گیاهپزشکی (مجله علمی کشاورزی)، جلد ۴۰ شماره ۱، بهار ۱۳۹۶

جداسازی و شناسایی اکتینومیست‌های خاک به عنوان عوامل موثر در کنترل زیستی برخی بیمارگرهای گیاهی

صدف سادات رفعتی[۱] و بهار شهنواز[۲*]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲- *نویسنده مسوول: استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران (shahnavaz@um.ac.ir)

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۴/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۶/۲۹

چکیده

در سال‌های اخیر، استفاده از میکروارگانیسم‌ها به عنوان آنتاگونیست بیمارگرها، به عنوان یکی از راههای جانشین سموم شیمیایی مورد توجه قرار گرفته است. اکتینومیست‌ها از مهمترین گروه‌های باکتریایی هستند که می‌توانند به عنوان عوامل زیستی علیه بیمارگرها مؤثر باشند. این پژوهش شامل جداسازی، شناسایی و بررسی فعالیت ضدمیکروبی اکتینومیست‌های جداسازی شده از خاک علیه سه نمونه بیمارگر گیاهی *Fusarium oxysporum*، *Xanthomonas campestris* و *Erwinia amylovora* بود. سویه‌های اکتینومیست روی محیط کشت‌های نشاسته‌کازئین‌آگار و گلیسرول‌کازئین‌آگار جداسازی شدند. غربالگری فعالیت ضدمیکروبی آنها در ابتدا به کمک کشت تقاطعی در برابر بیمارگرها و سپس در محیط‌های پیش‌کشت و تخمیری مختلف انجام شد. ۱۵ جدایه اکتینومیست براساس ویژگی‌های فنوتیپی برای سنجش فعالیت ضدمیکروبی در برابر بیمارگرها انتخاب شدند. غربالگری اولیه نشان داد که ۸ سویه دارای اثر ضدمیکروبی در برابر حداقل یک بیمارگر بودند که این موضوع برحسب اندازه هاله عدم رشد بیمارگر مورد سنجش قرار گرفت. استفاده از محیط‌های تخمیری مختلف نشان دادکه در برخی سویه‌ها استفاده از محیط دارای گلیسرول هاله بازدارندگی را افزایش داد. سه سویه براساس ژن ۱۶SrRNA شناسایی شدند که متعلق به گونه‌های جنس *Streptomyces* sp. بودند. بهینه‌سازی ترکیبات و شرایط محیط کشت نشان داد که محیط‌کشت تخمیری دارای گلیسرول و عصاره سویا در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH خنثی سبب بالاترین هاله مهار کنندگی رشد بیمارگر *X.campestris* در حضور جدایه ASC۶۰ شد. مطالعات آینده می تواند سبب خالص‌سازی ترکیبات ضد میکروبی و بهینه‌سازی شرایط تولید آن به منظور کاربرد صنعتی این سویه ها در کنترل آفات در کشاورزی شود.

کلید واژه‌ها: اکتینومیست، بیمارگرهای گیاهی، کنترل زیستی، فعالیت ضدمیکروبی

مقدمه

بیمارگرهای گیاهی عامل بیماری‌های گیاهی هستند که در تولید محصولات کشاورزی اختلال ایجاد می‌کنند و در سراسر جهان یک نگرانی عمده محسوب می‌شوند. در بررسی‌های صورت گرفته، میزان خسارت این بیمارگرها از ۲۵٪ در کشورهای غربی تا حدود ۵۰٪ در کشورهای در حال توسعه تخمین زده شده است. با توجه به افزایش جمعیت

جهانی، کنترل بیماری‌های گیاهی به منظور تولید محصولات کشاورزی بیشتر اهمیت بالایی دارد (Gohel et al., 2006). یکی از عمده‌ترین راه‌های مقابله، استفاده از مواد شیمیایی مثل سموم و آفت‌کش‌هاست که در طولانی مدت نه تنها سبب ایجاد عوامل بیماریزای مقاوم می‌گردند، بلکه تجمع این مواد در محیط زیست و ورودشان به چرخه‌های طبیعی برای انسان نیز خطرساز است (Moosavi et al., 2011). بنابراین تحقیقات برای استفاده از میکروارگانیسم‌های غیربیماریزا به عنوان عوامل کنترل‌کننده زیستی در برابر بیمارگرهای گیاهی یک راهکار امیدوارکننده محسوب می‌شود و گزینه مناسبی برای جایگزینی آنها در برابر مواد شیمیایی محسوب می‌شود (Talubnak and Soytong, 2010). مثال‌های متنوعی درباره استفاده از باکتری‌ها و قارچ‌ها به عنوان عوامل کنترل‌کننده زیستی وجود دارد (Pal and McSpadden, 2006). یکی از اصلی‌ترین گروه‌های باکتریایی که می‌توانند آنتاگونیست بیمارگرهای گیاهی واقع شوند، اکتینومیست‌ها می‌باشند. در میان ۱۰۰۰۰ ترکیب ضدمیکروبی تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها، بیش از ۵۰٪ این ترکیبات از اکتینومیست‌ها به‌دست آمده است که بیش از دو سوم آنها برای مصارف کشاورزی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Evangelista-Martínez, 2014). پژوهش‌های متعددی درباره ویژگی‌های آنزیمی این گروه از میکروارگانیسم‌ها و خواص ضدباکتریایی و ضدقارچی آنها به ویژه جنس *Streptomyces* انجام پذیرفته است (Jeffry, 2008).

Streptomyces ها باکتری‌های گرم مثبت، هوازی و رشته ای و دارای ژنوم با محتوای گوانین و سیتوزین بالا (mol ٪۷۳ـ ۶۹) می‌باشند (Lanoot et al., 2004). تلاش برای جستجوی گونه‌های جدید که قابلیت کاربرد در بیوتکنولوژی را داشته باشند، ادامه دارد (Fiedler et al., 2005). باکتری‌های جنس *Streptomyces* به شکل‌های متفاوتی از گیاهان در برابر میکروارگانیسم‌های بیمارگر محافظت می‌کنند (El-Tarabily and Sivasithamparam, 2006). پراکندگی آنها در خاک به پارامترهای مختلفی مانند نوع خاک، میزان اکسیژن، موادآلی، شوری، رطوبت نسبی و دما بستگی دارد (McCarthy and Williams, 1990). بررسی ویژگی‌های *Streptomyces* های مناطق مختلف جغرافیایی یک فعالیت مهم برای شناسایی منابع تجاری جدید باارزش ژنتیکی و بیوشیمیایی می باشد. به عنوان مثال *Streptomyces griseus* یک ترکیب ضدمیکروبی تولید می‌کند که در کنترل پژمردگی فوزاریومی در گیاه گوجه فرنگی مورد استفاده قرار گرفته‌است (Anitha and Rebeeth, 2009). در مطالعه‌ای دیگر فعالیت آنتاگونیستی برخی سویه‌های *Streptomyces* در برابر بیمارگرهای قارچی مانند *Fusarium oxysporum*، *Rhizoctonia solani* و *Curvularia lunata* نشان داده شده است (Sowndhararajan and Kang, 2012). در تحقیقات مشابه تاثیر متغیر زمان در ایجاد هاله بازدارندگی بیمارگرهای قارچی در حضور سویه های مختلف *Streptomyces* بررسی شده است (Evangelista-Martínez, 2014).

هدف از مطالعه حاضر، غربالگری جدایه‌های اکتینومیست از دو نمونه خاک جنگلی و کوهستانی، شناسایی آنها براساس ویژگی‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی، و همچنین بررسی فعالیت ضدمیکروبی آنها علیه برخی بیمارگرهای گیاهی در شرایط آزمایشگاهی است.

مواد و روش‌ها

بیمارگرهای گیاهی مورد مطالعه:

سویه‌های باکتریایی *Erwinia amylovora* ATCC 49946، *Xanthomonas campestris* ATCC13951 و قارچ *Fusarium oxysporum* PTCC5115 به عنوان بیمارگرهای گیاهی مورد مطالعه از

مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران و مرکز منطقه‌ای قارچها و باکتریهای صنعتی ایران (PTCC) تهیه شدند. قارچ *F. oxysporum* روی محیط کشت Potato dextrose agar (PDA) و باکتری‌ها روی محیط Nutrient agar (NA) کشت داده شدند و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سویه‌های مورد نظر به منظور مطالعه در مراحل بعدی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

نمونه برداری و کشت باکتری‌های خاک

نمونه‌برداری خاک از دو منطقه مختلف ایران: منطقه کوهستانی کدکن واقع در تربت حیدریه خراسان جنوبی و منطقه پارک جنگلی تلار واقع در شمال ایران با رعایت شرایط نمونه‌برداری از عمق ۱۰ سانتی‌متری خاک در فالکون‌های سترون صورت گرفت. نمونه‌ها برای انجام آزمایش‌ها و بررسی‌های بعدی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

در ابتدا ۱۰ گرم خاک وزن شد و با ۹۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه در شیکر انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۵۰ rpm قرار داده شد تا باکتری‌ها از ذرات خاک جداسازی شوند. به منظور تفکیک بهتر پرگنه‌ها، از نمونه خاک رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-6} تهیه شد و به منظور جلوگیری از فعالیت باکتری‌های تند رشد و همچنین تحریک رویش اسپور اکتینومیست‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم ۶۵ درجه سانتی‌گراد به عنوان پیش‌تیمار دمایی قرار گرفتند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت روی محیط کشت‌های نشاسته کازئین آگار[1] و گلیسرول کازئین آگار[2] با سه تکرار از هر کدام تلقیح شد و به مدت ۲ تا ۴ هفته در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند (Shetty et al., 2014). محیط نشاسته‌کازیین‌آگار شامل نشاسته (۱۰)، کازئین (۰/۳)، پتاسیم‌نیترات (۲)، سدیم‌کلرید (۲)، دی پتاسیم‌هیدروژن‌فسفات (۲)، منیزیوم‌سولفات ۷ هیدراته (۰/۰۵)، کلسیم‌کربنات (۰/۰۲)، آهن‌سولفات ۷ هیدراته (۰/۰۱) و آگار (۱۸) (Kuster and Williams, 1964) و محیط گلیسرول‌کازئین‌آگار حاوی گلیسرول (۱۰ میلی‌لیتر)، کازئین (۰/۳)، پتاسیم‌نیترات (۲)، سدیم‌کلرید (۲)، دی‌پتاسیم‌هیدروژن‌فسفات (۲)، منیزیوم‌سولفات۷هیدراته (۰/۰۵)، کلسیم‌کربنات (۰/۰۲)، آهن‌سولفات۷هیدراته (۰/۰۱) و آگار (۱۸) بود (El-Nakeeb and Lechevalier, 1963). مقادیر ذکر شده در داخل پرانتز برحسب گرم بر لیتر است. به منظور جلوگیری از رشد قارچ، ۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک ضدقارچی سیکلوهگزامید پس از سترون‌کردن با فیلتر ۰/۲۲میکرومتر به محیط کشت اضافه گردید.

فعالیت ضدمیکروبی جدایه‌های اکتینومیست:

جدایه‌های اکتینومیست از طریق کشت خطی در پلیت‌های حاوی محیط کشت اولیه خالص‌سازی شدند. غربالگری اولیه به منظور بررسی وجود ترکیبات ضدمیکروبی در جدایه‌های اکتینومیست در محیط کشت مولر هینتون آگار[3] و به روش کشت تقاطعی انجام پذیرفت. ابتدا جدایه‌های اکتینومیست به اندازه رقت ۰/۵ مک فارلند ($1/5 \times 10^8$ cell/ml) رقیق شد و به صورت یک خط مستقیم در مرکز پلیت کشت و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تا زمان لازم برای رشد جدایه گرماگذاری شد. پس از طی این زمان، از نمونه بیمارگرهای مورد بررسی غلظت ۰/۵ مک فارلند تهیه شده و به صورت خطوط عمود بر خط کشت جدایه‌های اکتینومیست، کشت داده شدند. پلیت‌های محیط کشت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند (Arifuzzaman et

1- Starch Casein Agar
2- Glycerol Casein Agar
3- Muller Hinton Agar (MHA)

al., 2010) و در صورت ایجاد هاله ممانعت‌کننده رشد، قطر هاله توسط کولیس با دقت ۰/۱ میلی‌متر اندازه گیری شد (Fourati-Ben Fguira et al., 2005). هر آزمایش شامل سه تکرار می‌باشد.

بررسی تاثیر محیط‌های پیش کشت و تخمیری در تولید ترکیب ضدمیکروبی

با توجه به اینکه ترکیبات محیط کشت می‌توانند اثر قابل توجهی در تولید ترکیبات ضدمیکروبی و اثر آنتاگونیستی جدایه‌های اکتینومیست داشته باشند، تاثیر دو محیط پیش کشت (A, B) و سه محیط تخمیری (هیکی ترزنر، گلیسرول سویا و گلیسرول) مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور، در ابتدا سوسپانسیون اسپوری از هر جدایه تهیه گردید. در ابتدا هر جدایه به مدت ۱۰ روز در محیط هیکی ترزنرآگار[1] در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. پس از طی این مدت، ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل روی سطح محیط کشت ریخته و با لوپ سطح پلیت خراشیده شد. اسپورهای معلق در آب به کمک یک گاز استریل از سایر مواد محیط کشت و میسلیوم جداسازی گردید. سوسپانسیون اسپوری تهیه شده به مدت ۳۰ دقیقه در شیکر انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۵۰ rpm قرار گرفت.

در مرحله بعدی، ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپوری تهیه شده به ۴۰ میلی‌لیتر از هر محیط پیش کشت (A و B) تلقیح شد و در شیکر انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۵۰ rpm به مدت ۷۲ ساعت قرار گرفتند. محیط پیش کشت A شامل عصاره مخمر (۴)، عصاره مالت (۱۰)، گلوکز (۴) (Wink, 2002) و محیط پیش کشت B حاوی پپتون (۱۰)، عصاره مالت (۱۰)، گلیسرول (۱۰) (Reading and Cole, 1977) بود. مقادیر ذکر شده در داخل پرانتز برحسب گرم بر لیتر می‌باشد. pH محیط کشت‌ها ۷ تنظیم شده بود. سپس ۱ میلی‌لیتر از محیط‌های پیش کشت حاوی سویه در حال رشد به ۲۰ میلی‌لیتر محیط‌های تخمیری تلقیح شدند و به مدت ۷ روز در شیکر انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۵۰ rpm گرماگذاری شدند. محیط تخمیری هیکی ترزنر شامل: دکسترین (۱۰)، عصاره گوشت (۱)، عصاره مخمر(۲)، تریپتون (۲)، کلرید کبالت (۰/۰۲) (Kuster and Williams, 1964)، محیط تخمیری گلیسرول سویا[2] شامل گلیسرول (۱۰)، عصاره سویا (۱۰)، کلرید سدیم (۵)، کربنات کلسیم (۱) (Reading and Cole, 1977)، و محیط تخمیری گلیسرول حاوی گلیسرول (۳۰)، تریپتون (۲)، کلرید سدیم (۱)، دی پتاسیم هیدروژن فسفات ۱ منیزیوم سولفات ۷ هیدراته (۰/۵) (Reading and Cole, 1977) بود. مقادیر ذکر شده در داخل پرانتز برحسب گرم بر لیتر بوده و pH محیط کشت‌ها روی ۷ تنظیم شده بود.

پس از گذشت ۷ روز، به منظور جداسازی ترکیبات ضد میکروبی، محیط‌های تخمیری با دور ۴۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. ۱۰۰ میکرولیتر از مایع حاصل از سانتریفیوژ داخل چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر که در محیط کشت مولر هینتون آگار حاوی بیمارگر ایجاد شده بودند، ریخته شد. پلیت‌ها در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرماگذاری شدند. قطر هاله عدم رشد در اطراف چاهک‌ها به وسیله کولیس اندازه‌گیری شد و براساس نتایج به‌دست آمده، محیط پیش کشت و تخمیری مناسب برای تولید ترکیب ضدمیکروبی جدایه اکتینومیست ارزیابی شد.

ویژگی بیوشیمیایی جدایه‌ها

1- Hicky Tresner Agar

2- Glycerol Soy meal

جدایه‌هایی که بیشترین ترکیبات ضدمیکروبی را تولید کردند، از نظر قابلیت رشد در شرایط مختلف دمایی، pH، قابلیت مصرف قندهایی مانند گلوکز، لاکتوز و ساکارز، وجود آنزیم‌های هیدرولازی مانند ژلاتیناز، پروتئاز، آمیلاز و سلولاز بررسی شدند (Gulve and Deshmukh, 2011).

بهینه‌سازی محیط کشت تخمیری با استفاده از متغیرهای مختلف محیطی

به منظور بررسی اثر منابع مختلف کربن، میزان ۱٪ V/W از هر یک از منابع کربن مختلف مانند گلوگز، دکستروز، نشاسته و گلیسرول مورد استفاده قرار گرفت. محیط تخمیری دارای منابع کربنی مختلف در حرارت ۳۰ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۵۰ rpm به مدت ۷ روزگرماگذاری شد. تولید ترکیب ضدمیکروبی حاصل به وسیله روش انتشار در آگار اندازه‌گیری شد. پس از انتخاب بهترین منبع کربنی، غلظت‌های مختلف ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ درصد (V/W) آن بررسی شدند. اثر منابع مختلف نیتروژن با افزودن منابع مختلف شامل پپتون، عصاره‌سویا و عصاره‌مالت و آمونیوم‌نیترات به میزان۰/۲ V/W٪ به محیط کشت بهینه شده در مرحله قبل بررسی شد. پس از انتخاب بهترین منبع نیتروژنی مؤثر بر تولید ترکیب ضدمیکروبی، اثر غلظت‌های مختلف منبع نیتروژنی (۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸، ۱ و ۱/۲ درصد وزنی حجمی) مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بررسی اثر pH محیط کشت بر تولید ترکیب ضدمیکروبی، بهینه محیط کشت از مرحله قبل با pH های ۶، ۷، ۸ و ۹ ساخته شدند. به منظور بررسی اثر دما بر تولید ترکیب ضدمیکروبی، محیط تخمیری در دماهای ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با دور ۱۵۰ rpm گرماگذاری شدند.

شناسایی مولکولی جدایه‌ها

استخراج DNA ژنومی از کشت تازه باکتری‌های خالص و براساس روش توضیح داده شده با استفاده از کیت (Qbiogene, MP Biomedicals, Illkirch, France) FastDNA® SPIN Kit انجام شد. بررسی کمی و کیفی DNA ژنومیک استخراج شده به وسیله ژل الکتروفورز محتوی ۱٪ آگارز صورت پذیرفت. شناسایی جدایه اکتینومیستی انتخاب شده که دارای بیشترین قدرت میزان مهارکنندگی بود، با تکثیر ژن و تعیین توالی ژن S ۱۶rRNA و با استفاده از آغازگرهای عمومی ۲۷F و ۱۴۹۲R انجام گرفت. تکثیر ژن ۱۶S rRNA با استفاده از ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۱۰X Buffer، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، ۰/۵ میکرومولار از هر آغازگر، ۰/۶ واحد تک پلیمراز با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر برای مخلوط واکنش، با استفاده از کیت Bioneer انجام شد. برنامه PCR به صورت زیر انجام شد:

واسرشت‌سازی اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، و به دنبال آن ۳۰ چرخه واسرشت‌سازی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه و طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه.

آنالیز فیلوژنی و مقایسه توالی‌های به‌دست آمده

محصول PCR حاصل پس از خالص سازی به منظور تعیین توالی به شرکت Macrogen کره جنوبی ارسال شد. توالی‌های به‌دست آمده در بانک ژنی NCBI ذخیره و شماره دسترسی مربوط به هر کدام دریافت گردید که از شماره KT232073 تا KT232075 بودند. قرابت فیلوژنتیکی جدایه‌های به‌دست آمده با یکدیگر و با سویه‌های موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی NCBI و Ez-Taxon با استفاده از نرم افزار MEGA (Vrsion 5) (Tamura et al., 2011) مورد بررسی گرفت. هم‌راستاسازی (Alignement) توالی‌ها توسط نرم افزار Muscle (Edgar, 2004) انجام پذیرفت. دسته بندی توالی‌ها

(Clustering) با استفاده از الگوریتم Maximum Likelihood با ۱۰۰۰ تکرار انجام شد.

آنالیز آماری

به منظور بررسی معنادار بودن تاثیر هریک از محیط‌های پیش‌کشت و تخمیری مورد بررسی بر روی هاله ممانعت‌کننده رشد، آنالیز آماری با روش آنالیز واریانس (ANOVA)، با استفاده از نرم‌افزار R و در سطح اطمینان ۹۵٪ بررسی شد.

نتایج

از مجموع ۷۰ نمونه‌ی اکتینومیست که از خاک منطقه کوهستانی و جنگلی جداسازی شد، ۱۵ نمونه (۱۰ نمونه از خاک جنگلی و ۵ نمونه از خاک کوهستانی) براساس ویژگی‌های مورفولوژیکی و رنگ میسیلیوم به منظور بررسی‌های بیشتر و ارزیابی تولید متابولیت‌های ضدمیکروبی در برابر بیمارگرهای گیاهی مورد نظر انتخاب شدند. قابلیت تولید ترکیبات ضدمیکروبی به کمک کشت تقاطعی مورد ارزیابی قرار گرفت. از این تعداد، ۸ جدایه (۵۳٪) که از خاک جنگل جداسازی شدند، حداقل نسبت به یک نوع بیمارگر گیاهی مورد بررسی اثر آنتاگونیستی نشان دادند و منجر به مهار رشد آن شدند (جدول ۱).

براساس نتایج جدول ۱، همه جدایه‌های اکتینومیست به‌دست آمده دارای فعالیت ضدمیکروبی در برابر بیمارگر *X. campestris* بودند. جدایه ACS۷۰ دارای ترکیبات ضدمیکروبی در برابر هر سه بیمارگر گیاهی بود. جدایه‌های ACS۱۲ و ACS۶۹ دارای قابلیت تولید ترکیبات ضدمیکروبی در برابر باکتری *X. campestris* و قارچ *F. oxysporum* بوده و سویه ACS۶۰ دارای ترکیب ضدباکتری در مقابل بیمارگرهای *E. amylovora* و *X. campestris* بود. جدایه ACS۶۰ دارای بالاترین هاله مهارکنندگی (۱۳/۳۵ میلی‌متر) در برابر بیمارگر *E. amylovora*، جدایه ACS۶۹ دارای بالاترین هاله مهارکنندگی (۲۵ میلی‌متر) در برابر بیمارگر *X. campestris* و جدایه ACS۷۰ بیشترین هاله مهارکنندگی (۲۰/۳ میلی‌متر) را در برابر قارچ *F. oxysporum* داشت. این سه جدایه به منظور بررسی تاثیر ترکیبات محیط پیش کشت و تخمیری در تولید ماده ضدمیکروبی انتخاب شدند.

دو محیط کشت A و B و سه محیط تخمیری هیکی ترزنر، گلیسرول سویا و گلیسرول ارزیابی شدند. بررسی آنالیز آماری نشان داد که محیط‌های پیش‌کشت تاثیر معناداری در اندازه هاله بازدارندگی رشد نداشتند. اگرچه در جدایه ACS۷۰ محیط پیش کشت A سبب تولید هاله بازدارندگی بزرگتری شد. محیط تخمیری گلیسرول سویا سبب افزایش اندازه هاله بازدارندگی رشد شد، هر چند این تاثیر فقط در جدایه ACS۷۰ معنادار بود (شکل ۱).

بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی سه سویه که ترکیبات ضدمیکروبی بیشتری تولید کردند (جدول ۲)، نشان دادکه هر سه سویه قادر به تجزیه گلوکز و ساکارز به عنوان منبع کربن بوده، ولی قادر به مصرف لاکتوز نبودند. جدایه‌های ACS۶۹ و ACS۷۰ دارای آنزیم پروتئاز و فاقد آنزیم آمیلاز بودند و این حالت در جدایه ACS۶۹ برعکس بود. تولید آنزیم ژلاتیناز در هر سه سویه منفی و سلولاز مثبت بود. جدایه ACS۶۹ و ACS۷۰ دارای همولیز آلفا بودند. بررسی اثر شرایط محیطی بر رشد سویه‌ها نشان داد که هر سه قادر به رشد در دماهای ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد بودند. همچنین برخلاف دو جدایه دیگر، جدایه ACS۶۰ قادر به رشد در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بود. جدایه ACS۶۹ و ACS۷۰ قادر به رشد در شرایط اسیدی با pH: ۵ بودند و این در حالی است که هیچ یک از سویه‌ها قادر به رشد در pH قلیایی ۹ نبودند.

با توجه به رشد جدایه ACS۶۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، روش تک متغیره به منظور بهینه‌سازی شرایط تولید ترکیب ضدمیکروبی در این سویه در برابر بیمارگر *X.campestris* مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده از این

جدول ۱ـ هاله عدم رشد ایجاد شده توسط متابولیت ها در هشت سویه اکتینومیست علیه سه بیمارگر گیاهی. نمونه‌هایی که زیر آنها خط کشیده شده است، از منطقه کوهستانی و بقیه از ناحیه جنگلی به‌دست آمده‌اند. اندازه‌ها برحسب میلی‌متر و با حداقل سه تکرار می‌باشند.

Table 1. Zone of growth inhibition caused by metabolites in eight Actinomycetes sp. against three plant pathogens. The underlined samples were obtained from mountain and others from jungle.

Isolates / Pathogens	ACS3	ACS5	ACS6	ACS12	ACS18	ACS29	ACS31	ACS32	ACS41	ACS46	ACS54	ACS57	ACS60	ACS69	ACS70
X. campestris	–	–	–	10±0	–	10±0	–	13±0.17	–	13±0.35	12.6±0.4	–	19±0.11	25±0	20.6±0.11
E. amylovora	–	–	–	-	–	–	–	–	–	–	–	–	13.35±0.1	–	11.3±0.11
F. oxysporum	–	–	–	0.8±0	–	–	–	–	–	–	–	–	-	15.6±0.2	20.3±0.5

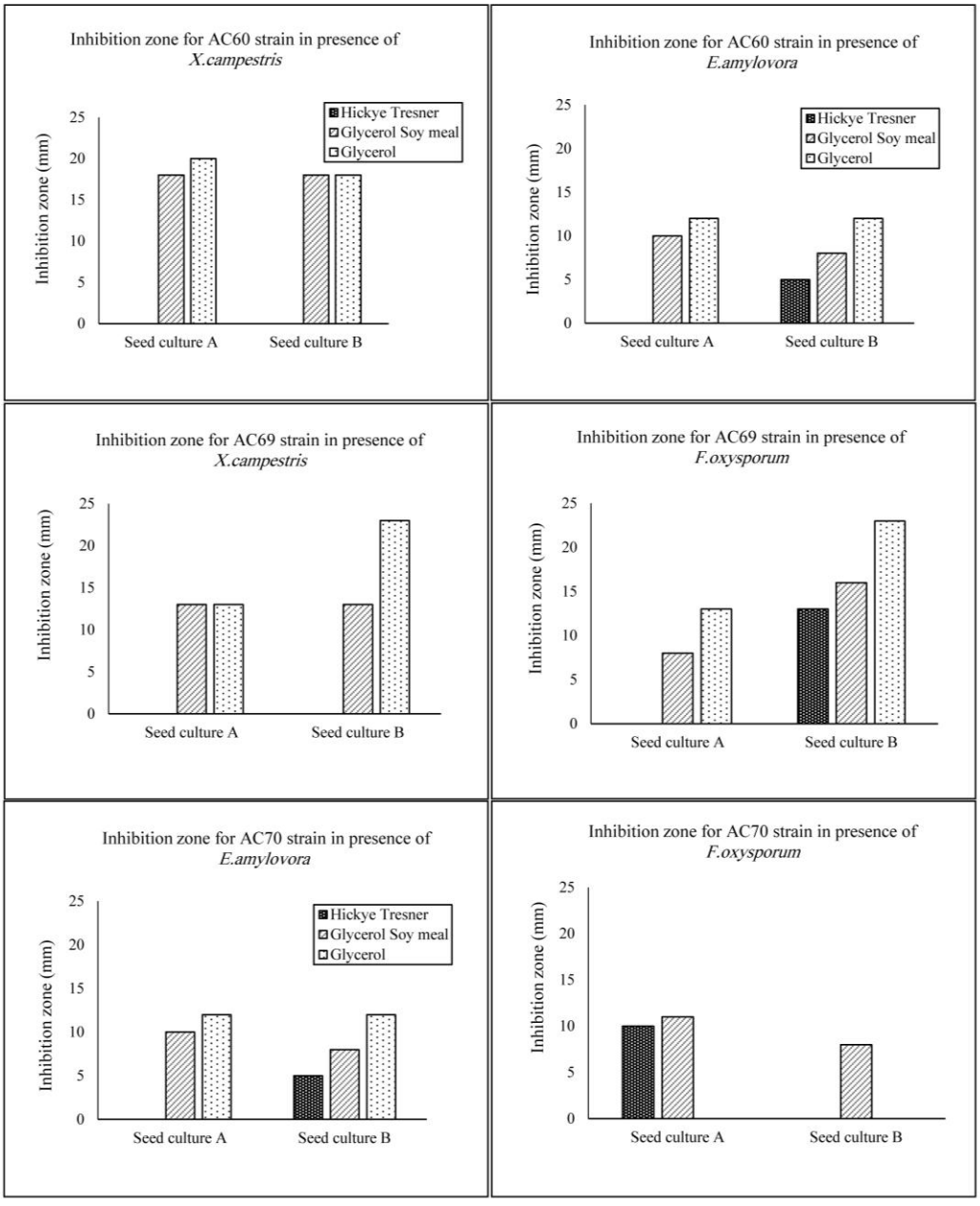
جدول ۲ـ ویژگی‌های مورفولوژی و بیوشیمیایی سویه های های منتخب.

Table 2. Morphological and biochemical characteristics of selected strains

Strains		Sugar Fermentation			Extracellular enzymes					Temperature (◦C)						pH		
	Color mycelium	Glucose	Lactose	sucrose	Gelatinase	Protease	Amylase	Cellulase	Catalase	4	20	25	30	37	55	5	7	9
AC S60	Cream	+	–	+	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	+	–
AC S69	Brown black	+	–	+	–	+	–	+	+	–	+	+	+	+	–	+	+	–
AC S70	White gray	+	–	+	–	+	–	+	+	–	+	+	+	+	–	+	+	–

شکل ۱ـ تاثیر دو محیط پیش کشت (A,B) و سه محیط تخمیری (هیکی ترزنر، گلیسرول سویا و گلیسرول) روی هاله بازدارندگی رشد در سویه‌ها

Figure 1. The effect of two seeding cultures (A/B) and three fermentation media (Hicky Tresner, Glycerol Soy meal and Glycerol) on inhibition zone in selected strains.



روش، متغیرهای مختلف به صورت جداگانه مورد بررسی قرار گرفته و به عنوان سطح ثابت برای متغیرهای بعدی در نظر گرفته شدند.

نتایج بهینه‌سازی نشان داد که سویه مورد نظر در تمامی محیط‌ها قادر به رشد بود، در حالی که در ایجاد هاله بازدارندگی رشد بیمارگر اثرات متفاوتی دیده شد (جدول ۳). آنالیز آماری نشان دادکه منابع کربنی پیچیده مانند گلیسرول و نشاسته موثرتر از منابع کربنی منومر بودند. غلظت گلیسرول مورد استفاده از ۰/۵ تا ۲ درصد اثر افزایشی بر تولید ترکیب ضدمیکروبی داشته و پس از آن منجر به کاهش تولید ترکیب شد. عصاره سویا و پپتون به عنوان منابع نیتروژنی به ترتیب بیشترین تأثیر را بر تولید ترکیب ضدمیکروبی داشتند. افزایش غلظت عصاره سویا تا ۱٪ سبب افزایش میزان تولید ترکیب ضدمیکروبی و پس از آن سبب کاهش تولید گردید. بیشترین هاله بازدارندگی رشد در pH خنثی مشاهده شد، و افزایش یا کاهش پس از آن سبب کاهش تولید ترکیب ضدمیکروبی شد. با افزایش دما تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد، تولید ترکیب ضدمیکروبی افزایش یافت و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد کاهش چشمگیری داشته و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به صفر رسید.

به منظور شناسایی بیشتر جدایه‌های به‌دست آمده، روش مولکولی با استفاده از تکثیر ژن ۱۶S rRNA انتخاب شد. توالی جدایه‌های به‌دست آمده با توالی‌های موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی NCBI و Ez-taxon مقایسه شد. توالی باکتری‌هایی که قرابت بیشتری با جدایه مورد نظر داشتند، به منظور رسم در درخت فیلوژنی انتخاب شد. سویه sp. (ACS۶۰) شباهت ۹۹/۵۱٪ به گونه *Streptomyces spororaveus* (KJ573040) نشان داد. شباهت سویه sp. (ACS۶۹) با گونه *Streptomyces purpeofuscus* (AB184234) ۹۹/۵۹٪ تخمین زده شد و سویه ACS۷۰ میزان ۹۹/۶۸٪ شباهت را با گونه باکتری *Streptomyces subrutilus* (X80825) نشان داد (شکل ۲).

بحث

قارچ *F. oxysporum* عامل بیماری در گیاهان خانواده کدوئیان (Cucurbitaceae) می باشد. این قارچ عامل پژمردگی برگ‌ها و سرشاخه‌های گیاهی است. انتشار این قارچ در گیاه از طریق آوندها صورت می‌گیرد که گاهی به پژمردگی کامل گیاه می انجامد. بیمارگر منجر به بوته میری در محصولات جالیزی در تمامی مراحل رشد گیاه می‌گردد و به میزان چشمگیری باعث کاهش کمیت و کیفیت این محصولات در ایران می گردد (Jahanbakhsh, 1997). *X. campestris* یک باکتری گرم منفی، هوازی، غیرمتحرک و میله ای می باشد که منجر به لکه برگی و سوختگی گیاهان می‌شود. این باکتری لکه‌های سوخته دایره‌ای نامنظم روی سطح برگ گیاه ایجاد می کند که این دوایر به مرور زمان به هم رسیده و سطح وسیعی از برگ سوخته به نظر می رسد (Modares-Sheikh et al., 2012). باکتری *E. amylovora* یکی دیگر از بیمارگرهای گیاهی محسوب می‌شود که سبب بیماری گال، نکروز و نرم شدن بافت‌های گیاهی می شود و بیماری فساد نرم باکتریایی و یا آتشک را در گیاه ایجاد می‌کند. این بیمارگر عامل سوختگی، ریزش شکوفه‌ها و عدم تشکیل میوه می‌باشد. این باکتری عموماً عامل بیماری در درختان میوه دانه‌دار مانند گلابی، به و سیب می‌باشد. در سال‌های اخیر گزارش‌هایی از اپیدمی این باکتری در محصولات گیاهی در شهرهای نیشابور، مشهد و چناران دیده شده است که خسارات غیر قابل جبرانی را به مزارع وارد کرده است (Abdollahi and Akbari-Mehr, 2008).

جدول ۳ـ اثر متغیرهای مختلف در ایجاد هاله بازدارندگی جدایه ACS٦٠ در حضور بیمارگر *X. campestris*
Table 3. The effect of different variables on production of inhibition zone for AC60 strain in presence of *X. campestris*.

Variables		Inhibition zone (mm)	Variables		Inhibition zone (mm)
Carbon source	Glycerol	19±0.1	% Soybean	0.2	12±0.07
	Starch	11±0.01		0.4	12±0.08
	Glucose	0		0.6	14±0.02
	Dextrose	8±0.07		0.8	17±0.1
				1	19±0.07
				1.2	17±0.03
%Glycerol	0.5	9±0.07	pH	6	11±0.02
	1	11±0.01		7	19±0.07
	1.5	18±0.01		8	9±0.07
	2	8±0.1		9	0
	2.5	19±0.07			
Nitrogen source	Peptone	10±0.01	Temperature	15	14±0.1
	Soy extract	15±0.07		20	17±0.1
	Malt extract	7±0.07		25	21±0.02
	NH_4NO_3	8±0.06		30	19±0.08
				37	0

هدف اولیه در پژوهش حاضر، بررسی ترکیبات ضدمیکروبی مشتق شده از اکتینومیست‌ها بود. متابولیت‌های ثانویه‌ی تولید شده توسط این باکتری‌ها دارای قابلیت مهار رشد بیمارگرهای گیاهی می‌باشند. نتایج نشان داده است که جداسازی اکتینومیست‌ها از ریزبوم‌های اکولوژیکی بررسی نشده می‌تواند منجر به دستیابی به سویه‌های جدید یا بومی آن منطقه گردد که در نتیجه امکان دستیابی به متابولیت جدید نیز بیشتر خواهد شد (Radhakrishnan et al., 2010).

در پژوهش حاضر محیط تخمیری گلیسرول سویا در بیشتر جدایه‌ها بالاترین میزان تولید ترکیب ضدمیکروبی را نشان داد، در حالی که در برخی پژوهش ها محیط هیکی ترزنر را بهترین محیط تخمیری ارزیابی کرده اند (Hamedi and Mohammadi-Panah, 2009). به عنوان مثال، جدایه ACS۷۰ دارای میانگین تولید ترکیب ضدمیکروبی ۸/۲ و ۰/۸۶ میلی‌متر در محیط پیش کشت‌های A و B بود، در حالی که این مقدار برای جدایه ACS۶۰ به میزان ۶/۴ و ۶/۹ میلی متر بود. این نتایج نشان می‌دهد که الزاماً یک محیط پیش‌کشت و تخمیری خاص برای تمامی نمونه‌های اکتینومیست جداسازی شده نمی‌تواند مؤثر واقع شود و دستیابی به محیط تخمیری و پیش کشت بهینه نیاز به بررسی‌های بیشتر دارد.

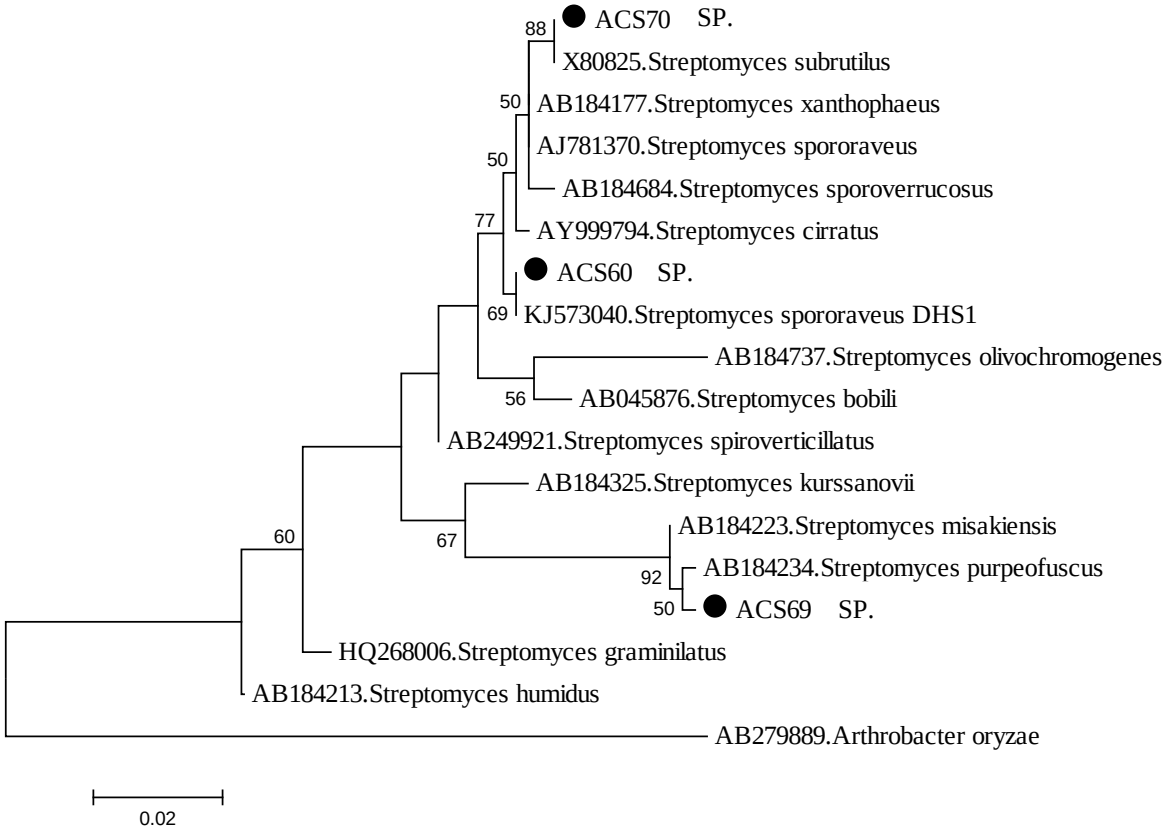
بررسی مولکولی جدایه‌های به‌دست آمده نشان داد که آنها متعلق به جنس *Streptomyces* می‌باشند. فعالیت آنتاگونیستی جنس *Streptomyces* در پژوهش‌های مختلف به اثبات رسیده است. به عنوان مثال، نشان داده شده است که *Streptomyces* های ناحیه ریزوسفر دارای فعالیت ضدقارچی در برابر بیمارگر *Colletotrichum* بود (Intra et al., 2011). همچنین، *Sterptomyces griseus*

جداسازی شده از خاک دارای فعالیت ضدقارچی در برابر *F. oxysporum* و *F. solani* بود (Anitha and Rebeeth, 2009). نتایج به‌دست آمده در این پژوهش مشابه نتایج تحقیق Debnath et al. (2013) بود که نشان داد گونه‌های مختلف این جنس مانند *S. cirratus*، *S. purpeofuscus* و *S. sporoverrcosus* دارای فعالیت علیه قارچ *F. oxysporum* بودند و هاله بازدارندگی رشدی در حدود ۱۹-۵ میلی‌متر را نشان دادند. در پژوهش حاضر، هاله بازدارندگی رشد در میکروارگانیسم‌های بیمارگر در حضور گونه‌های *Streptomyces* بیشتر و حدود ۲۱- ۸ میلی‌متر بود

پژوهش‌های انجام شده نشان می‌دهد که فعالیت مهارکنندگی و تجزیه‌کنندگی این باکتری‌ها در نتیجه تولید آنزیم‌های هیدرولازی مانند کیتیناز، گلوکوناز، پروتئاز و سلولاز بوده است (Intra et al., 2011). این آنزیم‌ها بازدارنده قوی بسیاری از قارچ‌های بیماریزای مهم گیاهی هستند و با اثر بر بخش کیتینی دیواره سلولی قارچ منجر به تجزیه دیواره سلولی آن می‌گردند و می‌توانند بر روی دامنه وسیعی از بیمارگرهای قارچی مؤثر واقع شوند. همچنین

شکل ۲ ـ درخت Maximum Likelihood موقعیت جدایه‌های به‌دست آمده را در بین جنس های *Streptomyces* نشان می دهد. هم‌راستاسازی توالی‌ها توسط نرم افزار Muscle انجام پذیرفت. اعداد روی شاخه ها ارزش bootstrap هستند که بصورت درصد از ۱۰۰۰ تکرار نشان داده شده است. bootstrap بالاتر از ۵۰٪ نشان داده شده است.

Figure 2. Maximum Likelihood tree showing the position of obtained isolates among members of genus *Streptomyces*. Alignment of sequences carried out by Muscle software. Numbers on branch nodes are bootstrap values shown as percentages of 1000 replications. Bootstrap values greater than 50% are indicated.



اکتینومیست‌ها قادر به تولید ترکیب ضدقارچی polyene هستند که ترکیبی آب گریز است و با ارگسترول غشای سلولی قارچ، تداخل ایجاد کرده و با ایجاد کانال منجر به افزایش نفوذپذیری آن می‌شود. تحقیقات نشان داده است که هنوز قارچ‌ها نسبت به ترکیبات polyene مقاوم نشده اند (Barke et al., 2010).

در پژوهش حاضر، سویه‌های جداسازی شده قادر به تولید سلولاز، پروتئاز و آمیلاز بودند که می‌تواند فعالیت ضدمیکروبی آنها را توضیح دهد. جدایه ACS۶۰ قادر به رشد در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بود که با توجه به رشد آن در ۳۷ درجه سانتی‌گراد می‌تواند به عنوان باکتری سرماپذیر (تحمل کننده سرما) در نظر گرفته شود. فعالیت ضدمیکروبی اکتینومیست‌ها می‌تواند در اثر تولید آنزیم‌های متعدد و اثر آنها بر ساختارهای مختلف بیمارگرها صورت گیرد و در نهایت منجر به مهار رشد و تکثیر آن‌ها گردد. تولید این آنزیم‌ها در شرایط دمایی اکستریم توسط باکتری‌ها می‌تواند نسبت به نوع تولید شده در شرایط دمایی میانه دارای ویژگی‌های منحصر به فردی مانند انعطاف‌پذیری بیشتر آنزیمی باشد که در نهایت باعث امکان اثربخشی بیشتر بر بیمارگر خواهد شد. پژوهش انجام شده توسط Giudice et al. (2007) نشان داد که سویه‌های سرمادوست و مقاوم به سرما می‌توانند کاندید مناسبی به منظور جستجوی ترکیبات ضدمیکروبی جدید در نظر گرفته شوند. در این پژوهش انجام بررسی‌های بیشتر بر روی جدایه ACS۶۰ و ارزیابی تولید ترکیب ضدمیکروبی آن علیه بیمارگرهای مورد بررسی در شرایط سرما برای نتیجه‌گیری دقیق‌تر ضروری می‌باشد.

تاکنون پژوهش‌های زیادی به منظور بهینه‌سازی شرایط محیط های تخمیری و میزان تولید متابولیت آن‌ها صورت پذیرفته است. در این پژوهش متغیرهای منابع کربنی و نیتروژنی، غلظت آنها، pH و دما مورد بررسی قرار گرفتند. در حالی که جدایه مورد نظر توانایی رشد در همه دماهای اندازه‌گیری شده را داشت، ولی دمای گرماگذاری ۲۵ درجه سانتی‌گراد تغییر چشمگیری را در میزان هاله بازدارندگی رشد بیمارگر *X. campestris* نشان داد. اگرچه بالاترین میزان تولید هاله بازدارندگی رشد در pH: ۷ بود، ولی نکته قابل توجه در این بود که در pH های اسیدی و قلیایی تولید ترکیب ضدمیکروبی متوقف نشد. پژوهش‌های متعدد نشان داده است که ماهیت محیط کشت و ترکیبات آن در تولید هاله مهارکنندگی رشد بیمارگر تاثیر عمده‌ای دارند. در این پژوهش استفاده از گلوکز در محیط تخمیری، تولید هاله مهارکنندگی را به شدت کاهش داد. در یک پژوهش افزودن گلوکز به محیط تخمیری سبب افزایش تولید ترکیبات ضدمیکروبی شد (Khandan Dezfully et al., 2015). این در حالی است که در یک پژوهش دیگر نشان داده شد که نشاسته به عنوان منبع کربن در افزایش هاله مهارکنندگی اثر مستقیم داشت (Abdelwahed, et al., 2012)

نتایج حاصل از این پژوهش وجود اکتینومیست‌های تولیدکننده ترکیبات ضدمیکروبی را در اکوسیستم‌های طبیعی ایران نشان می‌دهد. مطالعات آینده در جهت استخراج، خالص‌سازی و شناسایی نوع ترکیب ضدمیکروبی سویه‌های به‌دست‌آمده خواهد بود که می‌تواند می‌تواند تکمیل‌کننده نتایج پژوهش حاضر باشد.

سپاس‌گزاری

انجام این طرح تحقیقاتی با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد در قالب طرح شماره ۳۱۰۳۹/۳ انجام شده است. از آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی میکروبی گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه فردوسی مشهد تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Abdelwahed, N.A., Abdallah, N.A., El-Ghawas, D.E., El-Din, S.M.B., and El-Diwany, A.I. 2012. Isolation, identification and optimization of antimicrobial metabolites produced by soil derived actinomycetes. The Egyptian Journal of Experimental Biology, 24: 205-217.

Abdollahi, H., and Akbari-Mehr, H. 2008. Evaluation of fire blight resistance in some quince (*Cydonia oblonga* Mill.) genotypes. I. Isolation, evaluation and selection of causal bacterial (*Erwinia amylovora*) isolates. Seed and Plant Improvement Journal, 24: 515-528. (In Farsi)

Arifuzzaman, M., Khatun, M., and Rahman, H. 2010. Isolation and screening of *actinomycetes* from Sundarbans soil for antibacterial activity. African Journal of Biotechnology, 9: 4614-4619.

Anitha, A., and Rebeeth, M. 2009. In vitro antifungal activity of *Streptomyces griseus* against phytopathogenic fungi of tomato field. Academic Journal of Plant Sciences, 2: 119-123.

Barke, J., Seipke, R.F., Grüschow, S., Heavens, D., Drou, N., Bibb, M.J., Goss, R.J.M., Yu, D.W., and Hutchings, M.I. 2010. A mixed community of *actinomycetes* produce multiple antibiotics for the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus*. BMC Biology, 8: 109-119.

Debnath, R., Saikia, R., Sarma, R.K., Yadav, A., Bora, T.C., and Handique, P.J. 2013. Psychrotolerant antifungal Streptomyces isolated from Tawang, India and the shift in chitinase gene family. Extremophiles,17: 1045-1059.

Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Research, 32: 1792–1797.

El-Nakeeb, M.A., and Lechevalier, H.A. 1963. Selective isolation of aerobic *Actinomycetes*. Applied Microbiology, 11: 75-77.

El-Tarabily, K. and Sivasithamparam, K. 2006. Non streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. Soil Biology and Biochemistry, 38: 1505-1520.

Evangelista-Martínez, Z. 2014. Isolation and characterization of soil *Streptomyces* species as potential biological control agents against fungal plant pathogens. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 30: 1639-1647.

Fiedler, H.P., Bruntner, C., Bull, A.T., Ward, A.C., Goodfellow, M., Potterat, O., Puder, C., and Mihm, G. 2005. Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. Antonie van Leeuwenhoek, 87: 37–42.

Fourati-Ben Fguira, L., Fotso, S., Ben Ameur-Mehdi, R., Mellouli, L., and Laatsch, H. 2005. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80. Research in Microbiology, 156: 341-347.

Giudice, A.L., Bruni, V., and Michaud, L. 2007. Characterization of Antarctic psychrotrophic bacteria with antibacterial activities against terrestrial microorganisms, Journal of Basic Microbiology, 47: 496–505.

Gohel, V., Singh, A., Vimal, M., and Ashwini, P. 2006. Review-Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. African Journal of Biotechnology, 5: 54-72.

Gulve R. M., and Deshmukh, A. M. 2011. Enzymatic activity of actinomycetes isolated from marine sediments. Recent Research in Science and Technology, 3: 80-83.

Hamedi, J. and Mohammadi-Panah, F. 2009. Isolation, determination and evaluation of Antifungal activity of some Iranian actinomycetes against three plant pathogenic fungi. Journal of Entomology and Phytopathology. 76: 33-53. (In Farsi, with English abstract)

Intra, B., Mungsuntisuk, I., Nihira, T., Igarashi, Y., and Panbangred, W. 2011. Identification of *actinomycetes* from plant rhizospheric soils with inhibitory activity against *Colletotrichum* spp., the causative agent of anthracnose disease. BMC Research Notes, 4:98-107.

Jahanbakhsh, V. 1997. Study of the crown and root rot of melon. Thesis for M.Sc. degree, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. (In Farsi, with English abstract)

Jeffry, L. 2008. Isolation, characterization and identification of *Actinomycetes* from agriculture soils at Semongok, Sarawak. African Journal of Biotechnology, 7: 3697-3702.

Khandan Dezfully, N., and Ramanayaka, J.G. 2015. Isolation, identification and evaluation of antimicrobial activity of *Streptomyces flavogriseus*, strain ACTK2 from soil sample of Kodagu, Karnataka State (India). Jundishapur Journal of Microbiology, 8: 1-8.

Kuster, E. and Williams, S.T. 1964. Selection of media for isolation of *Streptomycetes*. Nature, 202: 928-929.

Lanoot, B., Vancanneyt, M., Dawyndt, P., Cnockaert, M., Zhang, Z., Huang, Y., Liu, Z., and Swings, J. 2004. BOX-PCR fingerprinting as a powerful tool to reveal synonymous names in the genus Streptomyces. Emended descriptions of the species *Streptomyces cinereorectus*, *S. fradiae*, *S. tricolor*, *S. colombiensis*, *S. filamentosus*, *S. vinaceus* and *S. phaeopurpureus*. Systematic and Applied Microbiology, 27: 84–92.

McCarthy, A.J., and Williams, S.T. 1990. Methods for studying the ecology of actinomycetes. Methods in Microbiology, 22: 533-563.

Modares-Sheikh, Z., Tarighi, S., Jafarpour, B., and Taheri, P. 2012. Isolation of some strains of the genus *Xanthomonas* from leaf spot and fruit of tomato in Khorasan Razavi. 3rd Iranian Agricultural and Biotechnology Conference, Mashhad, Iran.

Moosavi S.M.A., Dehnad, A., Kamali, S., and Pour-Soltan, M. 2011. Evaluation of antifungal effects and activity of Chitinase 19 from one strain of Iranian native Streptomyces griseus. Journal of Microbial Biotechnology. 3: 1-6 (In Farsi with English abstract)

Pal, K.K., and McSpadden Gardener, B. 2006. Biological control of plant pathogens. The Plant Health Instructor, 1-25.

Radhakrishnan, M., Suganya, S., Balagurunathan, R., and Kumar, V. 2010. Preliminary screening for antibacterial and antimycobacterial activity of *actinomycetes* from less explored ecosystems. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 26: 561-566.

Reading, C., and Cole, M. 1977. Clavulanic acid: a *β*-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 11: 852-857.

Sowndhararajan, K., and Kang, S.C. 2012. In vitro antagonistic potential of Streptomyces sp.AM-S1 against plant and human pathogens. Journal of Agricultural Chemistry and Environment, 1: 41-47.

Shetty, P.R., Buddana, S. K., Tatipamula, V. B., Naga, Y. V., and Ahmad, J. 2014. Production of polypeptide antibiotic from *Streptomyces parvulus* and its antibacterial activity, Brazilian Journal of Microbiology 45: 303-312.

Talubnak, C., and Soytong, K. 2010. Biological control of vanilla anthracnose using *Emericella nidulans*. Journal of Agricultural Technology, 6: 47-55.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G.M., and Kumar, N.S. 2011. MEGA 5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution, 28: 2162-2169.

Wink, J. 2002. The *Actinomycetales*, An order in the class of Actinobacteria important to the pharmaceutical industry- Electronic manual, Aventis Pharma, Deutschland Gmbh.

Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), 40(1) Spring 2017

Isolation and identification of Actinomycetes in soil as biological control agents against plant pathogens

S.S. Rafati[1] and B. Shahnavaz[2*]

1. M.Sc. student, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2. [*]**Corresponding author:** Assistant Professor, Institute of Applied Zoology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran (shahnavaz@um.ac.ir)

Received: 15 July 2015 Accepted: 19 September 2016

Abstract

In recent years, the use of microorganisms as a pathogenic antagonist and also a substitute for chemical pesticides has drawa the attention of researcliers. Actinomycetes are one of the most important bacterial groups with the ability to produce a variety of secondary metabolites and could be applied as biological agents against pathogens. This study included isolation, identification and evaluation of antimicrobial activity of Actinomycetes isolated from soil samples against three plant pathogens as *Fusarium oxysporum*, *Xanthomonas campestris* and *Erwinia amylovora*. Actinomycetes strains were isolated on the Starch Casein Agar and Glycerol Casein Agar. The screening of the antimicrobial activity against pathogens was primary evaluated with the cross culture method and followed different seeding and fermentation cultures. Fifteen Actinomycete isolates were selected to measure their antimicrobial activity against pathogens based on their phenotypic characteristics. The primary screening showed that 8 strains have antibacterial effects against at least one pathogen which was evaluated by plant pathogen inhibition zone. The results showed that the inhibition zone increases with the use of glycerol medium in some strains. Three strains were identified as *Streptomyces* sp. based on 16S rRNA gene. The culture compound and conditions optimization of ASC60 strain showed that fermentation media containing glycerol and soy meal at 25°C and neutral pH has the highest inhibitory zone against *X.campestris*. Future studies can focus on purification of antimicrobial compounds and improvement of production conditions in order to effectively use these strains in pest control.

Keywords: Actinomycete, Plant pathogens, Biological control, Antimicrobial activity