پژوهنده (مجله پژوهشي دانشگاه علوم پزشكي شهيد بهشتي)
سال دوازدهم, شماره ۳, پي در پي ۵۷ ، صفحات ۲۱۱ تا ۲۲۰
مرداد و شهريور ۱۳۸۶

تاريخ دريافت مقاله ۸۵/۳/۹
تاريخ پذيرش مقاله ۸۵/۱۱/۷

جداسازي، طبقه‌بندي و شناسايي سوش‌هاي استرپتومايسز به‌روش‌كموتاكسونومي

دكتر سـيد سـعيد اشـراقي [۱*]، افروزه نجم الهدى [۲]، فاطمه حاجى قاسمى [۳]

چكيده

سابقه و هدف: *اكتينومايست گروهي از باكتري‌هاي گرم مثبت رشته‌اي شكل هستند كه به لحاظ پاره‌اي از شباهت‌هاي ظاهري به‌قارچ‌ها، سالیان متمادي در قلمرو اوكاريوت‌ها مورد بررسي و مطالعه قرار مي‌گرفتند. اين باكتري‌ها در زمينه علوم پزشكي و بيوتكنولوژي اهميت زيادي دارند، چنان كه بعضي از جنس‌هاي آن قادرند بيماري‌هاي عفوني‌حاد و مزمني در انسان و حيوانات ايجاد نمايند. به علاوه بعضي از انواع (استرپتومايست) توانايي توليد آنتي‌بيوتيك‌هاي مختلف را دارند كه نوع و ميزان آن در بين گونه‌ها بسيار متفاوت است.*

مواد و روش ها: *پنجاه نمونه خاك از مناطق مختلف‌كشور جمع‌آوري و با استفاده از روش رقت پليت ۱۴۰ كلني خالص با ويژگي‌هاي استرپتومايسز به دست آمد. ۸۸ سوش از بين آن‌ها انتخاب و به‌روش كروماتوگرافي لايه‌نازك (TLC)، محتواي ديواره سلولي آن‌ها دقيقاً شناسائي گرديد. ابتدا اسيدهاي آمينه ديواره سلولي باكتري‌ها هيدروليز و توسط اتر دوپترول شستشو تا چربي‌ها در فاز اتري كاملاً حل و جدا شوند. از عصاره‌هاي صاف شده با استفاده از لوله‌هاي موئين لكه‌هايي با فواصل ۲ سانتي‌متر از هم بر روي صفحات۲۰*۲۰ سانتي‌متري كروماتوگرافي گذاشته شد. در ابتدا و انتهاي صفحه كروماتوگرافي دو لكه استاندارد قرار گرفت. در نهايت هرصفحه داراي ۸ نمونه و دو لكه استاندارد گرديد.*

يافته ها: *پس از ظاهر شدن لكه‌ها، ايزومرهاي دي‌آمينو پايميليك اسيد (DAP) به رنگ سبز زيتوني متمايل به زرد با R_f هاي متغير و ساير اسيدهاي آمينه به رنگ ارغواني نمايان گرديد كه از طريق مقايسه با استاندارد مورد تفسير قرارگرفتند. به علت حضور ايزومر چپ‌گرد دي‌آمينو پايميليك اسيد در صفحات، مشخص شد كه ۹۷% نمونه‌هاي مورد آزمايش استرپتومايسز بودند.*

نتيجه گيري: *كموتاكسونومي روشي مناسب براي شناسايي گونه‌هاي استرپتومايسز مي‌باشد.*

واژگان كليدي: *استرپتومايسز ، كموتاكسونومي ، كروماتوگرافي لايه‌نازك ، دي‌آمينو پايميليك اسيد*

مقدمه

راسته اكتينومايست گروه بزرگي از باكتري‌هاي گرم مثبت رشته‌اي شكل هستند كه به لحاظ پاره‌اي از شباهت هاي ظاهري به قارچ‌ها، سالياني متمادي در قلمرو اوكاريوت‌ها مورد بررسي و مطالعه قرار مي‌گرفتند. در دهه ۱۹۵۰ ميلادي با دستيابي به تركيب شيميايي و شناخت دقيق‌تر از ساختمان سلولي اكتينومايست‌ها ، ماهيت پروكاريوتيك آن‌ها به اثبات رسيد، به طوري كه امروزه كاملاً از محدوده مطالعات قارچ‌شناسي خارج شده و در زمره باكتري ها قرار گرفته‌اند (۳-۱). اكتينومايست‌ها در زمينه علوم پزشكي و بيوتكنولوژي از اهميت ويژه‌اي برخوردارند، زيرا بعضي از جنس‌هاي آن‌ها قادر به ايجـاد بيـماري‌هاي عفوني حاد و مزمني همچون سل و نوكارديوز ريوي، جذام و اكتينومايكوز مي‌باشند (۷-۴). از سويي ديگر انواعي از آن‌ها (فاميل استرپتـومايست) توانايي توليـد آنتي‌بيوتيـك‌هاي مختـلف را

۱ * . نويسنده مسؤول : دانشيار، گروه پاتوبيولوژي، دانشكده بهداشت، دانشگاه علوم پزشكي تهران . آدرس براي مكاتبه: تهران، خيابان انقلاب، خيابان قدس، خيابان پورسيـنا، دانشگاه علـوم پزشكي تهران، دانشـكده بهداشت، گروه پاتوبيـولوژي، صنـدوق پستي: ۱۴۱۵۵- ۶۴۴۶ . تلفن: ۶۳۶۳۱۳۴-۰۹۱۲ و ۸۸۹۷۳۶۶۰-۰۲۱ نمابر:۸۸۹۵۴۹۱۳-۰۲۱ . پست الكترونيك: eshraghs@sina.tums.ac.ir
۲ . دانشجوي دارو سازي
۳ . ايمنولوژيست، عضو هيأت علمي دانشكده پزشكي، دانشگاه شاهد

دارند كه نوع و ميزان آن در بين گونه‌ها بسيار متفاوت است (۱۱-۸). اين فاميل منشأ توليد بيش‌از ۸۵ درصد از آنتي‌بيوتيك‌هاي موجود مي‌باشند (۱۳-۱۲) و بعضي از گونه‌ها قادر به توليد بيش از يك آنتي‌بيوتيك هستند (۱۴). گونه‌هاي استرپتومايسز مولد آنتي‌بيوتيك مي‌توانند موجب مهـار رشد تعدادي از ميكروارگانيسم‌هاي درون خاك مانند باكتري‌ها، قارچ‌ها و نماتودها گردند (۱۸-۱۵). در اين راستا توانايي اين باكتري‌ها جهت كنترل پاتوژن‌هاي گياهي خاك به ميزان وسيعي مورد بررسي قرار گرفته است (۱۹). همچنين مطالعات گسترده‌اي جهت توليد گونه‌هاي جديد استرپتومايسز براي كنترل بيـولوژيكي بيـماري‌هاي گيـاهي (۲۰)، و مقاومت دارويي باكتري‌ها (۲۱) انجام شده است. استرپتومايسزها در بسياري از زيستگاه هاي طبيعي پراكنده‌اند ولي جـايگاه اصلي آن‌ها خاك است (۶و۲۲). همـگي آن‌ها هـوازي، گـرم مثبت، كاتـالاز مثبـت و كموارگانوتروف بوده و داراي نوعي متابوليسم اكسيداتيو مي‌باشند. بسياري از مواد موجود در خاك از جمله نيترات‌ها و منابع حاوي كربن مانند پارافين و نشاسته را تجزيه نموده و به مصرف مي‌رسانند و ظاهراً نيازي به ويتامين‌ها و فاكتورهاي رشد ندارند. يكي ازمتابوليت‌هاي مهم آن‌ها ژئوسمين (Geosmin) مي‌باشد كه مسؤول بوي خاص خاكي اين ميـكرو ارگانيـسم‌هاست (۲۳و۲۴). فاميل استرپتومايست داراي چهار جنس به نام هاي استرپتومايسز، استرپتوورتي‌سي‌ليوم، كينوس پوريا و اسپوري‌كيتا مي‌باشد كه از نظر توليد آنتي‌بيوتيك، استرپتومايسز بيش ترين سهم را به خود اختصاص مي‌دهد. اين گروه از ميكروارگانيسم‌ها از نظر ژنتيكي داراي پاره‌اي ويژگي‌هاي غيرمعمول و منحصر به فرد هستند. ازجمله مي‌توان به سلول غني از DNA و درصد بالاي سيتوزين وگوانين در آن‌ها كه درحدود ٦٩ تا ۷۸ درصد مي‌باشد اشاره نمود (۲و۲۵). استرپتومايست‌ها را مي‌توان به روش‌هاي مختلفي طبقه‌بندي نمود كه در اين راستا بايد به طبقه‌بندي هاي مختلف بر اساس خصوصيات ذيل اشاره كرد: ۱- خصوصيات مرفولوژيك، فيزيولوژيك و بيوشيميايي (Numerical-Taxonomy)، ۲- خصوصيات شيـميايي سلول باكـتري (Chemotaxonomy)، ۳- ويژگي هاي ايمني شناسي (Serology)، ۴- اختصاصات ژنتيكي (Phylogeni) و ۵- روش اسيدهاي نوكلئيك (۲۸-۲۶).

امروزه همگام با گسترش سريع و قابل ملاحظه تكنيك‌هاي آناليتيكال در شيمي و بيولوژي مولكولي، رشته‌اي از اطلاعات جديد در گستره تاكسونومي حاصل گرديده كه بيانگر نقش متغيرهاي شيميايي درحيات موجودات زنده و كاربرد خصايص شيميايي در طبقه‌بندي و شناسايي آن‌ها مي‌باشد. با توجه به تركيبات شيميايي ويژه‌اي كه در سلول استرپتومايسزها وجود دارد، كموتاكسونومي روش ايده‌آلي براي شناسايي و طبقه‌بندي آن‌ها محسوب مي‌گردد. به دليل وجود ايزومرهاي دي‌آمينو پايميليك اسيد و گلايسين، و فقدان اسيدهاي مايكوليك و قندهاي خاص در ديواره سلولي فاميل‌استرپتومايست، مي‌توان آن‌ها را در گروه كموتايپ ديواره‌اي نوع I و پپتيدوگلايكان A3 γ جاي داد (۳۱-۲۹). از طرفي نظر به پديده مقاوت دارويي و افزايش روز افزون سوش‌هاي مقاوم به آنتي‌بيوتيك و لزوم توليد داروهاي جديد با منشأ بيولوژيك، بر آن شديم تا با انجام مطالعه و تحقيق در زمينه جداسازي، طبقه‌بندي و شناسايي گونه‌هاي مختلف استرپتومايسز، زمينه و امكان توليد آنتي‌بيوتيك‌هاي جديد را در كشور فراهم آوريم، لذا مطالعه حاضر بر اساس ويژگي اصلي استرپتومايست‌ها يعني وجود ايزومر چپ‌گرد دي‌آمينو پايميليك اسيد (*L*-DAP) در پپتيدوگليكان ديواره سلولي انجام پذيرفته است.

مواد و روش ها

پنـجاه نمـونه خاك از منـاطق مختلف كشور شامل نقاط

مختلف پايتخت، مناطق شمالي كشور مانند چالوس، نوشهر، دماوند، رودهن، آمل، نور، محمودآباد، مناطق جنوبي كشور شامل نقاط مختلف استان بوشهر و مناطق مركزي كشور از جمله بخش‌هايي از شهرستان‌هاي قم و اراك جمع آوري گرديد. نمونه‌ها از عمق صفر تا پنج سانتي متري سطح خاك و از سطوحي به ابعاد ۲۰ *۲۰ سانتي‌متر برداشته شده و پس از بسته‌بندي مناسب و الصاق برچسب‌هاي حاوي اطلاعات لازم، به منظور جلوگيري از تماس با نور، هوا و حرارت در يخچال نگهداري گرديدند.

هر يك از نمونه‌ها در هاون به‌خوبي ساييده شده و يك گرم از آن به شيشه استريل حاوي ۹ ميلي‌ليتر آب مقطر استريل منتقل و يك تعليق يكنواخت از آن تهيه شد كه بيانگر رقت 10^{-1} بود. به منظور ازبين بردن ميكروب‌هاي مزاحم، سوسپانسيون حاصله به مدت ٦ تا ۱۰ دقيقه در داماي ۵۵ درجه سانتيگراد قرار گرفت. در مرحله بعد يك ميلي‌ليتر از سوسپانسيون حاصل برداشته و حجم آن با آب مقطر به۱۰ ميلي‌ليتر رسيد. بدين ترتيب رقت 10^{-2} به دست آمد. اين كار به طور متوالي تا رسيدن به رقت 10^{-10} تكرار گرديد. سپس۱۰۰ ميكروليتر از هر يك از رقت‌هاي تهيه شده درمحيط مناسب (نشاسته كازئين آگار و عصاره مخمر گلوكز آگار) كشت داده شد. لازم به ذكر است كه به منظور حذف قارچ‌هاي مزاحم، به ميزان ۵۰ ميلي‌گرم در ليتر نيستاتين به محيط كشت اضافه گرديد.

پس از طي ۷ الي۱۰ روز دوره انكوباسيون در داماي ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتيگراد، رشد كلني‌هاي مختلف مشاهده شد و از بين آن‌ها، كلني‌هاي داراي ظاهر پودري يا مخملي كه از خصوصيات مرفولوژيك استرپتومايسزهاست، انتخاب و برداشته شده و مجدداً بر روي محيط جديد كشت داده شدند تا كاملاً خالص گردند. پس از خالص سازي براي جلوگيري از هر نوع تغيير ژنتيكي در طول تحقيقات، يك پليت خالص به طور كامل با لوپ استريل تراشيده و به يك ظرف شيشه‌اي ۳ ميلي‌ليتري حاوي ۱ ميلي‌ليترگليسرول ۱۰% استريل منتقل و در داماي۲۰- درجه سانتيگراد نگهداري شد.

در نخستين گام از نمونه‌هاي خالص استرپتومايسز كشت مجدد تهيه و جهت انجام كموتاكسونومي، به شرح ذيل آماده سازي صورت‌گرفت؛ سطح پليت‌هاي خالص شده به طور كامل تراشيده شد و به درون يك لوله پيركس دريپچ دار حاوي يك ميلي‌ليتر اسيد كلريدريك ٦ نرمال انتقال يافته و كاملاً مخلوط گرديد. سپس عمل هيدروليز به مدت ۱۸ ساعت در داماي۱۰۰ درجه سانتيگراد صورت گرفت. متعاقباً عصاره‌هاي هيدروليز شده توسط تعدادي پيپت پاستور كه در انتهاي آن‌ها پشم شيشه قرار داشت صاف شده و سپس عصاره‌ها براي ۳ بار و هر بار يك ميلي‌ليتر اتردوپترول (^{oC}60-80 bp) شسته شد. بدين ترتيب چربي‌ها در فاز اتري كاملاً حل شده و جدا شدند. در مرحله آخر، از عصاره‌هاي صاف شده با استفاده از لوله‌هاي مويين لكه‌هايي با فواصل ۲ سانتي‌متر از هم بر روي صفحات۲۰*۲۰ سانتي‌متري كروماتوگرافي لايه نازك TLC سلولزي پشت پلاستيكي از نوع (Kodak 13255) گذاشته و با سشوار خشك گرديد. در ابتدا و انتهاي صفحه كروماتوگرافي دو لكه استاندارد (شامل محلول ۰/۱ درصد وزني حجمي از (*meso*-DAP) مقادير بسيار ناچيز *LL*-DAP & D-DAP در آب مقطر) قرار گرفت. اين كار ده بار روي هر لكه صورت گرفت تا لكه‌ها به خوبي تغليظ شوند. در نهايت هر صفحه داراي ۸ نمونه و دو لكه استاندارد بود. به دنبال آن، صفحه لكه‌گذاري شده به مدت ۳ ساعت در سيستم حلالي متشكل از متانول، آب، اسيدكلريدريك ٦ نرمال، پيريدين با نسبت‌هاي ۵: ۲: ۱۳: ٤٠ (V/V) قرار گرفت. پس از طي ٢٤ ساعت و خشك شدن كامل صفحات در هواي آزمايشگاه، صفحات با محلول ۲ در هزار نين‌هيدرين در استن (W/V) اسپري گرديد و در مرحـله بعد به مدت ۵ تا ۱۰ دقيـقه در داماي ۱۰۰ درجه

سانتيگراد قرار گرفتند تا لكه‌ها ظاهر شدند. در پايان آزمايش، ايزومرهاي (DAP) به رنگ سبز زيتوني با R_f متغير و ساير اسيدهاي آمينه به رنگ ارغواني‌نمايان گرديدند كه از طريق مقايسه با استاندارد مورد تفسير قرار گرفتند. به منظور تشخيص و تمايز استرپتومايسز از استرپتوورتي‌سيليوم، مقايسه زنجيره‌هاي‌اسپور به عنوان مهم ترين اختلاف اين دو جنس مهم استرپتومايست انجام شد.

يافته ها

- *جداسازي وتهيه كلني‌هاي خالص استرپتومايسز:*

از پنجاه نمونة مورد مطالعه۱٤۰ سوش استرپتومايسز جدا گرديد كه پس از انجام آزمايش‌هاي لازم بر روي آن‌ها، در محلول استريل‌گليسرول۱۰ درصد قرارگرفته و در دماي منفي۲۰ درجه سانتيگراد نگهداري شد. ويژگي‌هاي مورفولوژيك كلني‌ها نقش قابل ملاحظه‌اي در انتخاب و گروه‌بندي صحيح نمونه‌هاي جدا شده از نمونه خاك‌هاي مورد آزمايش داشتند. مهم تريـن اين ويژگي‌ها عبارت بودنـد از:

۱. شكل ظاهر كلني‌ها كه اكثراً خشك و چروكيده بوده و به دشواري به كمك لوپ از روي سطح آگاركنده مي‌شدند.
۲. اندازه كلني‌ها كه بين ۰/5 تا 5 ميلي‌متر بودند.
۳. آرايش كلني‌ها در زير لوپ كه به اشكال زگيلي، آتشفشاني، مارپيچي، دكمه‌اي با سطحي ناصاف و يا برآمده با يك فرورفتگي در مركز به چشم مي‌خوردند.
٤. سطح كركي اغلب كلني‌ها كه ناشي از اسپورسازي (Sporolation) آن‌ها بود.
۵. حاشيه كلني‌ها كه در غالب موارد به صورت منظم ديده مي‌شد.

پس از خالص‌سازي كلني‌هاي مشكوك روي محيـط‌هاي انتخابي و انكوباسيون به مدت ۷ تا۱۰ روز، كلني‌هاي بالغ ظاهر شدند كه داراي رنگ‌هاي مختلفي از جمله سفيد، خاكستري، كِرم، زرد و ندرتاً بنفش، سبـز، قرمـز، صورتي و گل‌بهي بودنـد. در بعضي از مـوارد رنگ پشت كلني ها با رنگ خود كلني تفاوت داشت و گاهي رنگ خـود محيط نيز با رنگ پشت و روي‌كلني متفاوت بود كه اين پديده ناشي از پيگمان‌هاي قابل انتشار در آگار مي‌باشـد. مشـخصات نمونه‌هاي استرپتومايسز به دست آمده به اختـصار در جدول ۱ آمده است. لازم به ذكر است كه بوي خاص پليـت‌هاي حاوي سوش‌هاي خالص شده كه ناشي از توليد ژئوسميـن مي‌باشد نيـز راهنماي وجـود احتمالي استرپتومايسزها بود.

جدول ۱- مشخصات سوش‌هاي استرپتومايسز جداشده از نمونه‌هاي خاك مورد بررسي

تعداد نمونه		سوش‌هاي انتخابي‌براي آزمونTLC	*تعداد (%) كلني‌هاي بدست آمده به تفكيك رنگ*						
خاك مورد بررسي	سوش جدا شده از خاك		سفيد	خاكستري	كرم	نارنجي	شيري	قرمز	*زرد*
۵۰	۱۴۰	۸۸	۴۷ (۵۳/۴)	۲۲ (۲۵)	۱۴ (۱۵/۹)	۱ (۱/۱۳)	۲ (۲/۲۷)	۱ (۱/۱۳)	۱ (۱/۱۳)

- *شناسائي نمونه‌هاي خالص شده استرپتومايسز با استفاده از روش کموتاکسونومي:*

براي حصول اطمينان از استرپتومايسز بودن نمونه‌هاي خالص شده، مي‌بايست وجود ايزومر چپ گرد دي‌آمينو پايميليك اسيد (*LL*-DAP) در ديواره سلولي آن‌ها به اثبات مي‌رسيد. بدين منظور، ۸۸ سوش استرپتومايسز مناسب‌تر از بين ۱۴۰ سوش جدا شده انتخاب و جهت کروماتوگرافي لايه نازك در نظر گرفته شد. پس از لکه گذاري عصاره هيدروليز شده و طي مراحل مختلف ظهور، در قسمت بالاي کروماتوگرام، لکه‌هاي ارغواني با R_f بالا ظاهر شد که نمايانگر اسيدهاي آمينه غير از دي‌آمينو پايميليك اسيد مي‌باشد و در مطالعه حاضر فاقد ارزش تشخيصي هستند. در زير لکه‌هاي ارغواني تعدادي لکه‌هايي برنگ سبز زيتوني متمايل به زرد مشاهده شد که بيانگر وجود ايزومرهاي مختلف DAP بود. در محل استقرار استانداردها، تنها دو لکه سبز زيتوني به چشم مي‌خورد زيرا محلول استاندارد مورد استفاده تنها حاوي ايزومرهاي مختلف DAP و فاقد هر گونه اسيد آمينه مزاحم ديگر مي‌باشد. لکه اول که داراي R_f بيش تر و رنگ روشن‌تر است معرف فرم (*LL*-DAP) و لکه دوم که R_f کم تري داشته و بزرگ‌تر و پر رنگ‌تر بود و زير لکه قبلي قرار داشت، مشخص‌کنندة فرم (*meso*-DAP) است. با اين تفسير، چنانچه لکه رنگي حاصل از هريك از سوش‌هاي مورد آزمايش در امتداد اولين لکه حاصله از استاندارد (لکه سبك و بالايي) قرار گيرد، سوش مذکور در ديواره سلولي خود داراي ايزومر (*LL*-DAP) است. ولي اگر لکه زرد رنگ مشتق از سوش‌هاي مورد نظر در امتداد دومين لکه حاصله از استاندارد قرار گيرد (لکه سنگين و پايينی)، سوش مزبور داراي ايزومر (*meso*-DAP) است، و اگر هيچ گونه لکه رنگي در مسير استقرار نمونه‌هاي مورد نظر روي کروماتوگرام ظاهر نگردد نشانه عدم حضورDAP در سوش مزبور است. در مطالعه حاضر سوش هاي مورد آزمايش اکثراً داراي ايزومر (*meso*-DAP) بودند و به دليل اين که اين ايزومر تنها در ديواره سلولي فاميل استرپتومايست وجود دارد، مثبت بودن پاسخ تست‌ها بيانگر تعلق آن‌ها به اين فاميل بود. به منظور تفكيك تا مرحله جنس براي همه نمونه ها اسلايد کالچر گذاشته شد و زنجيره اسپور آن‌ها مورد بررسي قرار گرفت و تعلق تعداد زيادي از سوش‌هاي به دست آمده به جنس استرپتومايسز مسجل شد زيرا يكي از وجوه تمايز مهم جنس استرپتومايسز از استرپتوورتي‌سيليوم، شكل زنجيره ی اسپور آن‌هاست. با استفاده از اين آزمايش گونه ها از هم تفكيك و جهت مطالعه محققين به صورت مناسب در دانشكده بهداشت نگهداري مي‌شود.

جدول ۲- تعيين در صد ايزومرهاي مختلف دي‌آمينو پايميليك اسيد به روش کروماتوگرافي لايه‌نازك

رنگ کلني‌ها	درصد ايزومر**DAP**	
	LL - DAP	*meso* - DAP
سفيد	%۹۳/۶	%۶/۴
خاکستري	%۹۵/۴	%۴/۵۴
کرم	%۹۲/۸۵	%۷/۱۴
نارنجي	%۱۰۰	۰
شيري	%۱۰۰	۰
قرمز	%۱۰۰	۰
زرد	%۱۰۰	۰

بحث

امروزه، مشكل مقاومت سوش‌هاي ميكروبي بيماري‌زا نسبت به آنتي‌بيوتيك‌هاي موجود در بازار دارويي، به دليل مصرف بي‌رويه و يا نادرست اين دسته از داروها، يكي از معضلات بزرگ بهداشتي و درماني جوامع بشري محسوب مي‌گردد. همان گونه که پيش تر نيز ذکر شد، حدود ۸۵% از آنتي‌بيوتيك‌هاي موجود، از استرپتومايسزها به دست مي‌آيند (۱۲و۱۳). از آنجايي که زيستگاه اصلي اين ميكروارگانيسم‌ها،

خاك مي‌باشد (۶و۲۲)، برآن شديم تا با بررسي خاك مناطق مختلف كشور پهناورمان، شماري از سوش‌هاي استرپتومايسز را به طور خالص جدا نموده و براي تحقيقات جامع به محققين ارائه نماييم.

در مطالعه حاضر پنجاه نمونه خاك از مناطق مختلف كشور مورد بررسي قرار گرفت. روش مورد استفاده براي جداسازي باكتري‌ها، متد *رفت پليت* بود. جداسازي و انتخاب نمونه‌هاي مشكوك به استرپتومايسز، با بهره‌گيري از ويژگي‌هاي مرفولوژيك آن‌ها مانند شكل و رنگ كلني‌ها و بوي خاص ژئوسمين كه يكي از محصولات متابوليسم استرپتومايسزهاست، صورت گرفت. رنگ كلني‌ها، با تغيير محيط كشت تغيير مي‌يافت و به رنگ هاي مختلف مانند سفيد، خاكستري، زرد، كرم، سبز، بنفش، قرمز و گل بهي ديده مي‌شد. گاهي رنگ پشت كلني با رنگ روي آن تفاوت داشت و حتي در بعضي از موارد رنگ خود محيط نيز با رنگ كلني و پشت آن يكسان نبود كه اين پديده را مي‌توان ناشي از پيگمان‌هاي قابل نفوذ در آگار دانست. اندازه قطر كلني‌ها از ۰/۵ تا ۵ ميلي‌متر متغير بود كه غالباً حاشيه منظم داشته ولي گاهي كلني‌ها با حاشيه نامنظم نيز به چشم مي‌خوردند.

بررسي بر روي pH خاك ها به طور مستقيم انجام مي‌گرفت و الكترود pH متر مستقيماً در سوسپانسيون‌حاصل از آب مقطر و هر يك از نمونه‌هاي خاك قرار گرفته و pH نمونه مورد آزمايش اندازه‌گيري مي‌شد. در نهايت مشخص گرديد كه تمامي نمونه‌هاي خاك جمع‌آوري شده خاصيت قلياي داشته و pH آن‌ها بين ۸ تا ۹ و گاهي بالاتر از ۹ بود. اين امر روشن مي‌سازد كه سوش‌هاي جدا شده احتمالاً از نوع استرپتومايسزهاي آلكالوفيل بوده‌اند (در صورتي كه مطالعه بر روي سوش‌هاي اسيدوفيل موجود در خاك‌هاي اسيدي مدنظر باشد مي‌بايست با به كارگيري تدابير خاصي pH محيط كشت را تعديل نمود). طي آزمايشات انجام شده، روشن گرديد كه تعداد استرپتومايسزها در نمونه‌هاي برداشته شده از سطح خاك (عمق صفر تا ۵ سانتي‌متر) بيش تر از تعداد موجود در نمونه‌هاي حاصل از قسمت‌هاي عميق‌تر خاك (۱۰ تا ۵۰ سانتي‌متري) مي‌باشد. اين امر مؤيد حضور گسترده‌تر اين ميكروارگانيسم‌ها در بخش‌هاي سطحي‌تر خاك است كه شايد به علت دسترسي بيش تر به نور، اكسيژن و رطوبت باشد.

نتيجه قابل توجه ديگر اين بود كه نمونه‌هاي خاك مجاور گياهان مخصوصاً باغچه‌هاي كود داده شده از نظر وجود استرپتومايسز غني‌تر از نمونه‌هاي خاك مناطق خشك و عاري از رستني‌ها بود. نتيجه ديگر اين كه در نمونه‌هاي جمع‌آوري شده از مناطق مرطوب و علف‌زارها، استرپتومايسزهاي بيشتري يافت شدند كه نشان دهنده تأثير مثبت عامل رطوبت در رشد و نمو استرپتومايسزها مي‌باشد. البته ذكر اين نكته مهم، ضروري است كه در نمونه‌هاي برداشت شده از خاك مناطق بسيار گرم و مرطوب مانند منطقه ري‌شهر بوشهر كه به علت نزديكي به دريا از رطوبت بسيار زيادي برخوردار است، هيچ موردي از وجود استرپتومايسز مشاهده نشد. اين امر در مورد نمونه‌هاي خاك مناطق كويري مانند قم نيز صدق مي‌كرد. شايد علت اين پديده، غلظت بالاي املاح خاك اين مناطق باشد. زيرا فشار اسمزي بالا، ادامه حيات استرپتومايسزها را به مخاطره مي‌اندازد. از جميع نتايج فوق‌الذكر، به ميزان اهميت شرايط اكولوژيك دركثرت جمعيت استرپتومايسزها وگسترش آن‌ها پي مي‌بريم.

شناسايي استرپتومايسزها به روش‌هاي گوناگون امكان پذير مي‌باشد. از جمله مي‌توان به روش‌هاي يادشده در مبحث طبقه‌بندي نومريكال اشاره نمود كه شامل آزمايشات فيزيولوژيك، مرفولوژيك و بيوشيميايي مي‌گردند (۲۸-۲۶). روش‌هاي ژنتيك، از جمله متدهاي بررسي ژنوم، DNA و RNA نيز گروه ديگري از روش‌هاي بسيارسودمند در زمينه شناسايي و طبقه‌بندي استرپتومايسزها مي‌باشد كه علي‌رغـم

سودمند بودن آن‌ها عمدتاً روش‌هاي مشكل، پرهزينه و وقت‌گيري است. روش‌هاي كموتاكسونوميك در زمره راحت‌ترين، سريع‌ترين و قابل اعتمادترين روش‌هاي شناسايي و طبقه‌بندي استرپتومايسزها محسوب مي‌شود كه طي آن به كمك متدهاي مختلف شيميايي، تك تك اجزاي سلول باكتريايي تجزيه و شناسايي شده و براساس آن‌ها طبقه‌بندي ميكروارگانيسم صورت مي‌گيرد (۳۱-۲۹). درتمامي اين روش‌ها، ابتدا سلول باكتري هيدروليز شده تا اجزايي مورد نظر در دسترس قرار گيرد. پس از طي مراحل متعدد، جزء دلخواه و مورد نظر (كه مي‌تواند انواع چربي‌هاي درون سلول يا ديواره سلولي، انواع قندها، اسيدهاي آمينه، برخي از سايتوكروم‌ها، كينون‌هاي ايزوپرنوئيد و ... باشد) توسط يك حلال مناسب استخراج شده و سپس به كمك روش‌هاي مختلف از جمله Mass-Spectrophotometry, TLC, HPLC, GLC و غيره مورد شناسايي قرار مي‌گيرد. برخي از روش‌هاي مذكور نه تنها قادرند كيفيت مواد مجهول را شناسايي كنند، بلكه مي‌توانند بيانگر كميت آن‌ها نيز باشند.

چنان كه پيش تر گفته شد، استرپتومايسزها داراي ايزومر چپ گرد دي‌آمينو پايميليك اسيد (*L*-DAP) در پپتيدوگليكان خود هستند. ضمن اين كه داراي اسيد آمينه گلايسين نيز مي‌باشند كه هر دو ماده مذكور از ارزش تشخيصي بالايي برخوردارند. از ديگر ويژگي‌هاي تشخيصي استرپتومايسزها مي‌توان به وجود مناكينون‌هاي هگزاهيدروژنه و اوكتاهيدروژنه و همچنين اسيدهاي چرب اشباع شده ايزو و آنتي‌ايزو در سلول آن‌ها اشاره نمود. در مقابل، استرپتومايسزها فاقد اسيدهاي مايكوليك و هرگونه قند تشخيصي در ديواره سلولي خود مي‌باشند. با توجه به اين كه كينون‌هاي ايزوپرونوئيد در تمامي اعضاي خانواده اكتينومايست وجود داشته و تنها اختلاف آن‌ها در تعداد واحدهاي ايزوپرن و ميزان اشباع شدگي بندهاي دوگانه آن‌ها مي‌باشد، و نيز به دليل اينكه گلايسين هم ممكن است در ساير جنس‌هاي اين خانواده يافت شود، لذا ارزش تشخيصي دو پارامتر مذكور در مرحله دوم اهميت و پس از دي‌آمينو پايميليك اسيد قرار مي‌گيرد (۲و۲۵). در حقيقت تشخيص اساسي استرپتومايسزها ازطريق جستجوي (*L*-DAP) صورت گرفته و رديابي كينون‌هاي ايزوپرنوئيد و گلايسين ضريب اطمينان تشخيص را افزايش مي‌دهند. به منظور رديابي كل اسيدهاي آمينه موجود در سلول باكتريايي از چند روش مي‌توان سود جست. نخست استفاده از GLC است كه با استفاده از اين روش مي‌توان به وجود DAP پي‌برد اما نوع ايزومر را نمي‌توان مشخص كرد. روش دوم كروماتوگرافي كاغذي دو بعدي است كه با استفاده از صفحات واتمن شماره ۱ و ۲ و نيز سيستم خاص حلال صورت مي‌گيرد.

نتيجه گيري

بهترين راه براي شناخت نوع ايزومرDAP استفاده از روش كروماتوگرافي لايه نازك است. هنگامي كه پاسخ يك تست براي (*LL*-DAP) مثبت باشد مي‌توان با اطمينان اظهار نظر نمود كه نمونه مورد آزمايش در زير مجموعه فاميل استرپتومايست است، ولي براي حصول اطمينان كه آيا در جنس استرپتومايسز قرار دارد يا خير؟ بايد آزمايشات ديگري را نيز انجام داد كه از جمله مي‌توان به بررسي زنجيره اسپور اشاره نمود كه يكي از مهمترين وجوه تمايز بين استرپتومايسز و استرپتوورتي‌سيليوم مي‌باشد.

REFERENCES

1. Lerner PI. Actinomyces and Arachnia species. In: Mandell GL, Douglas JR, Bennett JE, editors. Principles and Practice of Infectious Diseases. 3rd ed. New York, Edinburgh, London, Melborne: Churchill Livingstone. 1990; P:1932-41.

2. Goodfellow M, Williams ST. New strategies for the selective isolation of industrially important bacteria. Biotechnol and Genet Eng Rev 1986;4:213-6.

3. Marsollier L, Aubry J, Saint-Andre JP, Robert R, Legras P, Manceau AL, et al. Ecology and transmission of *Mycobacterium ulcerans*. Pathol Biol 2003;51:490-5.

4. Filice GA. Nocardiosis. In: Braunwald E, Fauci AS. Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, editors. Harrison's Principals of internal Medicine. Vol 1. 15th ed. McGraw-Hill Companies Inc: USA. 2001; P: 1006-8.

5. Thakkar SG, Isada C, Smith J, Karam MA, Reed J, Tomford JW, et al. Jaw complications associated with bisphosphonate use in patients with plasma cell dyscrasias. Med Oncol 2006;23(1):51-6.

6. Lunca S, Romedea N. Actinomycosis of the appendix. Case report. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi. 2004; 108: 640-3.

7. Kumar R, Singhasivanon P, Sherchand JB, Mahaisavariya P, Kaewkungwal J, Peerapakorn S, et al. Gender difference in socio-epidemiological factors for leprosy in the most hyper-endemic district of Nepal. Nepal Med Coll J 2004;6(2):98-105.

8. Awa Y, Iwai N, Ueda T, Suzuki K, Asano S, Yamagishi J, et al. Isolation of a new antibiotic, alaremycin, structurally related to 5-aminolevulinic acid from *Streptomyces* sp.A012304. Biosci Biotechnol Biochem 2005;69:1721-5.

9. Al-Bari MA, Bhuiyan MS, Flores ME, Petrosyan P, Garcia-Varela M, Islam MA. *Streptomyces bangladeshensis* sp. nov., isolated from soil, which produces bis-(2-ethylhexyl)phthalate. Int J Syst Evol Microbiol 2005;55(Pt 5):1973-7.

10. Davelos AL, Xiao K, Flor JM, Kinkel LL. Genetic and phenotypic traits of streptomycetes used to characterize antibiotic activities of field-collected microbes. Can J Microbiol. 2004;50(2):79-89.

11. Hotta K, Ogata T, Ishikawa J, Okanishi M, Mizuno S, Morioka M, et al. Mechanism of multiple aminoglycoside resistance of Kasugamycin-producing *Streptomyces kasugaensis* MB273: involvement of two types of acetyltransferases in resistance to astromicin groupantibiotics. J Antibiot (Tokyo). 1996; 49: 682-88.

12. Adeleye IA, Eruba S, Ezeani CJ. Isolation and characterisation of antibiotic producing microorganisms in composted Nigerian soil. J Environ Biol, 2004; 25: 313-16.

13. Fourati-Ben Fguira L, Fotso S, Ben Ameur-Mehdi R, Mellouli L, Laatsch H. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80. Res Microbiol, 2005;156:341-47.

14. Hopwood DA. The Leeuwenhoek lecture, 1980. Towards an understanding of gene switching in Streptomyces, the basis of sporulation and antibiotic production. Proc R Soc Lond B Biol Sci 1988; 235(1279):121-38.

15. Chamberlain K, Crawford DI. In vitro and in vivo antagonism of pathogenic turf grass fungi by *Streptomyces hygroscopicus* strains YCED9 and WYE53. J Ind Microbiol Biotechnol 1999;23:641-6.

16. Doumbou CL, Akimov V, Cote M, Charest PM, Beaulieu C. Taxonomic study on nonpathogenic *streptomycetes* isolated from common scab lesions on potato tubers. Syst Appl Microbiol 2001; 24: 451-56.

17. Krechel A, Faupel A, Hallmann J, Ulrich A, Berg G. Potato-associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-pathogenic fungi and the plant-parasitic nematode Meloidogyne incognita (Kofoid & White) Chitwood. Can J Microbiol 2002;48:772-86.

18. Xiao K, Xuan L, Xu Y, Bai D, Zhong D. Constituents from polygonum cuspidatum. Chem Pharm Bull (Tokyo) 2002;50:605-8.

19. Somers DA, Samac DA, Olhoft PM. Recent advances in legume transformation. Plant Physiol 2003;131:892-9.

20. Cao L, Qiu Z, You J, Tan H, Zhou S. Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized tomato (Lycopersicon esculentum) roots. Lett Appl Microbiol 2004;39:425-30.

21. Sujatha P, Bapi Raju KV, Ramana T. Studies on a new marine *streptomycete* BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Microbiol Res 2005;160:119-26.

22. Langham CD, Williams ST, Sneath PH, Mortimer AM. New probability matrices for identification of *Streptomyces*. J Gen Microbiol 1989; 135: 121-33.

23. Ueno M, Yamashita M, Hashimoto M, Hino M, Fujie A. Oxidative activities of heterologously expressed CYP107B1 and CYP105D1 in whole-cell biotransformation using *Streptomyces lividans* TK24. J Biosci Bioeng, 2005;100:567-72.

24. Schorlemmer HU, Bosslet K, Dickneite G, Luben G, Sedlacek HH. Studies on the mechanisms of action of the immunomodulator Bestatin in various screening test systems. Behring Inst Mitt 1984;74:157-73.

25. Bowden, GHW. Actinomyces. In: Balows A, Duerden BI, editors. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Vol 2. 9th. ed. Oxford University Press. 1998; P: 445-60.

26. Meyers PR, Goodwin CM, Bennett JA, Aken BL, Price CE, van Rooyen JM. Streptomyces africanus sp. nov., a novel streptomycete with blue aerial mycelium. Int J Syst Evol Microbiol, 2004; 54: 1531-35.

27. Semedo LT, Gomes RC, Linhares AA, Duarte G, Nascimento RP, Rosado AS, et al. *Streptomyces drozdowiczii* sp. nov., a novel cellulolytic streptomycete from soil in Brazil. Int J Syst Evol Microbiol 2004;54:1323-8.

28. Meyers PR, Porter DS, Omorogie C, Pule JM, Kwetane T. *Streptomyces speibonae* sp. nov., a novel streptomycete with blue substrate mycelium isolated from South African soil. Int J Syst Evol Microbiol 2003;53:801-5.

29. Funa N, Funabashi M, Ohnishi Y, Horinouchi S. Biosynthesis of hexahydroxyperylenequinone melanin via oxidative aryl coupling by cytochrome P-450 in *Streptomyces griseus*. J Bacteriol 2005;187:8149-55.

30. Ahel I, MikocA, Gamulin V. RecA gene expression in a *streptomycete* is mediated by the unusual C-terminus of RecA protein. FEMS Microbiol Lett 2005;248:119-24.

31. Saintpierre-Bonaccio D, Amir H, Pineau R, Lemriss S, Goodfellow M. *Streptomyces ferralitis* sp. nov., a novel *streptomycete* isolated from a New-Caledonian ultramafic soil. Int J Syst Evol Microbiol 2004;54:2061-5.