

بررسی خصوصیات ضد میکروبی برخی سویه‌های *Streptomyces* دریایی بر علیه سه بیمارگر گیاهی

۱. مهسا شمس؛ ۲. بهار شهنواز*

۱ و ۲. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۳/۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۳۰)

چکیده

در سال‌های اخیر، استفاده از متابولیت‌های ثانویه مانند آنتی‌بیوتیک‌ها به منظور کنترل زیستی عوامل بیماری‌زای گیاهی مورد توجه قرار گرفته است. این پژوهش با هدف جداسازی، شناسایی و بررسی فعالیت ضد میکروبی جدایه‌هایی از *Streptomyces* از دریای عمان علیه سه بیمارگر گیاهی *Fusarium oxysporum*، *Xanthomonas campestris* و *Erwinia amylovora* اجرا شد. سویه‌های *Streptomyces* روی محیط کشت‌های نشاسته کازین آگار، گلیسرول گلیسین آگار و نشاسته نترات آگار در غلظت‌های نمکی متفاوت جداسازی شدند. فعالیت ضد میکروبی سویه‌ها با استفاده از کشت تقاطعی و اندازه‌گیری هاله عدم رشد در برابر بیمارگرهای گیاهی اندازه‌گیری شد. ۹۰٪ این سویه‌ها قادر به تولید هاله مهارکنندگی رشد در برابر باکتری *X. campestris* بودند که بالاترین هاله 15 ± 1 میلی‌متر به دست آمد. دو سویه AC130 و AC275 برای استخراج ترکیب ضد میکروبی انتخاب شدند. این سویه‌ها در محیط‌های پیش‌کشت و تخمیری مختلفی کشت داده شدند. استفاده از محیط‌های تخمیری مختلف نشان می‌دهد که محیط دارای گلیسرول و سویا هاله بازدارندگی را افزایش می‌دهد. سویه‌های به دست آمده براساس ژن ۱۶S rRNA متعلق به گونه‌های *Streptomyces* sp. می‌باشند. جهت استخراج ترکیب ضد میکروبی از حلال آلی دی‌کلرومتان، کلروفرم و اتیل‌استات استفاده گردید. حلال دی‌کلرومتان در سویه AC130 و کلروفرم در سویه AC275 با ایجاد هاله مهارکنندگی ۲۱ و ۲۵ میلی‌متر مؤثرتر از سایر حلال‌ها بودند. این مطالعه نشان می‌دهد که برخی جدایه‌های *Streptomyces* در محیط‌های دریایی کمتر کاش شده، دارای قابلیت کنترل باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی می‌باشند که می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند.

کلیدواژه‌گان: *Streptomyces* دریایی، بیمارگرهای گیاهی، دریای عمان، فعالیت ضد میکروبی.

Evaluation of antimicrobial activity some of marine *Streptomyces* sp. against three plant pathogens

Mahsa Shams¹ and Bahar Shahnava^{2*}

1, 2. Former M. Sc. Student and Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

(Received: May 23, 2016 - Accepted: Jan. 19, 2017)

ABSTRACT

In recent years, application of secondary metabolites such as antibiotics has been considered as a biological control method for plant pathogens. This study aimed to isolate, identify and evaluate the antimicrobial activity of *Streptomyces* species in Oman Sea against three plant pathogens including *Fusarium oxysporum*, *Xanthomonas campestris* and *Erwinia amylovora*. The *Streptomyces* strains were isolated on different media including starch casein agar, glycerol glycine agar and starch nitrate agar with different NaCl concentration. Preliminary antimicrobial activity was investigated using cross streak method and evaluated by measuring the zone of growth inhibition against plant pathogens. Ninety percent of the strains were able to inhibit the growth of *X. campestris* strain and the highest inhibition zone was 15 ± 1 mm. Two strains, AC275 and AC130 were selected to extract the antimicrobial compound. The isolates were cultured in different seed cultures and fermentation media. The application of different fermentation media shows that glycerol and soybeans cultures increase inhibition zone. Based on 16S rRNA gene analysis, two strains were belonged to *Streptomyces* sp. The organic solvents including dichloromethane, chloroform and ethyl acetate were used in order to extract the antimicrobial compound. Dichloromethane in AC130 and chloroform in AC275 were more effective than other solvents by creating an inhibition zone of 21 and 25 mm respectively. This study shows that the *Streptomyces* species in less explored marine environment have the ability to control plant pathogenic bacteria.

Keywords: Antimicrobial activity, Marin *Streptomyces*, plant pathogens, sea Oman.

تازه‌های تحقیق

این پژوهش به تأثیر ترکیبات ضد میکروبی به دست آمده از سویه‌های *Streptomyces* sp. که از دریای عمان جداسازی شده‌اند، می‌پردازد. یکی از ویژگی‌های پژوهش حاضر این است که به جای رسوبات، آب دریا مورد استفاده قرار گرفته است. بر اساس مطالعات انجام شده، تاکنون پژوهشی بر مبنای جداسازی *Streptomyces* ها و بررسی خواص ضد میکروبی آنها در برابر بیمارگرهای گیاهی از دریای عمان گزارش نشده است.

مقدمه

نزدیک به نیمی از آنتی‌بیوتیک‌های کشف شده تا سال ۲۰۰۲ مشتقات محصولات طبیعی میکروبی بودند که منبع اصلی برای کشف داروهای جدید می‌باشند. در چند دهه اخیر تلاش‌ها برای کشف دارو از محصولات میکروبی کاهش یافته است که به دلیل کاهش میزان شناسایی متابولیت‌های جدید و مفید از آنها بوده است. موفقیت‌های محدود راهکارهای کشف جایگزین مانند استفاده از شیمی ترکیبی و همچنین افزایش بیمارگرهای مقاوم به چندین دارو سبب شد که توجهات دوباره به سمت اکتینوباکترها جلب شود که منبع مهمی برای محصولات ضد میکروبی هستند (Ng et al. 2013). اکتینومیست‌ها باکتری‌های گرم مثبت، هوازی و دارای درصد سیتوزین و گوانین بالا می‌باشند. این گروه از باکتری‌ها به دلیل قابلیت تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک و آنتی‌بیوتیک‌ها بسیار مورد توجه می‌باشند. تقریباً دو سوم آنتی‌بیوتیک‌ها و ۶۱ درصد از متابولیت‌های فعال زیستی میکروبی از اکتینومیست‌ها به ویژه *Streptomyces* حاصل شده‌اند (Thumar et al. 2010). تاکنون تنها ۱۰ درصد از اکتینومیست‌ها از طبیعت جداسازی شده‌اند (Duraipandiyan et al. 2010) و تلاش در جهت جداسازی اکتینومیست‌ها از محیط‌های ناشناخته‌تر مانند اقیانوس‌ها گامی مؤثر در جهت جداسازی اکتینومیست‌های جدید و احتمالاً کشف ترکیبات دارویی جدید باشد. زیرا تنوع متابولیکی و ژنتیکی اکتینومیست‌های دریایی نشان می‌دهد که محیط‌های دریایی منابعی بکر در جهت شناسایی ترکیبات فعال زیستی جدید هستند. در ۱۰ سال گذشته

تعداد ۶۵۹ ترکیب از باکتری‌های دریایی گرفته شده است که ۲۵۶ مورد از آنها از اکتینومیست‌ها منشأ گرفته است (Radhakrishnan et al. 2010). اکتینومیست‌ها در تولید برخی از هورمون‌های گیاهی مانند اندول استیک اسید و سیتوکینین نقش دارند که در مجموع باعث تقویت رشد گیاه می‌شوند. گونه‌های مختلف *Streptomyces* sp. و *Rhodococcus fascians* قادر به تولید این ترکیبات می‌باشند (Jog et al. 2012).

این باکتری‌ها از مکانیسم‌های مختلفی مانند تولید آنتی‌بیوتیک، تولید آنزیم‌های تخریب‌کننده دیواره باکتری‌ها، القای مقاومت میزبانی و رقابت برای کنترل میکروارگانیسم‌های بیمارگر استفاده می‌کنند (Palaniyandi et al. 2013). اکتینوباکتری‌های مفید در ریشه گیاهان استقرار یافته و با تولید آنتی‌بیوتیک سبب مهار رشد بیمارگر می‌شوند. از اولین آنتی‌بیوتیک‌هایی که در مهار بیمارگرهای گیاهی استفاده شد، می‌توان به سیکلوهورامید و استرپتومایسین اشاره کرد که توسط *S. griseus* تولید می‌شود. این باکتری‌ها آنتی‌بیوتیک‌های فراری تولید می‌کنند، که سبب ایجاد ناهنجاری‌های مورفولوژیکی در قارچ‌هایی مانند *Aspergillus giganteus* و *Penicillium viridicatum* می‌شود. اکتینوباکتری‌ها مکانیسم دفاع غیراختصاصی گیاهان را که به دو صورت مقاومت سیستمیک القایی (ISR)^۱ و مقاومت سیستمیک اکتسابی (SAR)^۲ می‌باشد، فعال می‌کنند. ISR توسط ریزوباکتری‌های و SAR توسط بیمارگرها و سالیلیک اسید القا می‌شود. اکتینوباکتری‌ها می‌توانند سبب فعال شدن این مکانیسم‌ها شوند. جلوگیری از رشد بیمارگرها با استفاده از رقابت برای کسب آهن بیشتر از سایر موارد مورد بررسی قرار گرفته است. غلظت آهن در ریزوسفر پایین می‌باشد، در این شرایط میکروارگانیسم‌ها برای به دست آوردن آهن شلاتورهای آهن (سیدروفور) با تمایل بالا تولید می‌کنند. این میکروارگانیسم‌ها به طور مؤثری در ریزوسفر ساکن می‌شوند و انواعی که دارای سیدروفور با تمایل پایین می‌باشند، حذف می‌شوند. در برخی اکتینومیست‌ها مشارکت سیدروفورها در جلوگیری از بیمارگرها گزارش شده است، مانند *S. griseus*، *S. albobinaceus* و

1. Induced Systemic Resistance
2. Systemic Acquired Resistance

دو غلظت مختلف نمک NaCl (۲۰ و ۲۶ گرم بر لیتر) استفاده شد. این محیط کشت‌ها شامل نشاسته کازبین آگار، گلیسرول گلیسین آگار و نشاسته نیترات آگار می‌باشد (جدول ۱). جهت جلوگیری از رشد قارچ‌ها آنتی‌بیوتیک سیکلوهاگزامید ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. به منظور جداسازی بهتر سویه‌ها و جلوگیری از رشد سایر باکتری‌ها، تیمار گرمایی نمونه آب در حمام آب گرم ۵۵ و ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. از نمونه آب سری رقت از 10^{-1} تا 10^{-4} تهیه شد و ۱۰۰۰ میکرولیتر از هر رقت با سه تکرار به محیط کشت اضافه و به کمک میله‌ای شیشه‌ای شکل پنخش شد و به مدت یک ماه در دماهای ۲۵ و ۳۰ درجه سلسیوس نگهداری شد. آنگاه حضور کلونی باکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

میکروارگانیزم‌های بیمارگر مورد استفاده

بیمارگرهای گیاهی *Erwinia amylovora* ATCC49946 و *Xanthomonas campestris* ATCC13951 از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران و PTCC5115 و *Fusarium oxysporum* از مرکز منطقه‌ای قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران خریداری شدند. قارچ *F. oxysporum* روی محیط کشت Potato (PDA) Nutrient (NA) dextrose agar و باکتری‌ها روی محیط agar کشت داده شدند و در دمای رشد ۳۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سویه‌های مورد نظر به منظور مطالعه در مراحل بعدی در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

بررسی تولید ترکیب ضد میکروبی

به منظور غربالگری اولیه، باکتری مورد نظر در مرکز پلیت کشت و پس از طی زمان لازم در دمای ۲۵ درجه سلسیوس باکتری‌ها و قارچ بیمارگر به صورت عمودی بر آن کشت داده شدند. هاله مهارکنندگی رشد پس از ۲۴-۱۸ ساعت گرماگذاری مورد بررسی قرار گرفت (Arifuzzaman et al., 2010). ترکیبات محیط کشت تأثیر عمده‌ای در تولید مواد ضد میکروبی دارند. به همین دلیل، دو محیط پیش کشت و سه محیط تخمیری مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱). یک

S. virginiae که سیدروفور آنها از تندش اسپور در *Moniliophthora perniciosa* جلوگیری می‌کند (Palaniyandi et al. 2013).

X. campestris باکتری گرم منفی، هوازی، غیرمتحرک و میله‌ای می‌باشد که منجر به لکه برگ و سوختگی گیاهان می‌شود (Leyns et al. 1984). *Erwinia amylovora* یکی دیگر از بیمارگر گیاهی محسوب می‌شود که سبب بیماری گال، نکروز و نرم شدن بافت‌های گیاهی است و بیماری فساد نرم باکتریایی و یا آتشک را در درختان میوه دانه‌دار مانند گلای، به و سیب ایجاد می‌کند (Vrancken et al. 2013). قارچ *F. oxysporum* عامل پژمردگی برگ‌ها و سرشاخه‌های گیاهی است که از طریق آوندها در گیاهان انتشار می‌یابد و منجر به بوته‌میری در محصولات جالیزی در تمامی مراحل رشد گیاه می‌گردد (Nelson et al. 1981).

هدف از انجام پژوهش جداسازی و شناسایی جدایه‌هایی از جنس *Streptomyces* دریای عمان به منظور بررسی پتانسیل قابلیت کنترل زیستی آنها می‌باشد. بررسی‌های ما نشان می‌دهد که تاکنون هیچ گونه بررسی بر روی *Streptomyces* های دریای عمان صورت نگرفته است.

مواد و روش‌ها

محل نمونه برداری و ویژگی‌های آن

نمونه آب از عمق ۱۰ متری ناحیه لیپار دریای عمان واقع در جنوب ایران با مختصات $25^{\circ} 51' E$ / $09^{\circ} N$ تهیه شد. میزان شوری آب دریای عمان به طور متوسط ۳۷ گرم بر لیتر می‌باشد و با افزایش عمق کاهش می‌یابد، به طوری که بیشترین میزان شوری آن در عمق صفر و کمترین میزان شوری در عمق ۳۰۰۰ متر می‌باشد. نمونه‌های آب در تاریکی و تحت شرایط استریل به آزمایشگاه منتقل شد. ویژگی‌های فیزیوشیمیایی نمونه توسط آزمایشگاه آنالیز دستگاهی دانشگاه فردوسی مشهد تعیین شد.

جداسازی گونه‌های *Streptomyces* و ترکیبات محیط کشت

جهت جداسازی باکتری‌ها از سه محیط کشت مختلف با

سپس، حدود ۲۵۰ میکرولیتر از ترکیبات استخراج شده روی دیسک‌های کاغذی ریخته و محیط مولر هینتون آگار حاوی بیمارگر مورد نظر منتقل شدند. حلال‌های آلی به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفتند. محیط کشت به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس قطر هاله عدم رشد باکتری اندازه‌گیری شد.

آنالیز آماری

به منظور بررسی معنادار بودن تأثیر هر یک از محیط‌های پیش‌کشت و تخمیری مورد بررسی بر روی هاله‌بازدارندگی رشد، آنالیز آماری با روش آنالیز واریانس (ANOVA) با استفاده از نرم‌افزار R و در سطح اطمینان ۹۵٪ انجام شد.

بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی و مولکولی سویه‌های منتخب

به این منظور رشد سویه‌های منتخب در غلظت‌های مختلف NaCl، در دماهای مختلف، وجود آنزیم‌های هیدرولازی مانند آمیلاز، ژلاتیناز، پروتئاز، سلولاز، اوره آز، سیتراز و تیروزیناز و تخمیر برخی قندها مورد بررسی قرار گرفت (Gulve and Deshmukh, 2014).

استخراج DNA ژنومی سویه‌های جداسازی شده، از کشت تازه و خالص آنها با استفاده از کیت تجاری (دنازیست، ایران) و براساس روش توصیه شده در آن صورت گرفت. آغازگرهای عمومی *Marchesi et al.* (27F) و *al.* (1998) 1492R (Lane 1991) به منظور تکثیر و تعیین توالی ژن DNA Sr۱۶ با استفاده از ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، بافر X_{10} ، ۰/۱۰ میلی‌مولار dNTP، ۰/۵ میکرومولار از هر پرایمر، ۰/۶ واحد تک پلیمرز با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر برای مخلوط واکنش، با استفاده از کیت Bioneer (شرکت سیناژن) انجام شد. برنامه دمایی PCR به صورت واسرشت‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۲۰ ثانیه، واسرشت‌سازی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها ۴۹ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، سنتز قطعه مورد نظر در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۹۰ ثانیه و گسترش نهایی

میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپوری حاصل به ۴۰ میلی‌لیتر از محیط پیش‌کشت اضافه شد و به مدت ۴۸ ساعت در ۲۰۰ دور در دقیقه و دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. سپس ۱۰ میلی‌لیتر از محیط پیش‌کشت حاوی سویه مورد نظر به ۲۰۰ میلی‌لیتر از محیط تخمیری تلقیح شد و به مدت ۷ روز به شیکر با دور ۲۰۰ دور در دقیقه و دمای ۳۰ درجه سلسیوس منتقل شد. محلول حاصل در دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد و فاز رویی حاصل برای مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

پس از گذشت ۷ روز، به منظور جداسازی ترکیبات ضد میکروبی، محیط‌های تخمیری با دور ۴۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفوژ شدند. در مرحله بعد، روی محیط کشت مولر هینتون آگار چاهک‌هایی با استفاده از سیلندرهای عمودی استریل ایجاد شد. سپس غلظت نیم مک فارلند از بیمارگرهای مورد نظر تهیه شد و به صورت چمنی بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت شدند. ۱۰۰-۷۰ میکرولیتر از فاز رویی حاصل از سانتریفوژ داخل چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر که در محیط کشت مولر هینتون آگار حاوی هر بیمارگر ایجاد شده بودند، ریخته شد. نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند و هاله‌بازدارندگی مورد بررسی قرار گرفت. قطر هاله عدم رشد در اطراف چاهک‌ها اندازه‌گیری شد و براساس نتایج به‌دست آمده، محیط پیش‌کشت و تخمیری مناسب برای تولید ترکیب ضد میکروبی سویه منتخب ارزیابی شد (Hamedi et al., 2008).

استخراج ترکیبات ضد میکروبی با استفاده از حلال‌های آلی

استخراج ترکیبات ضد میکروبی با استفاده از سه حلال‌های آلی اتیل استات، دی‌کلرومتان و کلروفرم انجام پذیرفت. به این منظور که پس از افزودن هم حجم حلال آلی به فاز رویی محیط کشت تخمیری سانتریفوژ و جداسازی فاز آبی و فاز آلی، تغلیظ فاز آلی در دمای پایین‌تر از ۴۰ درجه سلسیوس و در فشار کم انجام شد (Arasu et al., 2009).

پژوهش حاضر این است که آب دریا به عنوان نمونه انتخاب شده است. اگرچه تعداد استرپتومیسس در واحد حجم کاهش می‌یابد، ولی احتمال یافتن سویه‌هایی با ویژگی‌هایی متابولیکی جدیدتر بیشتر می‌باشد. در مجموع ۱۵۹ جدایه از ناحیه لیپار دریای عمان جداسازی شدند که از این تعداد ۳۵ سویه بر مبنای شکل کلنی، رنگ پشت و روی کلونی، شکل میسیلیوم و دیگر ویژگی‌های مورفولوژی و فیزیولوژی متعلق به استرپتومایسس‌ها می‌باشند. ۲۲ سویه روی محیط نشاسته نیترات آگار (SNA)، ۷ سویه روی نشاسته کازین آگار و ۲ سویه از گلیسرول گلیسین آگار به دست آمدند. بنابراین، محیط نشاسته نیترات آگار دارای بیشترین تعداد و بالاترین تنوع مورفولوژی در سویه‌های استرپتومایسس می‌باشد. تاکنون پژوهشی بر مبنای جداسازی استرپتومایسس‌ها و بررسی خواص ضد میکروبی آنها در برابر بیمارگرهای گیاهی از دریای عمان گزارش نشده است. این متابولیت‌های ثانویه تولید شده توسط باکتری‌های دریایی قابلیت کاربرد در کشاورزی و کنترل رشد بیمارگرهای گیاهی را دارند.

به منظور بررسی فعالیت ضد میکروبی، دو مرحله غربالگری صورت گرفت. در بررسی اولیه که با استفاده از کشت متقابل انجام پذیرفت، ۱۱ سویه (۳۲ درصد) دارای خاصیت ضد میکروبی حداقل نسبت به یکی از بیمارگرهای گیاهی بودند و منجر به مهار رشد آن شدند (جدول ۲). ۱۰ سویه (۲۹ درصد) دارای اثر بازدارندگی رشد در برابر *X. campestris* با میانگین ۱۵-۱۰ میلی‌متر بودند. سویه AC۱۴۱ نیز قادر به تولید هاله مهارکنندگی در برابر قارچ *F. oxysprum* بود. در حالی که هیچ یک از سویه‌های به دست آمده دارای اثر مهارکنندگی رشد در برابر باکتری *E. amylovora* نبودند. در تحقیقی که توسط آتیمارد و همکاران بر روی خواص ضدباکتریایی اکتینومیسست‌های دریایی کشور هند صورت گرفت، از ۱۷ اکتینومیسست جداسازی شده، ۱۴ سویه (۸۰٪) دارای خاصیت ضدباکتریایی در برابر بیمارگرها بودند، ولی هیچ کدام نسبت به قارچ‌های *Aspergillus niger* هاله مهارکنندگی نداشتند (Attimarad et al. 2012). در پژوهش انجام شده توسط هممان و همکاران آنتی‌بیوتیک تولید شده توسط *Streptomyces sp.* NTK

در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۷ دقیقه تنظیم گردید. تعداد ۳۵ سیکل برای واکنش در نظر گرفته شد.

تعیین توالی و ثبت سویه‌ها

محصول PCR حاصل پس از خالص‌سازی به منظور تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شد. توالی‌های به دست آمده در بانک ژنی NCBI ثبت و شماره مربوط به آن دریافت گردید (KT274203 و KT274206). قرابت فیلوژنتیکی سویه‌های به دست آمده با یکدیگر و با سویه‌های موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی NCBI و Ez-Taxon مورد بررسی گرفت. توالی‌های موجود با استفاده از نرم‌افزار آنالین SINA (<http://www.arb-silva.de/aligner/>) هم‌راستاسازی شدند. آنالیز داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Maximum Likelihood انجام شد. بررسی اعتبار شاخه‌های درخت با استفاده از نرم‌افزار bootstrap analysis با ۱۰۰۰ تکرار صورت گرفت.

نتیجه و بحث

اگرچه بسیاری از محققان بر این باورند که دوران طلایی آنتی‌بیوتیک‌ها سپری شده است، ولی جستجوی ترکیبات ثانویه به ویژه از اکوسیستم‌هایی که کمتر کاوش شده اند، زمینه مناسبی برای تحقیقات به شمار می‌رود. نتایج نشان می‌دهد که جداسازی میکروارگانیسیم‌ها از نیچ‌های اکولوژیکی بررسی نشده می‌تواند منجر به دستیابی به سویه‌های جدید یا بومی آن منطقه گردد که در نتیجه امکان دستیابی به متابولیت جدید نیز بیشتر خواهد شد (Duraipandiyan et al. 2010). ناحیه لیپار دریای عمان یکی از اکوسیستم‌های طبیعی و کمتر بررسی شده ایران می‌باشد. بررسی ویژگی‌های فیزیوشیمیایی ناحیه لیپار نشان می‌دهد که یون سدیم و کلر با ۱۵/۲ و ۱۷/۷۵ گرم بر لیتر فراوان‌ترین عناصر موجود بوده و درجه شوری آن ۲/۲۹ می‌باشد که در ساختن محیط کشت مورد توجه قرار گرفت. به منظور جداسازی سویه‌های استرپتومیسس بیشتر محیط‌های خاکی و یا رسوبات دریایی مورد توجه قرار گرفته اند. یکی از ویژگی‌های

چهار قارچ بیمارگر گیاهی ارزیابی شد (Kathiresan *et al.* 2005). بنابراین تحقیق حاضر با توجه به تعداد اکتینومیست‌های به‌دست آمده و فعالیت ضد میکروبی آنها و نیز زیستگاه جداسازی آنها می‌تواند قابل توجه باشد.

937 که از رسوبات دریا به‌دست آمده است، دارای اثر مهارکنندگی روی باکتری‌های بیمارگر گیاهی *X. campestris* و *Ralstonia solanacearum* می‌باشد (Hohmann *et al.* 2009). در مطالعه‌ای دیگر فعالیت ضد قارچی اکتینومیست‌های رسوبات دریایی در برابر

جدول ۱. ترکیب محیط کشت‌های جداسازی، پیش کشت و تخمیری. مقادیر ذکر شده برحسب گرم بر لیتر بوده و pH محیط روی ۷ تنظیم شده است.

Table 1. Composition of seed, fermentation media and isolation cultures. The values are in terms of g/l where pH is justified on 7

Fermentation Media			Seed Media		Isolation Media		
Glycerol soymeal medium (Reading & Cole 1997)	Glycerol oymeal medium (Reading & Cole. 1997)	Hicky Tresner medium (Kuster & Williams. 1964)	Seed Cultures B (Reading & Cole 1997)	Seed Cultures A (Wink 2002)	Starch nitrate agar	Glycerol glycine agar	Starch casein agar
Glycerol 30	Glycerol 15	Dextrin 10	Peptone 10	Malt extract 10	Starch 20	Glycerol 20	Starch 10
Peptone casein 2	Soy meal 10	Meat extract 1	Malt extract 10	Yeast extract 4	KNO ₃ 1	Glycine 2.5	Casein 0.3
NaCl 1	NaCl 5	Trypton 2	Glycerol 10	Glucose 4	K ₂ HPO ₄ 0.5	K ₂ HPO ₄ 1	K ₂ HPO ₄ 2
K ₂ HPO ₄ 1	CaCO ₃ 1	Yeast extract 1		MgSO ₄ 0.5	FeSO ₄ 0.01	FeSO ₄ 0.1	FeSO ₄ 0.01
MgSO ₄ 0.5	CoCl ₂ 0.001	CoCl ₂ 0.001		NaCl 1	MgSO ₄ 0.5	MgSO ₄ 0.1	KNO ₃ 2
						CaCO ₃ 0.1	CaCO ₃ 0.02

جدول ۲. فعالیت ضد میکروبی سویه‌های اکتینومیست با استفاده از کشت تقاطعی (میلی‌متر)

Table 2. Antibacterial activity of actinomycetes strains using cross-streak method

Strain	<i>E. amylovora</i>	<i>X. campestris</i>	<i>F. oxysprum</i>	strain	<i>E. amylovora</i>	<i>X. campestris</i>	<i>F. oxysprum</i>
AC111	-	13 ± 0	-	AC117	-	12 ± 0	-
AC112	-	10 ± 1	-	AC130	-	14 ± 1	-
AC113	-	10 ± 1	-	AC135	-	8 ± 0	-
AC114	-	12 ± 0.5	-	AC141	-	-	15 ± 1
AC115	-	12 ± 0.6	-	AC275	-	15 ± 1	-
AC116	-	12 ± 0.6	-				

دو سویه قادر به تخمیر گلوکز و عدم تخمیر ساکارز و لاکتوز می‌باشند. پژوهش‌ها نشان می‌دهد که فعالیت مهارکنندگی و تجزیه‌کنندگی این باکتری‌ها در نتیجه تولید آنزیم‌هایی مانند کیتیناز، گلوکوناز، پروتئاز و سلولاز می‌باشد (Intra *et al.* 2011). این آنزیم‌ها بازدارنده قوی بسیاری از قارچ‌های بیماری‌زای مهم گیاهی هستند و با تأثیر بر کیتین دیواره سلولی قارچ منجر به تجزیه دیواره سلولی آن می‌گردند. همچنین اکتینومیست‌ها قادر به تولید ترکیب ضدقارچی polyene هستند که ترکیبی آب‌گریز است و با ارگسترول غشای سلولی قارچ، تداخل ایجاد کرده و با ایجاد کانال منجر به افزایش نفوذپذیری آن می‌شود (Barke *et al.* 2010). اگرچه داده‌های حاضر در این پژوهش نمی‌تواند مشخص کند که به صورت دقیق کدام یک از مکانیسم‌های

دو سویه AC130 و AC275 که بالاترین هاله مهارکنندگی را در برابر باکتری *X. campestris* نشان دادند، به منظور بررسی نهایی انتخاب شدند. سویه AC275 قادر به رشد در غلظت ۲/۵، ۵ و ۷/۵ درصد نمک و عدم رشد در غلظت صفر درصد نمک می‌باشد و بنابراین در گروه نمک دوست متوسط قرار می‌گیرد، در حالی که سویه AC130 قادر به رشد در غلظت صفر، ۲/۵، ۵ و ۷/۵ درصد نمک بوده و مقاوم به نمک تلقی می‌گردد.

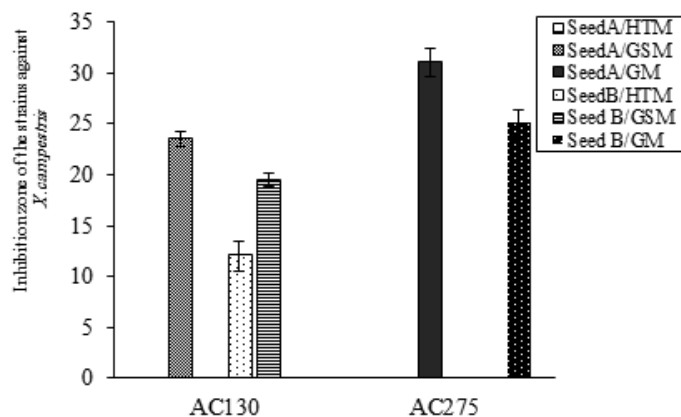
بررسی کیفی آنزیم‌های خارج سلولی نشان می‌دهد هر دو سویه دارای فعالیت سلولازی و پروتئازی مثبت می‌باشند. سویه AC275 دارای فعالیت آمیلازی و اوره‌آزی مثبت و سویه AC130 دارای فعالیت سیتراتازی و تیروزینازی مثبت می‌باشد (جدول ۳). هر

گرفت. استفاده از محیط‌های پیش‌کشت A و B تفاوت معنی‌داری در ایجاد هاله عدم رشد نشان ندادند ($p > 0.05$) در حالی که استفاده از محیط‌های تخمیری تفاوت معنی‌داری را در ایجاد هاله بازدارندگی نشان دادند. آنالیز آماری نشان داد که قطر هاله بازدارندگی با استفاده از محیط تخمیری GSM حاوی گلیسرول و عصاره سویا به صورت معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۱). این نتایج نشان می‌دهد که کاربرد یک محیط پیش‌کشت و تخمیری خاص برای تمام سویه‌ها مؤثر نیست و دستیابی به محیط تخمیری و پیش‌کشت بهینه نیاز به بررسی‌های بیشتر دارد.

مهارکنندگی که در مقدمه ذکر شده اند، مؤثر بوده‌اند. ولی به هر حال، حضور آنزیم‌های هیدرولیتیک می‌تواند به عنوان یک سامانه بازدارنده تلقی شود. پژوهش‌های مختلف نشان داده است که ترکیبات و شرایط محیط کشت در تولید ترکیبات ضد میکروبی تأثیر عمده‌ای خواهد داشت (Bredholt *et al.* 2008; Hamedi *et al.* 2008). از سوی دیگر عوامل دیگری مانند میزان انتشار این مواد در آگار و یا میزان تلقیح و غلظت در مهارکنندگی رشد اثر دارد. به همین دلیل در پژوهش حاضر دو نوع محیط پیش‌کشت و سه نوع تخمیری در بررسی هاله عدم رشد مورد استفاده قرار

جدول ۳. خصوصیات بیوشیمیایی سویه‌های استرپتومایسس AC130 و AC275 جدا شده از دریای عمان.

Sugar fermentation	AC275	AC130	Extracellular Enzyme	AC275	AC130
Glucose	+	+	Protease	+	+
Lactose	-	-	Amylase	+	-
Sucrose	-	-	Cellulase	+	+
			Urease	+	-
			Citratase	-	+
			Tryptophanase	-	+



شکل ۱. فعالیت ضد میکروبی سویه‌های استرپتومایسس AC130 و AC275 در برابر *X. campestris* در محیط پیش‌کشت و تخمیری بر حسب میلی‌متر. محیط پیش‌کشت A و B: (Seed A/B)، محیط‌های تخمیری: هیکی ترزنر (HTM)، گلیسرول سویا (GSM) و گلیسرول (GM).

Figure 1. Antibacterial activity of *Streptomyces* strains AC130 and AC275 against *X. campestris* in seed and fermentation medium (mm). Seed cultures A and B, fermentation cultures: Hicky Tresner (HTM), Glycerol soymeal (GSM) and Glycerol Media (GM).

منظور استخراج این ترکیبات مورد استفاده قرار گرفت. استفاده از حلال‌های قطبی دی‌کلرومتان برای سویه AC130 منجر به هاله بازدارندگی ۲۱ میلی‌متر و کلروفورم برای AC275 منجر به ایجاد هاله ممانعت‌کننده ۲۵ میلی‌متر در برابر باکتری بیمارگر

پژوهش‌های مختلف نشان می‌دهد که نوع و ماهیت ترکیب ضد میکروبی در سویه‌های تولیدکننده آن می‌تواند روی نوع حلال‌ها تأثیرگذار باشد (Radhakrishnan *et al.* 2010, Hamedi *et al.* 2008). به همین دلیل در این پژوهش سه حلال متفاوت به

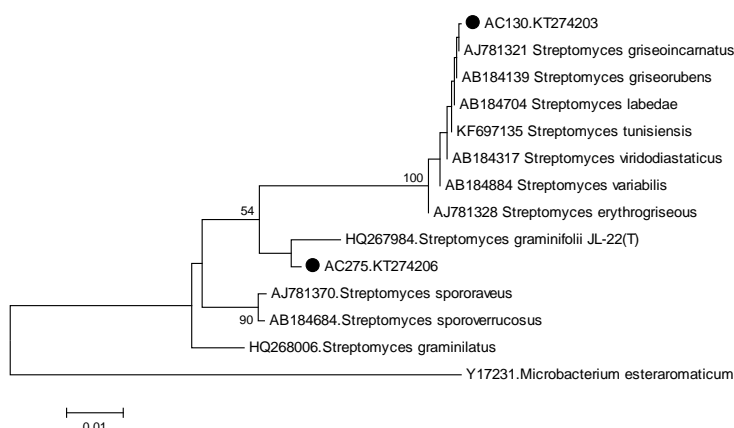
جانوری و گیاهی سویه‌های مقاوم ایجاد خواهد کرد. با این وجود نمی‌توان اثر آنها را نادیده گرفت. فعالیت ضد میکروبی گونه‌های استرپتومایسس در برابر بیمارگرهای گیاهی اثبات شده است (Anitha and Rebeeth, 2009, Intra et al. 2011, Debnath et al. 2013). اگرچه غالب این استرپتومایسس‌ها از محیط‌های خاکی به‌دست آمده‌اند، ولی در سال‌های اخیر به دلیل توجهی که به محیط‌های دریایی معطوف شده است، بررسی متابولیت‌های ثانویه و فعالیت ضد میکروبی آنها در برابر بیمارگرهای انسانی و گیاهی نیز مورد توجه قرار گرفته است. برخی محققان عقیده دارند که میکروب‌های جداسازی شده از دریا به هیچ عنوان قادر به بقا در شرایط خاک نخواهند بود. پاسخ به این پرسش تا حدودی در نظریه منشأ اکتینومیست‌های دریایی نهفته می‌باشد که آنها یا از خشکی منشأ گرفته و یا بومی دریا بوده‌اند (Helmke and Weyland, 1984, Fenical and Jensen, 2006). اگر منشأ خاکی داشته باشند و به تدریج به شرایط دریا سازگار شده باشند، با بازگشت آنها به خشکی و تولید آنتی‌بیوتیک در این شرایط، قادر به بقا در خشکی نیز هستند. اما اگر منشأ دریایی داشته باشند، با توجه به دشوار بودن شرایط دریا نسبت به خشکی احتمالاً قادر به تحمل شرایط سهل‌تر نیز هستند (Hohmann et al. 2009, Manivasagan et al. 2014).

X. campestris می‌شود. احتمالاً به دلیل ماهیت قطبی ترکیبات ضد میکروبی استفاده از حلال‌های آلی قطبی‌تر سبب استخراج بهتر ترکیبات می‌شوند (جدول ۴).

جدول ۴. قطر هاله مهارکنندگی فراکسیون‌های استخراج شده از محیط تخمیری حاصل از سویه‌های AC130 و AC275 در برابر بیمارگر *X. campestris*

	Strain AC130	Strain AC275
Ethyl acetate	-	8±0.3
Dichloromethane	21±0.7	11±0.3
Chloroform	-	25±0.7

به منظور شناسایی دقیق‌تر سویه‌های به‌دست آمده، تکثیر و توالی‌یابی ژن *16S rRNA* دو سویه منتخب انجام شد. توالی سویه‌های به دست آمده با توالی‌های موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی NCBI و Ez-taxon مقایسه شد (شکل ۲). توالی باکتری‌هایی که قرابت بیشتری با سویه‌های مورد نظر را داشتند، به منظور رسم درخت فیلوژنی انتخاب شد. سویه AC130 دارای شباهت ۱۰۰ درصدی به *S. albobrisesolus* NPRL B-1305 درخت فیلوژنی انتخاب شد. سویه AC275 دارای شباهت ۱۰۰ درصدی به *S. badius* NPRL B-2567 (AY999783) درخت فیلوژنی انتخاب شد. مصرف آنتی‌بیوتیک برای کنترل بیماری‌های



شکل ۲. دندروگرام دو سویه *Streptomyces* منتخب در این مطالعه. سویه‌های به‌دست آمده با دایره‌های توپر نشان داده شده است. هم‌راستاسازی توالی‌ها توسط نرم‌افزار آنالین SINA انجام پذیرفت. اعداد روی شاخه‌ها ارزش bootstrap هستند که بصورت درصد از ۱۰۰۰ تکرار نشان داده شده است. bootstrap بالاتر از ۵۰٪ نشان داده شده است.

Figure 2. Dendrogram of the two selected *Streptomyces* strains in this study. The obtained strains are shown by the filled circles. Alignments of sequences carried out by online software SINA. Numbers on branch nodes are bootstrap values shown as percentages of 1000 replications. Bootstrap values greater than 50% are indicated.

کشنده ترکیبات ضد میکروبی می‌تواند تکمیل‌کننده پژوهش حاضر باشد.

سپاسگزاری

انجام این طرح تحقیقاتی با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد در قالب طرح شماره ۳۱۰۴۴/۳ انجام شده است. از آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی میکروبی گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه فردوسی مشهد، تشکر و قدردانی می‌گردد.

نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که سویه‌های استرپتومیسس دریایی به‌ویژه در اکوسیستم‌های کمتر کاوش شده ایران دارای قابلیت تولید ترکیبات ضد میکروبی می‌باشند. استخراج این ترکیبات با حلال‌های مختلف منجر به نتایج متفاوتی خواهد شد که به ماهیت قطبی یا غیرقطبی آن بستگی دارد.

انجام بررسی‌های بیشتر مانند خالص‌سازی، بررسی شرایط بهینه تولید و بررسی حداقل غلظت مهارکننده و

REFERENCES

- Anitha, A, Rebeeth, M** (2009) In vitro antifungal activity of *Streptomyces griseus* against phytopathogenic fungi of tomato field. Academic Journal of Plant Sciences 2: 119-123.
- Arasu MV, Duraipandiyan V, Agastian P, Ignacimuthu S** (2009) In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India) Journal de Mycologie Médicale 19: 22-28
- Arifuzzaman M, Khatun M, Rahman H** (2010) Isolation and screening of *actinomycetes* from Sundarbans soil for antibacterial activity. African Journal of Biotechnology 9: 4614-4619.
- Attimarad SL, Ediga GN, Karigar AA, Karadi R, Chandrashekhar N, Shivanna C** (2012) Screening, isolation and purification of antibacterial agents from marine actinomycetes. International Current Pharmaceutical Journal 1(12): 394-402.
- Barke J, Seipke RF, Grünschow S, Heavens D, Drou N, Bibb, MJ, Goss RJM, Yu DW, Hutchings MI** (2010) A mixed community of *actinomycetes* produce multiple antibiotics for the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus*. BMC Biology 8: 109-119.
- Bredholt H, Fjærvik E, Johnsen G, Zotchev SB** (2008) Actinomycetes from sediments in the Trondheim fjord, Norway: diversity and biological activity. Marine Drugs 6(1): 12-24.
- Bu YY, Yamazaki H, Ukai K, Namikoshi M** (2014) Anti-Mycobacterial Nucleoside Antibiotics from a Marine-Derived *Streptomyces* sp. TPU1236A. Marine Drugs 12(12): 6102-6112.
- Debnath R, Saikia R, Sarma RK, Yadav A, Bora TC, Handique PJ** (2013) Psychrotolerant antifungal *Streptomyces* isolated from Tawang, India and the shift in chitinase gene family. Extremophiles 17: 1045-1059.
- Duraipandiyan V, Sasi AH, Islam VIH, Valanarasu M, Ignacimuthu S** (2010) Antimicrobial properties of actinomycetes from the soil of Himalaya. Journal of Medical Mycology 20(1): 15-20.
- Fenical W, Jensen PR** (2006) Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. Nature chemical biology 2(12): 666-673.
- Gulve RM, Deshmukh AM** (2011) Enzymatic activity of actinomycetes isolated from marine sediments. Recent Research in Science and Technology 3: 80-83.
- Hamedi J, Mohammadipanah F, Amoozegar MA, Dehghan S** (2007) Isolation of a new moderately halophilic broad-spectrum antibiotic producing actinobacter. Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products 2(2): 94-104.
- Hamedi J, Mohammadipanah F** (2008) Isolation, determination and evaluation of antifungal activity some Iranian actinomycetes against three plant pathogenic fungi. Entomology and Phytopathology 76(2): 33-53.
- Helmke E, Weyland H** (1984) *Rhodococcus marinonascens* sp. nov., an actinomycete from the sea. International Journal of Systematic Bacteriology 34(2), 127-138.
- Hohmann C, Schneider K, Christina B, Elisabeth Irran E et al,** (2009) Caboxamycin, a new antibiotic of the benzoxazole family produced by the deep-sea strain *Streptomyces* sp. NTK 937. The Journal of Antibiotics 62: 99-104.
- Intra B, Mungsuntisuk I, Nihira T, Igarashi Y, Panbangred W** (2011) Identification of *actinomycetes* from plant rhizospheric soils with inhibitory activity against *Colletotrichum* spp., the causative agent of anthracnose disease. BMC Research Notes 4:98-107.
- Jog R, Nareshkumar G Rajkumar S** (2012) Plant growth promoting potential and soil enzyme production of the most abundant *Streptomyces* spp. from wheat rhizosphere. Journal of Applied Microbiology 113(5): 1154-1164.

- Kathiresan K, Balagurunathan R, Selvam MM** (2005) Fungicidal activity of marine actinomycetes against phytopathogenic fungi. *Indian Journal of Biotechnology* 4: 271-276.
- Kuster E, Williams ST** (1964) Selection of media for isolation of *streptomycetes*. *Nature* 202: 928-929
- Lane DJ** (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M, editors. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Chichester, United Kingdom: John Wiley and Sons. 115-175.
- Leyns F, De Cleene M, Swings J, De Ley J** (1984) The host range of the genus *Xanthomonas*. *The Botanical Review* 50(3):305-355.
- Liu LL, Xu Y, Han Z, Li YX, Lu L, Lai PY, Zhong JL, GuoXR, Zhang XX, Qian PY** (2012) Four New Antibacterial Xanthones from the Marine-Derived Actinomycetes *Streptomyces caelestis*, *Marin Drugs* 10(11): 2571-2583.
- Manivasagan P, Venkatesan J, Sivakumar K, Kim SK** (2013) Marine actinobacterial metabolites: Current status and future perspectives. *Microbiological Research*, 168(6):311-332.
- Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, Martin TA, Fry JC, Hiom SJ, Wade WG** (1998) Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 795-799
- Nelson PE, Toussoun TA, Cook RJ** (1981) *Fusarium*, diseases, biology and taxonomy. University Park, PA, USA.
- Ng YK, Hewavitharana AK, Webb R, Shaw PN, Fuerst JA** (2013) Developmental cycle and pharmaceutically relevant compounds of *Salinispora actinobacteria* isolated from Great Barrier Reef marine sponges. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97(7): 3097-3108.
- Palaniyandi SA, Yang SH, Zhang L, Suh JW** (2013) Effects of Actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97(22): 9621-36.
- Radhakrishnan M, Suganya S, Balagurunathan R, Kumar V** (2010) Preliminary screening for antibacterial and antimycobacterial activity of actinomycetes from less explored ecosystems. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26(3): 561-566.
- Reading C, Cole M** (1977) Clavulanic acid: a β -lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 11(5): 852-57.
- Thumar JT, Dhulia K, Singh SP** (2010) Isolation and partial purification of an antimicrobial agent from halotolerant alkaliphilic *Streptomyces aburaviensis* strain Kut-8. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26(11): 2081-2087.
- Wink J** (2002) *The Actinomycetales, An order in the class of Actinobacteria important to the pharmaceutical industry*- Electronic manual, Aventis Pharma Deutschland GmbH.
- Zeng Q, Huang H, Zhu J, Fang Z, Sun Q, Bao S** (2013) A new nematocidal compound produced by *Streptomyces albogriseolus* HA10002. *Antoine Van Leeuwenhoek* 103(5): 1107-1111.