ژنتیک نوین
دوره هشتم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۲
صفحه ۱۴۸-۱۳۹

بررسی تنوع آکتینومیست‌های کمپوست قارچ خوراکی دکمه‌ای با استفاده از تجزیه و تحلیل الگوی قطعات برشی ژن 16S rRNA

Molecular identification of actinomycetes in the button mushroom compost using analysis of 16S rRNA gene restriction fragment patterns

محمد فارسی*[۱]، علی پاکدین پاریزی[۲]، خلیل ملک زاده[۳]

۱ - استاد گروه زیست فناوری قارچ‌های صنعتی جهاد دانشگاهی واحد مشهد
۲و۳- دانشجویان دکتری دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

Farsi M*[1], Pakdin Parizi A[2], Malekzadeh KH[1]

1. Professor, Research group of Industrial Fungi Biotechnology, ACECR, Mashhad, Iran
2,3. PhD Students, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mohfarsi@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۰/۲/۲۰- تاریخ پذیرش: ۹۱/۷/۴)

چکیده

آکتینومیست‌های گرمادوست به‌دلیل توانایی تجزیه مواد سلولزی از اجزای اصلی میکروفلور کمپوست قارچ خوراکی دکمه‌ای محسوب می‌شوند. این گروه همراه با میکروارگانیسم‌های گرمادوست دیگر نقش مهمی در فرایند کمپوست‌سازی ایفا می‌کنند. از روش‌های مختلف مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی برای شناسایی این گروه از باکتری‌ها استفاده شده است. روش‌های مولکولی مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) ازجمله آنالیز الگوی برشی جزء کوچک ژن RNA ریبوزومی (16S rRNA) با آنزیم‌های برشی روشی سریع و مطمئن برای شناسایی باکتری‌ها می باشد. مقایسه الگوی قطعات برشی ایزوله‌های جداشده با الگوی تهیه شده از هضم توالی‌های معتبر منتشر شده از جنس‌های آکتینومیست‌ها در GenBank به صورت این سیلیکو، روشی سریع برای شناسایی آکتینومیست‌ها می‌باشد. آکتینومیست‌های گرمادوست موجود در کمپوست با استفاده از روش رقیق‌سازی بر روی محیط کشت و گرمخانه‌گذاری در دمای ۴۶ °C جداسازی شدند. ژن 16S rRNA هر ایزوله به طور جداگانه، با استفاده از PCR تکثیر و با آنزیم‌های برشی مورد هضم قرار گرفت. پس از تعیین الگوی برشی هر آنزیم با الکتروفورز روی ژل آگارز، از تکنیک تجزیه و تحلیل قطعات DNA ریبوزومی تکثیر شده (ARDRA) برای شناسایی ایزوله‌های ناشناخته استفاده شد. بیشترین آکتینومیست‌های جداسازی شده از کمپوست قارچ خوراکی دکمه‌ای به جنس استرپتومایسس تعلق داشتند. این گروه دارای اهمیت زیادی در تجزیه بقایای گیاهی و تولید کمپوست می‌باشند.

واژه‌های کلیدی

آکتینومیست،
ژن 16S rRNA،
کمپوست،
Agaricus bisporus،
ARDRA

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.2.3.7]

مقدمه

قارچ‌های خوراکی به دلیل ارزش تغذیه‌ای و خصوصیات دارویی از مهم‌ترین محصولات باغبانی بوده و اهمیت تجاری قابل ملاحظه‌ای دارند (Fan et al. 2006; Farsi and Gordan 2009). قارچ خوراکی تکمه‌ای سفید برای رشد بهینه به محیط رشد انتخابی و با کیفیت عالی به نام کمپوست نیاز دارد (Singer and Harris 1987). در فرایند کمپوست‌سازی میکروارگانیسم‌های گرمادوست متفاوتی از قبیل آکتینومیست‌ها، قارچ‌های گرمادوست و باکتری‌های گرمادوست فعالیت دارند. این میکروارگانیسم‌ها علاوه بر فراهم کردن یک محیط مطلوب برای رشد میسلیوم قارچ، سوبسترای نامناسبی برای ارگانیسم‌های رقابت‌کننده به وجود می‌آورند (Fordyce 1970).

آکتینومیست‌ها به‌عنوان اجزای اصلی میکروفلور کمپوست‌ها شناخته شده‌اند. این گروه از باکتری‌ها قادر به تولید آنتی‌بیوتیک‌ها و آنزیم‌های مختلف بوده و توانایی تجزیه مولکول‌های پیچیده مخصوصاً سلولز، لیگنوسلولز و لیگنین را دارا می‌باشند (Lacey 1997; Chang and Miles 2004; Busti et al. 2006). بهبود فرایند تهیهٔ کمپوست و بدست آوردن کمپوست عالی برای پرورش قارچ با بهینه کردن ترکیب فلور میکروبی کمپوست می‌تواند عملکرد قارچ را افزایش دهد. برای بهینه نمودن ترکیب میکروفلور کمپوست، بایستی قارچها و باکتریهایی که در مرحله دوم کمپوست سازی دخالت دارند شناسایی شوند. در مرحله اول کمپوست سازی فرایندهای شیمیایی رخ می‌دهند و در مرحله دوم کمپوست سازی تخمیر میکروبی اتفاق می‌افتد. با شناسایی دقیق باکتری‌های موثر در مرحله دوم کمپوست سازی و تلقیح انتخابی آنها به کمپوستی که مرحله اول را به خوبی پشت سر گذاشته است می توان کمپوستی انتخابی تولید کرد که از رشد میسلیوم قارچ خوراکی بیشترین حمایت را داشته باشد (Pakdin et al. 1389; Farsi and Gordan 2009). برخی از محققین به منظور سرعت بخشیدن به فرایند تهیه کمپوست یا افزایش عملکرد قارچ، تعدادی از میکروارگانیسم‌های گرمادوست را به طور مصنوعی به کمپوست اضافه کرده اند. به طور مثال قارچ‌های گرمادوست در حین تهیه کمپوست اضافه شده‌اند و یا آکتینومیست‌ها را با کمپوست در زمان مایه‌زنی مخلوط کرده به طوریکه افزایش در عملکرد گزارش شده است (Fordyce 1970; Wiegant 1992).

برای شناسایی آکتینومیست‌های هوازی از روش‌های مورفولوژیکی، تعیین خصوصیات شیمیایی دیواره سلولی، قندهای تشخیصی موجود در عصاره سلولی و تست‌های بیوشیمیایی استفاده می‌شود. با این وجود، این روش‌ها به صرف هزینه و زمان زیادی نیاز داشته و غالباً نمی‌توانند یک ایزوله را به یک جنس خاص منتسب کنند. روش‌های مبتنی بر PCR یک راه سریع و مطمئن برای شناسایی باکتری‌ها ارائه کرده‌اند (Cook and Meyers 2003). ژن 16S rRNA یک ژن باکتریایی عمومی و محافظت شده با اعمال ثابت و بسیار محدود می‌باشد (Goto et al. 2000; Li et al. 2005). این ژن به اندازه کافی بزرگ بوده و دارای چندشکلی بین گونه‌ای کافی برای بررسی تمایز بین گونه‌ای می‌باشد (Clarridge 2004). علاوه براین وجود پایگاه داده بزرگ جمع‌آوری شده از توالی ژن 16S rRNA باکتری‌های مختلف در تعیین روابط فیلوژنی یا شناسایی باکتری‌ها می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد (Goto et al. 2000). بنابراین شناسایی باکتری‌ها بر اساس توالی 16S rDNA یکی از مفیدترین و دقیق‌ترین روش‌های شناسایی می‌باشد. این روش نسبت به روش‌های مرسوم مورفولوژیکی و تکنیک‌های شناسایی متابولیکی بسیار دقیق‌تر و قابل اعتمادتر است (Misbah et al. 2005) . در تکنیک تجزیه و تحلیل قطعات DNA ریبوزومی تکثیر شده (ARDRA)، بعد از تکثیر ژن 16S rRNA قطعه تکثیر شده با آنزیم‌های برشی مختلف هضم می‌شود. الگوی هضمی بدست آمده با الگوهای برشی ARDRA مقایسه شده و تفاوت میان گونه‌ها شناسایی می‌گردد (Dijkshoorn et al. 1998). این تکنیک برای تمایز میان گونه‌های باکتریایی در یک جنس، به عنوان مثال، کلستریدیوم و تمایز نژادهای باکتریایی در یک گونه، به عنوان مثال، لاکتوکوکوس مورد استفاده قرار گرفته است. شناسایی چندین گونه از آکتینومیست‌های هوازی متعلق به جنس‌های آکتینومادورا، گوردونیا، نوکاردیا، رودوکوکوس، ساکارومونوسپورا، ساکاروپلی‌اسپورا، استرپتومیسس و تسوکامورلا که از نظر پزشکی دارای اهمیت می‌باشند با این روش انجام گرفته است (Dietz 1988). علاوه بر این از تکنیک ARDRA برای مطالعه روابط

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.2.3.7]

فیلوژنیک در باسیلوس،کلوستریدیوم، موراکسلا و زانتاموناس استفاده شده است (Vaneechoutte 1998).

هدف از این تحقیق جداسازی و شناسایی مولکولی آکتینومیست‌های گرمادوست موجود در کمپوست قارچ خوراکی دکمه‌ای بود تا با ایزوله نمودن نژادهای خالص و تکثیر و معرفی آنها به کمپوست در اوایل مرحله دوم کمپوست‌سازی، تاثیر انفرادی و یا چند تایی آنها بر عمل‌آوری کمپوست و در نتیجه عملکرد قارچ خوراکی بررسی شود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های کمپوست

نمونه‌های مورد استفاده در این تحقیق در زمان های مختلف مرحله دوم تهیه کمپوست از مرکز تحقیقات قارچ‌های خوراکی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد و کارخانجات صنعتی تولید قارچ خوراکی در استان خراسان رضوی جمع آوری شدند. نمونه‌ها تا زمان بررسی در کیسه‌های پلاستیکی در دمای ۴ $^{\circ}C$ نگهداری شدند.

روش‌های جداسازی

از تکنیک رقیق‌سازی و تهیه غلظت‌های سریالی برای جداسازی آکتینومیست‌ها استفاده شد. برای بررسی تاثیر محیط کشت‌های مختلف در جداسازی این دسته از باکتری‌ها از محیط کشت‌های کمپوست آگار (Rainey 1989)، نوترینت آگار با غلظت نیمه، آب عصاره مخمر آگار (WYA) و زاپک‌دکس آگار (Czapek Dox Agar) (Atlas 2004) حاوی قارچ کش نیستاتین (۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر) به منظور جلوگیری از رشد قارچ‌ها، استفاده شد. در تیمار دیگر از محلول ۰/۰۵ درصد سدیم دودسیل سولفات (SDS) برای کشتن باکتری‌های ناخواسته و فعال کردن اسپور آکتینومیست‌ها استفاده شد. به منظور جداسازی انتخابی باکتری‌ها آنتی‌بیوتیک ریفامپیسین (۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) به محیط کشت اضافه شد. پلیت های جداسازی در ۴۶$^{\circ}C$ نگهداری و به مدت دو هفته روزانه مورد بررسی قرار گرفتند. تک کلنی‌های ظاهر شده به محیط کشت جدید منتقل و خالص‌سازی شدند.

روش‌های شناسایی

در شناسایی باکتری‌ها از مشاهده میکروسکوپی و تست‌های بیوشیمیایی مانند رنگ‌آمیزی اسید- فست جزئی، هیدرولیز اوره، احیای نیترات، کاتالاز و تست مقاومت به لیزوزیم استفاده شد (Schaad 1988). ظاهر کلنی باکتری‌ها بر روی محیط کشت آب- آگار نیز مورد بررسی قرار گرفت. کلنی‌های متفاوت از نظر شکل ظاهری و بیوشیمیایی بر روی محیط کشت جدید برای اطمینان از خلوص آنها به صورت مخطط کشت داده شدند. DNAی ژنومی باکتری از هر کشت خالص، برای بررسی‌های مولکولی جداسازی شد. برای این منظور تک کلنی‌ها در محیط کشت مایع LB در ۴۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت با ۲۰۰ دور در دقیقه رشد داده شدند. برای تهیه رسوب باکتری، چهار میلی‌لیتر محیط کشت باکتری به مدت ۹۰ ثانیه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل در بافر TE (۷/۷ pH) حل شد و به مدت دو دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب بدست آمده در ۵۰۰ میکرولیتر بافر TE بصورت محلول درآمد. میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شدند. نمونه‌ها بعد از جوشیدن به مدت پنج دقیقه در دمای محیط برای سرد شدن قرار گرفتند و سپس در ۷۵۰۰ دور در دقیقه به مدت سه دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول رویی (۳۰۰ میکرولیتر) به تیوب‌های جدید منتقل و برای آزمایشات بعدی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

از آغازگرهای عمومی '5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3 و '5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3 برای تکثیر توالی ژن 16S rRNA استفاده شد (Weisburg et al. 1991). تکثیر ژن 16S rRNA با استفاده از واکنش PCR با حجم نهایی ۵۰ میکرو لیتر برای هر مخلوط واکنش انجام شد. مواد لازم برای انجام واکنش از شرکت سیناژن خریداری شدند. چرخه حرارتی PCR به صورت مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۶ درجه سانتی‌گراد به‌مدت دو دقیقه، واسرشت سازی در دمای۹۶ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه در بقیه چرخه‌ها، مرحله اتصال در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله طویل‌شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت دو دقیقه انجام گرفت. مرحله

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.2.3.7]

آخر طویل شدن به مدت ۷ دقیقه بود. این برنامه در ۳۰ چرخه تکرار شد. برای اطمینان از اندازه صحیح قطعه تکثیر شده از الکترفورز در ژل آگارز یک درصد استفاده شد.

هضم توالی‌های ژن 16S rRNA موجود در پایگاه داده NCBI در این سیلیکو

توالی‌های ژن 16S rRNA آکتینومیست‌های گرمادوست موجود در پایگاه داده NCBI پس از استخراج و دسته‌بندی با استفاده از نرم‌افزار تحت وب NebCutter v2 با آنزیم‌های برشی تجاری هضم شدند. براساس الگوهای برشی بدست آمده، آنزیم‌هایی که توانایی تفکیک آکتینومایست‌های گرمادوست را دارا بودند از بین آنزیم های موجود انتخاب شدند.

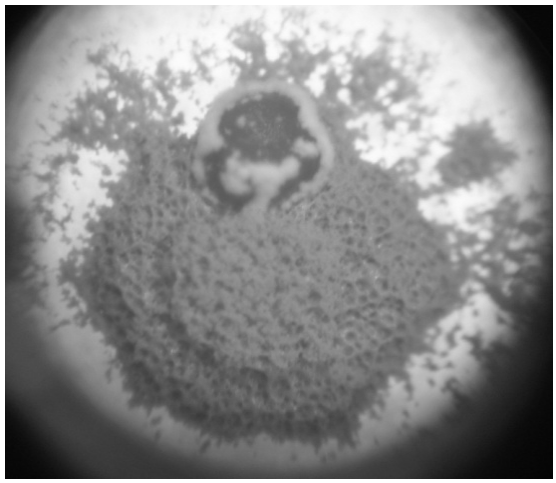
هضم با آنزیم‌های برشی و تجزیه و تحلیل الگوهای برشی

از آنزیم‌های برشی *Mbo*I, *Kpn*I, *Sph*I, *Pst*I, *Hin*dIII, *Sna*BI, *Sal*I, *Sca*I, *Age*I, *Asn*I برای تجزیه و تحلیل ژن 16S rRNA استفاده شد. این آنزیم‌ها از شرکت فرمنتاز (Fermentas, St. Leon-Roth, Germany) خریداری شدند. هضم محصولات واکنش PCR براساس شرایط بهینه برای هر آنزیم انجام گرفت. محصولات هضم آنزیمی در ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند. الگوهای برشی بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار TotalLab TL120 تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج و بحث

از آنجا که میکروارگانیسم‌های دخیل در کمپوست‌سازی نقش عمده‌ای در کیفیت نهایی کمپوست و عملکرد آن ایفا می‌نمایند، می‌توان با شناسایی و دستورزی میکروفلور کمپوست در طی مراحل مختلف فرایند کمپوست‌سازی و مهیا کردن زمینه رشد برای ارگانیسم‌های مطلوب، به اهداف مورد نظر دست یافت. با توجه به این که فلور میکروبی کمپوست تحت تاثیر ترکیبات متفاوت مواد خام آن و نوع اقلیم قرار می گیرد، شناسایی آکتینومیست‌های با قدرت تجزیه‌کنندگی بالا و گزینش آنها برای تلقیح به کمپوست مرحله دوم به افزایش عملکرد قارچ خوراکی دکمه‌ای کمک قابل توجهی می‌نماید.

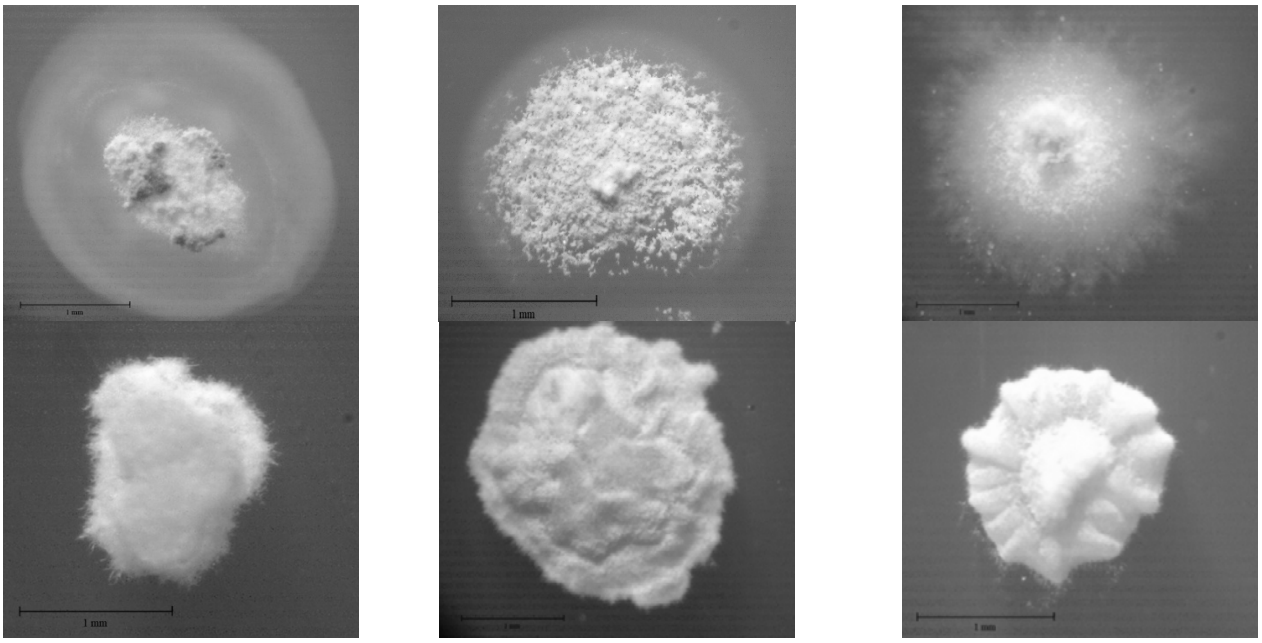
کلنی‌های باکتری روی محیط کشت کمپوست آگار نسبت به محیط‌کشت‌های نوترینت آگار با غلظت نیمه و WYA و زاپک‌دکس آگار نگهداری شده در دمای ۴۶°C در مدت زمان کوتاهتری ظاهر شده و رشد سریع‌تری داشتند. دلیل این امرتشابه ترکیب این محیط کشت با شرایط طبیعی رشد این دسته از میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. محیط کشت WYA به علت ضعیف بودن از نظر غذایی محیط بسیار مناسبی برای جداسازی آکتینومیست‌ها بود. در این محیط باکتری‌های ناخواسته به ندرت رشد نمودند. هرچند مدت زمان نسبتا طولانی برای ظاهر شدن کلنی باکتری‌ها نیاز بود. آکتینومیست‌ها به خوبی در محیط کشت زاپک دوکس آگار رشد کردند، هر چند باکتری‌های دیگر نیز به خوبی دارای این توانایی بودند. عملا هیچ کلنی باکتریایی به علت رشد بسیار سریع باکتری‌های گرمادوست در محیط نوتریت آگار از این محیط جداسازی نشد. قارچ‌کش نیستاتین در مدت زمان جداسازی و رشد باکتری‌ها به صورت کامل از رشد قارچ‌ها جلوگیری کرد. افزودن ریفامپیسین به محیط کشت سبب جداسازی انتخابی باکتری‌هایی شد که در آزمایشات بعد مشخص شد متعلق به جنس‌های ترمومونوسپورا و استرپتومایسس می‌باشند. در تیمار دیگر که با استفاده از ۰/۰۵ درصد SDS انجام شد، علاوه بر اینکه رشد باکتری‌های ناخواسته در محیط کشت محدود شد، باکتری‌های با ظاهر گچی و خشبی در محیط ظاهر شدند که نتیجه فعال شدن اسپور آکتینومیست‌ها بود. بعد از جداسازی و خالص کردن باکتری‌ها، ظاهر کلنی برخی از آنها بر روی محیط کشت کمپوست‌آگار با سه محیط دیگر متفاوت بود.



شکل ۱- اندام هوایی و ظاهر گچی بر روی محیط کشت کمپوست آگار

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.2.3.7]



شکل ۲- ظاهر کلنی باکتری‌ها روی محیط کشت آب آگار (بزرگنمایی ۲۵ برابر)

انـدام‌هـای هـوایی و ظـاهر گچـی بـاکتری‌هـا در محـیط کشـت کمپوست‌آگار کاملاً مشخص بود (شکل ۱)، درحـالی کـه در سـه محیط دیگر یا این اندام‌های هوایی تشکیل نمی‌شد یا بعد از مدت زمان نسبتا طولانی بـا نمـود کـم ظـاهر مـی‌شـدند. انـدام هـوایی جدایه‌های مختلف بر روی محیط کشت آب‌آگار با هـم متفـاوت بودند. در شکل ۲ ظاهر کلنـی چنـد جدایـه بـاکتری روی محـیط کشت آب‌آگار نشان داده شده است. پس از انتخاب جدایـه‌هـای آکتینومیست براساس خصوصیات ظاهری بر روی محـیط کشـت، این جدایه‌ها مورد بررسی‌های شیمیایی قرار گرفتند. پس از انجام رنگ‌آمیزی گِرَم برای اطمینان از گِرَم مثبت بودن باکتری‌های انتخاب شده، تست‌های رنگ‌آمیزی اسید-فست جزئی، هیـدرولیز اوره، احیای نیترات، کاتالاز و تست مقاومت بـه لیـزوزیم نیـز بـر روی جدایه‌ها انجام شد. جدایـه‌هـای بـا ظـاهر مورفولـوژیکی و خصوصیات شیمیایی متفاوت برای بررسی‌های مولکولی انتخـاب شدند.

تکثیر ژن 16S rRNA با استفاده از آغازگرهای عمومی منجر به تولید قطعه‌ای با طول تقریبی ۱۵۰۰ جفت باز در جدایه‌های آکتینومیست شد. براساس الگوهای برشی این سیلیکو بدست آمده از توالی‌های ژن 16S rRNA آکتینومیست‌های گرمادوست، آنزیم *Mbo*I به‌عنوان آنزیم کلیدی برای گروه‌بندی جدایه‌ها استفاده شد. بر اساس الگوی برشی این آنزیم (شکل۳) آکتینومیست‌های گرمادوست، که براساس اطلاعات بدست‌آمده از تحقیقات انجام گرفته بر میکروفلور کمپوست‌ها انتخاب شده بودند، را می‌توان به سه گروه اصلی با الگوی باندی متمایز (جدول ۱) تقسیم‌بندی کرد. Cook and Meyers (2003) در تحقیق خود این آنزیم را مبنای گروه بندی آکتینومیست‌ها برای شناسایی بر اساس الگوی هضم حاصل از آنزیم‌های برشی قرار دادند.

بر اساس جدول۱، باکتری‌های جداسازی شده از کمپوست قارچ خوراکی دکمه‌ای با استفاده از الگوی برشی آنزیم *Mbo*I را می‌توان در یکی از سه گروه جدول ۲ قرار داد. بر اساس الگوی برشی این‌سیلیکو بدست آمده از هضم ژن 16S rRNA آکتینومیست‌های گرمادوست (شکل ۴)، جدایه‌های هر گروه از جدول شماره ۲ با استفاده از

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.2.3.7]

جدول۱- گروه بندی آکتینومیست ها بر اساس الگوی برشی آنزیم *Mbo*I

بزرگترین قطعه DNA کوچکتر از ۷۵۰ جفت باز	گروه ۱
دو قطعه متمایز کوچکتر از ۹۸۰ جفت باز: (۳۰۰ تا ۳۵۰ جفت باز و ۷۶۰ تا ۹۸۰ جفت باز)	گروه ۲
بزرگترین قطعه DNA: ۹۸۰ تا ۱۳۵۰ جفت باز	گروه ۳

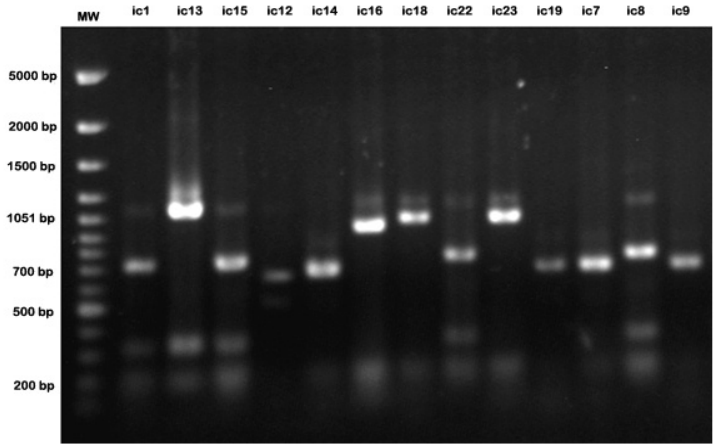
جدول ۲- تقسیم‌بندی جدایه‌های آکتینومیست به سه گروه اصلی براساس الگوی برشی آنزیم *Mbo*I

جدایه باکتری	الگوی برشی با آنزیم *Mbo*I
*ic*24, *ic*21, *ic*20, *ic*19, *ic*17, *ic*15, *ic*11, *ic*9, *ic*8, *ic*7, *ic*22, *ic*14, *ic*12, *ic*1	گروه شماره ۱
*ic*23, *ic*18, *ic*16	گروه شماره ۲
*ic*13	گروه شماره ۳

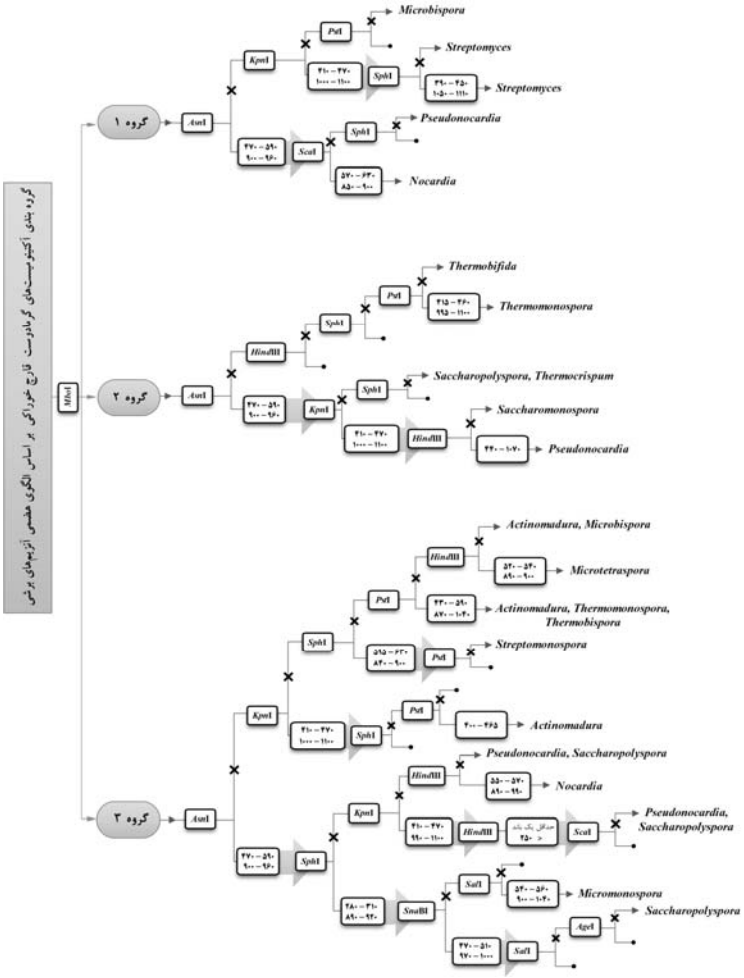
آنزیم‌های برشی مناسب مورد بررسی و شناسایی قرار گرفت. در شکل۳ الگوی برشی و آنزیم‌های مورد نیاز برای شناسایی آکتینومیست‌های گرمادوست هر گروه نشان داده شده است. با استفاده از آنزیم‌های برشی *Kpn*I, *Asn*I, *Sph*I, *Sca*I و *Pst*I و الگوی برشی بدست‌آمده از آنها آکتینومیست‌های گرمادوست گروه اول تا حد جنس شناسایی شدند. آکتینومیست‌های این گروه در سه جنس استرپتومایسس، نوکاردیا و میکروبیسپورا قرار گرفتند. گروه دوم با استفاده از الگوی برشی بدست‌آمده از آنزیم‌های *Asn*I, *Kpn*I, *Pst*I, *Hin*dIII و *Sph*I بررسی شده و در دو جنس ساکارومونوسپورا و ترمومونوسپورا قرار داده شدند. در شناسایی گروه سوم نیز که تنها دارای یک عضو بود، پس از هضم محصول PCR ژن 16S rRNA با آنزیم *Asn*I، براساس شکل ۳ از آنزیم‌های *Sna*BI, *Sal*I, *Sph*I و *Age*I استفاده شد. براساس تجزیه و تحلیل الگوی برشی مشخص شد که این جدایه متعلق به جنس ساکاروپلی‌اسپورا می‌باشد. الگوی برشی برای هر جدایه با استفاده از آنزیم‌های استفاده شده برای شناسایی در جدول ۳ و نتایج نهایی شناسایی در جدول ۴ آورده شده است. با توجه به اطلاعات خلاصه شده جدول ۴، بیشترین آکتینومیست‌های جداشده به جنس استرپتومایسس تعلق دارند. این دسته از باکتری‌ها دارای نقش مهم و محوری در تجزیه بقایای گیاهی و تولید کمپوست می باشند (Tuomela et al. 2000). از این رو حضور اعضای مختلف این جنس در جمعیت میکروبی کمپوست منطقی به‌نظر می‌رسد. در سایر تحقیقات انجام شده بمنظور بررسی جمعیت میکروبی کمپوست نیز بیشترین جدایه‌های آکتینومیست به این جنس تعلق داشته اند (Boulter et al. 2002; Ryckeboer et al. 2003; Silva et al. 2009). ایزوله *ic*23 که در جنس ترمومونوسپورا قرار گرفته است از محیط کشت حاوی ریفامپیسین (۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) بدست آمد. با استفاده از این آنتی‌بیوتیک در محیط کشت به صورت انتخابی می‌توان به جدا کردن باکتری‌های این جنس پرداخت. از ریفامپسین برای جداسازی آکتینومیست‌ها در چندین تحقیق استفاده شده است (Athalye et al. 1981; Zakharova et al. 2003). ساکارومونوسپورا، ساکاروپلی‌سپورا و میکروبیسپورا از دیگر جنس‌های متعلق به آکتینومیست‌های گرمادوست نسبت به جنس استرپتومایسس دارای فراوانی کمتری در کمپوست قارچ خوراکی می‌باشند. شکل ظاهری کلنی باکتری‌های جنس نوکاردیا روی محیط کشت آگار شبیه جنس استرپتومایسس می‌باشد. استفاده از تفاوت‌های مورفولوژیکی برای تمایز میان این دو جنس به تنهایی کافی نیست، درحالیکه با استفاده از تکنیک ARDRA می‌توان تفاوت میان این دو جنس را به آسانی مشخص کرد. برای

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.2.3.7]



شکل۳- الگوی هضم ژن 16S rRNA با استفاده از آنزیم *Mbo*I . از سمت چپ، چاهک شماره ۱) سایز مارکر 100 bp؛ سایر چاهک‌ها الگوی هضم تعدادی از باکتری‌های جداسازی شده (نام جدایه در بالای چاهک آورده شده است).



شکل ۴- گروه‌بندی آکتینومیست‌های گرمادوست قارچ دکمه‌ای براساس الگوی هضمی آنزیم‌های برشی. جنس‌های هرگروه در پایان مسیر برشی مشخص شده است. در هر مسیر پس از هضم با آنزیم برشی ذکر شده در مستطیل، عدم برش با علامت × و باندهای حاصل از هضم در مستطیل نشان داده شده است.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.2.3.7]

جدول ۳- نتایج هضم هر جدایه با استفاده از آنزیم‌های برشی مناسب برای شناسایی اعضای گروه‌های سه‌گانه مشخص شده با الگوی برشی آنزیم *Mbo*I

	شماره ایزوله‌های جداسازی شده																	
	***ic*1**	***ic*7**	***ic*8**	***ic*9**	***ic*11**	***ic*12**	***ic*13**	***ic*14**	***ic*15**	***ic*16**	***ic*17**	***ic*18**	***ic*19**	***ic*20**	***ic*21**	***ic*22**	***ic*23**	***ic*24**
*Age*I							–											
*Asn*I	–	۵۵۰ ۹۵۰	–	–	۵۵۰ ۹۵۰	–	۵۰۰ ۱۰۰۰	–	–	۵۵۰ ۹۵۰	–	۵۵۰ ۹۵۰	–	۵۵۰ ۹۵۰	۵۵۰ ۹۵۰	–	–	۵۵۰ ۹۵۰
*Hind*III										–		–					–	
*Kpn*I	۴۵۰ ۱۰۵۰		۴۵۰ ۱۰۵۰	۴۵۰ ۱۰۵۰		۴۵۰ ۱۰۵۰		۴۵۰ ۱۰۵۰	–	۴۵۰ ۱۰۵۰	۴۵۰ ۱۰۵۰	۴۵۰ ۱۰۵۰	۴۵۰ ۱۰۵۰			۴۵۰ ۱۰۵۰		
*Mbo*I	۷۰۰ ۲×۳۰۰ ۲۰۰	۷۰۰ ۲×۲۵۰ <۲۰۰	۷۰۰ ۲×۳۰۰ ۲۰۰	۷۰۰ ۲×۲۵۰ <۲۰۰	۷۰۰ ۲×۲۵۰ <۲۰۰	۶۵۰ ۶۰۰ ۲۵۰	۱۰۰۰ ۳۰۰ ۲۰۰	۷۰۰ ۲×۲۵۰ <۲۰۰	۷۰۰ ۲×۳۰۰ ۲۰۰	۹۰۰ ۲×۳۰۰	۷۰۰ ۲×۳۰۰ ۲۰۰	۹۰۰ ۲×۳۰۰	۷۰۰ ۲×۲۵۰ <۲۰۰	۷۰۰ ۲×۲۵۰ <۲۰۰	۷۰۰ ۲×۲۵۰ <۲۰۰	۷۰۰ ۲×۳۰۰ ۲۰۰	۹۰۰ ۲×۳۰۰	۷۰۰ ۲×۲۵۰ <۲۰۰
*Pst*I									–								۴۵۰ ۱۰۵۰	
*Sal*I							–											
*Sca*I		۶۰۰ ۹۰۰			۶۰۰ ۹۰۰									۶۰۰ ۹۰۰	۶۰۰ ۹۰۰			۶۰۰ ۹۰۰
*Sna*BI							۵۰۰ ۱۰۰۰											
*Sph*I	–		–	۴۵۰ ۱۰۵۰		۴۵۰ ۱۰۵۰	۲×۳۰۰ ۹۰۰	–			–		۴۵۰ ۱۰۵۰			–	–	

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.2.3.7]

شناسایی گونه‌های اسینتوباکتر تکنیک ARDRA با سایر روش‌های مولکولی مقایسه شده و توانایی این تکنیک در شناسایی این گروه از باکتری‌ها نشان داده شده است (Koeleman et al. 1998). در بررسی تنوع میکروبی در کمپوست‌های سنتتیک از تکنیک ARDRA استفاده شده و با استفاده از این روش شناسایی طیف گسترده‌ای از گونه‌های بسیار نزدیک به هم آکتینومیست‌های موجود در کمپوست انجام گرفته است (Dees and Ghiorse 2001).

در این تحقیق نشان داده شد که با استفاده از تکثیر ژن محافظت شده 16S rRNA و هضم آن با استفاده از آنزیم‌های برشی مناسب می‌توان برای هر باکتری یک الگوی برشی تهیه نمود. با مقایسه الگوی برشی تهیه شده با الگوهای برشی بدست آمده از هضم این‌سیلیکو توالی‌های ژن 16S rRNA ثبت شده در پایگاه داده GenBank می‌توان آکتینومیست‌های موجود در کمپوست را برای تسهیل شناسایی به گروه‌های مجزا دسته‌بندی کرد. به دلیل وجود خصوصیات مختلف در هر جنس و متفاوت بودن مشخصه‌های بیوشیمیایی گونه‌ها، این دسته‌بندی می‌تواند کمک مؤثری در انتخاب آکتینومیست‌های مورد نظر و متمرکز کردن تحقیقات بر روی آنها باشد. علاوه بر این از ARDRA بمنظور بررسی روابط تکاملی میان باکتری‌ها نیز می‌توان استفاده کرد (Heyndrickx et al. 1996). پس از شناسایی باکتری‌ها با استفاده از تکنیک ARDRA نتایج بدست‌آمده از تست‌های بیوشیمیایی برای هر جدایه با اطلاعات موجود در کتاب‌های راهنمای Bergey مقایسه شد (Buchanan and Gibbons 1974; Goodfellow and Jones 2009). بدلیل اینکه شناسایی جدایه‌ها تا حد گونه هدف این تحقیق نمی‌باشد، با وجود انطباق میان این نتایج و اطلاعات موجود برای جنس‌های مختلف آکتینومیست، نتیجه‌گیری کلی و انتساب جدایه‌ها به یک گونه خاص انجام نشد. بمنظور شناسایی گونه‌های آکتینومیست جداسازی شده انجام تست‌های بیوشیمیایی تکمیلی مورد نیاز می‌باشد. علاوه براین می‌توان از تکنیک‌های دیگر مانند توالی‌یابی ژن‌های 16S rRNA (Janda and Abbott 2007) یا *rpo*B (Mollet et al. 1997)، بررسی نواحی ITS[1] (Trcek 2005) و یا تکنیک MLST[2] (Scott et al. 2004) استفاده نمود. آنالیز الگوهای هضم ژن 16S rRNA در آکتینومیست‌های هوازی گرمادوست با استفاده از آنزیم‌های برشی ما را قادر به گروه‌بندی و شناسایی ایزوله‌های جداسازی شده تا حد جنس نمود. با استفاده از این روش مولکولی، کلنی‌های باکتریایی که دارای خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی متفاوت بودند، بررسی شدند و نشان داده شد که این کلنی‌ها علیرغم وجود تفاوت می‌توانند به یک جنس تعلق داشته باشند.

هرچند در تحقیق حاضر تنها از کمپوست‌های قارچ خوراکی موجود در استان خراسان رضوی نمونه‌گیری انجام گرفته است، اما الگوی کلی فراوانی و جنس‌های آکتینومیست‌های گرمادوست در کمپوست‌های قارچ خوراکی با توجه به نتایج سایر محققین نسبتا ثابت می‌باشد. بنابراین از الگوی انگشت‌نگاری ARDRA جدایه‌های آکتینومیست بدست‌آمده در این تحقیق می‌توان برای ساخت پایگاه داده برای شناسایی این گروه از باکتری‌ها در تحقیقات دیگر استفاده نمود.

منابع

Athalye M, Lacey J, Goodfellow M (1981) Selective Isolation and Enumeration of Actinomycetes using Rifampicin. Journal of Applied Microbiology 51: 289-297.

Atlas RM (2004) Handbook of Micorbiological Media 3rd ed. CRC Press LLC.

Boulter J, Trevors J, Boland G (2002) Microbial studies of compost: bacterial identification and their potential for turfgrass pathogen suppression. World Journal of Microbiology and Biotechnology 18: 661-671.

Buchanan RE, Gibbons NE (1974) Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th ed. The Williams and Wilkins Co, Baltimore 747-842.

Busti E, Monciardini P, Cavaletti L (2006) Antibiotic-producing ability by representatives of a newly discovered lineage of actinomycetes. Microbiology 152:675-683.

Chang S, Miles PG (2004) Mushrooms cultivation Nutritional value Medicinal effect and environmental Impact.2nd edn. Bocaraton CRC press.

Clarridge JE (2004) Impact of 16s rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. Clinical Microbiology Reviews 17: 840-862.

Cook AE, Meyers PR (2003) Rapid identification of filamentous actinomycetes to the genus level using genus-specific 16S rRNA gene restriction fragment patterns.

[1] Internal Transcribed Spacer region

[2] Multilocus sequence typing

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.2.3.7]

Dees PM, Ghiorse WC (2001) Microbial diversity in hot synthetic compost as revealed by PCR-amplifed rRNA sequences from cultivated isolates and extracted DNA. FEMS Microbiology Ecology 35: 207-216.
Dietz A (1988) Practical and proposed cooperative investigational criteria for taxonomic studies of the actinomycetes. In: Okami Y, Beppu T, Ogawara H (Eds.) Biology of Actinomycetes. Japanese Scientific Societies Press Tokyo 203-209.
Dijkshoorn LB, van Harsselaar I, Tjernberg PJ, Bouvet M, Vaneechoutte M (1998) Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis for identification of Acinetobacter genomic species. Systematic Applied Microbiology 21: 33-39.
Fan L, Pan H, Soccol AT, Pandey A, Soccol CR (2006) Advances in Mushroom Research in the Last Decade. Food Technology Biotechnology 44: 303-311.
Farsi M, Gordan HR (2009) Cultivation and breeding of mushrooms. Jahad-e Daneshgahi Mashhad 2nd ed. (In Farsi)
Fordyce C (1970) Relative numbers of certain microbial groups present in compost used for mushroom (*Agaricus bisporus*) propagation. Applied Microbiology 196-199.
Goodfellow M, Jones AL (2009) Family IX. Thermoactinomycetaceae. In: De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer K, Whitman WB (Eds). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 3: The Firmicutes. 2nd edn. Springer London 434- 453.
Goto K, Omura T, Hara Y, Sadaie Y (2000) Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus Bacillus. Journal of Genetics Applied Microbiology 46: 1-8.
Heyndrickx M, Vauterin L, Vandamme P, Kersters K, De Vos P (1996) Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. Journal of Microbiology Methods 26: 247-259.
Janda JM, Abbott SL (2007) 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. Journal of Clinical Microbiology 45: 2761-2764.
Koeleman JGM, Stoof J, Biesmans DJ, Savelkoul PHM, Vandenbroucke-grauls CMJE (1998) Comparison of Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis, Random Amplified Polymorphic DNA Analysis and Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprinting for Identification of Acinetobacter Genomic Species and Typing of *Acinetobacter baumannii*. Journal of Clinical Microbiology 36: 2522-2529.
Lacey J (1997) Actinomycetes in composting. Annual Agricultural and Environmental Medicine 4: 113-121.
Li H, Medina F, Vinson SB, Coates CJ (2005) Isolation characterization and molecular identification of bacteria from the red imported fire ant (*Solenopsis invicta*) midgut. Journal of Invertebrate Pathology 89: 203-209.
Misbah S, Hassan H, Yusof MY, Hanifah YA, AbuBakar S (2005) Genomic species identification of Actinobacter of clinical isolates by 16S rDNA sequencing. Singapore Medicine Journal 46: 461-464.
International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 53: 1907-1915.
Mollet, C, Drancourt M, Raoult D (1997) *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. Molecular Microbiology 26: 1005-1011.
Pakdin A, Farsi M, Marashi H (2010) Effect of biomass and incubation of actinomycetes in compost on mycelium growth of button mushroom. Journal of Water and Soil 23: 10-19. (In Farsi)
Rainey PB (1989) A new laboratory medium for the cultivation of *Agaricus bisporus*. New Zealand Natural Sciences 16:109-112.
Ryckeboer J, Mergaert J, Vaes K, Klammer S, De Clerco D, Coosemans J, Insam H, Swings J (2003) A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating process. Annual Microbiology 53: 349-410.
Schaad NW (1988) Laboratory guide for identification of plant Pathogenic bacteria 2nd edition APS Press.
Scott R, Santos SR, Ochman H (2004) Identification and phylogenetic sorting of bacterial lineages with universally conserved genes and proteins. Environmental Microbiology 6: 754-759.
Silva CF, Azevedo RS, Braga C, Da Silva R, Souza Dias E, Schwan RF (2009) Microbial diversity in a bagasse-based compost prepared for the production of *Agaricus brasiliensis.* Brazilian Journal of Microbiology 40: 590-600.
Singer R, Harris B (1987) Mushrooms and Truffles Botany cultivation and utilization.2nd rev. Koeltz Scientific Books, Koenigstein Federal republic of Germany.
Trcek J (2005) Quick identification of acetic acid bacteria based on nucleotide sequences of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer region and of the PQQ-dependent alcohol dehydrogenase gene. Systematic and Applied Microbiology 28: 735-745.
Tuomela M, Vikman M, Ataca A, Itävaara M (2000) Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. Bioresource Technology 72: 169-183.
Vaneechoutte M, Boerlin P, Tichy H, Bannerman E, Jager B, Bille J (1998) Comparison of PCR-based DNA fingerprinting techniques for the identification of Listeria species and their use for atypical Listeria isolates. International Journal of Systematic Bacteriology 48: 127-139.
Wiegant WM (1992) Growth characteristics of the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* in relation to production of mushroom compost. Applied and Environmental Microbiology 1301-1307.
Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology 173: 697-703.
Zakharova OS, Zenova GM, Zvyagintsev DG (2003) Some approaches to the selective isolation of actinomycetes of the genus actinomadura from soil. Microbiology 72: 110-113.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.2.3.7]