

غربالگری، جداسازی و ارزیابی استرپتومایسس تولید کننده ی مواد ضد میکروبی از پارک ملی کویر، ایران

سولماز یوسفی نیا

گروه علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران

چکیده

میکروارگانیسیم‌های خاک، به ویژه گونه‌های استرپتومایسس، منبع غنی ترکیبات ضد میکروبی طبیعی هستند. این پژوهش با هدف غربالگری، جداسازی و شناسایی مولکولی سویه‌های استرپتومایسس تولیدکننده مواد ضد میکروبی از پارک ملی کویر، ایران، با هدف تحقیق شناسایی و جداسازی سویه‌های استرپتومایسس از نمونه‌های خاک پارک ملی کویر و ارزیابی توانایی آن‌ها در تولید ترکیبات ضد میکروبی، با تمرکز بر شناسایی دقیق مولکولی انجام شد. نمونه‌های خاک از مناطق مختلف پارک ملی کویر جمع‌آوری گردید. سویه‌های استرپتومایسس با استفاده از محیط‌های کشت انتخابی جداسازی شدند. فعالیت ضد میکروبی سویه‌های جدا شده علیه باکتری‌های پاتوژن با روش انتشار دیسک ارزیابی شد. سویه R1 که پتانسیل ضد میکروبی قابل توجهی نشان داد، برای شناسایی مولکولی انتخاب شد. شناسایی این سویه با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با هدف تکثیر ژن 16S rRNA انجام گرفت. از پرایمرهای عمومی برای تکثیر ناحیه حدود ۱۵۰۰ جفت‌باز و از پرایمرهای اختصاصی RmF/RmR برای تکثیر قطعه‌ای به طول تقریبی ۵۰۰ جفت‌باز استفاده شد. نتایج حاصل از PCR به همراه تحلیل‌های فیلوژنتیکی مورد ارزیابی قرار گرفتند. در مجموع تعداد ۴ سویه استرپتومایسس از پارک ملی کویر جداسازی گردید. سویه R1 بیشترین فعالیت ضد میکروبی را علیه سویه‌های آزمایشی نشان داد. نتایج PCR و تحلیل‌های فیلوژنتیکی تایید کردند که سویه R1 به گونه *Bacillus subtilis* تعلق دارد. سویه R1 که از پارک ملی کویر جداسازی شده بود، پس از شناسایی مولکولی، به عنوان *Bacillus subtilis* تعیین گردید. این یافته‌ها نشان‌دهنده پتانسیل پارک ملی کویر به عنوان منبعی برای کشف میکروارگانیسیم‌های مفید و کاربردی است.

کلمات کلیدی: استرپتومایسس، مواد ضد میکروبی، پارک ملی کویر، غربالگری، شناسایی مولکولی، ژن 16S rRNA

۱. مقدمه

بحران جهانی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها، ناشی از ظهور سویه‌های باکتریایی مقاوم به دارو (MDR)، به یکی از بزرگ‌ترین تهدیدها برای سلامت عمومی در قرن بیست و یکم تبدیل شده است [۱، ۲]. با کاهش کارایی آنتی‌بیوتیک‌های موجود، نیاز مبرم به کشف کلاس‌های جدیدی از ترکیبات ضد میکروبی که دارای مکانیسم‌های اثر متفاوت هستند، بیش از پیش احساس می‌شود [۳، ۴]. در این میان، جنس *Streptomyces* که متعلق به شاخه آکتینوباکترهاست، همچنان به‌عنوان مهم‌ترین تولیدکننده متابولیت‌های ثانویه در صنعت داروسازی شناخته می‌شود؛ به‌طوری‌که حدود دو سوم آنتی‌بیوتیک‌های بالینی موجود، منشأ آکتینوباکتریایی دارند [۵]. توانایی خیره‌کننده استرپتومایسس‌ها در سنتز طیف گسترده‌ای از ترکیبات زیست‌فعال، ناشی از وجود خوشه‌های ژنی بیوسنتزی (BGCs) فراوان در ژنوم آن‌هاست که بسیاری از این خوشه‌ها در شرایط آزمایشگاهی معمولی خاموش بوده و تنها در پاسخ به سیگنال‌های محیطی خاص فعال می‌شوند [۶-۸]. در سال‌های اخیر، تمرکز پژوهشگران از منابع در دسترس به سمت زیستگاه‌های "اکستريم" (مانند بیابان‌ها، مناطق شور و چشمه‌های آب گرم) معطوف شده است؛ زیرا میکروارگانیسم‌های ساکن در این مناطق، برای بقا در برابر استرس‌های محیطی، به تکامل سازوکارهای پیچیده متابولیکی دست یافته‌اند [۹، ۱۰]. ایران با دارا بودن اکوسیستم‌های بیابانی متنوع، از جمله پارک ملی کویر، پتانسیل بالایی برای کشف سویه‌های بومی و نوظهور دارد [۱۱-۱۳]. شرایط اقلیمی خاص پارک ملی کویر، شامل تغییرات شدید دمایی، خشکی مفرط و میزان بالای تابش فرابنفش، این منطقه را به یک منبع بالقوه برای جداسازی استرپتومایسس‌های مقاوم و منحصربه‌فرد تبدیل کرده است که ممکن است متابولیت‌های ثانویه نوینی با فعالیت‌های بیولوژیک تقویت‌شده تولید کنند [۱۴]. بااین‌حال، علی‌رغم غنای تنوع زیستی میکروبی در این مناطق، مطالعات سیستماتیک بر روی پتانسیل آنتی‌بیوتیکی استرپتومایسس‌های بومی این ناحیه بسیار محدود است. اصلی‌ترین دغدغه این مطالعه، پر کردن شکاف علمی موجود در شناسایی منابع میکروبی مناطق کویری ایران برای مقابله با پاتوژن‌های نوظهور است. هدف از انجام این تحقیق، جداسازی سویه‌های خالص استرپتومایسس از نمونه‌های خاک پارک ملی کویر، غربالگری اولیه آن‌ها از نظر تولید فعالیت‌های ضد میکروبی علیه سویه‌های استاندارد (به‌عنوان مدل‌های پاتوژنی) و در نهایت ارزیابی توانمندی آن‌ها در تولید متابولیت‌های ثانویه فعال است. این پژوهش گامی در جهت شناسایی کاندیداهای بالقوه برای تولید داروهای ضد میکروبی جدید و بهره‌برداری پایدار از ظرفیت‌های میکروبی مناطق حفاظت‌شده ایران بر می‌دارد.

۲. روش تحقیق

۲-۱. نوع مطالعه

این پژوهش یک مطالعه آزمایشگاهی اکتشافی با هدف غربالگری، جداسازی، شناسایی و ارزیابی سویه‌های استرپتومایسس تولیدکننده ترکیبات ضد میکروبی از خاک‌های پارک ملی کویر، ایران، بود. مراحل اجرایی مطالعه شامل نمونه‌برداری از خاک، جداسازی اولیه آکتینومیسیت‌ها، غربالگری فعالیت ضد میکروبی، بهینه‌سازی شرایط کشت، استخراج DNA ژنومی، شناسایی مولکولی بر پایه ژن 16S rRNA و تحلیل آماری داده‌ها بود.

۲-۲. محل و زمان انجام پژوهش

نمونه‌برداری خاک از مناطق منتخب پارک ملی کویر، ایران، در بازه زمانی ۱۴۰۴ تا ۱۴۰۵ انجام شد. انتخاب نقاط نمونه‌برداری با در نظر گرفتن ویژگی‌های بوم‌شناختی منطقه، از جمله شرایط اقلیمی خشک، شوری نسبی خاک و تنوع میکروزیستگاه‌ها صورت گرفت. کلیه مراحل آزمایشگاهی در شرایط استریل و مطابق اصول استاندارد میکروبی‌شناسی در آزمایشگاه مربوطه انجام شد.

۲-۳. جمع آوری و آماده سازی نمونه های خاک

به منظور جداسازی اکتینومیسیت های بومی، نمونه های خاک از عمق تقریبی ۵ تا ۱۰ سانتی متری سطح زمین جمع آوری شدند. برای هر نقطه، نمونه ها با استفاده از ابزار استریل برداشت و در ظروف استریل در بسته به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از انتقال، نمونه ها در دمای محیط خشک و همگن شدند. به منظور کاهش جمعیت میکروارگانیسم های غیر اسپورزا و غنی سازی نسبی اکتینومیسیت ها، بخشی از نمونه ها تحت شوک حرارتی در دمای ۷۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند. این پیش تیمار با هدف افزایش احتمال جداسازی استریپتومایسس های مقاوم تر و اسپورزا انجام شد.

۲-۴. تهیه رقت های متوالی و کشت اولیه

برای تهیه سوسپانسیون خاک، ۱۰ گرم از هر نمونه در ۹۰ میلی لیتر آب مقطر استریل یا سرم فیزیولوژی استریل معلق و به مدت مناسب به خوبی همگن شد. سپس رقت های ده دهی متوالی از (10^{-1}) تا (10^{-6}) تهیه گردید. از هر رقت، حجم مشخصی بر روی محیط کشت (PDA) کشت داده شد و پلیت ها در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد به مدت ۵ روز انکوبه شدند. پس از پایان دوره انکوباسیون، کلنی های مشکوک به استریپتومایسس بر اساس ویژگی های مورفولوژیک شامل ظاهر گچی یا پودری، رشد رشته ای، رنگ میسلیم هوایی و بستر، و بوی مشخص ژئوزمین انتخاب شدند.

۲-۵. خالص سازی و نگهداری ایزوله ها

کلنی های منتخب به منظور دستیابی به کشت خالص، چندین مرحله بر روی محیط کشت تازه پاساژ داده شدند. خالص سازی تا زمان حصول کلنی های یکنواخت از نظر ویژگی های ریخت شناسی ادامه یافت. ایزوله های خالص شده در محیط مناسب نگهداری و برای بررسی های بعدی شامل غربالگری زیستی، بهینه سازی شرایط رشد و شناسایی مولکولی استفاده شدند.

۲-۶. بررسی ویژگی های مورفولوژیک ایزوله ها

ایزوله های به دست آمده از نظر خصوصیات ماکروسکوپی و میکروسکوپی بررسی شدند. در ارزیابی ماکروسکوپی، صفاتی نظیر رنگ کلنی، نوع حاشیه، بافت سطح کلنی، وجود یا عدم وجود میسلیم هوایی و رنگ دانه های مترشحه ثبت گردید. در بررسی میکروسکوپی نیز ساختارهای رشته ای، میسلیم منشعب و الگوی احتمالی زنجیره اسپورها در صورت مشاهده، مورد توجه قرار گرفت. این اطلاعات به عنوان مبنایی برای انتخاب ایزوله های شاخص جهت آزمون های تکمیلی استفاده شد.

۲-۷. غربالگری اولیه فعالیت ضد میکروبی

به منظور ارزیابی توانایی ایزوله های استریپتومایسس در تولید ترکیبات ضد میکروبی، فعالیت بازدارندگی آن ها علیه میکروارگانیسم های هدف با استفاده از روش دیسک دیفیوژن (Kirby-Bauer) بررسی شد. در این روش، ابتدا سوسپانسیون استاندارد از میکروارگانیسم های آزمون تهیه و بر سطح محیط کشت مناسب پخش شد. سپس دیسک های آغشته به متابولیت یا عصاره حاصل از کشت ایزوله های مورد بررسی بر سطح محیط قرار داده شدند. پلیت ها در شرایط مناسب انکوبه شدند و پس از پایان زمان انکوباسیون، قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی متر اندازه گیری شد. ایزوله هایی که هاله مهارتی بزرگ تر و پایدارتر ایجاد کردند، به عنوان سویه های برتر برای مراحل بعدی انتخاب شدند.

۲-۸. انتخاب سویه های برتر

پس از غربالگری اولیه، ایزوله هایی که بیشترین اثر مهارتی را علیه پاتوژن های هدف نشان دادند، به عنوان سویه های منتخب در نظر گرفته شدند. معیار انتخاب شامل وسعت هاله عدم رشد، تکرارپذیری فعالیت ضد میکروبی در آزمون های مستقل و کیفیت رشد سویه در شرایط کشت آزمایشگاهی بود.

۲-۹. بهینه سازی شرایط رشد و تولید متابولیت های ضد میکروبی

به منظور افزایش تولید ترکیبات ضد میکروبی توسط سویه های منتخب، اثر برخی پارامترهای فیزیکی و شیمیایی بر رشد و فعالیت زیستی آن ها بررسی شد. پارامترهای مورد مطالعه شامل pH محیط کشت، دما و سرعت هم زدن بودند.

۲-۹-۱. بررسی اثر pH

برای ارزیابی اثر اسیدیته محیط، سویه‌های منتخب در محیط‌های کشت با pHهای ۵/۴، ۵ و ۵/۵ کشت داده شدند. پس از انکوباسیون در شرایط کنترل‌شده، میزان رشد و فعالیت ضد میکروبی حاصل از هر شرایط با اندازه‌گیری قطر هاله مهاري مقایسه شد.

۲-۹-۲. بررسی اثر دما

به منظور تعیین دمای بهینه، کشت سویه‌های منتخب در دماهای ۲۵، ۲۸ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از پایان دوره رشد، تولید متابولیت‌های ضد میکروبی و شدت اثر بازدارندگی در هر دما مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲-۹-۳. بررسی اثر سرعت هم‌زدن

برای تعیین اثر هوادهی و اختلاط محیط بر رشد و تولید متابولیت، کشت‌های مایع در سرعت‌های ۱۲۰، ۱۳۵ و ۱۵۰ دور در دقیقه انکوبه شدند. پس از رشد، نمونه‌ها از نظر فعالیت ضد میکروبی بررسی شدند تا مناسب‌ترین سرعت هم‌زدن برای تولید مؤثر ترکیبات فعال تعیین گردد.

۲-۱۰. استخراج DNA ژنومی

برای شناسایی مولکولی سویه‌های برتر، استخراج DNA ژنومی از ایزوله‌های منتخب با استفاده از روش CTAB انجام شد. بدین منظور، ابتدا زیست‌توده میکروبی از کشت تازه تهیه شد. سپس سلول‌ها در بافر استخراج مناسب سوسپانده شده و پس از تخریب دیواره و غشاهای سلولی، DNA با استفاده از محلول CTAB خالص‌سازی شد. در ادامه، جهت حذف پروتئین‌ها و سایر ناخالصی‌ها از حلال‌های آلی مناسب استفاده گردید و DNA با الکل سرد رسوب داده شد. رسوب DNA پس از شست‌وشو و خشک شدن، در آب دیونیزه استریل یا بافر TE حل شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج‌شده با استفاده از روش‌های معمول آزمایشگاهی ارزیابی شد.

۲-۱۱. تکثیر ژن 16S rRNA با روش PCR

شناسایی مولکولی ایزوله‌های منتخب بر پایه تکثیر ژن 16S rRNA انجام شد. واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی/عمومی مناسب برای این ژن صورت گرفت. مخلوط واکنش شامل DNA الگو، آغازگرهای رفت و برگشت، مستر میکس و آب دیونیزه استریل بود. برنامه حرارتی PCR شامل مرحله واسرشت‌سازی اولیه، چرخه‌های متوالی واسرشت‌سازی، اتصال آغازگر و گسترش رشته، و در نهایت مرحله گسترش نهایی تنظیم شد. پس از تکثیر، محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شده و باندهای حاصل در حضور رنگ مناسب مشاهده و ثبت شدند.

۲-۱۲. توالی‌یابی و شناسایی مولکولی

محصولات PCR با کیفیت مناسب جهت توالی‌یابی به روش سَنگر ارسال شدند. کروماتوگرام‌های به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزارهای Chromas و BioEdit بررسی، ویرایش و هم‌تراز شدند. سپس توالی‌های نهایی با توالی‌های ثبت‌شده در پایگاه داده NCBI مقایسه شدند و نزدیک‌ترین گونه‌ها بر اساس درصد شباهت تعیین گردید. بر اساس نتایج حاصل، ایزوله‌های منتخب در سطح جنس و در صورت امکان در سطح گونه شناسایی شدند.

۲-۱۳. تحلیل فیلوژنتیکی

به منظور بررسی روابط تکاملی ایزوله‌های منتخب با سویه‌های مرجع، توالی‌های به‌دست‌آمده پس از هم‌ترازی با توالی‌های مشابه موجود در پایگاه داده، برای ترسیم درخت فیلوژنتیکی استفاده شدند. این تحلیل امکان تعیین جایگاه نسبی ایزوله‌های جداسازی‌شده را در میان اعضای جنس *Streptomyces* فراهم کرد.

۱۴-۲. تحلیل آماری داده‌ها

تمام آزمایش‌ها حداقل در قالب تکرارهای مستقل انجام شدند و داده‌ها به صورت $\pm$ میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شدند. برای مقایسه میانگین‌ها بین تیمارهای مختلف، از آزمون One-way ANOVA استفاده شد. در مواردی که اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها مشاهده شد، مقایسه چندگانه میانگین‌ها با استفاده از آزمون Tukey انجام گرفت. کلیه تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS version 26 و GraphPad Prism version 9 انجام شد و سطح معنی‌داری آماری برابر با $(p < 0.05)$ در نظر گرفته شد.

نتایج

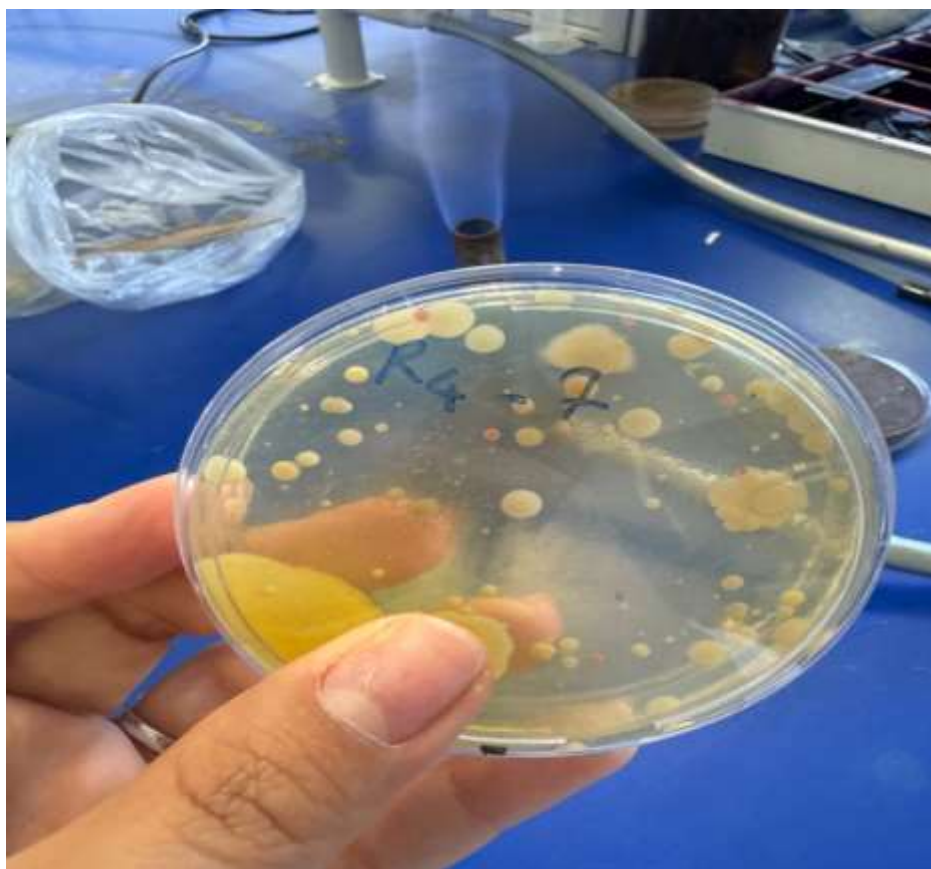
۱-۳. جداسازی و بررسی ویژگی‌های مورفولوژیک سویه‌های استرپتومایسس

در مجموع ۱۰ نمونه خاک از نقاط مختلف پارک ملی کویر جمع‌آوری گردید. پس از اعمال پیش‌تیمارهای فیزیکی (شوک حرارتی) و کشت روی محیط‌های اختصاصی، تعداد ۸ ایزوله مشکوک به جنس *Streptomyces* بر اساس ظاهر کلنی‌ها (تشکیل کلنی‌های سخت، چرمی‌مانند و رشد رشته‌ای) شناسایی شدند. پس از انجام فرآیندهای خالص‌سازی متوالی، در نهایت ۴ ایزوله خالص به عنوان سویه‌های استرپتومایسس تأیید شدند. بررسی‌های میکروسکوپی و میکروسکوپی نشان داد که تمامی ۴ ایزوله خالص‌شده دارای میسلیم منشعب و رشته‌ای (بستر و هوایی) بوده و زنجیره‌های اسپور را تشکیل می‌دهند که از ویژگی‌های تشخیصی اصلی جنس استرپتومایسس محسوب می‌شود. همچنین، تمام سویه‌های ایزوله شده، بوی خاص خاک (ژئوزمین) را هنگام کشت در محیط اختصاصی آزاد می‌کردند. ویژگی‌های مورفولوژیک ایزوله‌های خالص‌شده در جدول ۱ خلاصه شده است.

جدول ۱. ویژگی‌های مورفولوژیک ایزوله‌های خالص‌شده

کد ایزوله	بافت کلنی	ساختار میسلیم	شکل زنجیره اسپور	رنگ دانه
R1	پودری / مخملی	انشعابات فراوان	مارپیچی	زرد روشن
R2	چرمی / پوسته‌ای	انشعابات متراکم	منعطف	سفید
R3	پودری	انشعابات متوسط	شبکه باز	صورتی کم‌رنگ
R4	مخملی / دانه‌دار	انشعابات متراکم	مارپیچی	خاکستری

نمونه‌ای از نتایج خالص‌سازی ایزوله‌ها در شکل ۱ آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، ایزوله‌ها کلنی‌های مجزا با مورفولوژی‌های متنوع ایجاد کرده‌اند که نشان‌دهنده پتانسیل بالای نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از این منطقه است.



شکل ۱. نمای ماکروسکوپی از پلیت کشت (کد R4-7) که نشان‌دهنده کلنی‌های ایزوله شده از نمونه خاک پارک ملی کویر است.

۲-۳. ارزیابی فعالیت ضد میکروبی ایزوله‌های استرپتومایسس

فعالیت ضد میکروبی ایزوله‌های خالص‌شده استرپتومایسس علیه دو باکتری شاخص، شامل *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli*، با استفاده از اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد ارزیابی شد. نتایج نشان داد که تعدادی از ایزوله‌ها دارای اثر مهاری قابل توجهی علیه باکتری‌های آزمون بودند. قطر هاله عدم رشد مشاهده‌شده در محدوده تقریبی ۱۱ تا ۱۷ میلی‌متر قرار داشت که بیانگر توانایی این ایزوله‌ها در تولید ترکیبات ضد میکروبی با شدت اثر متفاوت است. به‌طور کلی، ایزوله‌های مورد بررسی علیه *S. aureus* فعالیت مهاری مناسب‌تری نسبت به *E. coli* نشان دادند. این تفاوت می‌تواند به اختلاف در ساختار دیواره سلولی باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی مربوط باشد، به‌طوری‌که غشای خارجی در باکتری‌های گرم‌منفی مانند *E. coli* معمولاً نفوذپذیری کمتری نسبت به بسیاری از متابولیت‌های ضد میکروبی دارد. با این حال، مشاهده هاله عدم رشد در برابر هر دو باکتری آزمون نشان‌دهنده پتانسیل ایزوله‌های استرپتومایسس جداسازی‌شده از خاک‌های پارک ملی کویر برای تولید مواد زیست‌فعال با طیف اثر نسبتاً مناسب است. این یافته‌ها نشان می‌دهد که سویه‌های جداسازی‌شده می‌توانند به‌عنوان منابع بالقوه برای مطالعات بیشتر در زمینه استخراج، شناسایی و خالص‌سازی ترکیبات ضد میکروبی مورد توجه قرار گیرند.

جدول ۲. فعالیت ضد میکروبی ایزوله‌های استرپتومایسس بر اساس قطر هاله عدم رشد

کد ایزوله	<i>Staphylococcus aureus</i> (mm)	<i>Escherichia coli</i> (mm)
R1	۱۷	۱۶
R2	۱۳	۱۲
R3	۱۴	۱۱
R4	۱۵	۱۴

۳-۳. انتخاب سویه برتر

پس از ارزیابی فعالیت ضد میکروبی سویه‌های باکتریایی جدا شده علیه عوامل بیماری‌زا، سویه R1 به دلیل دارا بودن بیشترین و مؤثرترین خاصیت بازدارندگی، به عنوان سویه برتر برای مطالعات بعدی و بهینه‌سازی انتخاب گردید.

۳-۳-۱. بهینه‌سازی شرایط رشد و تولید متابولیت‌های ضد میکروبی

به منظور افزایش راندمان تولید متابولیت‌های ضد میکروبی توسط سویه R1، تأثیر پارامترهای کلیدی شامل pH محیط کشت، دمای انکوباسیون و سرعت هم‌زدن بر فعالیت ضد میکروبی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از بررسی سویه R1 در pH های مختلف (۴٫۵، ۵٫۰ و ۵٫۵) نشان داد که بیشترین فعالیت ضد میکروبی، که با اندازه‌گیری قطر هاله ممانعت سنجیده شد، در pH برابر با [۵٫۵ = pH] مشاهده گردید. فعالیت در pH های پایین‌تر به طور قابل توجهی کاهش یافت. بررسی تأثیر دماهای مختلف (۲۵، ۲۸ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد) بر تولید متابولیت‌های ضد میکروبی سویه S1 حاکی از آن بود که دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد منجر به حداکثر بازدهی و شدت اثر بازدارندگی شد. ارزیابی کشت‌های مایع در سرعت‌های هم‌زدن متفاوت (۱۳۵، ۱۲۰ و ۱۵۰ دور در دقیقه) نشان داد که سرعت هم‌زدن عدد سرعت بهینه ۱۳۵ دور در دقیقه، مطلوب‌ترین شرایط را برای تولید مؤثر ترکیبات ضد میکروبی فراهم می‌آورد. در این سرعت، فعالیت بازدارندگی به طور محسوسی نسبت به سایر سرعت‌ها افزایش یافت.

شناسایی مولکولی و تحلیل فیلوژنی سویه R1

به منظور شناسایی دقیق سویه منتخب (R1)، بررسی‌های مولکولی انجام شد. نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات PCR نشان داد که پرایمرهای عمومی R16F/R16R موفق به تکثیر قطعه‌ای با اندازه تقریبی ۱۵۰۰ جفت‌باز (bp) از ژن 16S rRNA در سویه S1 شدند. همچنین، استفاده از پرایمرهای اختصاصی RmF/RmR منجر به تکثیر موفقیت‌آمیز قطعه‌ای با اندازه ۵۰۰ جفت‌باز شد که حضور ژن هدف را در این سویه تأیید نمود. پس از تعیین توالی قطعات تکثیر شده و بررسی در پایگاه داده NCBI (توسط BLAST)، سویه R1 بالاترین میزان شباهت (Homology) را با سویه‌های گونه *Bacillus subtilis* نشان داد. نتایج حاصل از هم‌ترازی توالی‌ها (Alignment) تاییدکننده تعلق این سویه به جنس *Bacillus* می‌باشد. بر اساس توالی ژن 16S rRNA، درخت فیلوژنتیکی سویه R1 ترسیم شد. موقعیت این سویه در درخت فیلوژنتیکی نشان داد که R1 در یک کلاستر (Cluster) واحد با گونه *Bacillus subtilis* قرار می‌گیرد و فاصله تکاملی کمی با سویه‌های شاخص این گونه دارد. این نتایج در کنار داده‌های مورفولوژیکی، شناسایی سویه R1 به عنوان *Bacillus subtilis* strain R1 را نهایی کرد.

۴. بحث

هدف اصلی این پژوهش، غربالگری، جداسازی و ارزیابی سویه‌های استرپتومایسس تولیدکننده مواد ضد میکروبی از پارک ملی کویر، ایران، بود. در این راستا، تلاش بر شناسایی دقیق مولکولی سویه‌های جدا شده، از جمله سویه R1، به منظور تعیین پتانسیل آن‌ها برای تولید ترکیبات زیست‌فعال معطوف گردید. محیط‌های طبیعی مانند پارک ملی کویر، به دلیل شرایط اکولوژیکی منحصر به فرد خود، منابع غنی بالقوه‌ای برای کشف میکروارگانیسم‌های جدید با قابلیت‌های متابولیکی ویژه، از جمله تولید متابولیت‌های ثانویه با خواص ضد میکروبی، محسوب می‌شوند. گونه‌های جنس *Streptomyces* به طور خاص به دلیل توانایی چشمگیرشان در تولید

طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها و سایر ترکیبات ضد میکروبی، از دیرباز مورد توجه محققان بوده‌اند. بنابراین، شناسایی دقیق سویه‌های جدا شده، به ویژه سویه R1، نه تنها به درک بهتر تنوع میکروبی منطقه کمک می‌کند، بلکه مبنایی برای تحقیقات آتی با هدف ارزیابی و بهره‌برداری از پتانسیل ضد میکروبی آن‌ها فراهم می‌آورد. در این پژوهش، از روش‌های مولکولی، از جمله تکثیر ژن 16S rRNA، برای دستیابی به شناسایی دقیق سویه R1 استفاده شد. نتایج این پژوهش، شناسایی مولکولی سویه R1 را به عنوان *Bacillus subtilis* با اطمینان بالایی تأیید می‌کند. این یافته با استفاده از تکثیر ژن کلیدی 16S rRNA و تحلیل نتایج حاصل از دو دسته پرایمر مجزا میسر شده است. استفاده همزمان از پرایمرهای عمومی، که قادر به تکثیر ناحیه طولانی (حدود ۱۵۰۰ جفت‌باز) و تقریباً کامل ژن 16S rRNA هستند، دقت شناسایی را افزایش داده و امکان مقایسه جامع با پایگاه‌های داده جهانی را فراهم می‌آورد. در کنار آن، استفاده از پرایمرهای اختصاصی RmF/RmR که قطعه‌ای به طول تقریبی ۵۰۰ جفت‌باز را هدف قرار می‌دهند، صحت شناسایی را با تأیید وجود توالی خاص مرتبط با گونه‌های نزدیک به *B. subtilis* تضمین می‌نماید. این رویکرد دوگانه، که هم جامعیت توالی را پوشش می‌دهد و هم ویژگی اختصاصی را تأیید می‌کند، خطاهای احتمالی ناشی از جهش‌های نقطه‌ای یا حذف‌های جزئی در نواحی هدف پرایمرهای عمومی را کاهش می‌دهد.

جنس *Bacillus*، به ویژه گونه *Bacillus subtilis*، یکی از پرکاربردترین میکروارگانیسم‌ها در علوم زیستی و صنایع مختلف است. این باکتری به دلیل توانایی تولید طیف وسیعی از آنزیم‌های صنعتی (مانند پروتئازها، آمیلازها، لیپازها)، ترکیبات زیست‌فعال (مانند آنتی‌بیوتیک‌ها و پپتیدهای ضد میکروبی)، و نقش مؤثرش در سلامت خاک و ریزوسفر، اهمیت فراوانی یافته است. از این رو، شناسایی دقیق سویه‌های جدید در این جنس، گام اولیه‌ای حیاتی برای کشف پتانسیل‌های بیوتکنولوژیکی آن‌ها محسوب می‌شود. جایگاه سویه S1 در درخت فیلوژنتیکی، که نشان‌دهنده قرارگیری آن در نزدیکی سویه‌های شناخته‌شده *B. subtilis* است، خبر از همین پتانسیل می‌دهد. با توجه به شباهت‌های زیاد فنوتیپی و ژنتیکی بین برخی گونه‌های جنس *Bacillus*، اتکا صرف به روش‌های کلاسیک شناسایی (مانند ریخت‌شناسی کلنی، رنگ‌آمیزی گرم، و تست‌های بیوشیمیایی) ممکن است با ابهاماتی همراه باشد. در این راستا، روش‌های مولکولی مانند PCR مبتنی بر ژن 16S rRNA، به عنوان یک استاندارد طلایی در شناسایی تاکسونومیک، دقت و سرعت عمل بیشتری را فراهم می‌آورند. نتایج حاصل از این مطالعه، با تأیید شناسایی مولکولی، مبنایی محکم برای ادامه پژوهش‌ها بر روی سویه R1 فراهم می‌آورد. هرچند شناسایی مولکولی سویه R1 را به عنوان *B. subtilis* با اطمینان بالا تأیید می‌کند، اما برای درک کامل توانایی‌های بیولوژیکی و پتانسیل‌های کاربردی آن، مطالعات تکمیلی ضروری است. این مطالعات می‌توانند شامل توالی‌یابی کل ژنوم (Whole Genome Sequencing - WGS) برای شناسایی دقیق‌تر ژن‌های دخیل در متابولیسم و تولید ترکیبات خاص، و همچنین ارزیابی‌های فنوتیپی و عملکردی جامع (مانند سنجش فعالیت آنزیمی، تولید متابولیت‌ها، یا بررسی خواص پروبیوتیکی/پتنوتژنیک) باشند. درک جایگاه دقیق سویه R1 در میان طیف وسیع سویه‌های *B. subtilis*، که با تحلیل‌های فیلوژنتیکی دقیق‌تر امکان‌پذیر است، می‌تواند راهنمای مطالعات آینده در جهت بهره‌برداری بهینه از این سویه باشد.

۵. نتیجه گیری

در این مطالعه، شناسایی مولکولی سویه باکتریایی R1 با استفاده از روش PCR بر پایه تکثیر ژن 16S rRNA انجام شد. نتایج حاصل از استفاده همزمان از پرایمرهای عمومی (با تولید آمپلیکون حدود ۱۵۰۰ جفت‌باز) و پرایمرهای اختصاصی RmF/RmR (با تولید آمپلیکون حدود ۵۰۰ جفت‌باز)، جایگاه این سویه را در میان گونه‌های شناخته‌شده جنس *Bacillus* مشخص کرد. تحلیل‌ها نشان داد که سویه R1 با اطمینان بالا متعلق به گونه *Bacillus subtilis* است. این شناسایی مولکولی، مبنایی محکم برای تحقیقات آتی با هدف بررسی پتانسیل‌های بیولوژیکی، بیوتکنولوژیکی و کاربردی این سویه فراهم می‌آورد. با توجه به اهمیت فراوان *B. subtilis* در صنایع مختلف و نقش آن در اکوسیستم‌ها، درک دقیق‌تر ویژگی‌های سویه S1 می‌تواند در آینده منجر به اکتشافات جدید یا بهینه‌سازی فرایندهای موجود گردد.

منابع

1. Senjaliya, T., Patel, M., & Raval, A. M. (2026). Strategies for combating the global health threat of antibiotic resistance: novel therapeutics and combination approaches. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 14(01), 122-130.
2. Sharma, M., Boora, S., Yadav, S., Kadian, S., Soniya, K., Rani, P., ... & Singh, J. (2026). Current global challenges and innovative strategies to combat antimicrobial resistance. *Discover Public Health*, 23(1), 452.
3. Ma, H., Zhang, L., Wang, L., Yang, Z., Liu, J., Sun, H., ... & Quan, C. (2026). Antibiotic mechanisms and resistance: molecular insights and therapeutic strategies. *Antibiotics*, 15(4), 351.
4. Priya, M., & de Carvalho, L. P. S. (2026). Circumnavigating Antibiotic Mechanisms of Action and Resistance Research. *Biochemistry*.
5. Lavin, P., Chen, Z., Wong, C. M. V. L., Teoh, C. P., Fierro-Vásquez, N., Osés, R., ... & Purcarea, C. (2026). Untapped Potential of the Antarctic Strain *Actinacidiphila fildesensis* DEC002: Integrative Genome Analysis and Functional Profiling. *Diversity*, 18(4), 236.
6. Raud, L. A. (2025). Activation of silent biosynthetic gene clusters of an Antarctic *Streptomyces* sp. for improved bioactivity and chemical diversity (Doctoral dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel).
7. Meka, A. F., Bekele, G. K., Abas, M. K., & Gemed, M. T. (2025). Exploring bioactive compound origins: Profiling gene cluster signatures related to biosynthesis in microbiomes of Sof Umer Cave, Ethiopia. *Plos one*, 20(3), e0315536.
8. Carretero Molina, D. (2024). Expanding the chemical space of microbial specialized metabolites: Structure elucidation and biosynthesis of novel bioactive natural products from actinomycetes (Doctoral dissertation, Universidad de Granada).
9. Islam, W., Naveed, H., Zhihao, Z., Du, Y., Zhang, Y., Alshaharni, M. O., ... & Zeng, F. (2026). Desert ecosystems as carbon frontiers: innovations in sequestration and climate adaptation strategies. *Biological Reviews*, 101(2), 615-643.
10. Wirajana, I. N., Vaghamshi, N., Ariantari, N. P., Sawur, A. B., Ratnayani, K., Antaliya, K., ... & Dudhagara, P. (2026). Hot Springs as Reservoirs of Valuable Microbes, Metabolites, and Minerals with Ecological, Biotechnological and Bioeconomic Perspectives. *Bacteria*, 5(1), 12.
11. Helmi, N. R. (2025). Exploring the diversity and antimicrobial potential of actinomycetes isolated from different environments in Saudi Arabia: a systematic review. *Frontiers in microbiology*, 16, 1568899.
12. Jan, A., Adil, S., Ali, T., Ahmed, B., Ahmed, Z., & Hussain, Z. (2025). Desert and medicinal plants as novel sources of antimicrobial agents for crop protection. *Planta Animalia*, 4(3), 197-218.

13. Hemmami, H., Seghir, B. B., Zeghoud, S., Ben Amor, I., Kouadri, I., Rebiai, A., ... & Atanassova, M. (2023). Desert endemic plants in Algeria: A review on traditional uses, phytochemistry, polyphenolic compounds and pharmacological activities. *Molecules*, 28(4), 1834.
14. Aliabadi, M., & Ghahremaninejad, F. (2025). Floristic Study of Estand Protected Region, Nehbandan, South Khorassan Province, Iran. *Taxonomy and Biosystematics*, 17(62), 1-24.