DOI: 10.22092/VJ.2020.343062.1724
شماره ۱۳۲ پاییز ۱۴۰۰
تحقیقات دامپزشکی و فراورده‌های بیولوژیک

جداسازی و بررسی خاصیت ضدباکتریایی اکتینوباکتریا از کود الاغ

• صدیقه یوسفی نژاد
دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه ایلام
•فاضل پوراحمد(نویسنده مسئول)
گروه میکروبیولوژی، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه ایلام
• مصطفی نعمتی
گروه میکروبیولوژی، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه ایلام

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹-۰۳-۰۳ تاریخ پذیرش:۱۳۹۹-۰۴-۳۰
Email:f.pourahmad@ilam.ac.ir

چکیده

فراورده‌های میکروبی نقش مهمی در هضم و جذب مواد، افزایش ایمنی و مقاومت در برابر بیماری‌ها دارند. این فراورده‌ها به وفور به وسیله اکتینوباکتریا تولید می‌گردند. پژوهش حاضر با هدف جداسازی اکتینوباکتریا، بررسی اولیه خاصیت ضدباکتریایی و شناسایی ژن‌های مولد ترکیبات فعال زیستی از کود الاغ انجام گرفت. برای این منظور نمونه‌های کود الاغ بر روی محیط استارچ کازئین کشت داده شدند، سپس جدایه‌های اکتینوباکتریا با استفاده از روش مولکولی PCR شناسایی شده و خاصیت ضد باکتریایی آن‌ها با استفاده از روش انتشار از چاهک در آگار بررسی شد. همچنین، این جدایه‌ها به منظور غربالگری ژن‌های *PKS II*، *PKS I* و *NRPS* مورد بررسی قرار گرفتند. از ۹۲ جدایه اکتینوباکتریایی، ۶۶ جدایه دارای فعالیت آنتاگونیستی در برابر باکتری‌های تست بودند. از این تعداد، ۶۱ جدایه (۹۲ درصد) استافیلوکوکوس اورئوس، ۴۵ جدایه (۶۸ درصد) اشریشیا کلی، ۴۷ جدایه (۷۱ درصد) باسیلوس سرئوس و چهار جدایه (۶ درصد) سودوموناس اروجینوزا را مهار رشد کردند. نتایج حاصل از آنالیز مولکولی ژن‌های *PKS I* و *PKS II* و *NRPS* برای ۳۰ جدایه اکتینوباکتریایی انتخاب شده از میان ۹۲ جدایه مذکور نشان داد که ۱۸ جدایه (۵۴ درصد) حاوی ژن *NRPS*، هفت جدایه (۲۳ درصد) حاوی ژن *PKS I* و نه جدایه (۳۰ درصد) حاوی ژن *PKS II* بودند. نتایج این پژوهش بیانگر غنی بودن کود الاغ از اکتینوباکتریای تولیدکننده ترکیبات فعال زیستی با خاصیت ضدباکتریایی و حاوی درصد قابل توجه از ژن‌های *PKS I*، *PKS II* و *NRPS* است.

کلمات کلیدی: اکتینوباکتریا، کود حیوانی، خاصیت ضدباکتری، ژن‌های *PKS II* ، *PKS I* و *NRPS*

Veterinary Researches & Biological Products No 132 pp: 22-30

Isolation and evaluation of antibacterial activity of *Actinobacteria* from donkey manure

By: Yousifinejad, S., Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Sciences, Ilam University, Ilam, Iran.Pourahmad, F., (Corresponding Author) Department of Microbiology, Faculty of Vterinary Sciences, Ilam University, Ilam, Iran and Nemati, M., Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Sciences, Ilam University, Ilam, Iran.

Received: 2020-05-23 **Accepted: 2020-07-20**

Email: f.pourahmad@ilam.ac.ir

Microbial products play an important role in digestion and absorption of substances, increase immunity and disease resistance. These products are abundantly produced by *Actinobacteria*. The aim of this study was to isolate *Actinobacteria*, to investigate the antibacterial properties and to identify the genes that produce bioactive compounds from donkey manure. For this purpose, donkey manure samples were cultured on the casein stretch medium, then *Actinobacteria* isolates were identified by PCR and their antibacterial properties were investigated by agar well diffusion method. These isolates were also screened for *PKS I*, *PKS II* and *NRPS* genes. Of 92 Actinobacterial isolates, 66 isolates had antagonistic activity against test bacteria. Of these, 61 isolates (92%) inhibited *Staphylococcus aureus*, 45 isolates (68%) *Escherichia coli*, 47 isolates (71%) *Bacillus cereus* and four isolates (6%) inhibited *Pseudomonas aeruginosa*. The results of molecular analysis of *PKS I*, *PKS II* and *NRPS* genes for 30 isolates of *Actinobacteria* selected from the 92 isolates showed that 18 isolates (54%) contained *NRPS* gene, seven isolates (23%) enclosed *PKS I* gene and nine isolates (30%) contained *PKS II* gene. The results of this study indicate that donkey manure is rich in *Actinobacteria* producing bioactive compounds with antibacterial properties and contain a significant percentage of *PKS I*, *PKS II* and *NRPS* genes.

Key words: Donkey manure, *Actinobacteria*, Antibacterial activity, *PKS I, PKS II* and *NRPS* genes

مقدمه

اکتینوباکتریا، باکتری‌هایی گرم مثبت با محتوی سیتوزین و گوانین بالا در DNA خود هستند و یکی از بزرگترین شاخه‌های باکتریایی را تشکیل می‌دهند. آن‌ها به طور گسترده‌ای در هر دو اکوسیستم آبی و خاکی توزیع شده‌اند و در خاک، دریا، گیاهان، کود، آب‌های شیرین و غیره یافت می‌شوند. تعدادی از اکتینوباکتریا دارای شیوه زندگی میسیلیایی هستند و خصوصیات مورفولوژیکی متفاوت و پیچیده‌ای دارند. اکتینوباکتریا همچنین متابولیت‌های ثانویه گسترده‌ای داشته و حدود دو-سوم از همه‌ی آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی شناخته شده را که اکثر آن‌ها به وسیله گونه‌های استرپتومایسس حاصل می‌شوند، تولید می‌کنند. در نتیجه این باکتری‌ها از نظر بیوتکنولوژی، پزشکی، دامپزشکی و کشاورزی و مبارزه با پاتوژن‌های مقاوم در برابر دارو بسیار مهم هستند (۸، ۱۱).

محصولات طبیعی زیست فعال از متابولیت‌های اولیه و ثانویه که به وسیله‌ی ارگانیسم‌های مختلف مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها، گیاهان و... تولید می‌شوند، حاصل می‌گردند. متابولیت‌های اولیه (پلی‌ساکارید، پروتئین، اسید نوکلئیک و چربی) از فعالیت پیش تخمیری باکتری‌ها حاصل می‌گردند و در چرخه‌ی زندگی سلول‌ها نقش دارند، اما متابولیت‌های ثانویه در چرخه زندگی سلول‌ها نقش ندارند و گروه‌های خاص موجودات را مشخص می‌کنند. متابولیت‌های ثانویه دارای ترکیبات گوناگون با عملکرد متنوع هستند که در جریان تخمیر باکتری‌ها تولید می‌گردند (۲). از لحاظ تاریخی، متابولیت‌های ثانویه میکروبی مهم‌ترین منابع برای توسعه دارو بوده‌اند، کشف پنی‌سیلین به کشف آنتی‌بیوتیک‌های قوی که از عصاره میکروبی جدا شده است، منجر گردید. پپتیدهای غیرریبوزومی (کدگذاری شده توسط ژن *NRPS*) و پلی‌کتایدها (کدگذاری شده در ژن‌های *PKS I* و *PKS II*)، ساختارهای متنوع قابل توجهی از محصولات طبیعی داشته و می‌توانند به صورت ساختارهای خطی، زنجیری و شاخه‌ای باشند. آن‌ها برای تولید محصولات پیچیده با ساختارهای شیمیایی نامتعارف و فعالیت‌های زیستی مهندسی شده‌اند (۱۹، ۲۱). پپتیدهای غیرریبوزومی و پلی‌کتایدها دو مسیر متنوع از سنتز محصولات طبیعی با طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های زیستی و دارویی بوده و شامل توکسین‌ها، رنگدانه‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها، سایتوتوکسیک‌ها و سرکوب کننده‌های سیستم ایمنی هستند (۲۴). با وجود این‌که مواد ضد باکتری و ضدقارچی گوناگونی در بازار وجود دارد، اما یک نیاز مداوم برای جست و جوی ترکیبات جدید بر علیه تعدادی از میکروارگانیسم‌هایی که در برابر دارو مقاومت پیدا کرده‌اند و روز به روز در حال افزایش هستند، وجود دارد (۹، ۱۰، ۱۳).

بر این اساس، این پژوهش با هدف جداسازی اکتینوباکتریا، بررسی خاصیت ضدباکتریایی آن‌ها در برابر باکتری‌های تست و شناسایی خوشه‌های ژنی بیوسنتتیک این باکتری‌ها از کود الاغ انجام گرفت.

مواد و روش کار

جمع‌آوری نمونه و کشت

از ابتدای اسفند ماه سال ۹۶ لغایت پایان خرداد ماه سال ۹۷، تعداد ۲۸ نمونه کود تازه از ۲۸ رأس الاغ از مناطق مختلف استان ایلام جمع‌آوری شد. در هر مورد، از قسمت میانی کود تازه الاغ با استفاده از یک پنس و یک قاشقک استریل نمونه اخذ و در یک کیسه‌ی استریل قرار داده شده و بلافاصله به آزمایشگاه ارسال گردید. نمونه‌ها در آزمایشگاه تکه تکه شده در دمای محیط به مدت یک هفته خشک و برای جداسازی اکتینوباکتریا مورد استفاده قرار گرفتند. سپس از هر نمونه رقتی معادل یک گرم کود در ۹ میلی‌لیتر آب مقطر تهیه شد و پس از رقیق‌سازی به صورت سریالی، رقت‌های 10^{-3} و 10^{-5} و 10^{-6} ابتدا به مدت ۱۵ دقیقه داخل آون ۱۰۰ گذاشته از هریک از آن‌ها مقدار ۱۵۰ میکرولیتر بر روی محیط کشت نوترینت آگار و استارچ کازئین آگار حاوی ۵۰ میکروگرم آنتی‌بیوتیک‌های سیکلوهگزامید و نالیدیکسیک اسید (به ترتیب جهت مهار رشد قارچ و باکتری) کشت داده شده و در گرمخانه با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷-۱۴ روز نگه‌داری شدند (۷، ۱۴). کلونی‌های رشدیافته با بررسی خصوصیات مورفولوژیکی نظیر رنگ، شکل کلونی، تولید اسپور و رنگدانه و نتیجه آزمایش گرم شناسایی اولیه و در ادامه از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) مورد تأیید تشخیص واقع شدند.

بررسی خاصیت ضدباکتریایی اکتینوباکتریای جدا شده

خاصیت ضدباکتریایی اکتینوباکتریای جدا شده در برابر تعدادی از باکتری‌های فرصت‌طلب شامل استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلی، باسیلوس سرئوس و سودوموناس اروجینوزا با روش انتشار از چاهک در آگار مورد بررسی قرار گرفت (۳).

در این روش ابتدا اکتینوباکتریای جدا شده، در محیط تریپتیکاز سوی براث (TSB) کشت و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز گرمخانه‌گذاری شدند. سپس سوسپانسیون‌هایی با کدورت استاندارد نیم مک فارلند از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌های فرصت طلب در محیط TSB با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، تهیه شد و با کمک سواب از این سوسپانسیون‌ها به صورت چمنی بر روی پلیت‌های حاوی ترکیباتی از محیط‌های مولر هینتون آگار و نوترینت آگار (۱:۱ v:v) کشت داده شد. سپس بر روی هر کدام از این محیط‌های کشت ترکیبی، تعداد پنج چاهک هر یک به قطر شش میلی‌متر ایجاد گردید. هم زمان، میزان دو میلی‌لیتر از سوسپانسیون کشت هفت روزه باکتری‌های اکتینوباکتریا داخل میکروتیوب‌های استریل ریخته و با سرعت g ۸۰۰۰ به مدت پنج دقیقه سانتریفوژ گردید و در پایان میزان ۷۵ میکرولیتر از مایع رویی به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد. در نهایت این محیط‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. پس از گذشت زمان مذکور، قطر هاله‌های ایجاد شده ارزیابی و نتایج ثبت شد. این آزمایش در مورد کشت ۱۴ روزه‌ی باکتری‌های اکتینوباکتریایی نیز تکرار و نتایج ثبت گردید. در هر مورد از دیسک حاوی آنتی بیوتیک‌های پنی‌سیلین و جنتامایسین (راین طب، ایران) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

استخراج DNA

برای استخراج DNA از روش پنگ و همکاران (۲۰)، با اندکی تغییرات استفاده شد. به طور خلاصه، دو میلی‌لیتر از کشت ۴۸ ساعته هرکدام از اکتینوباکتریای جدا شده را درون میکروتیوب‌های دو میلی‌لیتری ریخته و به مدت دو دقیقه با دور g ۶۰۰۰ سانتریفوژ و مایع رویی آن‌ها دور ریخته شد. در ادامه به هریک از این میکروتیوب‌ها میزان ۲۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده اضافه شد و درون دستگاه ترمومیکسر با دمای ۹۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ دقیقه قرار گرفته در پایان به مدت پنج دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ جی سانتریفوژ شدند و در نهایت، محلول رویی آن‌ها به‌عنوان DNA الگو برداشت و به درون میکروتیوب‌های جدید انتقال داده شدند و تا هنگام استفاده از آن‌ها در آزمایشات مولکولی، در فریزر با دمای ۲۰ - سانتی‌گراد نگهداری شدند.

آزمون PCR ژن 16S rRNA

برای انجام PCR در این پژوهش از دو آغازگر با نام‌های ACT235f (‘5-CGCGGCCTATCAGCTTGTTG-‘3) و ACT878r (‘5- CCGTACTCCCCAGGCGGGG-‘3) برای تکثیر اختصاصی ژن 16S rRNA در اکتینوباکتریا استفاده شد (۲۱). هر واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۱۲/۵میکرولیتر مسترمیکس تهیه شده از شرکت پیشگام بیوتک (ایران)، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرها (۱۰ پیکومول/ میکرولیتر)، سه میکرولیتر از DNA الگو و هفت و نیم میکرولیتر آب مقطر استریل بود.

برنامه حرارتی مورد استفاده در واکنش PCR به صورت واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۶ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه و نیز ۲۵ چرخه PCR به ترتیب شامل واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، دمای اتصال آغازگر ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، طویل‌سازی اولیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه و در نهایت یک مرحله طویل‌سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت هفت دقیقه انجام شد.

آزمون PCR ژن‌های *PKS I*، *PKS II* و *NRPS*

این آزمون‌ها که با استفاده از آغازگرهای به کار رفته در پژوهش‌های قبلی (۱، ۱۸) تشکیل شدند، به استثنای مرحله دمای اتصال، مطابق برنامه و ترکیب مواد آزمون PCR ژن 16S rRNA انجام یافتند. دمای اتصال در مورد تکثیر ژن‌های *PKS I*، *PKS II* و *NRPS* به ترتیب ۶۸، ۶۸ و ۷۰ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد.

نتایج

رنگ‌آمیزی و خصوصیات ظاهری کلونی باکتری‌ها

در مجموع ۱۸۴ باکتری از ۲۸ نمونه کود الاغ جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان ایلام جدا گردید. از این تعداد، ۱۰۳ جدایه گرم مثبت و ۸۱ جدایه گرم منفی بودند. نمونه‌های گرم مثبت با توجه به خصوصیات

کلونی آن‌ها شامل گچی‌شکل بودن، سفتی، چرم مانند بودن، تولید رنگدانه‌های مختلف و نیز ظاهر منشعب در زیر میکروسکوپ به عنوان اکتینوباکتریا شناسایی اولیه شدند.

آزمایش PCR ژن 16S rRNA

در آزمون PCR انجام شده بر روی ۱۰۳ نمونه DNA استخراج شده از باکتری‌های گرم مثبت، ۹۲ جدایه با توجه به تولید محصولی در حدود ۶۵۰ جفت باز، به‌عنوان اکتینوباکتریا مورد تشخیص نهایی قرار گرفتند (شکل ۱).

شناسایی ژن‌های *PKS II*، *PKS I* و *NRPS*

از میان ۹۲ جدایه‌ای که PCR ژن 16S rRNA آن ها مثبت شده بود، ۳۰ جدایه برای تکثیر ژن‌های *PKS II*، *PKS I* و *NRPS* انتخاب شدند که از میان آن‌ها تعداد ۱۸ جدایه حاوی ژن *NRPS* با محصولی به اندازه ۷۰۰-۶۵۰ جفت باز بودند (شکل ۲) و تعداد هفت جدایه حاوی ژن *PKS I* با اندازه ۱۲۰۰ جفت باز (شکل ۳)، نه جدایه حاوی ژن *PKS II* با اندازه ۶۰۰ جفت باز (شکل ۴) بودند. به این ترتیب، از میان این جدایه‌های انتخاب شده برای غربالگری ژن‌های نامبرده ۵۴ درصد حاوی ژن *NRPS*، ۲۳ درصد حاوی ژن *PKS I* و ۳۰ درصد حاوی ژن *PKS II* بودند.

بررسی خاصیت ضدباکتریایی اکتینوباکتریای جدا شده

بررسی خاصیت ضدباکتریایی باکتری‌های جدا شده با اندازه‌گیری قطر هاله روشن اطراف چاهک‌ها، نشان داد که از میان ۹۲ جدایه‌ای که نتیجه PCR ژن 16S rRNA آن‌ها مثبت شده بود، ۶۶ جدایه قادر به مهار رشد باکتری‌های تست بودند . از بین این ۶۶ جدایه تعداد ۶۱ جدایه (۹۲ درصد) در برابر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، ۴۵ جدایه (۶۸ درصد) در برابر باکتری اشریشیا کلی، ۴۷ جدایه (۷۱ درصد) در برابر باکتری باسیلوس سرئوس و چهار جدایه (۶ درصد) در برابر سودوموناس اروجینوزا دارای خاصیت ضدباکتریایی بودند (نمودار ۱).

مقایسه نتایج حاصل از غربالگری ژن‌های PKS و NRPS و فعالیت ضد باکتریایی اکتینوباکتریای جداشده از کود الاغ

در مقایسه نتایج PCR ژن‌های پلی‌کتاید و پپتیدهای غیرریبوزومی با نتایج حاصل از بررسی فنوتیپی خاصیت ضدباکتریایی جدایه‌های اکتینوباکتریایی مشخص شد که ۹ نمونه از ۱۸ جدایه‌ی (۵۰ درصد) حاوی ژن *NRPS*، هاله عدم رشد قابل توجه داشتند. سه نمونه از نه جدایه‌ی (تقریباً ۳۳ درصد) حاوی ژن *PKS I*، از خود فعالیت ضدباکتریایی نشان دادند. همچنین، سه نمونه از هفت جدایه‌ی (تقریباً ۴۳ درصد) حاوی ژن *PKS II*، دارای هاله عدم رشد بودند.

بحث

اکتینوباکتریا در همه جا حضور دارند و یکی از متنوع‌ترین شاخه‌های باکتریایی در طبیعت هستند. از لحاظ تاریخی اکتینوباکتریا عمدتاً به عنوان باکتری‌های خاک شناخته شده‌اند اما اکنون تقریباً در تمام اکوسیستم‌های آبی و خاکی، با بیشترین پوشش پراکنده در سیاره یافت می‌شوند. میکروب‌هایی آزادزی هستند و در محیط‌های خاک، خصوصاً در جاهایی با pH بالا و در اکوسیستم‌های دریایی و آب شیرین به فراوانی یافت می‌شوند (۱۵، ۲۱).

در مطالعات قبلی اکتینوباکتریا از منابع مختلفی جداسازی شده‌اند. کومبس و همکاران (۴)، در مطالعه خود اکتینوباکتریا را از بافت‌های داخلی ریشه گندم که سطح خارجی آن‌ها استریل شده بود، جداسازی نموده و با استفاده از آزمایش PCR ژن 16S rRNA شناسایی کردند. انگلهارت و همکاران (۶)، اکتینوباکتریا را از رسوبات دریایی جداسازی و شناسایی کردند و مشاهده کردند که از ۱۵ جدایه اکتینوباکتریا، نه جدایه دارای فعالیت ضد باکتریایی در برابر انتروکوکوس‌های مقاوم به ونکومایسین بودند.

در بین مطالعات مربوط به جداسازی اکتینوباکتریا از منابع مختلف، کود الاغ کمتر مورد توجه بوده است. از این‌رو، در مطالعه حاضر این منبع به‌عنوان موضوع پژوهش انتخاب شد تا هم وجود اکتینوباکتریا در آن نشان داده شود و هم این که خواص ضدباکتریایی آن‌ها مورد ارزیابی و سنجش قرار گیرد.

در این مطالعه تلاش بر این بود تا با جداسازی اکتینوباکتریا از کود الاغ و شناخت بیشتر آن‌ها، اثرات ضدباکتریایی آن‌ها علیه باکتری‌های بیماری‌زا از طریق تست‌های فنوتیپی صورت پذیرد. این جدایه‌ها تماماً در محیط کشت استارچ کازئین آگار و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد جداسازی شدند و پس از خالص‌سازی بر روی محیط کشت ISP۲، بر اساس ویژگی‌های ظاهری یعنی توجه به گچی شکل بودن ، سفت و سختی کلونی و چسبیده بودن آن‌ها به آگار، چرم مانند بودن آن‌ها و نیز تولید رنگدانه مورد بررسی قرار گرفتند.

در سال‌های اخیر، جداسازی اکتینوباکتریا از منابع مختلف از جمله رسوبات دریایی، موجودات آبزی شامل بی‌مهرگان و مهره‌داران با هدف جداسازی اکتینوباکتریای متفاوت با آن‌چه که در گذشته از خاک جدا شده‌اند و در نتیجه جستجوی آنتی‌بیوتیک‌های جدید، مورد توجه بسیاری از دانشمندان قرار گرفته است (۱۵). در این پژوهش از محیط کشت استارچ کازئین آگار حاوی سیکلوهگزامید و نالیدیکسیک اسید که یک محیط کشت انتخابی است، استفاده شد. این مواد مانع از رشد سایر باکتری‌ها و قارچ‌ها می‌شوند. این محیط برای جداسازی اکتینوباکتریا کارایی دارد و برای ارزیابی ارگانیسم‌های مولد آنتی‌بیوتیک توصیه می‌شود. علاوه بر این، عمدتاً اکتینوباکتریایی که قادر به تخریب پلیمرهای موجود در این محیط هستند، می‌توانند در این محیط رشد کنند (۲۳).

یکی دیگر از مسائل قابل بحث در این مطالعه بررسی خاصیت ضدمیکروبی اکتینوباکتریا جدا شده از کود الاغ به روش انتشار از چاهک در آگار می‌باشد. در مطالعات قبلی انجام گرفته برای بررسی خاصیت ضدباکتریایی اکتینوباکتریا از روش‌های انتشار از چاهک در آگار و انتشار دیسک استفاده شده است (۳، ۱۷). اگر چه این دو روش تقریباً مشابه هستند اما در اکثر مطالعات برای بررسی خاصیت ضدباکتریایی اکتینوباکتریا روش انتشار از چاهک در آگار ترجیح داده شده است که شاید دلیل آن این است که در روش انتشار از چاهک در آگار متابولیت‌های ثانویه حاصل از تخمیر اکتینوباکتریا به خوبی در محیط پراکنده شده و به طور مستقیم با باکتری‌های تست مواجهه شده و بر روی آن‌ها تأثیر بیشتری

می‌گذارند.

در بررسی خاصیت ضدباکتریایی اکتینوباکتریای جداشده در این پژوهش، با اندازه‌گیری قطر هاله روشن اطراف چاهک‌ها، تعداد ۶۶ جدایه در برابر باکتری‌های بیماری‌زای مورد آزمایش، دارای خاصیت ضدباکتریایی بودند. از بین این ۶۶ جدایه تعداد ۶۱ جدایه در برابر استافیلوکوکوس اورئوس و تعداد ۴۷ جدایه در برابر باسیلوس سرئوس، تعداد ۴۵ جدایه در برابر اشرشیا کلی و تعداد چهار جدایه در برابر سودوموناس اروجینوزا واکنش و اثرات قابل توجهی داشتند. این نتایج نشان داد که متابولیت‌های ثانویه حاصل از اکتینوباکتریا در برابر باکتری‌های گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس) نسبت به باکتری‌های گرم منفی (اشرشیا کلی و سودوموناس اروجینوزا) بیشترین اثرات را داشتند. باکتری‌های گرم منفی به دلیل داشتن لیپید، به ویژه لیپوپلی‌ساکارید در دیواره نفوذناپذیرتر هستند و بنابراین نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و سایر متابولیت‌های ثانویه مقاوم‌تر هستند. فعالیت‌های مهارکنندگی عصاره اکتینوباکتریا در برابر باکتری‌های تست نشان می‌دهد که اکتینوباکتریای جداشده از کود الاغ ممکن است نامزد بالقوه مناسبی برای تولید آنتی‌بیوتیک باشند.

نتایج این پژوهش با نتایج مطالعه سایر محققین همخوانی و مشابهت زیادی دارد. جیانگ و همکاران (۱۲)، اکتینوباکتریا را از مدفوع تازه ۳۱ گونه حیوانی در پارک یانای چین جداسازی و شناسایی کردند و خاصیت ضدمیکروبی جدایه‌ها را در برابر باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و قارچ‌های کاندیدا و آسپرژیلوس نشان دادند. وی و همکاران (۲۵)، اکتینوباکتریای درون‌زی (اندوفیت) چای را جداسازی و شناسایی کردند و مشاهده کردند که متابولیت‌های ثانویه تولید شده به وسیله بعضی از جدایه‌های درون‌زی چای قادر به مهار رشد باکتری‌های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، شیگلا فلکسنری، باسیلوس سرئوس و اشرشیا کلی می‌باشد. در مطالعه آن‌ها فراوانی ژن‌های *PKS* و *NRPS* جدایه‌ها نیز مورد بررسی قرار گرفت.

خواص ضدباکتریایی جدایه‌های اکتینوباکتریا در این مطالعه نشان‌دهنده‌ی این است که اکتینوباکتریا هنوز هم قادر به تولید بیش‌ترین متابولیت‌های ثانویه زیست فعال و همچنین ارائه مواد بیولوژیکی با کیفیت بالا برای کشف داروها هستند. با این وجود، در آینده که احتمال کشف جدایه‌های زیست فعال افزایش می‌یابد، اهداف جدید را می‌توان برای کشف فعالیت‌های بیش‌تر مانند فعالیت‌های ضدمیکروبی، ضد سرطان و سایتوتوکسیک گسترش داد.

در آزمایش PCR انجام شده بر روی ۳۰ نمونه DNA استخراج‌شده از باکتری‌های اکتینوباکتریا در مطالعه حاضر، تعداد ۱۸ جدایه حاوی ژن *NRPS* و هفت جدایه حاوی ژن *PKS I* و نه جدایه حاوی ژن *PKS II* بودند. بنابراین در این مطالعه ۵۴ درصد از جدایه‌ها حاوی ژن *NRPS* و ۳۰ درصد و ۲۳ درصد به ترتیب حاوی ژن‌های *PKS I* و *PKS II* بودند. میزان فراوانی ژن‌ها در گزارش محققان متفاوت است که در ادامه ذکر می‌گردد.

لی و همکاران (۱۷)، در مطالعه خود جدایه‌های اکتینوباکتریا جداشده از خاک‌های مانگرو را با استفاده از خصوصیات مورفولوژیکی و روش‌های مولکولی شناسایی کردند و در ادامه ۸۷ جدایه را برای بررسی فراوانی ژن‌های *NRPS* و *PKS* مورد آزمایش PCR قرار دادند که از میان آن‌ها ۵۲ جدایه (۵۹/۷ درصد) دارای توالی‌های مورد نظر بودند. ژن‌های *PKS* II با بیش‌ترین فراوانی در ۴۲/۵ درصد و ژن‌های *PKS I* در ۱۹/۵ درصد و *NRPS* در ۵/۷ درصد جدایه‌ها مشاهده شدند.

دانیشا و همکاران (۵)، در پژوهش خود نشان دادند که فراورده‌های طبیعی تولید شده به وسیله اکتینوباکتریای رسوبات قطب شمال دارای خاصیت ضد سرطانی می‌باشند، آن‌ها همچنین فراوانی ژن‌های *NRPS* و *PKS* را نیز مورد بررسی قرار دادند.

این نتایج با یافته‌های تحقیق حاضر همخوانی داشت و آغازگرهای PKS و NRPS که در مطالعه حاضر مورد استفاده قرار گرفته بودند، این ژن‌ها را با موفقیت در تعدادی از جدایه‌ها شناسایی کردند. همچنین، این یافته‌ها نشان می‌دهند که اکتینوباکتریای کود الاغ یک منبع امیدوارکننده برای متابولیت‌های ثانویه زیست‌فعال هستند. با توجه به این‌که این جدایه‌ها ژن‌های بیوسنتز قابل تشخیص را تولید می‌کنند، ممکن است نقش مهمی در زمین‌های کشاورزی که با کود حیوانی کوددهی می‌شوند داشته، رشد و تکامل گیاه را به دنبال داشته باشند.

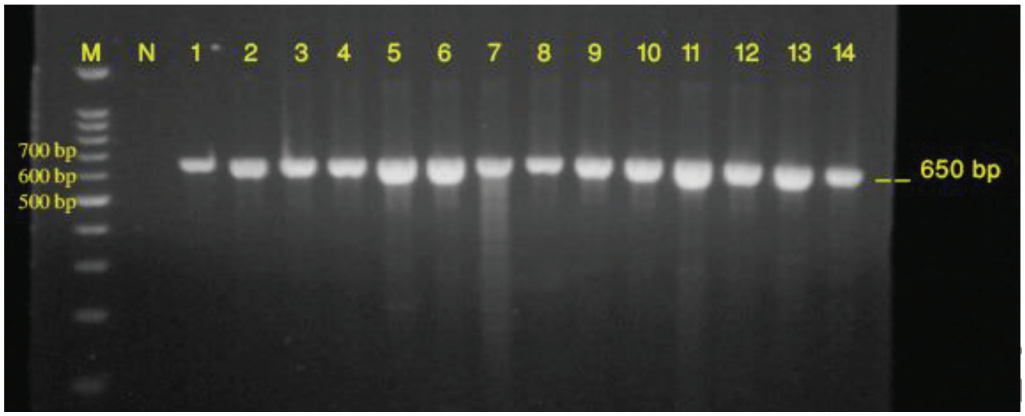
تحقیق حاضر اطلاعاتی را در زمینه خاصیت ضدباکتریایی اکتینوباکتریای حاصل از کود الاغ را در اختیار محققین قرار می‌دهد. اکتینوباکتریا نه تنها از نظر اکولوژیک و تاکسونومیک مهم می‌باشند بلکه برای تولید ترکیبات فعال زیستی جدید مانند آنتی‌بیوتیک‌ها، ترکیبات آنتی‌تومور، ترکیبات سرکوب‌کننده سیستم ایمنی، آنزیم‌ها و مهارکننده‌های آنزیمی نیز حائز اهمیت هستند. در این مطالعه با وجود به کارگیری تعداد کم محیط‌های کشت و جداسازی، تعداد قابل توجهی اکتینوباکتریا با فعالیت ضدباکتریایی به دست آمد. دستاوردهای این پژوهش افقی را در برابر پژوهش‌های آتی قرار می‌دهد که با به کارگیری روش‌های مبتنی بر کشت و نیز مستقل از کشت، به مانند روش‌های متاژنومیک، به جستجوی اکتینوباکتریای جدید با قابلیت ترکیبات فعال بیولوژیکی چشمگیر و ارزشمند پرداخت.

نتیجه‌گیری کلی

کمبود آنتی‌بیوتیک‌های جدید و ظهور پاتوژن‌های مقاوم به دارو که روز به روز در حال افزایش هستند، سبب به وجود آمدن دوره جدیدی در کشف آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی شده است. طبق اطلاعات نویسندگان در این مطالعه برای اولین بار تعداد ۹۲ جدایه اکتینوباکتریا از نمونه‌های کود الاغ مناطق مختلف استان ایلام جداسازی شد. به دلیل نبود مطالعات قبلی در مورد اکتینوباکتریای کود الاغ، امکان مقاسیه نتایج حاصل از پژوهش حاضر با نتایج مطالعات قبلی نبود. اما با مطالعه تحقیقات قبلی در مورد اکتینوباکتریای جدا شده از خاک، گیاه، اقیانوس، آب‌های شیرین و غیره می‌توان نتیجه گرفت که کود الاغ مانند سایر منابع مورد مطالعه از جمعیت میکروبی متنوع و منحصر به فردی برخوردار است و یک منبع غنی و ارزشمند برای جداسازی اکتینوباکتریا است.

منابع مورد استفاده

1. Ayuso-Sacido A, Genilloud O. 2005. New PCR primers for the screening of *NRPS* and *PKS-I* systems in actinomycetes: detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxo-

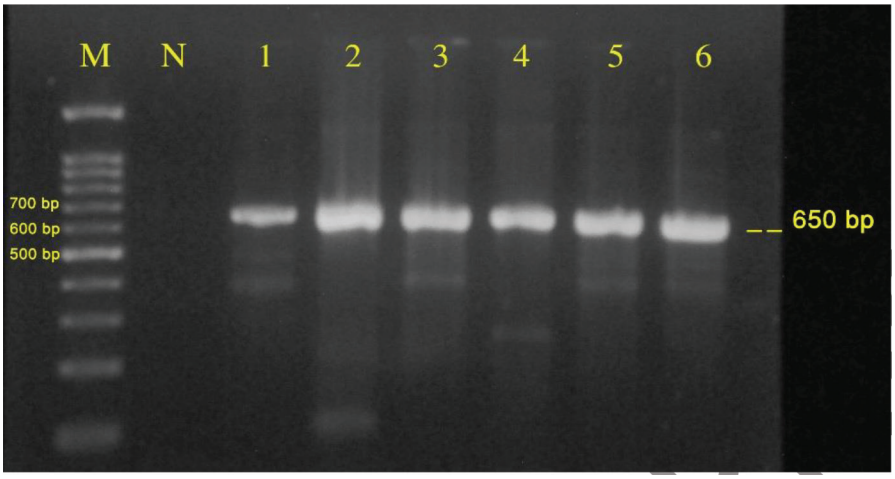


شکل ۱- نمونه‌هایی از محصولات PCR ژن16S rRNA در تعدادی از اکتینوباکتریای جدا شده در این مطالعه.

ستون M: DNA سایز مارکر

ستونN : کنترل منفی

ستون‌های ۱ تا ۱۴: جدایه‌های اکتینوباکتریایی این مطالعه

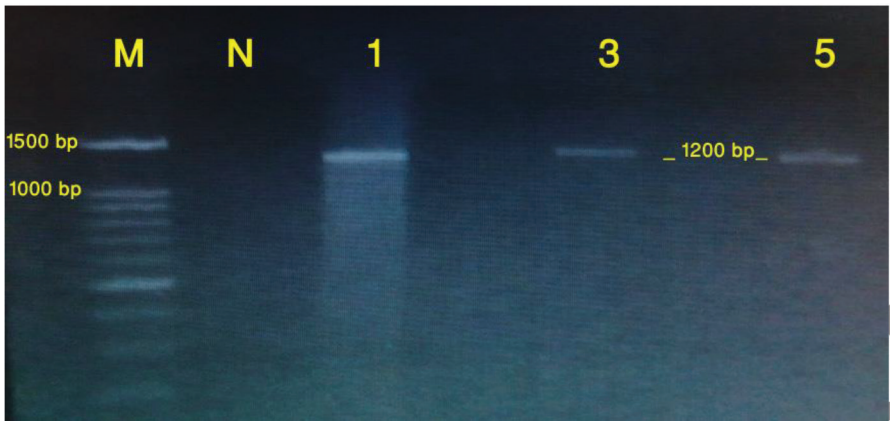


شکل ۲- نمونه‌هایی از محصولات PCR ژن NRPS در تعدادی از اکتینوباکتریای جدا شده در این مطالعه.

ستون M: DNA سایز مارکر

ستونN : کنترل منفی

ستون‌های ۱ تا ۶: جدایه‌های اکتینوباکتریایی این مطالعه

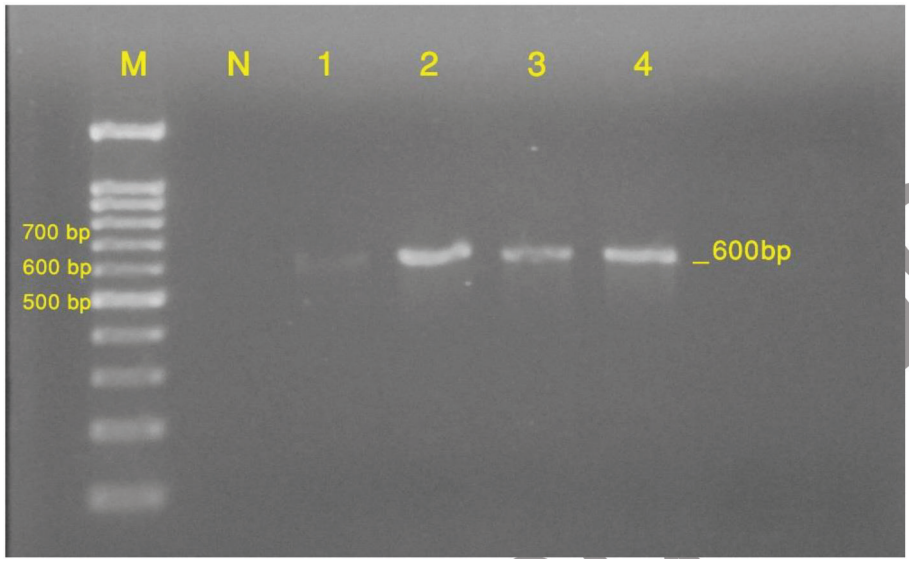


شکل ۳- نمونه‌هایی از محصولات PCR ژن PKS I در تعدادی از اکتینوباکتریای جدا شده در این مطالعه.

ستون M: DNA سایز مارکر

ستونN : کنترل منفی

ستون‌های ۱، ۳ و۵: جدایه‌های اکتینوباکتریایی این مطالعه

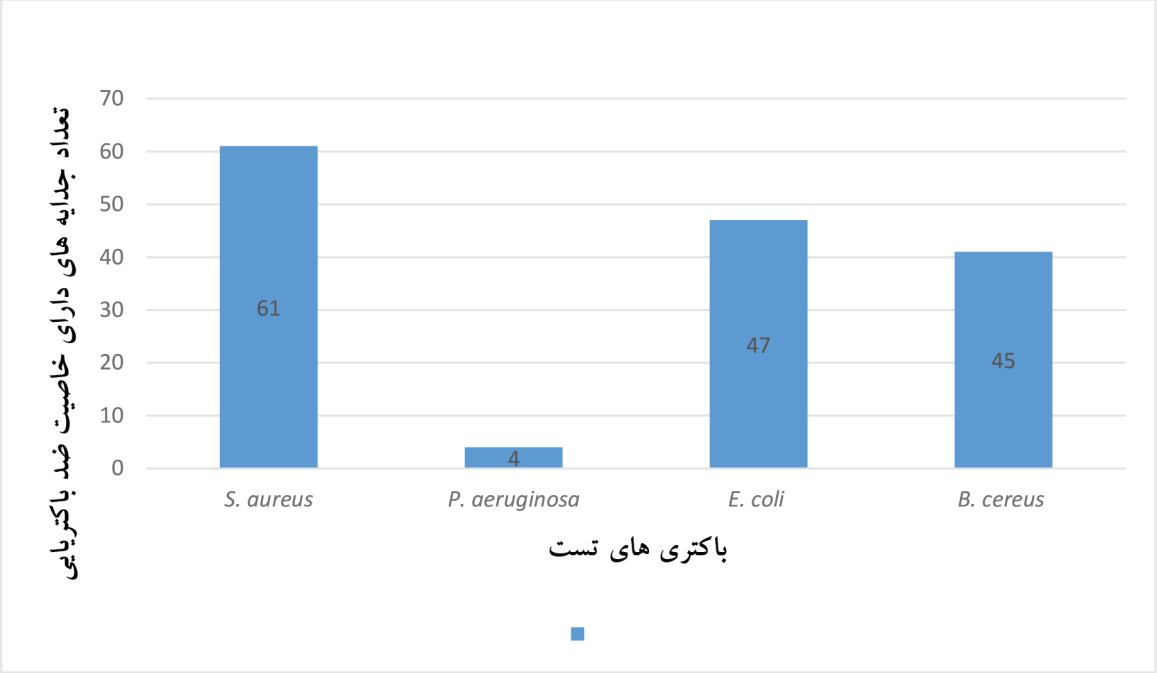


شکل ۴- نمونه‌هایی از محصولات PCR ژن PKS II در تعدادی از اکتینوباکتریای جدا شده در این مطالعه.

ستون M: DNA سایز مارکر

ستونN : کنترل منفی

ستون‌های ۱ تا ۴: جدایه‌های اکتینوباکتریایی این مطالعه



نمودار ۱- فراوانی جدایه های دارای اثر ضد باکتریایی در برابر باکتری های فرصت طلب مورد مطالعه.

nomic groups. *Microbial Ecology* 49:10–24.

2. Azman, A. S., I.S. Othman, S. Velu, K. G. Chan and L. H. Lee. 2015. Mangrove rare Actinobacteria: taxonomy, natural compound, and discovery of bioactivity. *Frontiers in Microbiology* 6: 856.

3. Carvalho T. and S. Van Dersand. 2016. Evaluation of antimicrobial activity of the endophytic actinomycete R18 (6) against multiresistant Gram-negative bacteria. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* 88(1): 155-163.

4. Coombs, J. T. and C. M. Franco. 2003. Isolation and identification of Actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. *Applied and Environmental Microbiology* 69(9): 5603-5608.

5. Dhaneesha M., C. B. Naman, K. P. Krishnan, R. K. Sinha, P. Jayesh, V. Joseph, and T. P. Sajeevan. 2017. Streptomyces artemisiae MCCB 248 isolated from Arctic fjord sediments has unique PKS and NRPS biosynthetic genes and produces potential new anticancer natural products. *3 Biotech* 7(1): 32.

6. Engelhardt, K., K. F. Degnes, M. Kemmler, H. Bredholt, E. Fjærvik, G. Klinkenberg, and S. B. Zotchev. 2010. Production of a new thiopeptide antibiotic, TP-1161, by a marine Nocardiopsis species. *Applied and Environmental Microbiology* 76 (15): 4969-4976.

7. Gebreyohannes G, F. Moges, S. Sahile, N. Raja. 2013. Isolation and characterization of potential antibiotic producing actinomycetes from water and sediments of Lake Tana, Ethiopia. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 3:426–35.

8. Genilloud O. 2017. Actinomycetes: still a source of novel antibiotics. *Natural product reports*, 34(10): 1203-1232.

9. Gundogan, N. and E. Avci. 2014. Occurrence and antibiotic resistance of Escherichia coli, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* in raw milk and dairy products in Turkey. *International Journal of Dairy Technology* 67(4): 562-569.

10. Hill, P., G. W., Heberlig, and C. N. Boddy. 2017. Sampling terrestrial environments for bacterial polyketides. *Molecules*, 22(5): 707.

11. Ilic, S. B., S. S. Konstantinovic, Z. B. Todorovic, M. L. Lazic, V. B. Veljkovic, N. Jokovic and B. C. Radovanovic. 2007. Characterization and antimicrobial activity of the bioactive metabolites in

Streptomycete isolates. *Microbiology* 76(4): 421-428.

12. Jiang, S., W. Sun, M. Chen, S. Dai, L. Zhang, Y. Liu and X. Li. 2007. Diversity of culturable Actinobacteria isolated from marine sponge *Haliclona* sp. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 92(4): 405-416.

13. Karnwal, A. and M. Kaur. 2020. Assessment of Agaricus Bisporus S-II Extract as a Bio-Controlling Agent against Human Pathogenic Bacterial Species. *Archives of Razi Institute*. 75: 123-130.

14. Kutu F. R., T. J. Mokase, O. A. Dada and O. H. J. Rhode. 2019. Assessing microbial population dynamics, enzyme activities and phosphorus availability indices during phospho-compost production. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture* 8: 87-97.

15. Lee L. H., N. Zainal, A. Z. Azman, S. K. Eng, B. H. Goh, W. F. Yin and K. G. Chan. 2014. Diversity and antimicrobial activities of Actinobacteria isolated from tropical mangrove sediments in Malaysia. *The Scientific World Journal* 2014: 1-14.

16. Lewin G. R., C. Carlos, M. G. Chevrette, H. A. Horn, B. R. McDonald, R. J. Stankeyand and C. R. Currie. 2016. Evolution and ecology of Actinobacteria and their bioenergy applications. *Annual Review of Microbiology* 70: 235-254.

17. Li F., S. Liu, Q. Lu, H. Zheng, I. A. Osterman, D. A. Lukyanov, and D. Huang. 2019. Studies on antibacterial activity and diversity of cultivable *Actinobacteria* isolated from mangrove soil in Futian and Maoweihai of China. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2019: 1-11.

18. Metsä-Ketelä M, L. Halo, E. Munukka, J. Hakala, P. Mäntsälä and K Ylihonko. 2002. Molecular evolution of aromatic polyketides and comparative sequence analysis of polyketide ketosynthase and 16S ribosomal DNA genes from various *Streptomyces* species. *Applied and Environmental Microbiology* 68:4472–4479.

19. Nikolouli K. and D. Mossialos. 2012. Bioactive compounds synthesized by non-ribosomal peptide synthetases and type-I polyketide synthases discovered through genome-mining and metagenomics. *Biotechnology Letters* 34(8): 1393-1403.

20. Peng X., K. O. Yu, G. H. Deng, Y. X. Jiang, Y. Wang, G. X. Zhang and H. W. Zhou. 2013. Comparison of direct boiling method with commercial kits for extracting fecal microbiome DNA by Illumina sequencing of 16S rRNA tags. *Journal of Microbiological Methods* 95(3): 455-462.

21. Salcedo R. G., C. Olano, C. Gómez, R. Fernández, A. F. Braña, C. Méndez and J. A. Salas. 2016. Characterization and engineering of the biosynthesis gene cluster for antitumor macrolides PM100117 and PM100118 from a marine Actinobacteria: generation of a novel improved derivative. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 44.

22. Stach J. E. M., L.A. Maldonado, A.C. Ward, M. Goodfellow and A.T. Bull. 2003. New primers for the class *Actinobacteria*: application to marine and terrestrial environments. *Environmental Microbiology* 5: 5828–841.

23. Velayudham S. and K. Murugan. 2012. Diversity and antibacterial screening of Actinomycetes from Javadi Hill Forest soil, Tamilnadu, India. *Journal of Microbiology Research* 2(2): 41-46.

24. Wang, H., D. P. Fewer, L. Holm, L. Rouhiainen and K. Sivonen. 2014. Atlas of non-ribosomal peptide and polyketide biosynthetic pathways reveals common occurrence of non-modular enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(25): 9259-9264.

25. Wei W., Y. Zhou, F. Chen, X. Yan, Y. Lai, C. Wei and X. Wang. 2018. Isolation, diversity, and antimicrobial and immunomodulatory activities of endophytic *Actinobacteria* from tea cultivars Zijuan and Yunkang-10 (Camellia sinensis var. assamica). *Frontiers in Microbiology* 9: 1-11.