

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 میکروبیشناسی، دانشکده پزشکی تبریز و مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
لاله یارسا یگانه: بخش تحقیقات ژنومیکس، مدیریت منطقه شمال غرب و غرب کشور (تبریز)، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی
ابولفضل برزگری: بخش تحقیقات ژنومیکس، مدیریت منطقه شمال غرب و غرب کشور (تبریز)، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی
هادی ملکی کاکلر: بخش تحقیقات ژنومیکس، مدیریت منطقه شمال غرب و غرب کشور (تبریز)، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی

دریافت: ۸۸/۴/۳۱، پذیرش: ۸۹/۱۱/۱۶

چکیده

زمینه و اهداف: اکتینومیسیت ها باکتری هایی گرم مثبت و رشته ای هستند که بخش بزرگی از میکروارگانیسم های خاک را شامل می شوند. بر اساس مطالعات، سه چهارم کل آنتی بیوتیک ها را اکتینومیسیت ها تولید می کنند. در این خانواده، جنس استرپتومایسس از اهمیت خاص دارد. در همین راستا غربالگری برای فعالیت ضدباکتریایی و نیز شناسایی مولکولی استرپتومایسس های جدا شده از خاک های استان آذربایجان شرقی با استفاده از ژن 16SrDNA انجام شد.

مواد و روش ها: اکتینومیسیت ها از نمونه خاک های استان آذربایجان شرقی جدا سازی 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 استخراجی ایزوله های 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 باکتری های منتخب استخراج، وژن 16SrDNA این ایزوله تکثیر و توالی یابی شد. نتایج حاصل با استفاده از برنامه های بیوانفورماتیک آنالیز شده و ایزوله های مذکور شناسایی شدند.

یافته ها: از ۱۱۰ نمونه خاک جمع آوری شده، ۳۱۰ ایزوله اکتینومیسیت جدا سازی شد، در غربالگری 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 ABRINW EA1145 در NCBI با کد رهگیری GQ925802 ثبت شد.

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان می دهد خاک های استان آذر بایجان شرقی غنی از ایزوله های فعال در زمینه تولید مواد آنتی باکتریایی جدیدی بوده که نیازمند بررسی های بیشتری است.

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

مقدمه

را در همه اکوسیستم ها از جمله خاک، آب، رسوبات دریایی و نیز آب های گرم مشاهده کرد. اما محیط زیست اصلی آنها خاک بوده

اکتینومیسیت ها، پروکاریوت هائی هستند که بصورت آزاد، ساپروفیت و گاه همزیست با گیاهان بسر می برند و می توان آنها

جهت جداسازی اکتینومیست ها ۵ گرم از نمونه های خاک خشک شده در ۵۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژیک استریل اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در انکوباتور شیکر ۲۸ درجه سانتی گراد تکان داده شد. سپس سری رقت تهیه شد و از رقت ۱۰^{-۳}، ۱۰^{-۴} و میکرولیتر به محیط کشت Starch Casein Agar انتقال داده و گسترش دادیم و پلیت های حاصل را در دمای C 28° به مدت هفت روز انکوبه کردیم. بعد از هفت روز کلنی های اکتینومیست که به طور معمول ویژگی هایی همچون رنگ سفید و ظاهری خشک و گچی روی محیط کشت S.C.A (Starch Casein Agar) و نیز بویی شبیه خاک دارند مشخص می شوند. در مرحله بعدی از رنگ آمیزی گرم و روش کشت اسلایدی می توان برای شناسایی مورفولوژیکی کلنی های استریپتومایسس استفاده کرد. بعد از جدا سازی، تک کلنی ها در دمای 4°C و یا به حالت استوک در دمای -80°C در محیط S.C.A نگهداری نمودیم (۹، ۱۰).

برای جداسازی اکتینومیست های فعال از نظر تولید مواد آنتی باکتریال غربالگری در دو مرحله جداگانه انجام یافت که برای هر دو مرحله از میکرو ارگانسیم های آزمایشی زیر که از کلکسیون های میکروبی موجود در کشور تهیه شده بود استفاده شد. *Escherichia coli ATCC 1399*, *Klebsilla pneumoniae 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 ایزوله ها کشت داده شده و پس از ۳۰ دقیقه پاتوزن ها که قبلا با نسبت ۱ به ۵ با محیط مولر هیتون آگار ترکیب شده و در بن ماری ۴۰ درجه سانتی گراد نگهداری شده بودند به محیط S.C.A اضافه شدند. پلیت ها به مدت ۱۰ روز در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. پس از ۱۰ روز پلیت های فقط پاتوزن رشد کرده به عنوان غیرفعال، پلیت های که هم ایزوله و هم پاتوزن مشاهده شدند کم فعال و پلیت های که فقط ایزوله های اکتینومیست رشد کردند بعنوان فعال انتخاب شدند.

جهت گزینش ثانویه پس از آنکه ایزوله ها در مرحله گزینش اولیه، از نظر پتانسیل ضد باکتریایی تست شدند، نمونه های 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°C محیط های کشت مایع جمع شده و سانتریفوژ شدند مایع رویی با حجم های برابر از ۷ نوع حلال قطبی و غیرقطبی مخلوط شد (جدول ۳) و در انکوباتور شیکردار 28°C با دور 180 rpm به مدت ۱ 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 شدند و به حجم 10^{CC} رسانیده شدند و در درون شیشه های پنی سیلین در دمای 4°C نگهداری شدند (۱). متابولیت های استخراج شده با روش انتشار از دیسک (Blank Disk) با دیسک های خالی (Blank Disk)

و جمعیت بزرگی از فلور طبیعی را تشکیل می دهند (۱). از نظر رده بندی این باکتری ها، جنس های مهمی مانند: میکرومونوسپورا *Micromonospora*، نوکاردیا *Nocardia* و استریپتومایسس را شامل می شوند که در بین آنها جنس استریپتومایسس به دلیل داشتن جمعیت ۶۰ درصدی اکتینومیست ها از اهمیت زیادی برخوردار است (۲).

استریپتومایسس ها بزرگترین ژنوم را در بین باکتری های اکتینومیست دارا بوده و در صد C+G فوق العاده بالایی دارند. طولانی بودن ژنوم توانایی تولید انواعی از متابولیت های ثانویه Secondary metabolite را به آنها می بخشد که آنتی بیوتیک ها از جمله این متابولیت ها هستند. بر اساس مطالعات، حدود ۷۰ درصد کل آنتی بیوتیک های شناخته شده متعلق به این باکتری هاست (۱). استریپتومایسس ها جایگاه برجسته ای در زمینه مطالعات به منظور غربالگری جهت تولید مواد آنتی بیوتیکی، ضدسرطانی و متابولیت های غذایی و غیره دارند که سالانه ده ها ماده مفید در زمینه دارویی، کشاورزی، غذایی و صنعتی از این باکتری ها جداسازی و به بازار مصرف ارائه می شود (۳). البته اولین قدم در راستای این امر مهم، جداسازی و شناسایی سویه های مستعد و فعال این گروه از باکتری هاست. در حال حاضر رایج ترین روش ها برای شناسایی و طبقه بندی این باکتری ها، استفاده از ویژگی های مورفولوژیک و بیوشیمیایی و نیز مقایسه توالی ژن های مختلف آنهاست (۴) که در بین این ژن ها، ژن 16SrDNA بدلیل حفظ ترادف در طول تکامل جهت شناسایی باکتری ها بسیار مناسب است (۵، ۶).

در کشور ما نیز مطالعات در زمینه جداسازی و شناسایی استریپتومایسس ها از مناطق مختلف گزارش شده است (۷، ۸). بررسی این منابع و داده 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 کشورهای منطقه است که می توان سویه های استریپتومایسس قدرتمندی در زمینه تولید متابولیت های ثانویه بویژه آنتی بیوتیک ها، در آن 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 استریپتومایسس های مناطق مختلف استان آذربایجان شرقی از جهت خواص آنتی باکتریایی بررسی شده و سویه های فعال با استفاده از ژن 16SrDNA شناسایی شده اند.

مواد و روش ها

نمونه های خاک از مناطق مختلف استان آذربایجان شرقی از عمق ۱۰-۱۵cm (افق A) برداشت شد (۳). سپس این نمونه ها به ظروف ویژه ای نگهداری نمونه انتقال یافت. سپس ویژگی های منطقه مانند عرض جغرافیایی، ارتفاع، شیب محل و تیپ خاک یادداشت گردیدند. نمونه ها پس از انتقال به آزمایشگاه در دمای یخچال 4°C نگهداری شدند.

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 باکتریایی در مقابل حداقل یک میکروارگانیزم 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. از طرفی مشخص می‌شود باکتری لیستریا مونوسیتوز با ۲۳/۵۲ درصد از کل پلیت‌های فعال حساس‌ترین باکتری نسبت به مواد ترش‌ساز 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. ایزوله‌های دیگر که هیچ فعالیتی نداشته و یا فعالیت شان ضعیف بود انتخاب نشدند (جدول ۴).

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 و کوچکترین هاله عدم رشد با ۳۱ mm 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 ۱۶/۴۳ بود. در بین ۱۲ ایزوله، ایزوله SB33 با ۱۶ (۱۳/۷۹) مورد محدودیت فعالیت‌های استرپتومایسس در مقابل پاتوژن‌ها 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 دیگر باکتری‌ها 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 با ۲۸/۴۴ درصد و حلال قطبی آب با ۲۶/۷۲ درصد ایجاد محدودیت برای پاتوژن‌ها، حلال‌هایی مناسب جهت استخراج متابولیت‌های موثر استرپتومایسس‌ها هستند.

با مقایسه نتایج حاصل از گزینش اولیه و ثانویه به این نتیجه رسیدیم که ایزوله‌های فعال گزینش اولیه (SI82 و SD21) وقتی در محیط کشت مایع که ارگانیزم‌های پاتوژن در آن وجود ندارد قرار می‌گیرند هیچ فعالیتی از خود نشان نمی‌دهند و یا ایزوله‌های کم فعال گزینش اولیه (SB33 و SF51) وقتی در محیط مایع قرار گرفتند بیشترین فعالیت را از خود نشان دادند (جدول ۴).

با قطر ۶mm در مقابل پاتوژن‌های استاندارد تست شده و اندازه هاله‌های عدم رشد اطراف هر دیسک قرائت شد. هاله‌هایی که قطر بیش از ۸ mm 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°C انکوبه شدند. سپس باکتری‌ها از روی پلیت‌ها برداشته شده و همراه با بافر لیز کننده (Tris (pH:7.4) 10mM:EDTA 1mM:SDS 0.5%:Proteinase K 0.1mg/ml) به داخل ازت مایع منتقل شدند. سپس در دور ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند، مایع رویی برداشته شد و با ۵۰۰۰ میکرولیتر محلول کلروفرم-ایزوامیل‌الکل در دور ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس ایزوپروپانول سرد به آن اضافه و مجدداً سانتریفیوژ شد. مایع رویی دور ریخته شده و ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر به ویال‌ها اضافه شده و در فریزر -20°C درجه نگهداری شد (۱۱).

برای طراحی جفت آغازگر اختصاصی، توالی‌های 16SrDNA گونه‌های استرپتومایسس ثبت شده (Accession numbers: AF008220, Y15502, D63861, M35377) در GenBank/EMBL/DBJ تهیه و با استفاده از برنامه Meg Alignment جایگاه‌های مشترک گونه‌ها شناسایی و براساس انتهای ۳' و ۵' این قطعات با استفاده از برنامه OLIGO5، پرایمر طراحی و توسط شرکت سینازن سنتز شد (جدول ۱).

واکنش زنجیره ای پلی مرز (Polymerase Chain Reaction) در حجم ۱۵ میکرولیتر (DNA 1μl:PF 0.5μl:PR 0.5μl:dNTP 2μl:10xPCR buffer with MgSO₄ 2μl:Taq 0.3μl:DMSO 3μl::DW 5.7μl) برای تکثیر ژن 16SrDNA استفاده شد که شامل برنامه زیر بود: دناتوراسیون اولیه (Primary (denaturing) ۹۶ (۲ دقیقه) [دناتوراسیون ۹۶ (۱ دقیقه) اتصال (Annealing) ۵۵ (۱ دقیقه) بسط (Extension) ۷۲ (۲ دقیقه) که سه مرحله اخیر در ۳۵ دور انجام گرفت] بسط نهایی ۷۲ (۱۰ دقیقه) برای تفکیک قطعات تکثیر یافته از ژل آگاروز ۱ درصد استفاده شد.

یافته‌ها

از ۱۱۰ نمونه خاک جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان آذربایجان شرقی ۳۱۰ ایزوله اکتینومیسست در فرم خالص جداسازی و فعالیت آنتی باکتریایی شان مورد بررسی قرار گرفت. این ایزوله‌ها بصورت استوک در دمای 80°C 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 می‌شود که رابطه معنی داری بین pH خاکی که ایزوله از آن گرفته شده و قدرت ضد باکتریایی ایزوله وجود دارد. چنانکه دیده می‌شود تقریباً همه نمونه‌هایی که

جدول ۱: آغازگرهای اختصاصی توالی های 16SrDNA

AF :5' AGAGTTTGATCCTGGCTC 3'	AR: 5'AAGGAGGTGATCCCAGCC3'
------------------------------	----------------------------

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	بز	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 باکتری های آزمایشی* در گزینش اولیه

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

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

مشاهده می شود 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 توالی یابی به شرکت سیناژن 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 SC91 با ۹۷٪ به *Streptomyces sampsonii*، سویه SG41 با ۹۶٪ به *Streptomyces mediolani* و سویه SE45 با ۹۹٪ 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.

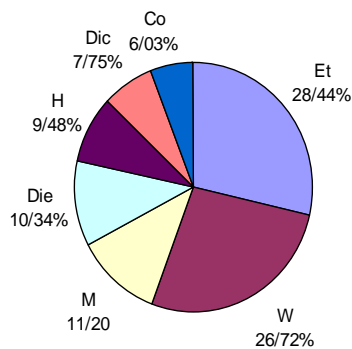
توالی های 16SrDNA با استفاده از جفت پرایمر طراحی شده، با تکنیک PCR تکثیر شد و با توجه به اینکه آغازگرها از روی قسمت های ابتدایی و انتهایی توالی های 16SrDNA گونه های استریپتومایسس ثبت شده در GenBank/EMBL/DDBJ طراحی شده بود و نیز به دلیل اختصاصی بودن آغازگرها، انتظار قطعات تکثیر یافته ۱۵۰۰ جفت نوکلئوتید را داشتیم که شکل (۱) آن را نشان می دهد. پس از تکثیر قطعات ژن 16SrDNA، مرحله بعدی توالی یابی آنهاست. که از میان ۱۲ ایزوله فعال گزینش ثانویه، ۴ ایزوله SB33، SG41، SC91 و SE45 به ترتیب با ۱۳/۷۸، ۱۱/۲۰، ۹/۴۸ و ۱۱/۳۰ درصد ایجاد محدودیت برای پاتوژن ها جهت توالی یابی ژن 16SrDNA انتخاب شدند که در ادامه فقط بررسی های مولکولی ایزوله های SG41 و SC91 نشان داده می شود. باندهای قطعات 16SrDNA ایزوله های SC91 و SG41 در شکل ۱

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

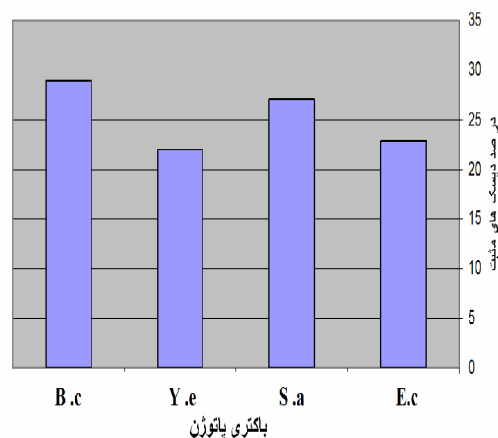
* *E. coli* (E.c): *S. aureus* (S.a): *Y. enterocolitica* (Y.e): *B. cereus* (B.c)
 ** متانول (M)، کلروفورم (Co)، هگزان (H)، اتیل استات (Et)، دی کلرومتان (Dic)، دی اتیل اتر (Die) و آب مقطر دو بار استریل (DDW)

تاثیر نوع حلال در استخراج متابولیت



ب

اثر متابولیت های استخراجی بر پاتوژن ها

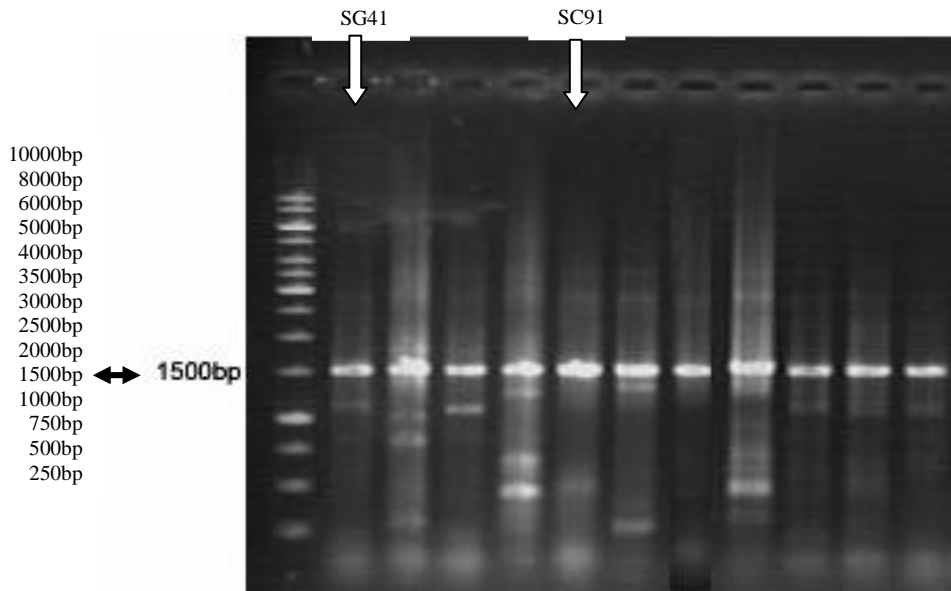


الف

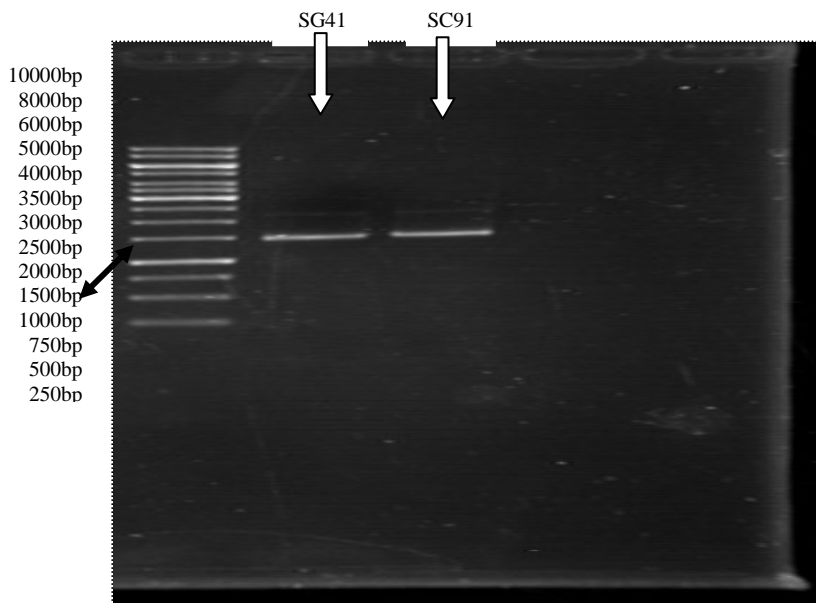
نمودار ۱: اثر متابولیت های استخراجی بر پاتوژن ها (الف) و تاثیر حلال ها در استخراج متابولیت ها (ب).

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

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



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



شکل ۲: الکتروفورز محصولات PCR ژن 16SrDNA، ایزوله های SG41 و SC91
پس از خالص سازی.
M: مارکر 1Kb

بحث

در سال های اخیر مطالعات در زمینه جداسازی و شناسایی استرپتومایسس ها از مناطق مختلف ایران گزارش شده است (۸۷). بررسی این منابع و داده ها نشان می 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 و شناسایی استرپتومایسس های مستعد و فعال مولد این مواد از خاک های مناطق مختلف آذربایجان شرقی صورت پذیرفت که یکی از جامعترین و دقیقترین آنها در منطقه شمال غرب کشور

است. بر اساس مطالعات صورت گرفته باکتری های استرپتومایسس بزرگترین گروه باکتری های تولید کننده متابولیت های ثانویه، بویژه مواد ضدباکتریایی و ضد قارچی هستند (۲) که به منظور استحصال این مواد صدها مرکز و گروه تحقیقاتی، در گوشه و کنار دنیا بر روی این ارگانسیم ها، مطالعه و تحقیق می کنند (۱، ۷، ۸، ۱۲). 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 می دهند (۷) و عملاً این مواد از حیطه درمان خارج

جدول ۳ و با مشاهده نمودار ۱ (الف) به نظر می‌رسد که باکتری‌های *S.aureus* و *B.cereus* بیش از دیگر میکروارگانیسم‌های آزمایشی محدود شده اند که این مطلب یافته‌های Gerhardt و Scherrer در سال ۱۹۷۱ را تایید می‌کند که باکتری‌های گرم مثبت در مقابل متابولیت‌های تولیدی استرپتومایسس‌ها حساسیت بیشتری دارند که دلیل آن شاید عدم وجود لپیدهای سرشار در دیواره سلولی از جمله لیپولی ساکارید در این باکتری هاست (۱۲). از مقایسه نتایج جدول ۳ و بررسی نمودار ۱ (ب) این نکته حاصل می‌شود که از بین حلال‌هایی که برای استخراج متابولیت‌ها استفاده شد حلال غیرقطبی اتیل استات و قطبی آب بسیار مناسب است که احتمالاً 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 روش‌های فوق استفاده از ژن 16SrDNA به دلیل دقت بالا در سال‌های اخیر معمولتر است (۱۴). مستندترین مورد در سال ۱۹۹۱ 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 (۱۳ و ۱۱). اهمیت منطقه γ در بین نواحی فوق به این دلیل است که به انتهای ۵ نزدیکتر است (از نوکلئوتید 203-158) که این مسئله باعث می‌شود در هنگام توالی یابی بطور کامل خوانده شود. لذا می‌توان 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 ایزوله‌های 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 کمک‌های ارزنده‌شان قدردانی نماییم.

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 آذربایجان شرقی جمع‌آوری و مطالعه 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 میکروارگانیسم‌هاست بطوری که با مقایسه داده‌های این مرحله با غربالگری ثانویه چنین به نظر می‌رسد نمونه‌هایی که در غربالگری اولیه خود را فعال نشان دادند، مانند ایزوله‌های SD21 و SI82 در مرحله استخراج متابولیت و بررسی آنها با میکروارگانیسم‌های آزمایشی غیرفعال بودند که دلیل آن عدم همجواری پاتوژن‌ها با این ایزوله‌ها 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 ایزوله‌های SF51 و SB33 در گزینش اولیه فعالیت قابل توجهی نداشتند اما در غربالگری ثانویه از جمله فعال‌ترین ایزوله‌ها بودند که توانستند هر چهار پاتوژن را با قدرت محدود کنند که این نتیجه با پیش‌بینی‌هایی که قبلاً 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 آنتی‌بیوتیک از یک منبع به یک سطحی از محیط کشت جامد باعث ایجاد یک هاله بازدارنده رشد می‌شود، قطر این هاله متناسب با لگاریتم غلظت آنتی‌بیوتیک است (۷ و ۱۳). 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 نیتروفوران‌توین 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 و قطر 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 داده‌های

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 arbitrary 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.