Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دوره ۳۳ شماره ۲ خرداد و تیر ۱۳۹۰ صفحات ۵۶-۴۹

شناسایی مولکولی باکتری های جنس استرپتومایسس مولد مواد ضد باکتریایی از خاک های استان آذربایجان شرقی

صمد عبدی صوفیانی: بخش تحقیقات ژنومیکس، مدیریت منطقه شمال غرب و غرب کشور (تبریز)، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، و دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور

علیرضا دهناد: بخش تحقیقات ژنومیکس، مدیریت منطقه شمال غرب و غرب کشور (تبریز)، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی: نویسنده رابط

E-mail: Adehnad@ABRII.ac.ir

محمد رضا نهایی: گروه میکروبشناسی، دانشکده پزشکی تبریز و مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

لاله پارسا یگانه: بخش تحقیقات ژنومیکس، مدیریت منطقه شمال غرب وغرب کشور (تبریز)، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی

ابولفضل برزگری: بخش تحقیقات ژنومیکس، مدیریت منطقه شمال غرب وغرب کشور (تبریز)، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی

هادی ملکی کاکلر: بخش تحقیقات ژنومیکس، مدیریت منطقه شمال غرب وغرب کشور (تبریز)، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی

دریافت: ۸۸/۴/۳۱ ، **پذیرش**: ۸۹/۱۱/۱۶

چکیده

زمینه واهداف: اکتینومیسیت‌ها باکتری هایی گرم مثبت و رشته ای هستند که بخش بزرگی از میکروارگانیسم های خاک را شامل می‌شوند. بر اساس مطالعات، سه چهارم کل آنتی‌بیوتیک‌ها را اکتینومیسیت‌ها تولید می‌کنند. در این خانواده، جنس استرپتومایسس از اهمیت خاص دارد. در همین راستا غربالگری برای فعالیت ضدباکتریایی و نیز شناسایی مولکولی استرپتومایسس‌های جدا شده از خاک‌های استان آذربایجان شرقی با استفاده از ژن 16SrDNA انجام شد.

مواد و روش‌ها: اکتینومیست‌ها از نمونه خاک‌های استان آذربایجان‌شرقی جداسازی شد، غربالگری اولیه به روش تست دولایه (Bilayer) در مقابل میکروارگانیسم های آزمایشی *E. coli* ATCC 1399, *K. pneumoniae* ATCC 1290, *S. flexneri* ATCC 1234, *L. monocytogenes* ATCC 33090, *B. cereus* ATCC 1431, *Y. enterocolitica* ATCC35669, and *S. aureus* ATCC29213 و غربالگری ثانویه، با استفاده از متابولیتهای استخراجی ایزوله‌های فعال گزینش اولیه در مقابل همان میکروارگانیسم ها با روش انتشار در آگار(Diffusion Method Disk) بررسی شدند. جهت شناسایی مولکولی، ابتدا، DNA ژنومیک از باکتری‌های منتخب استخراج، وژن 16SrDNA این ایزوله تکثیر و توالی یابی شد. نتایج حاصل با استفاده از برنامه های بیوانفورماتیک آنالیز شده وایزوله های مذکور شناسایی شدند.

یافته ها: از ۱۱۰ نمونه خاک جمع آوری شده، ۳۱۰ ایزوله اکتینومیست جدا سازی شد، درغربالگری اولیه، ۴۴ ایزوله فعالیت ضد باکتریایی نشان دادند که از این تعداد ۱۲ ایزوله در گزینش ثانویه بررسی شدند. نتایج توالی یابی نشان داد، ایزوله SC91 با ۹۷٪ به *Streptomyces sampsonii* سویه SG41 با ۹۶٪ به *Streptomyces mediolani* و سویه SE45 با ۹۹٪ به *Streptomyces albogriseolus* شباهت دارد. ایزوله اخیر تحت نام *Streptomyces albogriseolus* strain ABRIINW EA1145 در NCBI با کد رهگیری GQ925802 ثبت شد.

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان می‌دهد خاک‌های استان آذر بایجان شرقی غنی از ایزوله‌های فعال در زمینه تولید مواد آنتی‌باکتریایی جدیدی بوده که نیازمند بررسی‌های بیشتری است.

کلیدواژه ها: استرپتومایسس، ماده ضد باکتریائی، متابولیت، ژن 16SrDNA

مقدمه

اکتینومیست‌ها، پروکاریوت هائی هستند که بصورت آزاد، ساپروفیت و گاها همزیست با گیاهان بسر می‌برند و می‌توان آنها را درهمه اکوسیستم ها از جمله خاک، آب، رسوبات دریائی و نیز آب های گرم مشاهده کرد. اما محیط زیست اصلی آنها خاک بوده

www.SID.ir

Archive of SID

و جمعیت بزرگی از فلور طبیعی را تشکیل می‌دهند (۱). از نظر رده‌بندی این باکتری‌ها، جنس‌های مهمی مانند: میکرومونوسپورا Micromonospora، نوکاردیا Nocardia و استرپتومایسس را شامل می‌شوند که در بین آنها جنس استرپتومایسس به دلیل داشتن جمعیت ۶۰ درصدی اکتینومیسیت‌ها از اهمیت زیادی برخوردار است (۲).

استرپتومایسس ها بزرگترین ژنوم را در بین باکتری‌های اکتینومیسیت دارا بوده و درصدG+C فوق العاده بالایی دارند. طولانی بودن ژنوم توانائی تولید انواعی از متابولیت‌های ثانویه Secondary metabolite را به آنها می‌بخشد که آنتی‌بیوتیک ها از جمله این متابولیت‌ها هستند. بر اساس مطالعات، حدود ۷۰ درصد کل آنتی بیوتیک‌های شناخته شده متعلق به این باکتری هاست (۱).

استرپتومایسس‌ها جایگاه برجسته‌ای درزمینه مطالعات به منظور غربالگری جهت تولید مواد آنتی‌بیوتیکی، ضدسرطانی و متابولیت‌های غذائی و غیره دارند که سالانه ده‌ها ماده مفید در زمینه دارویی، کشاورزی، غذایی و صنعتی از این باکتری‌ها جداسازی و به بازار مصرف ارائه می‌شود (۳). البته اولین قدم در راستای این امر مهم، جداسازی و شناسایی سویه های مستعد و فعال این گروه از باکتری‌هاست. در حال حاضر رایج ترین روش‌ها برای شناسایی و طبقه‌بندی این باکتری‌ها، استفاده از ویژگی‌های مورفولوژیک و بیوشیمیایی ونیز مقایسه توالی ژن‌های مختلف آنهاست (۴) که در بین این ژن‌ها، ژن 16SrDNA بدلیل حفظ ترادف در طول تکامل جهت شناسایی باکتری‌ها بسیار مناسب است (۵و۶).

در کشور ما نیز مطالعات در زمینه جداسازی و شناسایی استرپتومایسس‌ها از مناطق مختلف گزارش شده است (۷و۸). بررسی این منابع و داده‌ها نشان می‌دهد که تاکنون مطالعه جامعی در این زمینه انجام نگرفته است. این مسئله زمانی بیشتر اهمیت پیدا می‌کند که بدانیم کشور ما دارای متنوع‌ترین اقلیم‌ها در بین کشورهای منطقه است که می‌توان سویه‌های استرپتومایسس قدرتمندی در زمینه تولید متابولیت‌های ثانویه بویژه آنتی‌بیوتیک‌ها، درآن شناسایی و جداسازی کرد. با عنایت به این موضوع لازم بود مطالعه جامع و دقیقی در این راستا انجام شود به همین منظور در تحقیق حاضر استرپتومایسس‌های مناطق مختلف استان آذربایجانشرقی از جهت خواص آنتی‌باکتریائی بررسی شده و سویه های فعال با استفاده از ژن 16SrDNA شناسایی شده اند.

مواد و روش ها

نمونه‌های خاک از مناطق مختلف استان آذربایجانشرقی از عمق ۱۵cm–۱۰ (افقA) برداشت شد (۳). سپس این نمونه‌ها به ظروف ویژه‌ای نگهداری نمونه انتقال یافت. سپس ویژگی‌های منطقه مانند عرض جغرافیائی، ارتفاع، شیب محل و تیپ خاک یادداشت گردیدند. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه در دمای یخچال 4^oC نگهداری شدند.

جهت جداسازی اکتینومیست‌ها ۵ گرم از نمونه‌های خاک خشک شده در۵۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک استریل اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در انکوباتور شیکر ۲۸ درجه‌سانتی‌گراد تکان داده شد. سپس سری رقت تهیه شد و از رقت 10^{-3}، ۱۰۰ میکرولیتر به محیط کشت Starch Casein Agar انتقال داده و گسترش دادیم و پلیت‌های حاصل را در دمای 28^o C به مدت هفت روز انکوبه کردیم. بعد از هفت روز کلنی های اکتینومیست که به طور معمول ویژگی‌هایی همچون رنگ سفید و ظاهری خشک و گچی روی محیط کشت (Starch Casein Agar) S.C.A و نیز بویی شبیه خاک دارند مشخص می‌شوند. در مرحله بعدی از رنگ آمیزی گرم و روش کشت اسلایدی می توان برای شناسایی مورفولوژیکی کلنی‌های استرپتومایسس استفاده کرد. بعد از جدا سازی، تک کلنی‌ها در دمای 4^oC و یا به حالت استوک در دمای - 80^oC در محیط S.C.A نگهداری نمودیم (۱۰،۹).

برای جداسازی اکتینومیست‌های فعال از نظر تولید مواد آنتی‌باکتریال غربالگری در دو مرحله جداگانه انجام یافت که برای هر دو مرحله از میکرو ارگانیسم‌های آزمایشی زیر که از کلکسیون‌های میکروبی موجود در کشورتهیه شده بود استفاده شد.

Escherichia coli ATCC 1399, Klebslla pneumonie ATCC 1290, Shigella flexneri ATCC 1234, Listeria monocytogenes ATCC 33090, Bacillus cereus ATCC 1431, Yersinia enterocolitica ATCC35669, and Staphylococcus aureus ATCC 29213

جهت گزینش اولیه از محیط کشت S.C.A به روش دو لایه Bilayer method استفاده شد. در این روش ابتدا در محیط S.C.A ایزوله‌ها کشت داده شده و پس از۳۰ دقیقه پاتوژن‌ها که قبلا با نسبت ۱ به ۵ با محیط مولر هینتون آگار ترکیب شده و در بن ماری ۴۰ درجه سانتی گراد نگهداری شده بودند به محیط S.C.A اضافه شدند. پلیت‌ها به مدت ۱۰ روز در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از ۱۰ روز پلیت‌های فقط پاتوژن رشد کرده به عنوان غیرفعال، پلیت‌های که هم ایزوله و هم پاتوژن مشاهده شدند کم فعال و پلیت‌های که فقط ایزوله‌های اکتینومیست رشد کردند بعنوان فعال انتخاب شدند.

جهت گزینش ثانویه پس از آنکه ایزوله ها در مرحله گزینش اولیه، از نظر پتانسیل ضد باکتریائی تست شدند، نمونه‌های مثبت (فعال) حاصل از مرحله اول برای مطالعه بیشتر به محیط کشت مایع Muller Hinton Broth انتقال یافتند. پس از ۳۶ ساعت انکوباسیون در دمای 28^oC محیط‌های کشت مایع جمع شده و سانتریفوژ شدند مایع رویی با حجم‌های برابر از۷ نوع حلال قطبی و غیرقطبی مخلوط شد (جدول۳) و در انکوباتور شیکردار28^oC با دورrpm ۱۸۰ به مدت ۱ ساعت به شدت به هم زده شدند. سپس فاز حلال از فاز آبی جدا شده و حلال‌ها که حاوی متابولیت‌ها بودند توسط اواپراتور تغلیظ شدند و به حجم ^{CC} ۱۰ رسانیده شدند و در درون شیشه‌های پنی‌سیلین در دمای 4^oC نگهداری شدند (۱). متابولیت‌های استخراج شده با روش انتشار از دیسک Disk (Diffusion Method) با دیسک های خالی (Blank Disk)

www.SID.ir

Archive of SID

با قطر۶mm در مقابل پاتوژن‌های استاندارد تست شده و اندازه هاله‌های عدم رشد اطراف هر دیسک قرائت شد. هاله‌هایی که قطر بیش از mm ۸ داشتند به عنوان فعالیت آنتی‌بیوتیکی قابل قبول شناخته شد(۷).

برای استخراج DNA نمونه‌هایی که قدرت آنتی‌باکتریایی قوی داشتند بر روی محیط کشت S.C.A کشت و به مدت سه روز در دمای 30^oC انکوبه شدند. سپس باکتری‌ها از روی پلیت ها برداشته شده و همراه با بافر لیز کننده (Tris (pH:7.4 10mM:EDTA1mM:SDS 0.5%:Proteinase K 0.1mg/ml) به داخل ازت مایع منتقل شدند. سپس در دورrpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۰دقیقه سانتریفیوژ گردیدند، مایع رویی برداشته شد و با۵۰۰ میکرولیتر محلول کلروفرم- ایزوامیل الکل در دورrpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۰دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس ایزوپروپانول سرد به آن اضافه و مجددا سانتریفیوژ شد. مایع رویی دور ریخته شده و۱۰۰میکرولیتر آب مقطر به ویال‌ها اضافه شده و در فریزر -20^oC درجه نگهداری شد (۱۱).

برای طراحی جفت آغازگر اختصاصی، توالی‌های 16SrDNA گونه‌های استرپتومایسس ثبت شده (Accession numbers:AF008220,Y15502,D63861,M35377) در GenBank/EMBL/DDBJ تهیه و با استفاده از برنامه Meg Alignment جایگاه‌های مشترک گونه‌ها شناسایی و براساس انتهای ۳/و۵/ این قطعات با استفاده از برنامه OLIGO5، پرایمر طراحی و توسط شرکت سیناژن سنتز شد (جدول۱).

واکنش زنجیره ای پلی مراز (Polymerase Chain Reaction) در حجم ۱۵ میکرولیتر(DNA 1µl:PF 0.5µl:PR 0.5µl:dNTP 2µl:10xPCR buffer with $MgSo_4$ 2µl:Taq 0.3µl:DMSO 3µl::DW 5.7µl) برای تکثیر ژن 16SrDNA استفاده شد که شامل برنامه زیر بود: دناتوراسیون اولیه (denaturing) Primary ۹۶(۲دقیقه) [دناتوراسیون ۹۶ (۱ دقیقه) اتصال (Annealing) ۵۵ (۱دقیقه) بسط (Extension) ۷۲ (۲دقیقه) که سه مرحله اخیر در ۳۵ دور انجام گرفت] بسط نهایی۷۲ (۱۰دقیقه) برای تفکیک قطعات تکثیر یافته از ژل آگاروز ۱ درصد استفاده شد.

یافته ها

از۱۱۰ نمونه خاک جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان آذربایجانشرقی ۳۱۰ ایزوله اکتینومیست در فرم خالص جداسازی و فعالیت آنتی باکتریائی شان مورد بررسی قرار گرفت. این ایزوله‌ها بصورت استوک در دمای80^oC نگهداری شدند. pH و رنگ کلنی همه نمونه‌ها یادداشت شد. در جدول ۲ محل نمونه برداری، ارتفاع محل، pH و رنگ کلنی ۱۲ نمونه که از نظر تولید مواد آنتی‌باکتریال قوی تشخیص داده شدند آمده است.

با توجه به جدول فوق مشاهده می شود که رابطه معنی داری بین pH خاکی که ایزوله از آن گرفته شده و قدرت ضد باکتریایی ایزوله وجود دارد. چنانکه دیده می‌شود تقریبا همه نمونه هایی که در گزینش ثانویه مثبت قوی هستند دارای pH بالای ۷/۵ دارند. همچنین همبستگی مثبتی بین قدرت ضد باکتریایی ایزوله‌ها و ارتفاع محل برداشت آنها وجود دارد بطوری که ۷۵ درصد نمونه‌های مثبت دارای ارتفاع بیش از ۱۵۰۰ متر از دریا بودند.

در غربالگری اولیه جهت شناخت ایزوله‌های مثبت (فعالیت آنتی‌بیوتیکی) نتایج زیر حاصل شد: از بین ۳۱۰ ایزوله، ۴۴ ایزوله (۱۴ درصد) فعالیت ضد باکتریائی در مقابل حداقل یک میکروارگانیسم آزمایشی داشتند و ۲۶۶ عدد ایزوله (۸۶ درصد) هیچ فعالیتی بروز ندادند همچنین این جدول نشان می‌دهد ۱۴ درصد ایزوله‌ها در مقابل پاتوژن‌های گرم مثبت، ۱۴ درصد در مقابل باکتری‌های گرم منفی و ۷۲ درصد برای هر دو گروه گرم مثبت و منفی فعال بودند. ازطرفی مشخص می‌شود باکتری لیستریا مونوسیتوژنز با ۲۳/۵۲ درصد از کل پلیت‌های فعال حساس ترین باکتری نسبت به مواد ترشحی استرپتومایسس‌ها به محیط کشت و باکتری باسیلوس سرئوس مقاومترین پاتوژن به این مواد است (جدول ۳).

۴۴ ایزوله انتخاب شده از گزینش اولیه، در گزینش ثانویه بررسی شدند که ۱۲ ایزوله (۲۷ درصد) در گزینش ثانویه فعال تشخیص داده شدند. ایزوله های دیگر که هیچ فعالیتی نداشته و یا فعالیت شان ضعیف بود انتخاب نشدند (جدول۴).

جدول ۴ آنالیز آماری ۱۲ ایزوله فعال گزینش ثانویه را نشان می‌دهد. در این بررسی در کل ۳۳۶ دیسک خالی استفاده شد که به ترتیب بزرگترین وکوچکترین هاله عدم رشد باmm ۳۱ و ۸mm بدست آمد. از کل ۳۳۶ دیسک بکار رفته در ۱۱۶ (۳۶/۵۲) دیسک هاله عدم رشد مشاهده شد که میانگین هاله‌های عدم رشد mm ۱۶/۴۳ بود. در بین ۱۲ ایزوله، ایزوله SB33 با ۱۶ (۱۳/۷۹) مورد محدودیت فعالترین استرپتومایسس در مقابل پاتوژن ها بود.

با نگاه به داده‌های جدول ۴ وبا مشاهده نمودار ۱ (الف) مشاهده می‌شود که *B.cereus* با ۲۸/۴۴ درصد و *S.aureus* با ۲۶/۷۲ درصد بیش از دیگرباکتری‌ها محدود شده‌اند که به دلیل گرم مثبت بودن هر دو قابل تامل است. همچنین با مقایسه همین جدول و بررسی نمودار ۱ (ب) این نکته حاصل می‌شود که از بین حلال‌هایی که برای استخراج متابولیت‌ها استفاده شد. حلال غیرقطبی اتیل استات با۲۸/۴۴ درصد و حلال قطبی آب با ۲۶/۷۲ درصد ایجاد محدودیت برای پاتوژن‌ها، حلال هایی مناسب جهت استخراج متابولیت‌های موثر استرپتومایسس‌ها هستند.

با مقایسه نتایج حاصل از گزینش اولیه و ثانویه به این نتیجه رسیدیم که ایزوله های فعال گزینش اولیه (SD21وSI82) وقتی در محیط کشت مایع که ارگانیسم های پاتوژن در آن وجود ندارد قرار می گیرند هیچ فعالیتی از خود نشان نمی‌دهند و یا ایزوله‌های کم فعال گزینش اولیه (SF51وSB33) وقتی در محیط مایع قرار گرفتند بیشترین فعالیت را از خود نشان دادند (جدول۴).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۱: آغازگرهای اختصاصی توالی های 16SrDNA

AR: 5/AAGGAGGTGATCCCAGCC3/	AF :5/ AGAGTTTGATCCTGGCTC 3/

جدول ۲ : pH، محل نمونه برداری، ارتفاع محل و رنگ سطح و پشت کلنی ایزوله هایی که از نظر فعالیت ضد باکتریایی در گزینش ثانویه قوی تشخیص داده شدند

ردیف	کد ایزوله	محل نمونه برداری	ارتفاع محل نمونه برداری(متر)	pH خاک آزمایشی	رنگ سطح کلنی	رنگ پشت کلنی
۱	**SF51**	سیه رود	۶۳۰	۸,۹	طوسی	قهوه ای روشن
۲	**SH83**	سهند	۳۰۸۰	۷,۶	صورتی	قرمز مایل نارنجی
۳	**SH112**	سهند	۲۴۵۰	۷,۷	قهوهای روشن	کرم مایل قهوه ای
۴	**SH111**	سهند	۲۴۵۰	۷,۷	قهوهای روشن	کرم مایل قهوه ای
۵	**SB33**	مرند	۱۸۰۰	۸,۵	قهوه ای	کرم
۶	**SE45**	بناب	۱۳۴۰	۸,۷	سبز زیتونی	کرم
۷	**SA32**	لیقوان	۱۷۲۰	۸,۲	کرم	سفید
۸	**SD152**	کلیبر	۱۶۵۰	۸,۳	بژ	قهوه ای سبز
۹	**SD144**	کلیبر	۱۵۳۰	۸,۵	کرم	کرم
۱۰	**SG41**	کلیبر(شاهوردی)	۱۶۰۶	۷,۳	سفید	کرم
۱۱	**SC84**	هریس	۱۶۱۸	۸,۷	اجری	اجری
۱۲	**SC91**	هریس	۱۴۵۹	۸,۵	کرم	زیتونی

جدول ۳ : پاسخ ایزوله ها در مقابل باکتری‌های آزمایشی* در گزینش اولیه

اطلاعات ایزوله ها	تعداد	درصد
کل ایزوله ها	۳۱۰	۱۰۰
ایزوله های مثبت (فعال آنتی باکتریایی) حداقل برای یک پاتوژن	۴۴	۱۴
ایزوله های مثبت برای باکتریهای گرم مثبت	۱۴	۶
ایزوله های مثبت برای باکتریهای گرم منفی	۱۴	۶
ایزوله های مثبت برای هر دو باکتریهای گرم مثبت و منفی	۳۲	۷۲
کل پلیت ها	۲۱۷۰	۱۰۰
پلیت های مثبت	۱۳۶	۱۲/۵۳
پلیت های مثبت برای E.c	۱۹	۱۳/۹۷
پلیت های مثبت برای S.a	۲۵	۱۸/۳۸
پلیت های مثبت برای L.m	۳۲	۲۳/۵۲
پلیت های مثبت برای Y.e	۲۱	۱۵/۴۴
پلیت های مثبت برای B.c	۷	۵/۱۴
پلیت های مثبت برای S.f	۲۰	۱۴/۷۰
پلیت های مثبت برای K.p	۱۲	۸/۸۲

* *E. coli* (E.c): *S. aureus* (S.a): *Y. enterocolitica* (Y.e): *B. cereus* (B.c): *K .pneumonie* (K.p): *S. flexneri* (S.f): *L. monocytogenes* (L.m)

توالی های 16SrDNA با استفاده از جفت پرایمر طراحی شده، با تکنیک PCR تکثیر شد و با توجه به اینکه آغازگرها از روی قسمت‌های ابتدایی و انتهایی توالی‌های 16SrDNA گونه‌های استرپتومایسس ثبت شده در GenBank/EMBL/DDBJ طراحی شده بود و نیز به دلیل اختصاصی بودن آغازگرها، انتظار قطعات تکثیر یافته ۱۵۰۰ جفت نوکلئوتید را داشتیم که شکل (۱) آن را نشان می‌دهد. پس از تکثیر قطعات ژن 16SrDNA، مرحله بعدی توالی یابی آنهاست. که از میان ۱۲ ایزوله فعال گزینش ثانویه، ۴ ایزوله SB33، SG41، SC91 وSE45 به ترتیب با ۱۳/۷۸، ۱۱/۲۰، ۹/۴۸ و ۱۱/۳۰ درصد ایجاد محدودیت برای پاتوژن‌ها جهت توالی یابی ژن 16SrDNA انتخاب شدند که در ادامه فقط بررسی‌های مولکولی ایزوله‌های SG41 و SC91 نشان داده می‌شود. باندهای قطعات 16SrDNA ایزوله‌های SC91وSG41 در شکل ۱ مشاهده می‌شود و شکل ۲ باندهای حاصل از PCR همان ایزوله ها پس از خالص سازی است که در هر دو مورد به منظور آشکارسازی از ژل آگاروز ۱/۵ درصد استفاده شده است. این قطعات از ژل برداشته شده و همراه جفت پرایمرها جهت توالی‌یابی به شرکت سیناژن فرستاده شد که پس از توالی یابی، داده‌های حاصل با برنامه کروماس و با مراجعه به داده‌های NCBI بررسی گردیدند که نتیجه نشان داد سویه SC91 با۹۷٪ به *Streptomyces sampsonii*، سویه SG41 با ۹۶٪ به *Streptomyces mediolani* و سویه SE45 با۹۹٪ درصد به *Streptomyces albogriseolus* شباهت دارد. ایزوله اخیر تحت نام *Streptomyces albogriseolus* strain ABRIINW EA1145 در NCBI با کد رهگیری GQ925802 ثبت و قابل دسترسی است.

www.SID.ir

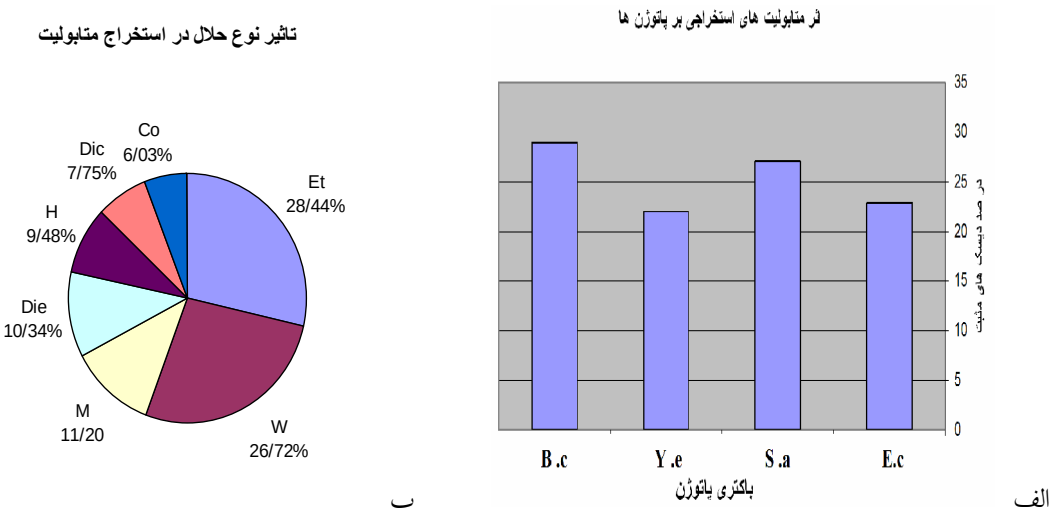
Archive of SID

جدول ۴: تحلیل آماری داده های حاصل از متابولیت های ثانویه ایزوله ها در مقابل میکروارگانیسم آزمایشی* با حلال های مختلف** در گزینش ثانویه.

نوع دیسک ها	تعداد	درصد	بزرگترین هاله عدم رشد (mm)	کوچکترین هاله عدم رشد (mm)	میانگین هاله عدم رشد (mm)
کل دیسک های بررسی شده	۳۳۶	۱۰۰	۳۱	۸	۱۶/۴۳
دیسک هایی که هاله عدم رشد در آنها مشاهده شد (دیسک های مثبت)	۱۱۶	۳۴/۵۲	۳۱	۸	۱۶/۴۳
دیسک های مثبت حاوی متابولیت استخراجی ایزوله SF51 با حلال های هفت گانه	۱۴	۱۲/۰۶	۲۲	۹	۱۶
دیسک های مثبت حاوی متابولیت استخراجی ایزوله SH83 با حلال های هفت گانه	۸	۶/۸۹	۲۸	۱۶	۲۱/۱
دیسک های مثبت حاوی متابولیت استخراجی ایزوله SH112 با حلال های هفت گانه	۷	۶/۰۳	۲۴	۱۱	۱۸/۲
دیسک های مثبت حاوی متابولیت استخراجی ایزوله Sh111 با حلال های هفت گانه	۸	۶/۸۹	۲۸	۱۴	۲۰/۲۵
دیسک های مثبت حاوی متابولیت استخراجی ایزوله SB33 با حلال های هفت گانه	۱۶	۱۳/۷۹	۳۰	۸	۱۸/۱۲
دیسک های مثبت حاوی متابولیت استخراجی ایزوله SE45 با حلال های هفت گانه	۱۳	۱۱/۲۰	۳۰	۹	۱۵/۸۴
دیسک های مثبت حاوی متابولیت استخراجی ایزوله SA32 با حلال های هفت گانه	۵	۴/۳۱	۳۰	۱۸	۲۴/۶
دیسک های مثبت حاوی متابولیت استخراجی ایزوله SD152 با حلال های هفت گانه	۱۰	۸/۶۲	۳۱	۱۰	۱۸/۱
دیسک های مثبت حاوی متابولیت استخراجی ایزوله SD144 با حلال های هفت گانه	۵	۴/۳۱	۱۶	۹	۱۴/۲
دیسک های مثبت حاوی متابولیت استخراجی ایزوله SG41 با حلال های هفت گانه	۱۱	۹/۴۸	۲۹	۹	۲۰/۸
دیسک های مثبت حاوی متابولیت استخراجی ایزوله SC84 با حلال های هفت گانه	۴	۳/۴۴	۲۱	۹	۱۵/۵
دیسک های مثبت حاوی متابولیت استخراجی ایزوله SC91 با حلال های هفت گانه	۱۳	۱۱/۲۰	۲۶	۸	۱۵/۳
دیسک های مثبت که متابولیت آن با حلال Die استخراج شده بود	۱۶	۱۳/۷۹	۲۸	۹	۱۱/۵
دیسک های مثبت که متابولیت آن با حلال DDW استخراج شده بود	۳۱	۲۶/۷۲	۳۱	۸	۱۹
دیسک های مثبت که متابولیت آن با حلال M استخراج شده بود	۱۳	۱۱/۲۰	۲۳	۹	۱۵/۳
دیسک های مثبت که متابولیت آن با حلال Co استخراج شده بود	۷	۶/۰۳	۲۶	۸	۱۴/۴۲
دیسک های مثبت که متابولیت آن با حلال Et استخراج شده بود	۳۳	۲۸/۴۴	۳۰	۱۰	۱۸/۷۸
دیسک های مثبت که متابولیت آن با حلال Dic استخراج شده بود	۹	۷/۷۵	۲۶	۹	۱۷/۴
دیسک های مثبت که متابولیت آن با حلال H استخراج شده بود	۱۱	۹/۴۸	۲۶	۸	۱۳/۳۶
کل دیسک های مثبت در مقابل پاتوژن E.c	۲۷	۲۳/۲۷	۳۰	۸	۱۸/۸۵
کل دیسک های مثبت در مقابل پاتوژن S .a	۳۱	۲۶/۷۲	۲۷	۹	۱۷/۵۳
کل دیسک های مثبت در مقابل پاتوژن Y .e	۲۵	۲۱/۵۵	۳۱	۹	۱۷/۱۶
کل دیسک های مثبت در مقابل باکتری B .c	۳۳	۲۸/۴۴	۳۰	۸	۱۸/۱۲

E. coli (E.c): *S. aureus* (S.a): *Y. enterocolitica* (Y.e): *B. cereus* (B.c) *

** متانول (M) کلروفرم (Co) هگزان (H) اتیل استات (Et) دی‌کلرومتان (Dic) دی اتیل اتر (Die) و آب مقطر دو بار استریل (DDW)



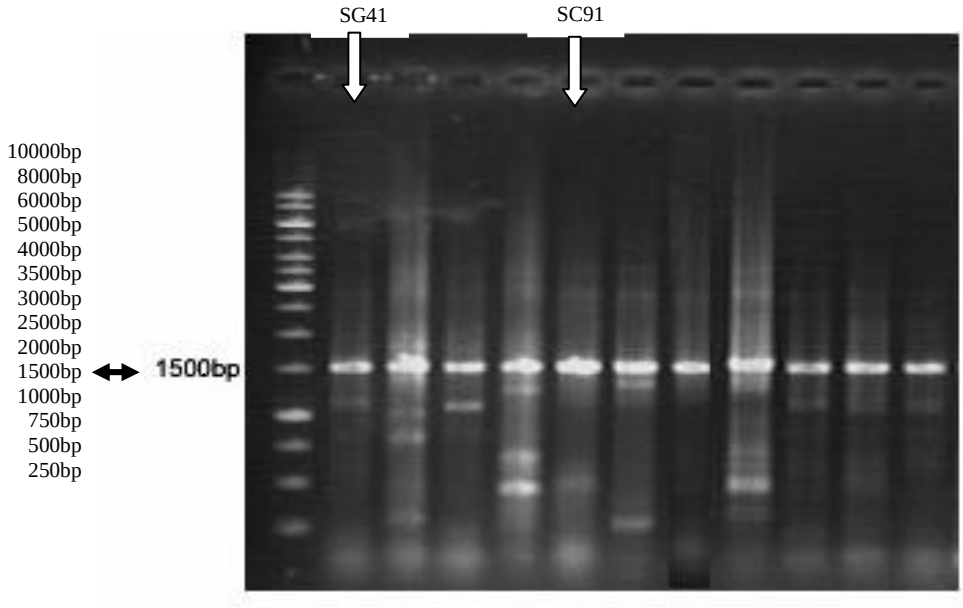
نمودار۱ : اثر متابولیت‌های استخراجی بر پاتوژن ها (الف) و تاثیر حلال‌ها در استخراج متابولیت ها (ب).

الف، *B. cereus*(B.c) Y. *enterocolitica* (Y.e) *S. aureus* (S.a) *E. coli* (E.c)

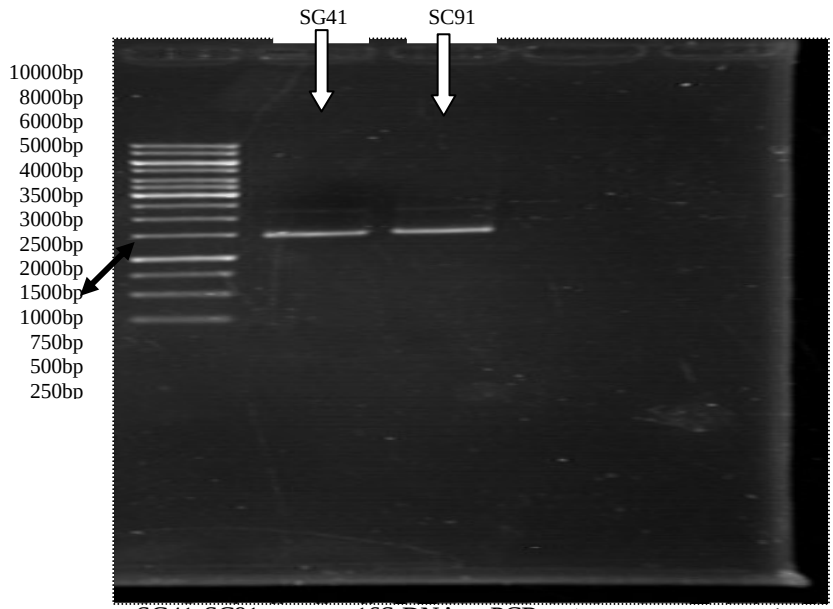
ب. متانول (M)، کلروفرم (Co)، هگزان (H)، اتیل استات (Et)، دی کلرومتان (Dic)، دی اتیل اتر (Die)، آب مقطر (DDW)

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱ : نمایش نتایج PCR از ژن 16SrDNA ایزوله های استرپتومایسس
M: مارکر 1Kb



شکل۲ : الکتروفورز محصولات PCR ژن 16SrDNA، ایزوله های SC91وSG41
پس از خالص سازی.
M: مارکر1Kb

بحث

در سال‌های اخیر مطالعات در زمینه جداسازی و شناسایی استرپتومایسس‌ها از مناطق مختلف ایران گزارش شده است (۷و۸). بررسی این منابع و داده‌ها نشان می‌دهد که تاکنون مطالعه جامعی در این زمینه انجام نگرفته است، لذا با توجه به اهمیت این باکتری‌ها در زمینه تولید انواع آنتی‌بیوتیک‌ها، مطالعه حاضر با هدف جداسازی و شناسایی استرپتومایسس‌های مستعد و فعال مولد این مواد از خاک‌های مناطق مختلف آذربایجان شرقی صورت پذیرفت که یکی از جامعترین و دقیق‌ترین آنها در منطقه شمال غرب کشور است. بر اساس مطالعات صورت گرفته باکتری‌های استرپتومایسس بزرگترین گروه باکتری های تولید کننده متابولیت‌های ثانویه، بویژه مواد ضدباکتریایی و ضد قارچی هستند (۲) که به منظور استحصال این مواد صدها مرکز وگروه تحقیقاتی، در گوشه و کنار دنیا بر روی این ارگانیسم‌ها، مطالعه وتحقیق می‌کنند (۷،۸،۱۲،۱). از طرفی این مسئله زمانی اهمیت می یابد که بدانیم باکتری‌های بیماری زا با گذشت زمان نسبت به آنتی بیوتیک‌های در دسترس از خود مقاومت نشان می‌دهند (۷) و عملا این مواد از حیطه درمان خارج

www.SID.ir

Archive of SID

می‌شوند. جهت فائق آمدن به این مقاومت نیاز به آنتی‌بیوتیک‌های جدید است که واقعا می‌توان گفت تنها ابزار و منبع موجود برای تولید آنتی‌بیوتیک‌های موثر، میکروارگانیسم‌ها بویژه استرپتومایسس‌ها هستند. در همین راستا و با هدف جداسازی و غربالگری استرپتومایسس‌های فعال، نمونه خاکهایی از مناطق مختلف آذربایجانشرقی جمع آوری ومطالعه شد. مطالعات بر روی خاک‌های مناطق مختلف نشان داد که مناطق بکر نظیر ارتفاعات و خاکهای دست نخورده که در آنها کشت و زرع نمی‌شود دارای پتانسیل جمعیتی بالا و در عین حال متنوعی از باکتری‌هاست که این موضوع با بررسی‌های Oskay و همکاران به سال ۲۰۰۴ که در مناطق جنگلی و کشاورزی کشور ترکیه انجام شده بود مطابقت دارد (۵). غربالگری اولیه با روش همپوشانی صورت گرفت که یک متد بسیار مناسب برای بررسی فعالیت‌های آنتاگونیستی بین میکروارگانیسم هاست بطوری که با مقایسه داده های این مرحله با غربالگری ثانویه چنین به نظر می‌رسد نمونه‌هایی که در غربالگری اولیه خود را فعال نشان دادند، مانند ایزوله‌های SD21وSI82، در مرحله استخراج متابولیت و بررسی آنها با میکروارگانیسم‌های آزمایشی غیرفعال بودند که دلیل آن عدم همجواری پاتوژن‌ها با این ایزوله ها و از بین رفتن فضای رقابتی میان آنهاست. به همین دلیل هم هیچ ماده محدود کننده‌ای از خود منتشر نمی‌کنند و بر عکس این قضیه هم مشاهده شد، برای مثال ایزوله‌هایSF51وSB33 در گزینش اولیه فعالیت قابل توجهی نداشتند اما در غربالگری ثانویه از جمله فعال ترین ایزوله‌ها بودند که توانستند هر چهار پاتوژن را با قدرت محدود کنند که این نتیجه با پیش‌بینی‌هایی که قبلا توسط Bushell و همکاران (۱۹۹۳) ارائه شده بود همخوانی دارد (۱۲). برای غربال‌گری ثانویه روش انتخابی ما، روش بهبود یافته انتشار از دیسک بود زیرا تست انتشار راهی معمول برای تشخیص فعالیت ضد باکتریایی در ایزوله‌هایی است که فعالیت مشخصی ندارند (۷). 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 آنتی‌بیوتیک است (۷ و۱۳). در هنگام استفاده از این روش به نکات ریزی باید توجه داشت تا نتیجه کاملی بدست آورد، از آن جمله: دما، pH ،غلظت نمک و غلظت آگار، pH از آن جهت مهم است که بعضی از مواد ضد باکتریایی در محیط اسیدی موثرند مانند نیتروفورانتوئین و برعکس موادی مانند آمینوگلیکوزیدها در محیط‌های 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، هر چه وزن مولکولی مواد منتقله از دیسک، کم‌تر باشد به همان نسبت به فاصله دورتری منتشر شده وقطر هاله عدم رشد بزرگتر می‌شود (۷). اگرچه اندازه هاله به تنهایی تعیین کننده قدرت اثر ماده ضد باکتریایی استحصال شده و یا حساسیت میکروب مورد آزمایش نیست (۱۳)، اما با توجه به داده های جدول ۳ و با مشاهده نمودار ۱ (الف) به نظر می‌رسد که باکتری‌های *B.cereus* و *S.aureus* بیش از دیگر میکروارگانیسم‌های آزمایشی محدود شده اند که این مطلب یافته‌های Scherrerو Gerhardt در سال ۱۹۷۱ را تایید می‌کند که باکتری‌های گرم مثبت در مقابل متابولیت های تولیدی استرپتومایسس‌ها حساسیت بیشتری دارند که دلیل آن شاید عدم وجود لیپیدهای سرشار در دیواره سلولی از جمله لیپوپلی ساکارید در این باکتری هاست (۱۲). از مقایسه نتایج جدول ۳ و بررسی نمودار ۱ (ب) این نکته حاصل می‌شود که از بین حلال هایی که برای استخراج متابولیت‌ها استفاده شد حلال غیرقطبی اتیل استات و قطبی آب بسیار مناسب است که احتمالا اولی متابولیت‌های غیر قطبی و دومی متابولیت‌های قطبی را از محیط کشت (مایع رویی) بیرون می‌کشد. در زمینه شناسایی استرپتومایسس‌ها از روش‌های مولکولی نظیر هیبریداسیون DNA-DNA، برش آنزیمی DNA کامل باکتری، RAPD-PCR و مقایسه توالی‌های ژن 16SrDNA استفاده می‌شود که در بین روش های فوق استفاده از ژن 16SrDNA به دلیل دقت بالا در سالهای اخیر معمولتر است (۱۴). مستندترین مورد در سال۱۹۹۱ توسط Stackebrandt و همکاران گزارش شد که برای تقسیم بندی استرپتومایسس‌ها از این ژن بهره جست که توسط روش‌های دیگر طبقه‌بندی از جمله تست بیوشیمیایی و تاکسونومی عددی Numerical taxonomy هم حمایت شد (۵). دلیل برتری ژن 16SrDNA از آن جهت است که در طول تکامل، کمترین جهش و تغییر را به خود دیده است از طرفی پنج ناحیه α , β , γ , δ و ε در ترادف نوکلئوتیدی آن مشخص شده که از تنوع کافی برای شناسایی استرپتومایسس‌ها برخوردار است. بویژه ناحیه γ که برای رده بندی در سطح سویه پیشنهاد شده است (۵و۱۱و۱۳). اهمیت منطقه γ در بین نواحی فوق به این دلیل است که به انتهای ۵ نزدیکتر است (از نوکلئوتید203-158) که این مسئله باعث می‌شود در هنگام توالی یابی بطور کامل خوانده شود. لذا می توان با در دست داشتن ترادف نوکلئوتیدی آن، ایزوله مورد نظر را با دقت بالایی شناسایی و ثبت کرد (۱۱).

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که ایزوله های جدیدی در نمونه خاک‌های استان آذربایجان شرقی وجود دارند که توانایی تولید مواد ضد باکتریایی جدیدی دارند.

تقدیر و تشکر

از ریاست محترم پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال غرب و غرب کشور جناب آقای دکتر محمد امین حجازی به خاطر حمایتهایشان سپاسگزاریم. بر خود لازم می‌دانیم از آقایان وطن دوست، خسروی، اسلامی، محرمی، و نیز آقای موسویان به خاطر همکاری و کمک های ارزنده شان قدردانی نماییم.

www.SID.ir

Archive of SID

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. Oskay M, Usame Tamer A, Azeri C. Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *Africa Biotech* 2004; **3**(9): 441-446.
4. 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.
5. Stackebrandt E, Liesack W, Web R, Wett D. Towards a molecular identification of Streptomyces species in pure culture and in environmental samples. *Actino* 1991; **5**: 38-44.
6. Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acids Res* 1990; **18**: 6531-6535.
7. Salami F.[Isolation and determination of Streptomyces that produce antibiotic from soil] *Paj & Saz* 2004; **64**: 41-47.(Persian)
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 EB, Gottlieb D. Cooperative description of type cultures of Streptomyces. II. Species descriptions from first study. *Int J Syst Bac* 1968; **18**: 69-189.
10. Shirling EB, Gottlieb D. Cooperative description of type cultures of Streptomyces. III. Additional Species descriptions from first and second studies. *Int J Syst Bac* 1968; **18**: 279-392.
11. Kreuze F, Suomalainen S, Paulin L, Valkonen PT. Phylogenetic Analysis of 16S rRNA Genes and PCR Analysis of the nec1 Gene from Streptomyces spp. *Phito* 1999; **89**(6): 462-469.
12. Pandey B, Ghimire P, Agrawal VP. Studies on the antibacterial activity of the Actinomycetes isolated from the Khumbu Region of Nepal (Tribhuvan University) 2002.(unpublished data)
13. Hash John H. *Method in Enzymology* 1975; **43**:1-24.
14. Anderson AS, Wellington MH. The taxonomy of Streptomyces and related genera. *Int Sys and Evo Mic* 2001; **51**: 797-814.

www.SID.ir