام شد (۲۲). در این مطالعه، ۲۳ مورد مشکوک به خانواده اکتینومیست بود که پس از انجام تست‌های مورفولوژی و بیوشیمیایی، ۱۰ مورد استرپتومایسس به دست آمد. برای بررسی فعالیت ضد میکروبی جدایه‌های موردنظر نیز از باکتری‌هایی با شماره ATCC استفاده شد که در نتیجه، سویه S1 با ایجاد هاله عدم رشد مناسب، قدرت بیشتری جهت توقف رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (Methicillin-Resistant *Staphylococcus* aureus) از خود نشان داد؛ درصورتی‌که هاله عدم رشد ایجادشده توسط سایر سویه‌ها، علیه باکتری‌های نام‌برده مناسب نبود و جهت پی بردن به ساختار تقریبی متابولیت موجود در محیط، از طیف FT-IR استفاده شد که درنهایت، فرمول بسته شیمیایی ترکیب به‌صورت C11H12Cl2N2O5 ثبت گردید. مقایسه این داده با سایت جهانی NIST Chemistry متابولیت موردنظر با داروی کلرامفنیکل را بیان کرد. کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)، یکی از پرکاربردترین روش‌های کروماتوگرافی است که منحنی استاندارد با منحنی متابولیت تولیدشده، حاصل از دستگاه HPLC موردبررسی قرار گرفت و نتایج همخوانی این دو را نشان داد. ژن ۱۶SrRNA به‌عنوان یک ژن معتبر مطرح است که به‌تنهایی با بررسی مقایسه‌ای توالی آن در بین سویه‌ها می‌توان ارتباط ژنتیکی آن‌ها را پیش‌بینی کرد. بررسی مولکولی این جدایه‌ها براساس ژن‌های ۱۶SrRNA انجام شد و برای تأیید نهایی تست PCR، ۱۰ نمونه برای بررسی بیشتر سکانس گردید. میزان اختلاف مشاهده‌شده در توالی‌های ژن در بین سویه‌ها، منعکس‌کننده اختلاف ژنومی آن‌ها بود و متوسط اختلاف سکانس بین سویه‌ها، ۵٪ برآورد شد که ۶۰٪ توالی ژن‌ها در میان سویه‌ها ثابت و ۴۰٪ آن دستخوش تغییرات شده بود. پس از توالی‌یابی برای نمونه‌های مثبت برای هر سکانس، درختچه فیلوژنتیک بررسی و جهت میزان قرابت جدایه‌ها رسم گردید.

www.SID.ir
International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج این مطالعه، از غربالگری اکتینومیست‌های جداسازی‌شده از خاک‌های زراعی شور استان قم، از ۱۰ سویه جداشده تنها یک‌سویه توانایی تولید ماده ضد میکروبی علیه MRSA را دارا بود. با در نظر گرفتن این مشاهدات می‌توان عنوان کرد خاک‌های زراعی شور استان قم می‌تواند منبع خوبی برای جداسازی استرپتومیست و اکتینومیست‌های مولد ماده آنتی‌میکروبیال باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم می‌باشد. بدین‌وسیله از مسئولین دانشگاه و کارکنان آزمایشگاه کارشناسی ارشد که شرایط اجرای این فعالیت پژوهشی را فراهم نمودند و شرکت دانش‌بنیان سامان ژن آراد، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

References:

1. Mohitosh Biswas, Ajijur Rahman, Hejera Khatun, Anwar – ul Islam. Isolation and cherecterization of streptomyces sp. ANBS – 15 and antimicrobial activities of its secondary metabolies. Bangladesh Pharm J 2011;14(1):15-20. Link

2. Bredholt H, Fjaervik E, Johnsen G, Zotchev SB. Actinomycetes from sediments the Trondheim Fjord_ Norway: Diversity and biological activity. Mar Drugs 2008;6(1):12-24. Link

3. Singh LS, Baruah I, Bora TC. Actinomycetes of loktak habitat: isolation and screening for antimicrobial activities. Biotechnology 2006;5(2):217-21. Link

4. Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH. The prokaryotes. Springer; 2006. p. 430-530.

5. Usha R, Ananthaselvi P, Venil CK, Palaniswamy M. Antimicrobial and antiangiogenesis activity of Streptomyces parvulus KUAP106 from mangrove soil. Eur J Biol Sci 2010,2(4):77-83. Link

6. Kavya Deepthi M, Solomon Sudhakar M, Nagalakshmi Devamma M. Isolation and Screening of streptomyces sp. From coringa Mangrove soils for Enzyme production and Antimicrobial activity. Int J Pharm Chem Biol Sci 2012;2(1):110-6. link

7. Gurung TD, Sherpa C, Agrawal VP, Lekhak B, Isolation and characterization of antibacterial actinomycetes from soil samples of Kalapathar mount Everest region. Nepal J Sci Technol 2009 10:173-82. link

8. Atta MA. An antifungal agent produced by streptomyces olivaceiscleroticus, Az – SH 514. World Appl Sci J 2009;6(11):1495–505. link

9. Dehnad A, Parsa L, Bakhshi R, Abdi Soofiani S, Mokhtarzadeh A, Investigation antibacterial activity of streptomycetes isolates from soil samples, west of Iran. African J Microbiol Res 2010;4(14):1542-9. link

10. Walter J, Hertel C, Tannock, GW, Lis CM, Munro K, Hammes WP. Detection of Lactobacillus, Pediococcus, Leuconostoc, and Weissella species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. Appl Environ Microbiol 2001;67(6):2578-85. PubMed

11. El-Naggar MY, El-Assar SA, Abdul-Gawad SM. Meroparamycin production by newly isolated streptomyces sp. Strain MARO 1: Taxonemy, fermentation, purification and structural Elucidation. J Microbiol 2006;44(4):432-8. PubMed

12. Scholler CEG, Gurtler H, Pedersen R, Molin S, Wilkins K. Volatile metabolites from actinomycetes. J Agric Food Chem 2002;50(9):2615-21. link

www.SID.ir

International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

13. Gandhimathi R, Kiran GS, Hema TA, Selvin J, Thomas TA, Rajeetha Ravji T, et al Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus Aspergillus ustus MSF3. Colloids Surf B Biointerfaces 2009;73(2):250-6. PubMed

14. Gandhimathi RGS, Kiran T, Hema J, Selvin T, Raviji R, Shanmughapriya S. Production and characterization of lipopeptide biosurfactant by a sponge-associated marine actinomycetes Nocardiopsis alba MSA10. Bioprocess Biosyst Eng 2009,32(6): 825-35. link

15. Srivastava P, Shukla S, Kumar Choubey S, Gomase VS. Isolation, purification and characterization of glucose isomerese enzyme from streptomyces species isolated from Parbhani Region. J Enzyme Res ,2010;1(1):1-10. link

16. Oskay M. Anti fungal and antibacterial compounds from streptomycetes strains. African J Biotechnol 2009;8(13):3007-17. link

17. Kumar N, Singh RK, Mishra SK, Singh AK, Pachouri UC. Isolation and screening of soil actinomycetes as source of antibiotics active against bacteria. Int J Microbiol Res 2010;2(2):12-16. link

18. Hamedi J, Mohammadi Panah F, Amoozegar MA, Dehghan S. Isolation of A New Moderately Halophilic Broad SpectRum Antibiotic Producing Actinobacter. Jundishapur J Natural Pharm Products 2007;2(2):94-104. link

19. Rhee KH. Isolation and characterization of streptomyces sp. KH - 614 Producing anti VRE (Vancomycin – Resistant entrococci) antibiotics. J Gen. Appl Microbial 2002;48(6):321-7. PubMed

20. Singh LS, Mazumder S, Bora TC. Optimization of process parameters for growth and bioactive metabolite Produced by a salt – tolerant and alkalophilic actinomycetes, streptomyces tanashiensis strain AZD. J de Mycologie Medicale 2009;19(4):225–33. link

21. Zhong K, Gao X-L, Xu Z-J, Gao H, Fan S, Yamaguchi I, et al. Antioxident activity of a novel streptomyces strain Eril 2 isolated from the rhizosphere of rhizoma. curcumae longae. Cur Res Acteiol 2011;4(2):63-72. link

22. Atta HM. An antifungal agent produced by streptomyces olivaceiscleroticus, Az – SH 514. World Appl Sci J 2009;6(11):1495-505. link

www.SID.ir
International License Creative Commons Attribution License 4.0