شناسایی استرپتومایسس‌های خاک لواسان و بررسی پتانسیل آنتاگونیستی آن‌ها

Identification of Lavasan Soil Streptomyces and Their Antagonistic Potential

سید حسام توابع قوامی[۱]، ابوالقاسم قاسمی[۲*] و ثمین صدیق[۳]

دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۲ پذیرش: ۱۳۹۵/۲/۲

چکیده

استرپتومایسس‌ها گروهی از باکتری خاکزی و عموما ساپروفیت هستند که تاکنون بیش از ۴۰۰ گونه از آن‌ها توصیف شده است و تعداد کمی از گونه‌های آن بیماری‌زای گیاهی است. این باکتری‌ها در بسیاری از محیط‌های طبیعی وجود داشته و تولید آنتی‌بیوتیک از مشخصات بارز آن‌ها می‌باشد. تعداد معدودی از آن‌ها رابطه انگلی با جانوران و گیاهان داشته که از آن جمله می‌توان به عامل بیماری اسکب معمولی سیب‌زمینی اشاره نمود. در این تحقیق از خاک مزارع و باغ‌های منطقه لواسان در عمق ده تا ۳۰ سانتی‌متری نمونه‌برداری شده و نمونه‌ها پس از خشک و الک شدن به روش سری رقت در محیط کازئین-گلیسرین-آگار (CGA) کشت و پس از یک هفته کلنی‌های دارای اسپور و با مشخصات استرپتومایسس انتخاب و به محیط جدید منتقل و تکثیر گردید. جدایه‌ها براساس خصوصیات فنوتیپی شامل رنگ و شکل اسپور، رنگ کلنی و تولید ملانین، مصرف هیدروکربن‌ها و تولید آنتی‌بیوتیک در محیط کشت به سه گروه اصلی دسته‌بندی و نماینده گروه‌ها با استفاده از توالی آران‌ای ریبوزومی شناسایی و فیلوژنی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. در مجموع ۳۸ جدایه از ۲۰ نمونه خاک جداسازی شد که نتایج نشان داد جدایه‌ها به گونه‌های *S. kanamyceticus*، *S. violascens*، *S. akiyoshiensis* و *S. ambofaciens* با شباهت بیش از ۹۹ درصد تعلق داشتند.

واژگان کلیدی: استرپتومایسس، آنتاگونیست، آنتی‌بیوتیک، خاک

۱ - دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا، ورامین، ایران.

۲- عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات گیاه پزشکی، تهران، ایران.

۳- استادیار، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین- پیشوا، ورامین، ایران

نویسنده مسئول مکاتبات: idghasemi@yahoo.com

مقدمه

استرپتومایسس‌ها (Streptomyces) از جمله باکتری‌های گرم مثبت خاکزی هستند که ژنوم آن‌ها دارای GC بالا در حدود ۶۹-۷۳ درصد می‌باشد (Gomez-Escribano and Bibb, 2014)، که در راسته اکتینومایست‌ها (Actinomycetes) قرار دارند. این میکروارگانیسم از نظر تاکسونومی در جایگاه ذیل قرار می‌گیرد:
Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria(class); Actinobacteriadae; Actinomycetales; Streptomycineae; Streptomycetaceae; Streptomyces

اکتینومیسیت‌ها پروکاریوت‌هائی هستند که به‌صورت آزاد، ساپروفیت و گاهی به صورت همزیست با گیاهان به سر می‌برند و می‌توان آن‌ها را در همه اکوسیستم‌ها از جمله خاک، آب، رسوبات دریائی و نیز آب‌های گرم مشاهده کرد؛ اما محیط زیست اصلی آن‌ها خاک بوده و جمعیت بزرگی از فلور طبیعی آن را تشکیل می‌دهند. بیش از ۵۰۰ گونه استرپتومایسس وجود دارد که ظاهر خشک کلنی بالغ، فشردگی طبیعی و رنگ آن بر روی محیط آگاردار تشخیص کلنی‌های استرپتومایسس را آسان می‌کند. این باکتری‌ها کاربردهای بی‌شماری دارند و موارد کاربرد آن‌ها در پزشکی، کشاورزی، جنگل و بیوتکنولوژی بسیار گسترده است به‌طوری‌که نیمی از آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی و تولیدی جهان از استرپتومایسس ها به‌دست می‌آید (حنیفه‌زاده و همکاران، ۱۳۸۸).

استرپتومایسس‌ها بزرگ‌ترین ژنوم را در بین باکتری‌های اکتینومیست دارا بوده که این طولانی بودن ژنوم عامل توانایی تولید انواعی از متابولیت‌های ثانویه از جمله آنتی‌بیوتیک‌ها در آن‌ها است. نزدیک به۵۰ درصد از استرپتومایسس‌های خاک بیش از ۵۰۰ ماده آنتی‌بیوتیکی مجزا تولید می‌کنند، تعداد زیادی از این ترکیبات از لحاظ شیمیایی ساختار مشخص دارند (Baltz, 2016).

اولین آنتی‌بیوتیک کشف شده از استرپتومایسس‌ها، استرپتومایسین است که در سال ۱۹۴۰توسط واکسمن و همکاران کشف شد و به دنبال آن طی ۵۰ سال، حدود ۴۰۰۰ آنتی‌بیوتیک از منشأ باکتری‌های اکتینومیست شناسایی شده است (Wong *et al*., 2012). از سوی دیگر، میکروارگانیسم‌ها بخش جدایی‌ناپذیر اکوسیستم‌ها بوده و به عنوان محرک رشد گیاه با مکانیسم‌های مختلفی مانند انحلال فسفات آلی و معدنی (Oliveira *et al*., 2009; Ahmad *et al*., 2008)، تثبیت نیتروژن (Ahmad and Khan, 2011)، سیدروفور (Khamna *et al*., 2009) و سنتز ایندول استیک اسید (Sadeghi *et al*., 2012) نیز می‌باشند.

بهبود قابلیت دسترسی عناصر غذایی، کیفیت و عملکرد محصول به وسیله گروه‌های مختلف میکروبی به‌طور گسترده گزارش شده است (Figueiredo *et al*., 2008; Araújo *et al*., 2008). استفاده از مایه تلقیح میکروارگانیسم¬های محرک رشد گیاه در کشاورزی پایدار برای افزایش عملکرد محصول و کاهش استفاده از آفت¬کش‌ها و کودهای شیمیایی نقش به سزایی بازی می¬کند (Adesemoye and Kloepper, 2009).

یکی از راه‌های مناسب جهت کنترل بیماری‌های ناشی از قارچ‌های بیماری‌زا با حداقل اثرات نامطلوب، استفاده از روش‌های کنترل بیولوژیک است. برخلاف عوامل سنتتیک، موادی که به صورت میکروبیولوژیکی از گونه¬های مؤثر گرفته شده¬اند سمیت کم‌تر داشته، به راحتی قابل تجزیه بوده و آلرژی¬زایی کمی دارند. به¬علاوه این مواد در محصولات غذایی انباشته نمی¬شوند و نیز برای کاربرد در مقیاس صنعتی مقرون به صرفه می¬باشند. بسیاری از اکتینومیست¬ها، به ویژه گونه¬های استرپتومایسس، ترکیبات گوناگونی از قبیل آنتی¬بیوتیک¬ها، آنزیم¬های هیدرولیتیک از قبیل کیتیناز¬ها و بازدارنده¬های آنزیمی در برابر قارچ‌های بیماری‌زای گیاهان تولید و ترشح می¬کنند (Zakalyukina *et al*., 2007).

هدف از این تحقیق بررسی وجود گونه‌های استرپتومایسس در خاک‌های لواسان و پتانسیل تولید آنتی‌بیوتیک و تنوع زیستی آنها بوده‌است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی اکتینومیست‌ها

در این تحقیق نمونه‌برداری مرکب از خاک‌های مزارع و باغ‌های مختلف در منطقه لواسان از عمق ده تا ۳۰ سانتی‌متری خاک انجام شد (جدول۱). نمونه‌ها به طور جداگانه مخلوط و در دمای اتاق به مدت ۱۰-۷ روز در معرض هوای خشک قرار گرفت. سپس نمونه‌های خاک از الک با مش ۰/۸ میلی‌متری عبور داده و به میزان۱۰ گرم از هر نمونه خاک مورد نظر با ۹۰ میلی لیتر آب مقطر سترون داخل شیشه‌های درب دار ۲۰۰ میلی‌لیتری مخلوط و روی شیکر دوار (۳۰ دقیقه و*rpm*۱۳۰) قرار داده شد. پس از آن نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه به حالت ساکن رها شده و سپس سری رقت از طریق رقیق کردن متوالی سوسپانسیون خاک، غلظت‌های $۱۰^{-۳}$، $۱۰^{-۴}$، $۱۰^{-۵}$ و $۱۰^{-۶}$ تهیه گردید (Saadoun *et al*., 1999; Lee and Hwang, 2002).

یک میلی‌لیتر از رقت‌های متوالـــی $۱۰^{-۳}$، $۱۰^{-۴}$، $۱۰^{-۵}$ و $۱۰^{-۶}$ به دست آمده در هر یک ازتشتک‌های پتری سترون ریخته (هر رقت در سه تکرار) و مقدار ۲۵-۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت CGA (در دما تقریبی ۴۵ درجه سلسیوس) به آن اضافه گردید و روی میز کار آزمایشگاه به آرامی حرکت داده شده تا سوسپانسیون خاک کاملاً با محیط کشت مخلوط شود. تشتک‌ها دردما ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری (Saadoun *et al*., 1999) و پس از ۱۰-۷ روز، پرگنه‌های اکتینومیست و همچنین برخی قارچ‌ها و باکتری‌ها روی محیط کشت پدیدار شدند. از هر پرگنه اکتینومیست، کشت خطی روی محیط کشت CGA جدید تهیه و نمونه‌های خالص در دمای ۲۸ °C تکثیر شدند (Shahidi Bonjar, 2004).

جدول ۱- مشخصات نمونه‌های جمع‌آوری شده

Table 1. Location and type of soil collected

ردیف Index	محل نمونه‌برداری Sampling location	نوع کشت Cultivar type	ردیف Index	محل نمونه‌برداری Sampling location	نوع کشت Cultivar
1	روستای افجه(باغات گل نوار) Afjeh Village	باغات گیلاس Cherry gardens	11	روستای افجه(باغات بنه رود) Afjeh Viallage (Bane rood gardens)	زراعی Crop
2	روستای افجه(باغات حاشیه رودخانه) Afjeh village (Riverside gardens)	باغات گیلاس Cherry gardens	12	روستای افجه (باغات محله شیراز) Afjeh Viallage (Mahaleh shiraz gardens)	زراعی Crop
3	روستای افجه(باغات پشت جنگل) Afjeh Village (Gardens behind the forest)	باغات گیلاس Cherry gardens	13	روستای افجه(باغات محله‌ی اون دست) Afjeh Viallage (Oon dast gardens)	زراعی Crop
4	روستای سینک(باغات همبوسنان) Sinak Village (Hamboosnan gardens)	باغات گیلاس Cherry gardens	14	روستای افجه دشت هویج Afjeh Viallage (Dasht havij)	زراعی Crop
5	روستای انباج (باغات بخش سیال) Anbaj Village (Siaal Gardens)	باغات گیلاس Cherry gardens	15	روستای افجه(تپه زارعی چهار چشمه) Afjeh Viallage (Chahar cheshmeh crop hill)	زراعی Crop
6	روستای ابناج(باغات بخش کیله میان) Anbaj Village (Killeh mian gardens)	باغات گیلاس Cherry gardens	16	روستای کند(باغات کند بالا) *Kond village (Kond-e-Olya gardens)*	زراعی Crop
7	روستای برگ جهان(تپه های پاچان) Barg e Jahan (Paachaan hills)	زراعی Crop	17	روستای ناصر آباد Naserabad village	زراعی Crop
8	روستای سبو کوچک باغات(دره آسیاب) Sabboo Koochake Baghaat (Dareh Asiaab	زراعی Crop	18	روستای راحت آباد Rahatabad village	زراعی Crop
9	روستای یاران(زمین زراعی صحرای ناران) Yaaraan Village (Naran Desert Land)	زراعی Crop	19	روستای بوجان Bujan Village	زراعی Crop
10	روستای هنزک(باغات تپه گنجی) Hanzak village (Tapeh ganji gardens)	زراعی Crop	20	روستای سینک Sinak Village	باغ سیب و گیلاس Apple and cherry gardens

بررسی خصوصیات فنوتیپی

در این تحقیق ویژگی ظاهری و میکروسکوپی جدایه به شرح ذیل مورد بررسی قرار گرفت:

رنگ توده میسیلیوم هوایی هر جدایه در محیط ISSA (Inorganic Salt Starch Agar) مورد بررسی قرار گرفت (Locci, 1989). رنگ کلنی‌ها از پشت محیط کشت: به رنگهای بژ، ارغوانی، صورتی، قرمز، قرمز بنفش، زرد و زرد متمایل به سبز ارزیابی شد. تولید رنگریزه ملانین در جدایه‌ها از دیگر آزمون‌های افتراقی مورد ارزیابی بود. مورفولوژی زنجیره اسپور در استرپتومایسس‌ها از دیگر خصوصیات گونه‌های این جنس است که به فرم‌های مارپیچی، صاف و انعطاف‌پذیر تقسیم‌بندی می‌شوند. جهت تعیین نوع زنجیره اسپور، جدایه‌ها روی محیط YMEA (yeast malt extract agar) کشت شدند، سپس یک لامل استریل در کنار خطوط کشت شده در محیط فرو برده شد تا هم سطح محیط گردد و زنجیره اسپور باکتری پس از رشد بر روی لام گسترش پیدا کند. لام حاوی زنجیره اسپور باکتری با استفاده از میکروسکوپ نوری و بزرگنمایی ۱۰X و ۴۰ X مشاهده گردید. رنگ کلنی جدایه‌ها روی محیط کشت YMEA بعد از ۱۰ تا ۱۴روز در دمای ۳۰ درجه سلسیوس بررسی شد.

ویژگی‌های بیوشیمیایی

خصوصیات فیزیولوژیکی شامل توانایی در هضم کازئین، تیروزین و زانتین، مصرف منابع مختلف کربنی و هضم اسیدهای آمینه، تولید ملانین و مصرف اوره در جنس استرپتومایسس دارای اهمیت بوده و مورد بررسی قرار گرفت (Shirling and Gottlieb, 1966).

توانایی جدایه¬ها در استفاده از منابع مختلف کربنی با قندهای گروه *ISP* شامل: دی زایلوز، دی گلوکز، ال آرابینوز به روش شاد (Schaad *et al*., 2001) و محیط پایه هیوارد استفاده شد. محیط پایه طبق فرمول ارائه شده تهیه شد. قبل از اضافه کردن آگار محلول ۴۰ درصد NaOH به صورت قطره‌ای به محیط پایه اضافه شد تا pH محیط به ۷/۱ – ۷ (رنگ سبز زیتونی) برسد. یک گرم از هر قند یا اسید آمینه در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد (۱۰ ٪) قندها و اسیدهای آمینه با روش تندالیزاسیون (جوشاندن در آب جوش به مدت ۲۰ دقیقه طی سه روز متوالی) سترون شدند. ده میلی‌لیتر از محلول هر قند یا اسید آمینه جداگانه با ۹۰ میلی‌لیتر محیط پایه مخلوط شد. از محیط مذکور به مقدار ۵ میلی‌لیتر در لوله‌های آزمایش ریخته و جدایه‌های باکتری به‌طور جداگانه به لوله‌ها تلقیح منتقل و در حرارت ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از چهار هفته نتایج بررسی شد و تغییر رنگ سبز محیط داخل لوله‌های حاوی قند به زرد به‌عنوان مصرف این ترکیبات و تولید اسید تلقی گردید. تغییر رنگ سبز محیط به آبی در مورد اسیدهای آلی یا اسیدهای آمینه به‌عنوان مصرف و تولید قلیا تلقی شد. استفاده از اسیدهای آمینه به روش (Faucher *et al*., 1997) و آزمون تولید اوره آز به روش Dye انجام شد. جهت تولید ملانین، هر یک از جدایه‌ها روی محیط PYIA (Pepton yeast Extract Iron Agar) کشت و به مدت ۹۶ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری و بررسی شدند (Lindholm *et al*., 1977).

عدم بیماری‌زایی استرین‌ها

ابتدا غده سیب‌زمینی رقم کنکورد و اگریا با آب شستشو و سپس با هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد به مدت ۳ دقیقه ضدعفونی سطحی و آب‌شویی گردید. از قسمت وسط غده قطعاتی به اندازه ۲ سانتی‌متر مربع تهیه و در تشتک‌های پتری استریل قرار داده شدند. از هر جدایه کشت شده بر روی محیط غذایی Oat Meal Agar (کشت‌های ۱۴روزه)، قطعه‌ای از محیط کشت برداشته شده و به‌طور وارونه روی قطعات سیب‌زمینی قرار گرفت. از محیط OMA تلقیح نشده به‌عنوان شاهد منفی استفاده شد. پتری‌ها در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۳ تا ۵ روز نگهداری شدند (Loria *et al*., 1995).

آزمون فعالیت آنتاگونیستی استرین‌ها

پتانسیل آنتاگونیستی جدایه‌های جدا شده از خاک باغات و مزارع منطقه لواسان با استفاده از قارچ *Geothrichum candidum* به‌عنوان یک قارچ حساس ارزیابی گردید. هر جدایه در وسط پتری حاوی محیط کشت Oat Meal Agar به مدت هفت روز کشت و سپس سوسپانسیون اسپور قارچ مذکور در سطح پتری‌ها افشانه شده و پس ازگذشت ۴۸ ساعت هاله بازدارندگی مورد ارزیابی قرار گرفت.

آنالیز عددی داده‌های فنوتیپی

آنالیز داده‌های حاصل از آزمایشات فنوتیپی به این صورت انجام شد، که داده‌ها در صورت مثبت بودن با کد یک و منفـی بودن با کـد صفـر مشخص شد و مرتب‌سازی داده‌ها در نرم افزار Excel انجام گرفت. داده‌های حاصل به نرم افزار NTSYS PC وارد شدند. دندروگرام بین جدایه‌ها به روش UPGMA با ترسیم خوشه‌ای انجام گرفت (Maniatis *et al*., 1982).

شناسایی و فیلوژنی جدایه‌ها با استفاده از PCR

استخراج DNA ژنومی

جدایه‌ها به مدت ۴ روز بر روی محیط ISSA تکثیر و سپس به روش CTAB استخراج DNA صورت گرفت (Hung *et al*., 2000).

تکثیر 16sRNA و تعیین توالی آن

هریک از جدایه‌های مورد بررسی، با استفاده از جفت آغازگر fD2 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') و rP1 (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') به شرح ذیل تکثیر شد:

واکنش در حجم ۳۵ میکرولیتر شامل ۳/۵ میکرولیتر بافر ده برابر غلظت PCR (Tris-HCl ،۵۰۰ mM KCl با اسیدیته ۸/۴)، دو میلی‌مولار کلرید منیزیم ($MgCl_2$)، ۰/۲ میلی‌مولار دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات (dNTPs)، ۱۰ پیکومول از هر یک از آغازگرها، یک میکرولیتر DNA الگو و یک واحد آنزیم پلیمراز (Taq Polymerase) (سیناژن، ایران) در ترموسایکلر بیورد (Bio-Rad, USA) انجام شد.

تکثیر با آغازگرهای فوق با برنامه دمایی، شامل یک چرخه واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت چهار دقیقه سپس ۳۲ چرخه شامل واسرشته‌سازی DNA ژنومی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال آغازگر به رشته الگو در دمای ۵۲ درجه سلسیوس، به مدت ۴۵ ثانیه، گسترش رشته جدید در دمای ۷۲ درجه سلسیوس، به مدت ۷۵ ثانیه و یک مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت هفت دقیقه انجام شد (Weisburg *et al*., 1991). محصول PCR با دستگاه الکتروفورز افقی مینی ژل مدل سیگما روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با ولتاژ ثابت ۷۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز گردید. برای ارزیابی اندازه قطعات محصول PCR، از مارکر استاندارد 100bp استفاده شد(Rademaker *et al*., 2000).

تعیین توالی و آنالیز کامپیوتری توالی‌ها

محصولات PCR نمونه‌های مورد نظر جهت تعیین توالی، به شرکت‌های مرتبط ارسال و تعیین توالی صـورت می‌گرفت. تعیین توالی در هر دو جهت سنس و آنتی‌سنس توسط شرکت تکاپوزیست و در شرکت ماکروژن کره انجام و توالی‌های حاصل با استفاده از نرم افزار DNAStar همردیف و مرتب شده و در پایگاه NCBI داده‌ها بلاست و شباهت نمونه‌ها با گونه‌های شناخته شده تعیین گردید. فیلوژنی نمونه‌های تعیین توالی شده به همراه نمونه‌های نزدیک و خارج از گـروه با استفـاده از نرم افـزار Clustal W همردیف و سپس در نرم افزار MEGA ورژن ۶ با

استفاده از الگـوریتم کم‌ترین تکامل (Minimum evolution) کلاستر مربوطه ترسیم و مورد مقایسه قرار گرفت (Tamura, *et al*., 2013).

نتایج

نمونه‌برداری و جداسازی

از ۲۰ نمونه خاک جمع‌آوری شده از مناطق مختلف لواسان در نهایت ۳۸ جدایه با خصوصیات کلنی استرپتومایسس شامل تولید هیف‌های رویشی رشته‌ای با انشعابات کوتاه چسبیده و فرو رفته در محیط کشت که این هیف‌ها تولید رشته‌های هوایی در محیط کشت YMEA جداسازی شدند. در این بررسی همه جدایه‌هایی که روی محیط کشت YMEA کلنی‌های مجزا چرمی به رنگ‌های مختلف ایجاد کردند و با مسن شدن کلنی، میسلیوم‌های هوایی (اسپوروفور) تولید نمودند، به جنس *Streptomyces* تعلق داشتند.

خصوصیات فنوتیپی جدایه‌های استرپتومایسس

جدایه‌های مختلف دارای رنگ‌های سیاه، سفید، قهوه‌ای، زرد و خاکستری از پشت پتری بودند. رنگ اسپورها نیز از سفید، قهوه‌ای، تیره و زرد در سطح محیط کشت دیده می‌شد. جدایه‌های مختلف از نظر شکل اسپور نیز دارای اسپورهای مارپیچی و ساده بودند (جدول ۲). در آزمون‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی جدایه‌ها گرم مثبت و هوازی بودند. تعداد کمی از استرین‌ها در محیط Peptone Yeast Iron Agar(PYIA) تولید ملانین کردند. بیش‌تر استرین‌ها گلوکز، آرابینوز و زایلوز را مصرف نمودند و در روی دیسک‌های سیب زمینی ایجاد بیماری نکردند. استرین‌ها توان تولید آنتی‌بیوتیک و بازدارنگی از رشد قارچ *Geothrichum candidum* را داشتند و به‌عنوان عامل بالقوه آنتاگونیست شناسایی شدند. استرین‌های مورد مطالعه در بازدارنگی از رشد قارچ *Geotrichum candidum* مورد بررسی قرار گرفته و تمامی جدایه‌های منتخب قادر به ایجاد هاله بیش از ۱۵ میلی‌متر در محیط کشت شدند.

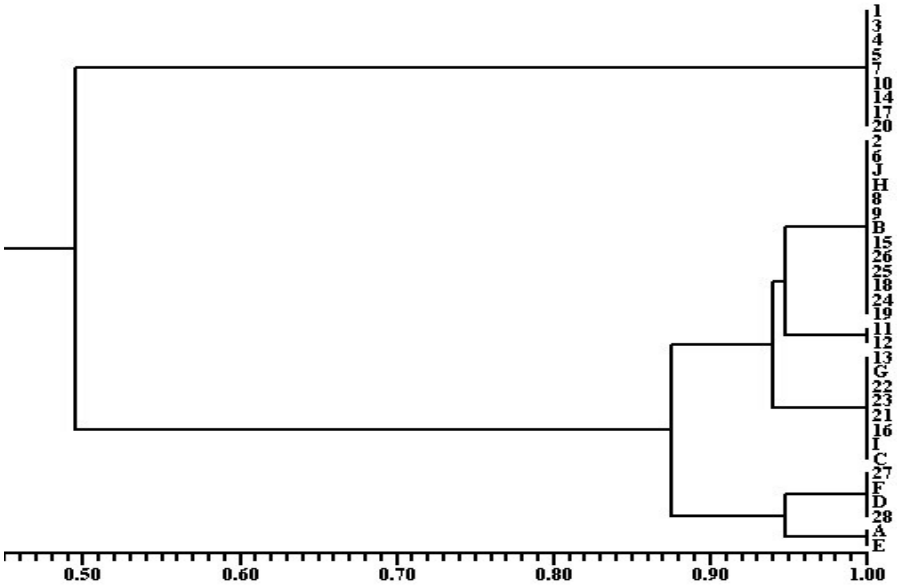
جدول ۲- خصوصیات فنوتیپی استرین‌های استرپتومایسس جدا شده از خاک لواسان

Table 2. Phenotypic characteristics of Streptomyces strains isolated from Lavasan soil

Reaction واکنش	Characteristics	خصوصیات
+	Gram reaction	واکنش گرم
_	Anaerobic growth	رشد بی‌هوازی
مارپیچی – انعطاف پذیر Spiral- Flexible	Spor shape	نوع اسپور
سفید، خاکستری و زرد White, yellow&Gray	Spor color	رنگ اسپور
سفید، خاکستری و زرد White, yellow&Gray	Colony color	رنگ کلنی
بی‌رنگ، قهوه‌ای و تیره Colorless, Brown & Dark	Colony back color	رنگ کلنی از پشت
V-	Melanin production	تولید ملانین
-	Use from:	استفاده از :
V+	Glucose	گلوکز
V+	Xylose	زایلوز
V+	Arabinose	آرابینوز
+	Antibiotic production	تولید آنتی‌بیوتیک
-	Pathogenicity on the disk of potatoes	بیماری‌زایی روی دیسک سیب‌زمینی

گروه‌بندی استرین‌های جدا شده از خاک لواسان براساس خصوصیات فنوتیپی

با بررسی‌های به عمل آمده بر روی نتایج حاصل از آزمایشات فنوتیپی جدایه‌های مورد مطالعه در سه گروه مجزا تفکیک گردیدند شکل (۱) دندروگرام به‌دست آمده با روش گروه‌بندی UPGMA و براساس ضریب جاکارد بر مبنای خصوصیات مهم فنوتیپی و بیوشیمیایی که در این تحقیق استفاده گردید، سه گروه عمده را مشخص نمود. گروه اول جدایه‌های ۱، ۳، ۴، ۵، ۷، ۱۰، ۱۴، ۱۷ و ۲۰ بودند که کاملاً شبیه هم بودند. گروه دوم شامل جدایه‌های ۲، ۶، J، H، ۸، ۹، B، ۱۵، ۲۵، ۲۶، ۱۸، ۲۴، ۱۹، ۱۱، ۱۲، ۱۳، G، ۲۲، ۲۳، ۲۱، ۱۱ و I و C بودند که با ۹۵ درصد شباهت در گروه دوم قرار گرفتند. گروه سوم نیز شامل استرین‌های ۲۷ و ۲۸، F، D، E و A بودند که شباهت آن‌ها با هم حدود ۹۵ درصد بوده است. گروه اول با دو گروه دیگر حدود ۵۰ درصد شباهت فنوتیپی داشته و دو گروه دیگر نیز با هم حدود ۸۸ درصد شبیه بوده که هر یک از این دو گروه نیز به گروه‌های کوچک‌تری تقسیم می‌شدند.

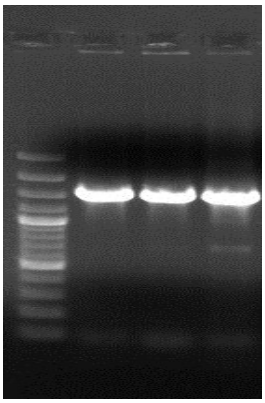


شکل ۱- دندروگرام تشابه جدایه‌ها براساس آزمون‌های فنوتیپی استرین‌های استرپتومایسس جدا شده از خاک لواسان استفاده از نرم افزار NTCY`S با روش جور شدن ساده

Fig. 1. Similarity dendrogram of isolates based on phenotypic tests of Streptomyces strains isolated from Lavasan soil using NTCY`s software with simple matching method

شناسایی مولکولی استرین‌ها

همه استرین‌های منتخب در تکثیر قطعه 16sRNA تولید قطعه ۱۵۰۰ جفت بازی نمودند (شکل ۲).

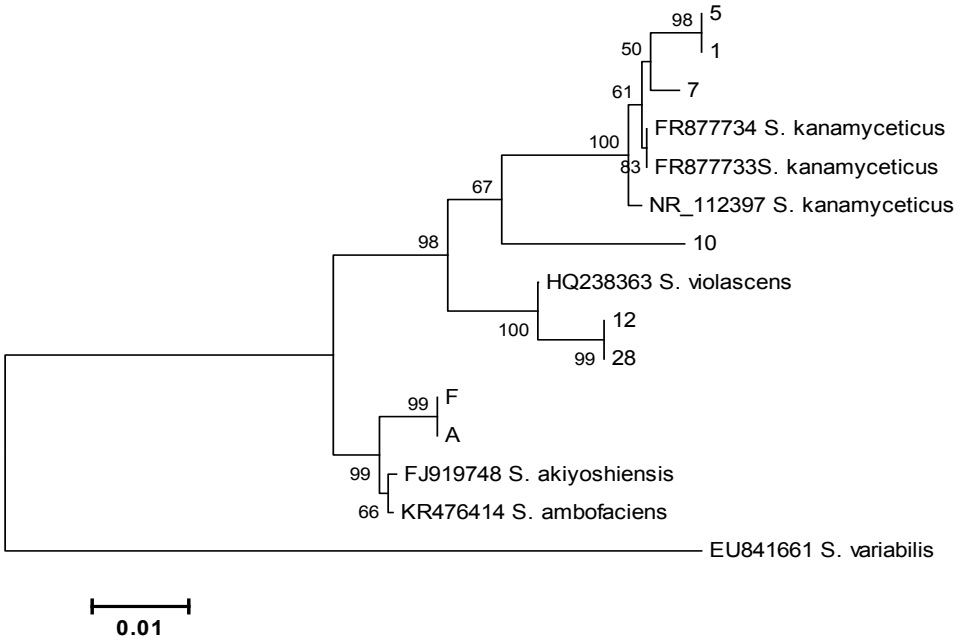


شکل ۲- تکثیر قطعه ۱۵۰۰ جفت بازی استرین‌های استرپتومایسس جدا شده از خاک لواسان با آغازگر RP1/FD2

Fig. 2. The PCR product of 1500 bp streptomyces strains isolated from Lavasan soil with RP1 / FD2 primer

پس از تعیین توالی به بررسی میزان قرابت جدایه‌های خاک منطقه لواسان با جدایه‌های نزدیک به آن‌ها در بانک‌های اطلاعاتی پرداخته شد، به این منظور پس از مقایسه دو توالی پیشرو و برگشت از هشت استرین منتخب از خاک‌های لواسان و تعیین توالی قطعی آن‌ها توالی‌های مورد نظر با توالی‌های موجود در بانک ژن (NCBI) با نرم افزار Blast هم‌ردیف و به همراه توالی‌های موجود در بانک NCBI با استفاده از الگوریتم Clustalw هم‌ردیف و سپس به روش Bootstrap-Neighbour Joining با استفاده از نرم افزار مگا ۶ فیلوژنی جدایه‌ها ترسیم گردید (Altschul, 1990; Tamura *et al*., 2013). درخت فیلوژنی رسم شده براساس مقایسه توالی 16sRNA استرین‌های ۱، ۵ و ۷ با استرین‌های گرفته شده از بانک ژن نشان داد که جدایه‌های مذکور به میزان ۹۹ درصد با نمونه‌های *Streptomyces kanamyceticus* در بایگانی NCBI شباهت دارد و استرین ۱۰ کمی کم‌تر و به میزان ۹۸ درصد با این گونه شباهت داشته و به این گونه تعلق دارند (شکل ۳).

استرین‌های ۱۲ و ۲۸ به میزان بیش از ۱۰۰ درصد با گونه *S. violascens* شباهت داشته و به‌عنوان این گونه شناسایی می‌شود. استرینهای *F* و *A* به میزان ۹۹ درصد با دو گونه *S. akiyoshiensis* و *S. ambofaciens* شباهت داشته و به این دو گونه متعلق می‌باشند و با استفاده از این توالی قابل تفکیک نبودند.



شکل ۳- دندروگرام فیلوژنتیکی هشت استرین استرپتومایسس جدا شده از خاک مناطق مختلف لواسان در مقایسه با تعدادی از گونه‌های شناخته شده جنس استرپتومایسس براساس توالی ژن 16SRNA با استفاده از نرم افزار مگا-۶ با ۱۰۰۰ بوتسترپ

Fig. 3. The phylogenetic dendrogram of eight strains of Streptomyces isolated from different parts of Lavasan soil compared with some known species of Streptomyces genus based on the sequence of the 16SRNA gene using Mega-6 software with 1000 boostrap

بحث

جداسازی و تعیین ویژگی‌های اکتینومایست‌ها از زیستگاه‌های متنوع نه تنها به درک نقش این میکروارگانیسم‌ها در اکوسیستم‌ها کمک می‌کند بلکه برای دست یافتن به سویه‌هایی با کاربردهای صنعتی، دارویی و کشاورزی دارای اهمیت است. اکتینومایست‌ها سازگاری‌های فیزیولوژیک و مورفولوژیک پیچیده‌ای را در خاک ایجاد می‌نمایند، بنابراین ممکن است نسبت به سایر گروه‌های میکروبی کم‌تر تحت تأثیر عوامل نامساعد محیطی قرار بگیرند. این گروه از میکروارگانیسم‌ها نه تنها یک گروه غالب از میکروفلور خاک را تشکیل می‌دهند، بلکه قادرند تحت شرایط تنشی اسپور تشکیل داده و زنده بمانند. از سوی دیگر آن‌ها می‌توانند به‌طور مؤثری ریشه گیاهان را اشغال نموده و منجر به بهبود رشد گیاه گردند (Sadeghi *et al*., 2012).

گزارش‌های مختلفی در ارتباط با اثر آنتاگونیستی اکتینومیست‌های جدا شـده از خـارک علیـه قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی منتشر شده است. بسیاری از اکتینومیست‌ها خصوصاً گونه‌های استرپتومایسس، عوامل کنترل زیستی وسیع‌الطیفی در برابر پاتوژن قارچی گیاهان هستند. فعالیت آنتاگونیستی استرپتومایسس‌ها به قارچ‌های پاتوژن به‌طور معمول مربوط به تولید ترکیبات ضدقارچی و آنزیم‌های هیدرولیتیک است (دهناد و همکاران، ۱۳۹۴). بیش از ۹۰ ٪ آنتی‌بیوتیک‌های تولید شده توسط اکتینومایست‌ها و بیش از پانصد نوع آنتی‌بیوتیک توسط استرپتومایسس‌ها تولید می‌شود (Brock and Madigan, 1991; Illing *et al*., 1989) برخی از استرپتومایسس‌ها قادر به تولید بیش از یک نوع آنتی‌بیوتیک می‌باشند که حتی ممکن است از نظر شیمیایی به یکدیگر وابسته نباشند علاوه بر تولید بیش از ۶۰ درصد تمام آنتی بیوتیک‌های شناخته شده، بیش از ۷۰ % تولیدات تجاری باکتریایی توسط استرپتومایسس‌ها صورت می‌گیرد (Yang and Kao, 1991). در مجموع بیش از ۵۰ نوع آنتی‌بیوتیک حاصل از تولیدات استرپتومایسس‌ها در درمان بیماری‌های انسان و دام، کشاورزی و تولید فراورده‌های صنعتی کاربرد دارند (Brock and Madigan, 1991). از نظر فیلوژنتیکی درخت فیلوژنی رسم شده براساس مقایسه توالی 16sRNA در سه استرین با استرین‌های گرفته شده از بانک ژن نشان داد که جدایه‌های مذکور به میزان ۹۹ درصد با نمونه‌های *Streptomyces kanamyceticus* در بایگانی NCBI شباهت دارد و یک استرین دیگر کمی کم‌تر و به میزان ۹۸ درصـد با این گونـه شباهت داشتـه و به این گونـه تعلق دارند. و دو استـرین نیز به میزان بیش از ۹۹ درصد با گونه *S. violascens* شباهت داشته و به عنوان این گونه شناسایی شدند. دو استرین دیگـر به میزان ۹۹ درصد با دو گونه *S. akiyoshiensis* و *S. ambofaciens* شباهت داشته و به این دو گونه تعلق داشتند که با استفاده از این توالی قابل تفکیک نبودند. با توجه به نتایج حاصل تعیین توالی ناحیه 16sRNA می‌تواند در تفکیک جدایه‌های استرپتومایسس بسیار دقیـق عمل کند اما برای تاییـد قطعـی نیاز به تعیین توالی یک یا دو ژن دیگر و استفـاده از آنالیـز چنـد ژنی می‌باشد، تا بتوان با دقت و ضریب خطای پایینی به شناسایی گونه‌های این جنس پرداخت. درخت فیلوژنی رسم شده براساس مقایسه توالی 16sRNA استرین‌های ۱، ۵ و ۷ با استرین‌های گرفته شده از بانک ژن نشان داد که جدایه‌های مذکور به میزان ۹۹ درصد با نمونه‌های *Streptomyces kanamyceticus* در بایگانی NCBI شباهت دارد و استرین ۱۰ کمی کم‌تر و به میزان ۹۸ درصد با این گونه شباهت داشته و به این گونه تعلق دارند.

استرین‌های ۱۲ و ۲۸ به میزان بیش از ۱۰۰ درصد با گونه *S. violascens* شباهت داشته و به عنوان این گونه شناسایی می‌شود. استرین‌های F و A به میزان ۹۹ درصد با دو گونه *S. akiyoshiensis* و *S. ambofaciens* شباهت داشته و به این دو گونه متعلق می‌باشند و با استفاده از این توالی قابل تفکیک نبودند. ضمن این‌که در منابع توصیف دقیقی از گونه‌های این جنس نشده است و با توجه به آزمون‌های محدود فنوتیپی شناسایی جدایه‌های استرپتومایسس عملا امکان‌پذیر نبوده و تنها می‌توان آن‌ها را با این روش گروه‌بندی کرد و برای مراحل بعدی از نماینده گروه‌ها استفاده نمود.

منابع References

حنیفه‌زاده، م.، بخشی خانیکی، غ. و دبیری، ش. ۱۳۸۸. جداسازی و بررسی تنوع ژنتیکی استرپتومایسس‌های جداسازی شده از خاک اردبیل با استفاده از تکنیک ARDRA و ERIC- PCR، پایان نامه کارشناسی ارشد، رشته بیوتکنولوژی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر.

دهناد، ع.، اسماعیلی، ا. و سلوکی، م. ۱۳۹۴. جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری‌های استرپتومایسس مولد آنزیم کیتیناز و بررسی آثار آنتاگونیستی آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی، فصلنامه علمی-پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها ۴(۱۵): ۱۲۳-۱۳۴.

Adesemoye, A. O. and Kloepper, J. W. 2009. Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. Applied Microbiology and Biotechnology 85: 1-12.

Ahmad, F., Ahmad, I. and Khan, M. S. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiological Research 163: 173-181.

Ahmad, M. and Khan, M. S. 2011. Toxicological effects of selective herbicides on plant growth promoting activities of phosphate solubilizing *Klebsiella sp*. strain PS19. Current Microbiology 62: 532-538.

Altschul, S. F., W. Gish, , W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology 215: 403-410

Araújo, A. P., Plassard, C. and Drevon, J. J. 2008. Phosphatase and phytase activities in nodules of common bean genotypes at different levels of phosphorus supply. Plant Soil 312: 129-138.

Baltz, R. H. 2016. Genetic manipulation of secondary metabolite biosynthesis for improved production in *Streptomyces* and other actinomycetes. Journal of industrial microbiology & biotechnology 43(2-3), 343-370.

Brock, T. D. and Madigan, M. T. 1991. Biology of Microorganism, 6th ed, Prentice Hall International, Inc., New Jersey, pp. 703-790.

Faucher, E., Paradis, E., Goyer, C., Hodge, N. C., Houge, R. and Stall, R. E. 1995. Characterization of *Streptomyces* causing deep-pitted scab of Potato in Quebec. International journal of systematic bacteriolog 45:222-225.

Figueiredo, M. V. B., Burity, H. A., Martínez, C. R. and Chanway, C. P. 2008. Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*. Applied Soil Ecology 40: 182-188.

Gomez-Escribano, J. P. and Bibb, M. J. 2014. Heterologous expression of natural product biosynthetic gene clusters in *Streptomyces coelicolor*: from genome mining to manipulation of biosynthetic pathways. Journal of industrial microbiology & biotechnology 41(2), 425-431.

Hung, T. H., Wu, M. L. and Su, H. J. 2000. A rapid method based on the one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique for detection of different strains of *Citrus tristeza virus*. Journal of Phytopathology 148: 469-475.

Illing, G. T., I. D. Normansell and J. F. Peberdy. 1989. Genetic mapping in *Streptomyces clavuligerus* by protoplast fusion. Journal of General Microbiology 135: 2299-2305.

Khamna, S., Yokota, A., Peberdy, J. F., and Lumyong, S. 2009. Antifungal activity of *Streptomyces spp*. isolated from rhizosphere of Thai medicinal plants. International Journal of Integrative Biology 6(3): 143-147.

Lee, J. Y. and Hwang, B. K. 2002. Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. Canadian Journal of Microbiology 48: 407-417.

Lindholm, P., Kortemaa, H., Kokkola, K., Salkinoja-Salonen, M., Valkonen, J. P. T., Korrtemaa, H., Kokkola, M., Haahtela, K., Salkinoja-Salonen, M. and Valkonen, J. 1997. Streptomyces spp. isolated from potato scab lesions under Nordic conditions in Finland. Plant Disease 81: 1317–1322.

Locci, R., 1989. Streptomycetes and related genera. Pp. 2451–2493. In: Williams, S. T., Sharpe, M. E., Holt, J. G. (eds.) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 2451–2493.

Loria, R., Bukhalid, R., Creath, R. A., Leiner, R. H., Olinier, M. and Steffans, J. C. 1995. Differential production of Thaxtomin by pathogenic Streptomyces species in vitro. Phytopathology 85: 537-541.

Maniatis, T., Fritisch, E. F. and Sambrook, J. 1982. Molecular Clonig: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, p. 545.

Oliveira, C. A., Alves, V. M. C., Marriel, I. E., Gomes, E. A., Scotti, M. R., Carneiro, N. P., Guimara˜es, C. T., Schaffert, R. E. and Sa, N. M. H. 2009. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. Soil Biology and Biochemistry 41: 1782-1787.

Rademaker, J. L. W., Hoste, B., Louws, F. J., Kersters, K., Swings, J., Vatuerin, L., Vatuerin, P. and Bruijn, F. J. de. 2000. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomona*s as a model system. Systematic Microbiology 50: 665-677.

Saadoun, I. F., Al-Momani, F., Malkawi, H. I. and Mohammad, M. J. 1999. Isolation, identification and analysis of antibacterial activity of soil *Streptomycetes* isolates from North Jordan. Microchemical Journal 100:41-46.

Sadeghi, A., Hessan, A. R., Askari, H., Aghighi, S. and Shahidi Bonjar, G. H. 2006. Biological control potential of two Streptomyces isolates on of *Rhizoctonia solani*, the causal agent of damping-off of sugar beet. Pakistan Journal of Biological Sciences 9: 904-910.

Sadeghi, A., Karimi, E., Dahaji, P. A., Ghorbani Javid, M., Dalvand, Y. and Askari, H. 2012. Plant growth promoting activity of an auxin and siderophore producing isolate of Streptomyces under saline soil conditions. World Journal of Microbiology and Biotechnology 28: 1503-1509.

Schaad, N. W., Jones. J. B. and Chun. W. 2001. Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria. 3rd ed. APS Press, St. Pual, Minnesota. 373 pp.

Shahidi Bonjar, G. H. 2004. Screening for antibacterial properties of some Iranian plants against two strains of *Escherichia coli*. Asian Journal of Plant Sciences 3: 310-314.

Shirling, E. B. and Gottlieb, D., 1966. Methods for character-ization of *Streptomyces* species. International journal of systematic bacteriology 16: 313–340.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6. 0. Molecular biology and evolution 30(12): 2725-2729.

Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. and Lane, D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology 173: 697–703.

Wong, W. R., Oliver, A. G. and Linington, R. G. 2012. Development of antibiotic activity profile screening for the classification and discovery of natural product antibiotics. Chemistry & Biology 19(11): 1483-1495.

Yang, S. S. and Kao, C. Y. 1991. Oxytetracycline production in solid state and submerged fermentation by protoplast fusion of *Streptomyces rimosus*. Proceedings of the National Science Council, Republic of China 15: 20-24.

Zakalyukina, Y. V. and Zenova, G. M. 2007. Antagonistic activity of soil acidophilic actinomycetes. Biology Bulletin 34(4), 329-332.