

اثرات ضد قارچی استرپتومایس های خاکزی جدا شده از استان گلستان

چکیده

زمینه و هدف: استرپتومایس از مهمترین جنسها در خانواده اکتینومیسیتها می باشد و کاربرد وسیعی در صنایع مختلف و تولید آنتی بیوتیک دارد هدف از این تحقیق جدا سازی استرپتومایس های خاکزی تولید کننده آنتی بیوتیک از خاک استان گلستان در شمال ایران و بررسی پتانسیل تولید متابولیت های ضد قارچی توسط این ارگانیسمها می باشد.

روش بررسی: نمونه های خاک از عمق 6-10 سانتی متری در منطقه جنگلی ناهار خوران گرگان، ارتفاعات درازنو کردکوی، مناطق بیابانی آق قلا و زمینهای کشاورزی علی آباد در استان گلستان جمع آوری شدند و در محیط های اکتینومایست ایزولاسیون آگار و نشاسته کازئین آگار کشت داده شدند و توسط روشهای مورفولوژیکی و بیوشیمیایی شناسایی و جداسازی و خالص شدند. بررسی فعالیت ضد قارچی استرپتومایس ها ی جدا شده علیه قارچهای کاندیدا آلیکنس، آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس فلاووس و مالا سزیا فور فور با استفاده از روش انتشار در آگار بررسی شد. برای دو ایزوله که بهترین اثر ضد قارچی را داشتند PCR با استفاده از پرایمر 16S rRNA انجام و با تعیین توالی شناسائی گردید.

یافته ها: از بین 120 نمونه مورد مطالعه 24 مورد استرپتومایس (20%) شناسایی و جداسازی شد. فراوانی آن در منطقه بیابانی آق قلا، درازنو کردکوی، جنگل ناهار خوران و زمین های علی آباد به ترتیب 10 (41,6%)، 8 (33,3%)، 4 (16,6%) و 2 (8,3%) مورد بوده است. از بین 24 ایزوله استرپتومایس جدا شده 2 ایزوله دارای اثرات ضد قارچی قوی و 4 ایزوله اثر متوسطی داشته است. همچنین ما دریافتیم استرپتومایس های جدا شده از مناطق بیابانی دارای فعالیت ضد قارچی بیشتری بودند.

نتیجه گیری شناسائی و خالص سازی مواد ضد قارچی دو ایزوله استرپتومایس برای مطالعات آینده پیشنهاد می نگردد.

واژه های کلیدی: استرپتومایس - فعالیت ضد قارچی - آنتی بیوتیک

سید مسعود هاشمی

دکتری قارچ شناسی، دانشگاه
آزاد واحد تنکابن

آیت الله نصرالهی عمران

دکتری قارچ شناسی، دانشگاه آزاد واحد تنکابن

حمیدرضا پردلی

دانشجو دکتری قارچ شناسی، دانشگاه
آزاد واحد گرگان

اعظم حسینیان

دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه
آزاد واحد تنکابن

نویسنده مسئول: اعظم حسینیان

تلفن: 09111755505

پست الکترونیک:

azam_hoseiniyan72@yahoo.com

آدرس: دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن گروه
میکروب شناسی

وصول مقاله: 90/3/17

اصلاح نهایی: 90/5/10

پذیرش مقاله: 90/5/23

مقدمه

اکتینومیست ها حدود 40% از جمعیت باکتریایی را در محیط های خاکی تشکیل می دهند (2 و 1). اکتینومیست ها مخصوصا استرپتومایس ها دارای پتانسیل بالایی در تولید متابولیت های ثانویه مثل آنتی بیوتیک ها - آنزیم ها - مواد علف کش - مواد ضد سرطان و دیگر ترکیبات مفید می باشند که نقش مهمی در بیوکنترل و تثبیت نیتروژن در خاک ایفا می کنند (3).

استرپتومایس ها باکتریهای گرم مثبت با نسبت مولار $G+C$ بالا می باشند. میسلیم هوایی مستقیم یا پیچیده (به فرم های خمیده یا فنر مانند و یا اسپریال) تولید می نمایند. زنجیره اسپور ها یا آزادند و یا توسط یک غلاف هیدروفوب احاطه شده اند (4).

امروزه شمار بیماریهای قارچی رنج می برند و رو به افزایش است. قارچهانیز ماهیت یوکاریوتی دارند و بنابراین بدست آوردن داروهای ضد قارچی با سمیت انتخابی بر میزان آسان نیست (7). اغلب داروهای ضد قارچی مورد استفاده در پزشکی هم دارای اثرات جانبی هستند و شمار زیادی از مواد ضد قارچی از میکروارگانیسم ها بدست آمده اند که دارای اثرات سمی برای انسان هستند. امروزه فقط تعداد کمی از داروهای ضد قارچی مورد استفاده اند که اغلب از گونه های اکتینومایست بویژه جنس استرپتومایس استخراج شده اند (7) که مهمترین آنها نیستاتین و آمفوتریسین ب و پیمارسین می باشد (6). فقط تا سال 1984 حدود 3477 آنتی بیوتیک که توسط استرپتومایس ها تولید شدند گزارش شده است (2). استرپتومایسها گذشته از تولید آنتی بیوتیک قادر به تولید بیش از 70% مواد اولیه مورد نیاز صنعت داروسازی هستند (9) و از نظر تولید فراورده های بیولوژیک (قارچ کش ها و حشره کش ها و علف کشها و ...) که متابولیت های ثانویه این میکروارگانیسم ها محسوب می شو ند از اهمیت خاصی برخوردارند (10). هنوز هم مطالعات برای بدست آوردن آنتی بیوتیک های جدید از استرپتومایس ها با اثرات بهتر و سمیت کمتر بر میزان ادامه دارد و نیاز دست یابی به این مواد احساس می شود (11).

در این مطالعه به شناسایی استرپتومایس های خاکزی توسط خصوصیات مورفولوژیکی و بررسی های میکروسکوپی و تست های بیوشیمیایی پرداخته و سپس فعالیت ضد قارچی باکتریهای بدست آمده را مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

الف) 120 نمونه خاک از مناطق مختلف استان گلستان شامل: شهرستان آق قلا (روستای عطا آباد - زمینهای حومه) کردکوی (منطقه درازنو) گرگان (زیارت - ناهار خوران) علی آباد (زمینهای کشاورزی - منطقه کبود وال) در سال 90- 89 جمع آوری شده و به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان منتقل شدند.

ب) روش نمونه برداری

نمونه های خاک توسط یک قاشق چوبی استریل و محکم از لایه سطحی خاک زمینهای حاصلخیز و بیابانی نواحی مختلف استان گلستان و از عمق 10-6 سانتی متر مناطق ریزوسفری و غیر ریزوسفری به میزان 100 تا 200 گرم جمع آوری شدند و داخل کیسه های نایلونی پلی اتیلن استریل ریخته و درب آنها محکم بسته و به آزمایشگاه منتقل شدند. مشخصات منطقه نمونه برداری، موقعیت و زمان نمونه برداری ثبت شد. سپس با مراجعه به مرکز تحقیقات خاکشناسی استان گلستان ویژگیهای خاکهای مورد مطالعه مشخص و ثبت گردید.

غربالگری و ایزولاسیون اکتینومایست ها از نمونه های خاک

نمونه های خاک جمع آوری شده از نواحی مختلف در دمای اتاق بمدت 4 روز خشک شدند (12). از نمونه های خاک درقت 10^{-2} در سرم فیزیولوژی تهیه شد و نمونه ها بمدت 1 ساعت در بن ماری $55^{\circ}C$ قرار گرفتند تا اسپورها از فرم رویشی جدا شوند. سپس از سوسپانسیون رویی باکتری روی محیط اکتینومایست ایزولاسیون آگار و Starch casein KNO₃ Agar کشت تهیه شد و در 28 درجه سانتیگراد بمدت 4 روز انکوبه شدند (13).

مشاهدات مورفولوژی

1. **مشاهدات ماکروسکوپی:** کلنی ها پس از 7 تا 10 روزه نمایان شدند. مدت رشد، رنگ پشت و رنگ روی کلنی، سطح

تست های بیوشیمیایی

به کمک تست های بیوشیمیایی مثل تولید پیگمان، هیدرولیز کازئین، نشاسته، ژلاتین، تولید هیدروژن سولفور، تست کاتالاز و بررسی خصوصیات ماکروسکوپی و میکروسکوپی، کلنی های استرپتومیسس در حد جنس شناسائی شد (15 و 16) و نمونه های بدست آمده خالص شدند

پ- بررسی اثر ضد قارچی ایزوله ها

میزان فعالیت ضد قارچی استرپتومیسس علیه 4 سویه قارچی پاتوژن مورد مطالعه قرار گرفت. در این آزمایش اثر آنتاگونیسمی این ایزوله ها علیه قارچهای پاتوژن استاندارد: *Candida albicans* (ATCC 10231), *Aspergillus niger* (IR 6), *Aspergillus flavus* و *Malassezia fur fur sp.* تهیه شده از مرکز کلکسیون قارچها و باکتریهای صنعتی ایران مورد ارزیابی قرار گرفت (WWW.IROST.IR). این قارچ ها بصورت آمپول لیوفلیزه تهیه و روی محیط توصیه شده از سمت مرکز احیا گردید.

تهیه سوسپانسیون باکتریایی

به ایزوله ها اجازه داده شد بمدت 3-4 روز روی محیط کازئین نیترا نشاسته آگار رشد نمایند. سپس یک تک کلنی از هر سویه را در داخل فلاسک ارلن مایر 250 ml حاوی 50-40 میلی لیتر از محیط مایع YME که شامل: {3 گرم / Yest extrst 3 گرم Malt extract / گلوکز 10 گرم / پپتون 5 گرم (10^{-1} g)} بود تلقیح شد. سپس ارلن های حاوی محیط مایع تلقیح شده با استرپتومیسس را روی یک انکوباتور Sheaker با دور 150rpm و در 28 درجه برای مدت 6 روز کامل (144 ساعت) قرار گرفت تا در این مدت رشد کرده و به فاز تولید آنتی بیوتیک برسند. پس از گذشت این مدت همه سویه ها در این محیط رشد کردند و کدورت حاصل شد. کدورت معادل نیم مک فارلند تهیه شد سپس توسط سانتریفیکاسیون 5000 rpm در 10 دقیقه کشت مایع از میسلیم ها جدا شد. سپس از سوپرناتانت بدست آمده برای فعالیت ضد قارچی سویه ها استفاده نمودیم (13).

به منظور بررسی اثرات آنتاگونیسمی و تولید آنتی بیوتیک حاصل از استرپتومیسس های خالص شده بر علیه قارچ های

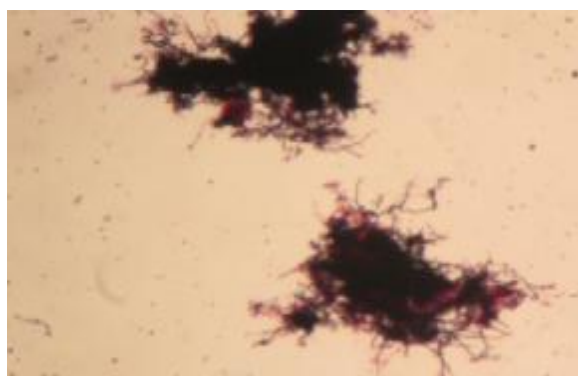
کلنی و شکل میکروسکوپی میسلیم های هوایی (14) و دیگر خصوصیات کلنی ها بررسی شد. کلنی ها ظاهری شبیه گچ خشک شده داشته و دارای رنگهای متفاوت بودند (شکل 1). سطح تمام کلنی های استرپتومیسس پوشیده از میسلیم های هوایی بود که یک منظره کرک مانند در سطح کلنی ایجاد می نمود.



شکل 1: رنگ کلنیهای استرپتومایسس سویه 14

مشاهدات میکروسکوپی

مطالعات میکرومورفولوژی کلنی ها پس از گذشت 7 تا 10 روز از کشت استرپتومیسسها بررسی شد. به منظور بررسی میسلیم هوایی وزنچیره اسپورها رنگ آمیزی گرم از کلنی های رشد یافته روی محیط استارچ کازئین انجام شد و نتایج رنگ آمیزی و بررسی میسلیم هوایی و سوبسترای زیر میکروسکوپ نوری در $40\times$ و $100\times$ مشاهده و ثبت شد (شکل 2).



شکل 2: تصویر میکروسکوپی میسلیم های استرپتومایسس (انتهای اسپریال میسلیمها)

مورد آزمایش به سه روش کشت انجام شد که عبارتند از :

الف : کشت خطی

در گوشه ای از پلیت 1 60 از سوپرناتانت استرپتومیسس های خالص شده را به طور خطی کشت داده و سپس عمود بر این خط و نزدیک به آن سویه قارچی انتخاب شده بطور خطی کشت داده شد و پس از انکوباسیون بمدت 3روز در 28 درجه فاصله بین خط کشت استرپتومیسس و سویه قارچی بررسی شد.

ب : روش کشت نقطه ای

در این روش یک کلنی استرپتومیسس را روی محیط استارچ کازئین آگار به صورت نقطه ای تلقیح میکنیم و بمدت 4 روز در 28 درجه انکوبه می کنیم تا رشد کند. سپس سوسپانسیون قارچی را روی آن پخش میکنیم و در 28 درجه انکوبه شد. پس از 3 روز انکوباسیون در 28 درجه هاله های عدم رشد نمایان شد.

ج : روش دیسک گذاری

در این روش دیسک های کاغذی (4,6 میلیمتری) استریل آغشته به 1 60 سوسپانسیون استرپتومیسس ها را روی سطح محیطی که توسط یک لایه نازک قارچی پوشیده شده قرار دادیم. بمنظور ثبت و اندازه گیری قطر دقیق هاله های عدم رشد از روش دیسک گذاری استفاده شد. دیسک ها در مرکز روی محیط PDA حاوی سوسپانسیون قارچی قرار گرفتند. پلیت ها در 28⁰ بمدت 3 روز انکوبه شدند. پس از این مدت هاله عدم رشد اندازه گیری شد (هاله های عدم رشد بیش از 10 میلیمتر ثبت شد). در تمامی این سه روش از محیط های آکتنوماست ایزولاسیون آگار - استارچ کازئین نیترا پتاسیم آگار و PDA استفاده شد (17 و 18).

آنالیز ژنتیکی PCR

دو سویه فعال 12 و 14 بدلیل اثرات ضد قارچی مناسب نسبت به سایر سویه های بدست آمده در این مطالعه مورد شناسائی ملکولی قرار گرفتند. پس از انجام CR , 45 μl از محصولات نهائی PCR به همراه پرایمر فوروارد برای تعیین توالی جهت شناسائی ملکولی بر اساس 16SrDNA به شرکت ماکروژن کره جنوبی (www.macrogen.com) ارسال شدند.

شناسائی ملکولی

سکانس های حاصل از تعیین توالی با استفاده از نرم افزار Blast با توالی های موجود در بانک ژنی مرکز ملی بیوتکنولوژی (www.ncbi.nlm.nih.gov) مقایسه شدند. این کار جهت شناسائی ایزوله ها به روش ملکولی و با استفاده از توالی 16SrDNA موجود در سطح جنس و گونه انجام گرفت (شکل 3).

یافته ها

در این مطالعه از هر منطقه 30 نمونه مورد بررسی قرار گرفت. از بین 120 نمونه مورد مطالعه 24 مورد استرپتومیسس (20%) شناسایی و جداسازی شد. بیشترین استرپتومیسس جدا شده به ترتیب مربوط به مناطق بیابانی آق قلا (10 مورد 33,3%)، ارتفاعات درازنودر کردکوی (8 مورد 26,6%)، منطقه ناهارخوران گرگان (4 مورد 13,3%) و دشت علی آباد (2 مورد 6,6%) می باشد (جدول 1).

آنالیز آماری (Anova) spss نشان می دهد بین تعداد استرپتومیسس ها و میزان شوری خاک استان تفاوت معنی داری وجود دارد ($P\text{Value} < 0.05$).

از بین 24 ایزوله استرپتومیسس تست شده 6 استرپتومیسس قادر به تولید آنتی بیوتیک بودند و هاله ممانعت از رشد علیه هر 4 قارچ مورد بررسی ایجاد کردند و از بین آنها فعالیت آنتی بیوتیکی 2 ایزوله 12 و 14 بیش از سایر ایزوله ها بود. این ایزوله ها برای شناسائی قطعی انتخاب گردیدند. جدول 2و3

این ایزوله ها برای شناسائی قطعی انتخاب گردیدند. جدول 2و3 اثر مهارتی آنها بر قارچ های مورد بررسی، ویژگی های محل جداسازی و خواص بیوشیمائی آنها را نشان میدهد. در جدول 2 فعالیت آنتی بیوتیکی این 2 سویه مهم نشان داده شده است. همچنین در جدول 4 خصوصیات بیوشیمیایی سویه های مولد آنتی بیوتیک بررسی شده است.

جدول 1: توزیع فراوانی ایزولاسیون استرپتومیس از خاک مناطق مختلف استان گلستان در سال 1389-90

محل نمونه برداری	تعداد کل نمونه های خاک	تعداد نمونه های مثبت	درصد فراوانی	میزان شوری ds/m
منطقه بیابانی آق قلا	30	10	33,33%	9/5
درازنو کردکوی	30	8	26,6%	1
ناهارخوران گرگان	30	4	13,3%	1
دشت علی آباد	30	2	6,66%	0/5
مجموع	120	24	20%	

جدول 2: اثر مهار ایزوله های منتخب استرپتومایسیس بر روی قارچ های مورد مطالعه

سویه های قارچی استاندارد				
سویه های منتخب استرپتومایسیس	کاندیدا آلیکنس ATCC: 10231	آسپرژیلوس نایجر ATCC: 9092	آسپرژیلوس ATCC: IR6	مالاسزیا فور فور Spp.
12	14	21	11	4
14	16	12/5	10	3

جدول 3: ویژگی خاکهای محل جداسازی ایزوله های استرپتومایسیس با بهترین اثر ضد قارچی

شماره نمونه و محل جداسازی	درصد رس	درصد آهک	کربن آلی %	PH	درصد شوری %
12- آق قلا	14	12,5	1/6	7/5	9/4
14- آق قلا	14	12,8	1/7	7/5	9/5

جدول 4: ویژگی های بیوشیمیایی ایزوله های استرپتومایس منتخب تولید کننده آنتی بیوتیک

ویژگیهای بیوشیمیایی	14	12
تست کاتالاز	+	+
هیدرولیز نشاسته	+	+
هیدرولیز کازین	+	+
تولید اندول	-	-
هیدرولیز ژلاتین	+	+
H ₂ S تولید	-	-
تولید پیگمان	+	-
اوره آز	-	+
SIM	-	-
رشد در 28 درجه سانتیگراد	+	+
رشد در 37 درجه سانتیگراد	-	+
رشد در 50 درجه سانتیگراد	-	-
رنگ روی کلنی (روی محیط استارچ کازنین نیترات پتاسیم آگار)	قرمز	گل بی
رنگ پشت کلنی	قرمز	کرم
رنگ میسلوم هوایی	خاکستری	سفید
شکل انشعابات میکروسکوپی میسلومها	خطی	خطی
رنگ توده اسپور پس از 14 روز	سفید	یشمی
رشد در نمک 6,5 %	+	+

در بلاست محصول PCR ژن 16S rRNA ایزوله شماره 12 و 14 با سویه استاندارد استرپتومایس در NCBI میزان تشابه به ترتیب 100% و 99% می باشد (جدول 5).

جدول 5: نتایج شناسایی ملکولی در سطح جنس و گونه

نمونه	باکتری مرجع در NCBI	درصد همولوژی	شناسایی ملکولی نهایی	سطح شناسایی
ارسالی				
12	HQ438283.1 Streptomyces sp. YSEE-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	Streptomyces	جنس
14	GU045528.1 Streptomyces sp. SXY37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99 %	Streptomyces sp. . SXY37	گونه

شکل ۳ : آنالیز ژنی سویه ها

الف) سویه 12

>gb|HQ438283.1| Streptomyces sp. YSEE-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=334

Score = 466 bits (252), Expect = 3e-128
Identities = 252/252 (100%), Gaps = 0/252 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 1   ATGAGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGG 60
          |||
Sbjct 41   ATGAGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGG 100

Query 61   GGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGC 120
          |||
Sbjct 101  GGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGC 160

Query 121  GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACAC 180
          |||
Sbjct 161  GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACAC 220

Query 181  CCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTGCAAGGTGGGACTGGCGATTG 240
          |||
Sbjct 221  CCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTGCAAGGTGGGACTGGCGATTG 280

Query 241  GGACGAAGTCGT 252
          |||
Sbjct 281  GGACGAAGTCGT 292

```

ب (سویه 14

>gb|GU045528.1| Streptomyces sp. SXY37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1524

Score = 507 bits (274), Expect = 2e-140
Identities = 281/284 (99%), Gaps = 1/284 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 1   ACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTC 60
          |||
Sbjct 1239 ACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTC 1298

Query 61   GACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTT 120
          |||
Sbjct 1299 GACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTT 1358

Query 121  CCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTG 180
          |||
Sbjct 1359 CCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTG 1418

Query 181  GCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTGCAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGT 240
          |||
Sbjct 1419 GCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTGCAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGT 1478

Query 241  AACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGTTGGAAGCACCTCCTT 284
          |||
Sbjct 1479 AACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGAT-CACCTCCTT 1521

```

بحث

بررسی های اخیر حاکی از آنست که سیستمهای ژنتیکی هوشیار در سلولهای زنده میکروارگانیسمها قادر به برنامه ریزی در جهت مقابله با عوامل تهدید کننده حیات سلول هستند و بر این اساس گونه های مقاوم شناخته شده هر روز در حال ایجاد و گسترش اند. این موضوع می تواند بشر را در آستانه ورود به یک فاجعه پزشکی قرار دهد و چه بسا یک عفونت کوچک بدلیل نبودن داروهای موثر تبدیل به بیماری مرگباری شود.

از سوی دیگر هنوز تعدادی از بیماری های قارچی - باکتریای - ویروسی و انگلی وجود دارد که داروی موثر بر علیه آنها شناخته نشده است. از این رو حتی در آغاز قرن 21 با آنکه عصر طلایی آنتی بیوتیک ها سپری شده است اما هنوز متابولیسم ثانویه میکروبی زمینه مناسبی برای تحقیقات کاربردی بشمار می رود و در این میان کشف و توسعه عوامل ضد قارچی جدید از بین متابولیت های ثانویه جایگاه خود را حفظ کرده است.

از بین موجودات زنده میکروارگانیسمها بطور عام و دسته استرپتومیسستها بطور خاص از جهت اهمیتی که در تولید آنتی بیوتیکها دارند همواره مورد توجه بوده اند و برخی تولید آنتی بیوتیک بوسیله این میکروارگانیسمها را مهمترین ویژگی آنها می دانند که رابطه تنگاتنگی با اسپورولاسیون داشته و مکانیسمی برای مهار رشد سایر میکروارگانیسمها در رقابت کسب مواد مغذی محیط بشمار می رود. از این رو در بین مطالعات هدفداری که برای یافتن میکروارگانیسمهای تولید کننده عوامل ضد قارچی موثر بر علیه قارچهای بیماریزای استاندارد تهیه شده از مرکز پژوهشهای علمی و صنعتی ایران انجام شد 2 گونه k 12 و j 14 بعنوان گونه های موفق در تولید مواد آنتی بیوتیکی موثر علیه سویه های پاتوژن قارچی (4سویه مورد آزمایش) از بین تعداد زیادی از میکروارگانیسمهای تولید کننده جدا و شناسایی گردید و پس از تعیین جنس و گونه جهت مطالعات بعدی نگهداری و ذخیره شد. هدف اصلی جداسازی استرپتومیسستها از خاک و

بدست آوردن فراورده آنها در محیط مایع و غربال کردن استرپتومیسسهای تولید کننده آنتی بیوتیک بوده است.

روش انتخابی ما Difiossen agar بود. زیرا راه معمول در تشخیص فعالیت ضد میکروبی نمونه هائی که میزان فعالیت نمی باشد با کمک تست انتشار آگار انجام می شود (19). روش انتشار یک روش فیزیکی شیمیائی است که در آن میکروارگانیسم بعنوان اندیکاتور غلظت ترکیب فعال بکار برده می شود (19). میزان قطر هاله در روش تلقیح نقطه ای استرپتومیسس بیشتر از روش دیسک گذاری نشان داده شد که می تواند بدلیل انتشار مستقیم ماده در آگار باشد ولی در دیسک های آغشته به سوسپانسیون بدلیل اینکه این سوسپانسیون علاوه بر ماده آنتی بیوتیکی حامل مقداری از محیط مایع نیز می باشد قطر هاله ایجاد شده کمتر گزارش می شود.

در مقایسه نتایج تحقیقات این مطالعه با تحقیقات قبل باید گفت در سال 2009 در ترکیه از بین 16 نمونه خاک ریزوسفری گیاهان داروئی مورد مطالعه 27 استرپتومیسس ایزوله شد که 1 سویه فعالیت ضد قارچی علیه چند قارچ پاتوژن نشان داد که استرپتومیسس سپکتاپیلیس معرفی شد (20). در سال 2009 در هند از بین 100 اکتینومایست مورد مطالعه جدا شده از محیطهای نمکی 3 ایزوله دارای فعالیت ضد درماتوفیتی بودند (21). در بانکوک سال 2008 از مطالعه 146 نمونه اکتینومایست 10 سویه فعالیت ضد قارچی علیه 3 قارچ پاتوژن داشتند (22). در سال 2002 در ترکیه از 46 نمونه خاک 74 مورد اکتینومایست بدست آمد 34 مورد فعالیت ضد قارچی مثبت داشتند (17). در مطالعه دیگری از 11 نمونه خاک 15 استرپتومیسس متفاوت بدست آمد که 12 سویه فعالیت ضد کاندیدائی نشان دادند (18). در ترکیه (2009) از بین 16 استرپتومیسس مورد مطالعه علیه چند قارچ فیلانتوس انسانی و گیاهی نهایتاً یک سویه بعنوان سویه فعال انتخاب گردید (23).

در اصفهان نیز در سال 1376 با مطالعه 800 نمونه خاک موفق به جدا سازی 153 نمونه اکتینومایست هوازی شدند (24).

مجموع ایزوله های بدست آمده در صد قابل توجهی از استرپتومیسها دارای اثر ضد قارچی بوده اند. 25% از سویه های استرپتومایسس (6 مورد) دارای فعالیت ضد قارچی است که 8,3% (2 مورد) به عنوان سویه های قوی و منتخب معرفی شدند. و این در حالیست که این نتایج نسبت به نتایج اعلام شده در مطالعات مشابه که برای بدست آوردن سویه های موثر ضد قارچی (3 تا 10 درصد) و برای معرفی سویه منتخب (1 تا 3 درصد) گزارش شده اند بالاتر می باشد.

به طور خلاصه باید گفت در این پروژه تعیین حساسیت به روش انتشار روشی بود برای بدست آوردن سریع فعالیت و نمی تواند جهت بدست آوردن اندازه مطلق حساسیت قارچ و یا فعالیت آنتی بیوتیک استفاده شود. روش تعیین حساسیت با کمک پلیت می تواند 5-10 درصد خطا داشته باشد. روش های تعیین حساسیت روش های محدود به رشد می باشند و هر چیز موثر بر رشد بر روی میزان تولید آنتی بیوتیک نیز موثر است. هدف ما در این مطالعه شناسایی میکروارگانیسمهای مولد آنتی بیوتیک ضد قارچی بود. بنابراین می توانیم در مطالعات بعدی با استخراج و خالص سازی و بهینه سازی شرایط تولید آنتی بیوتیکهای استرپتومیسهای ذخیره شده در این مطالعه نتایج بهتر و قویتری را شاهد باشیم.

ما در این مطالعه مقطعی از بین 120 نمونه خاک مورد بررسی مویوط به نواحی مختلف گرگان موفق به جدا سازی 24 نمونه استرپتومیس شدید که 20% از کل مجموع ایزوله هاست. این تعداد ایزوله استرپتومیس جدا شده از منطقه مورد مطالعه در بین مطالعات انجام شده دارای نتیجه بسیار خوبی بوده است. برای بررسی اثرات ضد قارچی از دو سویه قارچ مخمری و دو سویه قارچ فیلانتوس استفاده شد. این اولین باریست که خاک منطقه گرگان به منظور بررسی اثرات ضد قارچی میکروارگانیسم های بومی خاک مانند اکتینومیسها و مخصوصا استرپتومیس مورد بررسی قرار گرفته است. تعداد استرپتومیسهای جدا شده در مقایسه با مطالعات مشابه کم نظیر است. همچنین از مجموع استرپتومیسها 6 نمونه دارای اثرات ضد قارچی مثبت بودند و در نهایت از بین این تعداد موفق به جداسازی 2 سویه بعنوان سویه های منتخب شدیم شناسایی نهائی جنس و گونه توسط شرکت ماکروژن کره انجام شد و نمونه ها برای ادامه تحقیقات ذخیره شد.

در مطالعات قبلی اغلب ایزوله ها استرپتومیس از خاکهای ریزوسفری بدست آمده بودند در حالیکه ما در این مطالعه 33,33% از مجموع استرپتومیسها را از مناطق غیر ریزوسفری و زمینهای بایر در منطقه آق قلا جدا نمودیم. در مقایسات دیگر دریافتیم اغلب ایزوله ها از خاکهای قلیائی با اسیدیته 7-9 جدا شدند که ما نیز به نتایج مشابه ای رسیدیم. همچنین در یافتیم استرپتومیسها را با راحتی می توان از محیطهای نمکی با در صد نمک بین 5-7% جدا نمود. هم چنین این مطالعه نشان می دهد استرپتومیسها در محیطهای خشک و با درجه رطوبت متوسط فراوانترند. فراوانی استرپتومیسهای بدست آمده در این پروژه نسبت به فراوانی استرپتومیسهای بدست آمده در برخی مطالعات بیشتر و در برخی کمتر است که می توان این امر را به عواملی مانند در صد بالای رطوبت خاک و اسیدیته بالای خاکهای کشاورزی منطقه که سطح وسیعی از استان را پوشش داده است مرتبط دانست. اما در مقایسه نتیجه نهایی بدست آمده در این بررسی نشان می دهد که از بین

References

- 1-Atlas. R . M and R. Bartha. *Microbial ecology (Fundamentals and application)*. 2nd edition. 1987;101-129.
- 2- David A. Hopwood. *Handbook STREPTOMYCETES in Nature and Medicine* 2007.
- 3-Sanglier J J, Haag H, Huck TA, Fehr T. *Novel bioactive compounds from actinomycetes. A Short review.* (1988-1992);144:633-642.
- 4-Anderson A S ,Wellington E M. *The taxonomy of Streptomyces and related genera..* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2001; 51:797–814..
- 5- Silver LL, Bostain KA. *Discovery and development of new antibiotics: The problem of antibiotic resistance.* Antimicrob. Agents Chemoter. 1966;37:377-383.
- 6- Shadzi SH. *The handbook Medical Mycology.* 2009.
- 7- Zeyini F. *The handbook Medical Mycology.* 1989.
- 8- Zolfaghari M. *The survey novel antibiotic agent resistance pathogenic* .Thesis (M.Sc) Islamic Azad University Ghom Branch. 1996.
- 9- Good flow M, Cross T. *In the biology of the Actinomycetes* . Good flow , M.; Mordarski , ST.; Williams eds. London academic .1983;42-56.
- 10- Brock TD, Madigan MT. *Biology of microorganisms.* 8th edition. 1997;16-29 ,413-33
- 11- Henckel T ,Zeeck A. *Secondary metabolites by chemical screening* . J Antibio.1991;44(6):665-669.
- 12-Numura H, Hayakawa M. *New methods for the selective isolation of soil actinomycetes.* Biology of actinomycetes, Japanese Scientific Society Press, Tokyo. 1988; 88:288-293.
- 13- Krishna Kumari K, Ponmurugan P, Kannan N. *Isolation and characterization of streptomyces sp. From soil sample for secondary metabolite production.* Biotechnology.2006;5(4):478-480.
- 14- Yun NR , Lee YN. *Identification of soil Streptomyces spp. Producing Antifungal Substance.* Department of Microbiology, Chungbuk National University. 1994;32(6),449-454.
- 15- Jayalakshmi T, Krishnamoorthy P, Rameshkumar G, Sivamani P . *Characterisation and Identification of Feather - Degrading Streptomyces sp From Chick Feather Wastes.* New York Science Journal. 2009;4(1).
- 16-Holt JG. *Bergey's determination bacteriology.* 1989;145-9.
- 17- Nurettin S. *Investigation of the Antimicrobial Activity of Some Streptomyces Isolates.* Turk J Biol 2002;27:79-84.
- 18- Ceylan O, Okmen G, Ugur A. *Isolation of soil Streptomyces as source antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria.* EurAsian Journal of BioSciences. 2008;2: 73-82 .
- 19-Hewitt W. *Theory and application of microbiological assay.* Capter(4). 1988.
- 20- Khamna S. . *Antifungal activity of streptomyces spp. Isolated from rhizosphere of Thai medicine plants.* A jurnal for biology beyond border. 2009
- 21- Deepika T. *Lakshmi pathy and Krishnan Kannabiran. A Morphological, Biochemical and Biological Studies of Halophilic Streptomyces sp. Isolated from Saltpan Environment.* American Journal of Infectious Diseases. 2009;5 (3): 200-206.
- 22-Prapagdee B , Kuekulvong Ch, Mongkolsuk S . *Antifungal Potential of Extracellular Metabolites Produced by Streptomyces hygroscopicus against Phytopathogenic Fungi.* Int J Biol Sci .Ivyspring International Publisher. 2008; 4:330-337
- 23- Oskay M. *Antifungal and antibacterial compounds from Streptomyces strains.* African Journal of Biotechnology . 2009;8 (13):3007-3017.
- 24- Emami M , Babaii GH , Kachuii R ,Geramishar M. *Isolation and Identification Aerobic Actinomycetes from Isfahan.* 1997