Applied Biology
Online ISSN: 2538-3434
Homepage: http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir

Identification of soil actinomycetes and their effects in olive (*Olea europea* L.) variety Conservalia[1]

Parvin Bagheri Masters, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran. pbagheriii13@gmail.com
Farah Farahani Associate Professor, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran **(Corresponding author).** abioqom2020@gmail.com
Seyed Soheil Aghaei Assistant Professor, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran. soheilaghaee@yahoo.com

Abstract

Objective: Actinomycetes are useful for biocontrol against soil fungi and increase seed growth, plant weight and yield in some crops. In this study, the isolation, identification and investigation of the population of Streptomyces species in the agricultural soil of C Bagh Fadak area and the effect on the seed growth of olive (Olea europea L.) cultivar Conservalia were investigated.

Materials and methods: In this study, actinomycetes were isolated from the soil of region C, then primary screening, culture and secondary screening were done by diffusion in agar and DNA extraction and the effect on seed growth of conservalia cultivar olives. DNA molecular identification was done for all the isolates and their rRNA 16s genes were amplified by PCR reaction and the positive samples were sequenced. The results of phylogenetic analyzes of all recorded sequences of this gene were downloaded from the NCBI database and saved for phylogenetic analysis with Mega 7 software in FAST A format. The whole sequence of isolating, identifying and checking the population of Streptomyces species was entered into the software.

Findings: 40 actinomycete bacteria were isolated from the soil of area C of Fadak garden. By performing specific tests, Streptomyces isolates were identified. Biochemical and morphological tests (stringy and white appearance) on 5 isolates confirmed the presence of streptomycetes. By producing auxin, the isolates were effective in increasing the rooting of Conservalia cultivar olive seeds. The rooting capacity of Streptomyces isolate D was statistically significant (probability level 0.05).

Conclusion: Streptomyces of agricultural soils are effective on tree rooting.

Keywords: Actinomycetes, Rhizobacteria, Streptomycete, Conservalia variety olive.

1. **Received:** 2021/12/29 ; **Received in revised form:** 2022/01/24 ; **Accepted:** 2022/03/04 ; **Published online:** 2022/03/21
© the authors http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir
Publisher: Qom Islamic Azad University **Article type:** Research Article

بیولوژی کاربردی
شاپا الکترونیکی: ۲۵۳۸-۳۴۳۴
Homepage: http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir

شناسایی اکتینومیست‌های خاک و اثرات آن‌ها در زیتون (*Olea europea* L.) رقم کنسروالیا[1]

پروین باقری | کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران. pbagheriii13@gmail.com
فرح فراهانی | دانشیار، گروه میکروبیولوژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران (**نویسنده مسئول**). abioqom2020@gmail.com
سید سهیل آقایی | استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران. soheilaghaee@yahoo.com

چکیده

هدف: اکتینومیست‌ها برای بیوکنترل علیه قارچ‌های خاک مفید و در برخی از گیاهان زراعی رشد دانه، وزن بوته و عملکرد را افزایش می‌دهند. در این مطالعه جداسازی، شناسایی و بررسی جمعیت گونه‌های استرپتومیست خاک کشاورزی منطقه C باغ فدک و تاثیر بر رشد دانه رست‌های زیتون (*Olea europea* L.) رقم کنسروالیا مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش جداسازی اکتینومیست‌ها از خاک منطقه C انجام شد، سپس غربالگری اولیه، کشت و غربالگری ثانویه با انتشار در آگار و استخراج DNA و تأثیر بر رشد دانه رست‌های زیتون رقم کنسروالیا انجام گرفت. شناسایی مولکولی DNA برای تمام جدایه‌ها انجام و ژن rRNA 16s آن‌ها با واکنش PCR تکثیر و نمونه‌های مثبت، سکانس شدند. نتایج حاصل از آنالیزهای فیلوژنتیکی تمام سکانس‌های ثبت شده این ژن، از بانک اطلاعاتی NCBI دانلود شدند و برای بررسی فیلوژنتیکی با نرم‌افزار Mega 7 با فرمت FAST A ذخیره گردید. تمام سکانس جداسازی، شناسایی و بررسی جمعیت گونه‌های استرپتومیست‌ها وارد نرم‌افزار گردید.

یافته‌ها: از خاک منطقه C باغ فدک ۴۰ باکتری اکتینومیست جداسازی شدند. با انجام تست‌های اختصاصی، جدایه‌های استرپتومیست مورد شناسایی قرار گرفتند. تست‌های بیوشیمیایی و مورفولوژیکی (ظاهر رشته‌ای و سفید) بر روی ۵ جدایه، وجود استرپتومیست‌ها را تایید نمودند. جدایه‌ها با تولید اکسین، در افزایش ریشه‌زایی دانه رست‌های زیتون رقم کنسروالیا موثر بودند. ظرفیت ریشه‌زایی جدایه D استرپتومیست از نظر آماری معنی‌دار بود (سطح احتمال ۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: استرپتومیست‌های خاک‌های کشاورزی، بر ریشه‌زایی درختان موثر هستند.

کلیدواژه‌ها: اکتینومیست‌ها، ریزوباکترها، استرپتومیست، زیتون رقم کنسروالیا.

---

۱. **تاریخ دریافت:** ۱۴۰۰/۱۰/۰۸؛ **تاریخ بازنگری:** ۱۴۰۰/۱۱/۰۴؛ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۰/۱۲/۱۳؛ **تاریخ انتشار:** ۱۴۰۱/۰۱/۰۱

© نویسندگان **ناشر:** دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم **نوع مقاله:** مقاله پژوهشی

۱. مقدمه

اکتینومیست‌ها یکی از بزرگ‌ترین گروه‌های میکروارگانیسم‌ها هستند که تولیدکننده قسمت اعظم آنتی بیوتیک‌ها در طبیعت می‌باشند. این باکتری‌ها ساپروفیت‌های رشته‌ای گرم مثبتی هستند که به طور وسیع در خاک، آب و گیاهان پراکنده می‌باشند. اکتینومیست‌ها تولیدکننده تعداد زیادی از ترکیبات اساسی و حیاتی برای سلامتی انسان از جمله آنتی بیوتیک‌ها، آنزیم‌ها، تنظیم‌کننده‌های ایمنی، مهارکننده‌های آنزیمی، ترکیبات ضد توموری و ویتامین‌ها می‌باشند. این باکتری‌ها در چرخه مواد آلی، تولید مواد غذایی و در صنایع داروسازی، کشاورزی و ماهیگیری نقش مهمی ایفا می‌کنند (۱). اکتینومیست‌ها حدود ۴۰ درصد از جمعیت باکتریایی خاک را تشکیل می‌دهند و بزرگ‌ترین ژنوم را در بین باکتری‌ها دارا بوده و توانایی تولید انواعی از متابولیت‌های ثانویه را دارند (۲). اگرچه اکتینومیست‌ها میکروارگانیسم‌های همه‌جازی هستند، اما مشخص شده است که خاک و مواد تشکیل‌دهنده آن از قبیل هوموس و کودهای آلی را ترجیح می‌دهند (۳). اکتینومیست‌ها برای عوامل بیوکنترل بر علیه قارچ‌های خاکزاد بیمارگر مفید بوده و دارای ویژگی‌هایی شامل تولید انواع مختلف متابولیت‌های ثانویه، هدایت‌گرهای عمده با فرمول بیولوژیکی خاک‌ها هستند و در تجزیه مواد آلی و هدایت آن‌ها به تولید محصول، نقش دارند. معمولاً در مقادیر زنده، چندین میلیون به ازای هر گرم خاک دیده می‌شوند و بیش از ۲۰ جنس از آن‌ها، از خاک جدا شده‌اند. به طور کلی در خاک‌های نسبتاً خشک و قلیایی، اکتینومیست‌ها بخش غالب میکروفلور خاک را تشکیل می‌دهند (۲). اکتینومیست‌ها به ویژه استرپتومیست‌ها به عنوان عوامل بیوکنترل پاتوژن‌های گیاهی عمل می‌کنند، اکتینومیست‌ها به طرق ذیل رشد گیاهان را تحریک نموده و بهبود می‌بخشند:

الف) مواد غذایی خاک را برای رشد گیاه در دسترس قرار می‌دهند،

ب) تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (Plant growth regulators: PGRs) از قبیل اکسین‌ها، ژیبرلین‌ها و سیتوکینین‌ها را تولید می‌کنند. به طور مثال، جنس‌های Nocardia، Actinomyces، Frankia تولید اکسین و جنس‌های Nocardia و Actinomyces تولید ژیبرلین و Streptomyces griseoluteus تولید ژیبرلیک اسید و ایندول استیک اسید می‌نماید.

ج) به‌طور غیرمستقیم، آن‌ها از طریق تولید متابولیت‌هایی از جمله آنتی‌بیوتیک‌ها علیه پاتوژن‌های بیماری‌زای گیاهی، رشد گیاه را بهبود می‌بخشند. تولید بیش از ۶۰% آنتی بیوتیک‌های جهان توسط اکتینومیست‌ها صورت می‌گیرد و از این میزان بالغ بر ۸۰% توسط استرپتومیست‌ها تولید

می‌شوند (۴). کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی بر پایه جنبه‌های مختلف بیوتکنولوژی، دارای مزایای فراوانی است و نظر بسیاری از محققین را به خود جلب نموده است. از نقاط قوت کنترل بیولوژیک می‌توان به موارد زیر اشاره نمود:

الف) دارای اثر طولانی و بادوام است، برخلاف سموم شیمیایی که نیاز به استفاده مکرر و متناوب دارند.

ب) نسبت به روش‌های شیمیایی، کم هزینه می‌باشد.

ج) برای محیط زیست ایمن و بی‌ضرر است.

سیستم‌های بیوکنترل، پاتوژن و بیماری را به طور کامل ریشه کن نمی‌کند، بلکه آن‌ها را به حالت تعادل طبیعی بازمی‌گرداند. ریزوباکترهای پرورش‌دهنده رشد گیاهی PGPR به طور طبیعی باکتری‌های خاکی هستند که به طور پرخاشگرانه ریشه‌های گیاه را مستعمره می‌کنند، از گیاهان سود می‌برند و افزایش ترویج رشد گیاه را فراهم می‌کنند. تلقیح گیاهان زراعی با برخی از سویه‌های PGPR در مراحل اولیه رشد، از طریق اثر مستقیم بر رشد ریشه و شاخه و تلقیح عناصر، باعث افزایش زیست توده می‌شود. همچنین ممکن است اثرات متعددی بر رشد قدرت ارتفاع بوته، وزن ساقه، محتوای مواد مغذی بافت‌های ساقه، شکوفه‌های زودرس، محتوای کلروفیل و افزایش میزان بذر در حبوبات داشته باشد. آن‌ها می‌توانند سبب افزایش سایر باکتری‌های مفید یا قارچ‌ها و همچنین کنترل بیماری‌های قارچی و باکتری‌ها شوند (۵). اکتومینست‌ها مانند سایر باکتری‌ها دارای RNA و DNA می‌باشند، در محیط کشت باکتری رشد می‌کنند، برخلاف قارچ‌ها در دیواره آن‌ها کیتین و سلولز وجود ندارند، روش تولیدمثل، تقسیم دوتایی است، در غشاء سیتوپلاسمی، استرول وجود ندارد و داروهای ضدقارچی بر روی این باکتری‌ها بی‌اثر است، قطر، مشابه باکتری‌ها حدود ۱ میکرون است.

زیتون کنسروالیا بیشتر در کشور یونان که سومین کشور تولیدکننده زیتون است، رشد می‌کند. از نظر اندازه و میزان تولید، همانند زیتون مانزانیلا اسپانیا است. به طوری که نسبت گوشت به هسته نیز در این زیتون همانند گونه مانزانیلا ۸ به ۱ است. درصد روغن اینگونه کمی بیشتر از مانزانیلا است. درصد روغن اینگونه زیتون ۲۰ الی ٪۲۵ است. هر کیلوگرم زیتون کنسروالیا ۱۸۰ الی ۲۰۰ دانه است. علاوه بر کشور یونان، در کشور مصر نیز اینگونه زیتون پرورش می‌یابد، نزدیک به ٪۵۱ زیتون تولیدی مصر از نوع کنسروالیا است. در چند سال اخیر نیز باغداران طارم زنجان سعی در

پرورش این رقم زیتون کرده‌اند.

کریمی و صادقی در پژوهشی تاثیر نانوذرات نقره بر فلور باکتریایی خاک بالک و ریزوسفر پنبه را مورد بررسی قرار دادند. در این پژوهش تاثیر دو فرمولاسیون نانونقره LS2000 و L2000 بر جمعیت باکتریایی خاک ریزوسفر و بالک پنبه بررسی شد. نتایج نشان داد تاثیر ls2000 بر پروفایل PCR-DGGE ژن 16SrDNA بیشتر از L2000 بود (۶).

ذاکر بستان‌آباد و همکاران، نیز در پژوهشی جداسازی و خواص ضد میکروبی اکتینومیست‌های جدا شده از کویرهای ایران را بررسی کردند. این مطالعه نشان داد که خاك‌های بیابانی دارای گونه‌های متنوعی از اکتینومیست‌ها بوده و منابع بالقوه‌ای برای آنتی‌بیوتیك‌ها است (۷).

یوسفی و همکاران در پژوهشی جداسازی، شناسایی مولکولی و آنالیز فیلوژنتیکی اکتینومیست‌های مولد مواد ضد میکروبی علیه پاتوژن‌های بیماری‌زا از خاک‌های زراعی شور شهر قم را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد ایزوله‌های جدیدی در نمونه خاک استان قم وجود دارد که توانایی تولید مواد آنتی باکتریایی جدید را دارند و می‌توان از آن‌ها در حوزه صنعت استفاده کرد (۸).

جباری و همکاران در پژوهشی جداسازی اکتینومیست‌های دریایی رسوبات بین جزر و مد ساحل دیلم و خواص ضدقارچی آن‌ها را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که اکتینومیست‌های دریایی رسوبات ساحل دیلم، منابع غنی از ترکیبات فعال زیستی هستند که فعالیت ضدقارچی قابل توجهی دارند (۹).

آقایی و همکاران نیز در پژوهشی تولید بیوسورفکتانت در اکتینومیست‌های هالوتولرانت جدا شده از خاک دریاچه نمک قم را بررسی کردند. ۵۵ جدایه توانستند نمک ۵۵% را تحمل کنند و در گروه هالوتولرانت جای بگیرند. سپس بر اساس تست‌های بیوشیمیایی، جدایه‌های اکتینومیست‌ها لوتولرانت، برای تولید بیوسورفکتانت مورد بررسی قرار گرفتند. جدایه‌های اکتینومیست به عنوان جدایه‌هایی با توان تولید بیوسورفکتانت انتخاب شدند. با توجه به نتایج به دست آمده، جدایه 1 به عنوان بهترین جدایه انتخاب شد (۱۰).

گلینسکا در پژوهشی نشان داد که اکتینومیست‌ها از جنس Streptomyces باکتری‌های گرم مثبت هستند و به دلیل فعالیت متابولیکی و قابلیت انطباقی بالا، یک حلقه مهم در گردش ماده و انرژی به‌شمار می‌آیند (۱۱).

شیوالایی و همکاران در پژوهشی به بررسی جداسازی و غربالگری میکروبیوتا از نمونه‌های

مختلف خاک جمع‌آوری شده از مناطق مختلف کالابوراگی، کارناتاکا، هند برای تولید کیتیناز پرداختند (۱۲).

هتام و همکاران در پژوهشی جداسازی اکتینومیست‌ها را از نمونه‌های خاک مطالعه کرده و فعالیت ضد میکروبی ۱۲ سویه بیماری‌زای انتخاب شده را مورد بررسی قرار دادند. این جدایه‌ها فعالیت ضد باکتری دارند و می‌توانند در تولید آنتی‌بیوتیک‌های جدید برای اهداف دارویی یا کشاورزی مورد استفاده قرار گیرند (۱۳).

بهاراتی و همکاران در پژوهشی ۳۱۶ اکتینومیست از ۶۹ نمونه خاک را از مناطق مختلف هند جدا کردند. نتایج حاصل، طیف وسیع فعالیت ضدقارچی اکتینومیست‌های جدا شده از مناطق هند را نشان دادند (۱۴).

در این راستا، پژوهش حاضر به بررسی جداسازی، شناسایی و بررسی جمعیت گونه‌های استرپتومیست خاک کشاورزی منطقه C باغ فدک و اثرات آن‌ها بر روی رشد دانه رست‌های زیتون (*Olea europea* L.) رقم کنسروالیا پرداخته است.

۲. مواد و روش‌ها

در این پژوهش از خاک منطقه C باغ فدک شهر قم، ۲۰ نمونه برداشت شد. برای جمع‌آوری نمونه‌های خاک، ابتدا بخش‌های سطحی خاک (حدود ۵ سانتیمتر) کنار زده شده و با استفاده از یک بیلچه کاملاً تمیز و استریل، از عمق ۵ تا ۱۵-۲۰ سانتیمتر خاک برداشته و در بسته‌های پلی‌تن[1] استریل گذاشته شد. تاریخ و محل نمونه‌گیری و پوشش گیاهی منطقه و شماره نمونه بر روی پلاستیک مربوطه نیز ثبت گردید. سپس تمامی نمونه‌ها را در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده و به آزمایشگاه دانشگاه آزاد قم انتقال داده شد. قبل از انتقال نمونه‌ها بر روی محیط‌های کشت، تیمارهایی روی خاک صورت گرفت:

۱) تیمار $CaCo_3$ (مرک آلمان): بعد از مخلوط کردن خاک و $CaCo_3$، به مدت ۳ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، گرماگذاری شد.

۲) تابش پرتو فرابنفش (UV) به مدت ۵ دقیقه.

۳) حرارت دادن نمونه‌های خاک: مقدار g ۱۰ از نمونه خاک را وزن نموده و بعد داخل آون در

1. Polythene

۱۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. از آنجایی که اکتینوباکترها تحمل نسبتاً بالایی به این تیمارها دارند، این امر باعث شد میکروارگانیسم‌های رقیب از بین بروند. سپس به غربالگری و غنی‌سازی و جداسازی اولیه اکتینومیست‌ها از نمونه‌های خاک ادامه داده شد و برای این کار از محیط کشت SCA استفاده گردید. جهت جداسازی اکتینومیست‌ها از مقدار ۱۰ گرم نمونه خاک، ارلن به مدت ۲۰ دقیقه در انکوباکتر شیکر با دور ۱۵۰rpm قرار داده شد. پس از ته‌نشین شدن ذرات درشت خاک، باکتری‌ها از مایع رویی جدا شدند و در تهیه رقت‌های سریالی مورد استفاده قرار گرفتند. با تهیه سوسپانسیون خاک، شروع به آماده‌سازی رقت‌های سریالی گردید. پس از الک کردن خاک، مقداری از هر نمونه را وزن کرده و داخل ارلن ۵۰۰ که حاوی ۱۰۰ میلی لیتر بافر فسفات **(pH=7)** و چند قطره توئین ۸۰ بود، ریخته شد. سپس ارلن به مدت ۲۰ دقیقه در انکوباتور شیکر با دور ۱۵۰rpm قرار داده شد. پس از ته‌نشین شدن رسوبات خاک، از سوپرناتانت حاوی سلول‌های باکتری، تهیه رقت‌های سریالی انجام گردید. رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-5} از هر نمونه خاک به دست آمد. سپس کشت اولیه با روش Spread plate method و Pour plate انجام شد. بدین منظور، برای روش Spread plate method ۰/۱ میلی لیتر از هر رقت به پلیت‌های حاوی محیط SCA منتقل و با میله شیشه‌ای سرکج استریل، بر روی کل سطح آگار پخش شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۱۰-۷ روز در دمای۳۰- ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری گردیدند و با روش پورپلیت نیز ۱ میلی لیتر از هر رقت کف پلیت ریخته و روی آن محیط SCA اضافه گردید. سپس پلیت‌ها را چرخانده تا یکنواخت شده و به مدت ۱۰-۷ روز در حرارت ۳۰-۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. کلنی‌های اکتینومیست را می‌توان از نظر مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی بر اساس دستورالعمل‌های (ISP) بررسی کرد. جهت شناسایی خصوصیات ماکروسکوپی، کلنی‌هایی که ظاهری خشن، صاف، سفت، چسبنده و یا پودری شکل داشته باشند و با رنگ‌های مختلف مثل سفید، خاکستری و یا زرد باشند، انتخاب شدند (۱۵). جهت شناسایی خصوصیات میکروسکوپی، شکل میسیلیوم‌های اکتینومیست توسط میکروسکوپ نوری بررسی شد. بدین جهت، رنگ‌آمیزی گرم انجام شد. هیف و کندی اکتینومیست‌ها مشاهده شدند و آن‌هایی که گرم مثبت و آرایش رشته‌ای داشتند، باکتری‌های اکتینومیست احتمالی بودند (۱۵). برای خالص‌سازی اکتینومیست‌ها از محیط بین‌المللی استرپتومیست ۲ استفاده گردید. بدین منظور کلنی‌های تک و احتمالی اکتینومیست‌های حاصل، در محیط کشت استرپتومیست کشت داده شدند و ۵ جدایه استرپتومیست

مورد شناسایی قرار گرفتند (۱۵). سپس تست‌های بیوشیمیایی مانند تست هیدرولیز نشاسته، تست تجزیه توئین۸۰، تست لیستیناز، تست احیای نیترات، تست اکسیداز، تست کاتالاز، تست H2S، تست Dnase، تست هیدرولیز تریپتوفان، تست هیدرولیز اوره، تست حرکت (۱۶) روی تمام جدایه‌ها انجام گرفت. سپس تولید سیانید هیدروژن (HCN)، هورمون گیاهی، حل کنندگی فسفات و اثرات ضد قارچی آن‌ها بررسی شد. فعالیت ضد قارچی ۵ جدایه استرپتومیست مورد بررسی قرار گرفت. سپس شناسایی مولکولی انجام شد. بدین منظور آزمایش‌های مولکولی و تهیه محلول‌های مورد نیاز مانند اتیدیوم بروماید و ساخت بافر XTBE10 انجام گرفت. سپس به استخراج DNA پرداخت شد و واکنش PCR روی آن‌ها انجام گرفت. پس از تهیه پرایمرها ومحلول‌های مورد نیاز، کیت شرکت سینا کلون مورد استفاده قرار گرفت (۱۷).

با استفاده از پرایمرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، قطعات DNA مورد نظر طبق جدول شماره (۱) در دستگاه ترموسایکلر تکثیر می‌شوند.

پس از تهیه محصول در میکروتیوب‌های ۰/۲، درب میکروتیوب‌ها را بسته و در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شدند (۱۸). برای الکتروفورز محصول PCR پس از تهیه ژل آگارز و بیرون آوردن شانه از ژل، درون کاست تانک الکتروفورز حاوی بافر TBE X5/0 قرار گرفت. بعد از خالص‌سازی، برای تمامی نمونه‌های مثبت، OD هر یک از نمونه‌ها قرائت شد، سپس محصول PCR به شرکت Microsynth سوییس با حجم حدود µl20 و غلظت (۳۰ µl ng) از هر نمونه ارسال گردید و با نرم‌افزار Finch TV نسخه ۱/۴/۰ بررسی شد. پس از بررسی با این نرم‌افزار، سکانس‌ها با هم هم‌ردیف‌سازی شده و برای آنالیزهای فیلوژنتیکی، تمام سکانس‌های مثبت شده این ژن، از بانک اطلاعاتی NCBI دانلود و برای بررسی‌های فیلوژنتیکی با نرم‌افزار MEGA7 با فرمت FAST A ذخیره شده و تمام سکانس‌ها وارد نرم‌افزار گردید و در نهایت همردیف‌سازی توالی‌ها انجام شد. در گام بعدی ترسیم دندروگرام ژنی انجام شد. درخت ژنی برای نمایش ارتباط ایزوله‌ها با یکدیگر با متد Neighbor-joining بر اساس مدل تعداد اختلاف نوکلئوتیدی با استفاده از نرم‌افزار MEGA7 ترسیم گردید. ایزوله‌های دارای یک تیپ سکانس، در یک کلاستر قرار گرفتند و وجود حتی یک نوکلئوتید اختلاف، باعث قرارگیری ایزوله در کلاستر دیگر شد (۱۹). برای نگهداری سویه‌ها، از نگهداری طولانی مدت به دو روش میکروتیوب و محیط کشت اسلنت و نیز نگهداری کوتاه مدت استفاده شد. در نهایت به منظور تأثیر اکتینومیست‌ها بر رشد دانه رست‌های

زیتون رقم، کنسروالیا سوسپانسیون و متابولیت‌های حاصل از باکتری‌های انتخابی تهیه شدند و با مقدار ۱۰۰۰ ماکرولیتر به خاک دانه رست‌های زیتون رقم کنسروالیا تلقیح شدند.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در شناسایی جدایه‌ها

Primers rRNA 16s	Sequence	Tm	طول قطعه
27F	5AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3	58	1500 bp
1492R	5'- GGTTACCTTGTTACGACTT -3'		

۳. یافته‌ها

۳-۱. جداسازی اکتینومیست‌ها از نمونه‌های خاک

از ۲۰ نمونه‌برداری که از خاک کشاورزی منطقه C فدک قم صورت گرفت، ۴۰ سویه اکتینومیست خالص شده بدست آمده که از این بین ۵ سویه دارای کلنی‌های متفاوت بودند و برای استرپتومیست بودن آن‌ها تست‌های بیوشیمیایی گذاشته شد، سپس خواص ریزوباکتر آن‌ها بررسی گردید و از ۵ سویه برای تلقیح به بذر گیاه انتخاب گردید (جدول۲).

جدول ۲- نتایج تست‌های بیوشیمیایی جهت شناسایی استرپتومیست

جدایه	A	B	C	D	E
هیدرولیز نشاسته	+	+	+	+	+
توئین ۸۰	−	−	−	−	+
لیستیناز	−	−	−	−	−
ملانین	+	+	−	+	+
اوره‌از	−	−	−	−	+
اکسیداز	+	+	+	+	−
کاتالاز	+	+	+	+	+
Dnase	−	−	−	−	+
H2s	−	−	−	−	+
تریپتوفان	−	−	−	−	−
حرکت	−	+	−	−	−
اندول	−	−	−	−	−

کلنی‌هایی که دارای ظاهری خشن، صاف، سفت، چسبنده و یا پودری شکل و به سطح محیط کشت چسبیده و با رنگ‌های مختلف مثل سفید، خاکستری و یا زرد دیده شدند (۱۵). همچنین

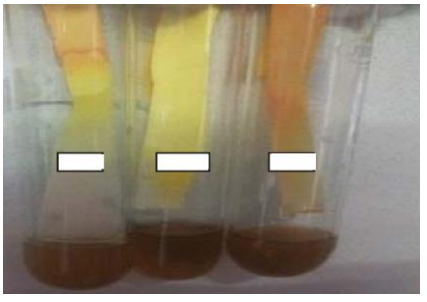
بوی خاک مرطوب از آن‌ها استشمام شد، باکتری‌های اکتینومیست بودند (۲۰). با مشاهده پلیت‌ها، کلنی‌هایی که دارای ظاهر پودری یا گچی و به رنگ سفید خاکستری، قرمز، زرد، آبی و بنفش بودند، انتخاب گردیدند، در مورد کلنی‌های مورد نظر، رنگ‌آمیزی گرم انجام شد (جدول ۳).

جدول ۳- مشخصات مورفولوژی جدایه‌های استرپتومیست

شماره	جدایه	مشخصات کلنی	ویژگی‌های میکروسکوپی
۱	A	فرورفته – سفید – گچی	رشته‌ای، بسیار نازک، کوتاه
۲	B	برآمده – سفید – گچی	رشته‌ای، نازک
۳	C	برآمده – خاکستری – پودری	رشته‌ای، انشعاب‌دار، مارپیچ
۴	D	برآمده – گچی – سفید طوسی	فنری، اسپوردار
۵	E	خاکستری – گچی – برآمده	رشته‌ای، انشعاب‌دار، نازک

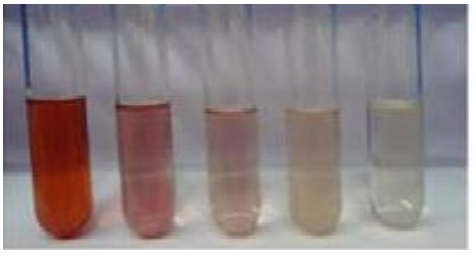
میکروارگانیسم‌هایی که اکسین تولید شده در طول موج ۵۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد، زیر میکروسکوپ دارای ویژگی‌های اکتینومیست (گرم مثبت و آرایش رشته‌ای) بودند را علامت‌گذاری کرده و کلنی‌ها به محیط ISP2 انتقال داده شدند (۱۷).

باکتری‌هایی که در زیر میکروسکوپ به صورت رشته‌ای و مثل کلافی درهم پیچیده هستند، باکتری اکتینومیست بودند (۱۵). پس از رنگ‌آمیزی و بررسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی باکتری‌های سطح پلیت حاوی محیط ISP5، باکتری‌های مورد نظر با لوپ از سطح محیط جدا شده و در سطح پلیت حاوی محیط ISP2 به صورت چهار منطقه برای بدست آوردن کلنی خالص کشت داده شد و به مدت ۷ روز در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (جدول ۴). توانایی تولید هیدروژن سیانید از روی تغییر رنگ کاغذ صافی قابل مشاهده بودند. تغییر رنگ کاغذ صافی‌ها به ترتیب از کرم (تولید کم)، قهوه‌ای روشن (تولید متوسط)، قهوه‌ای تیره (تولید زیاد) و آجری (تولید خیلی زیاد) متغیر بودند (تصویر ۳).

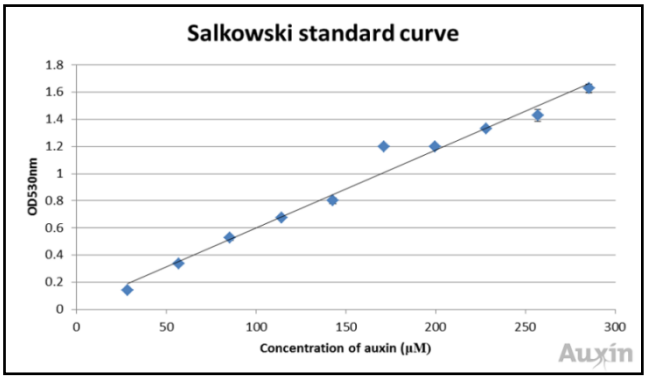


تصویر ۳- الگوی تغییر رنگ براساس مقدار تولید هیدروژن سیانید

اندازه‌گیری توان تولید اکسین با معرف سالوسکی، سپس با استفاده از منحنی استاندارد غلظت اکسین تولید شده توسط جدایه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. جدایه‌های مختلف در تولید IAA متفاوت هستند، از ۹/۰ تا ۱/۳۷ متفاوت است. جدایه A بالاترین تولید این تنظیم‌کننده رشد گیاه را دارد (جدول۴؛ تصویر ۴؛ نمودار ۱).



تصویر ٤- تغییرات رنگ محلول‌های حاوی اکسین حاصل از باکتری



نمودار ۱- استاندارد سالکوسکی

جدول ٤- غلظت اکسین سویه‌های منتخب

جدایه منتخب	خوانده شده OD
D	۱/۰۲
A	۱/۳۶
C	۱/۲۴
B	۰/۹
E	۱/۶۵

جذب نور محلول با استفاده از اسپکتوفتومتر در طول موج ۴۷۰ نانومتر قرائت شد (جدول ۵).

جدول ۵- حلالیت فسفات معدنی

جدایه منتخب	حلالیت فسفات (میلی گرم بر لیتر)
D	۱۹/۷
A	۹/۱
C	۱۱/۹
B	۱۷/۳
E	۱۲/۶

اکتینوباکتری‌ها ممکن است با تولید آنتی بیوتیک، به عنوان میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست عمل کنند. این ترکیبات از طریق محیط، مانع از رشد قارچ‌های فیتوپاتوژن می‌شوند (۲۱) (جدول ۶).

جدول ٦- اثر مهاری جدایه‌های استرپتومیست بر قارچ

جدایه	اکاندیدا آلبیکنس	آسپرژیلوس نایژه	آسپرژیلوس فلاوییس
D	+	−	+
A	+	+	+
C	+	+	−
B	+	+	+
E	+	+	+

از بین ۱۱ سویه جدا شده، ۵ سویه دارای خواص ریزوباکتر بهتری بودند که انتخاب و جدا شدند. حال که بهترین سویه‌ها انتخاب گردیدند، آن‌ها را به بذر گیاه زیتون تلقیح کرده و اثرات رشد گیاهان زیتون مورد ارزیابی قرار گرفت، همچنین شناسایی مولکولی RNA 16s روی آن‌ها انجام شد (جدول ۷).

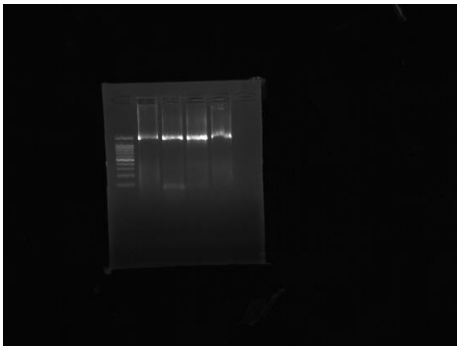
جدول ۷- خصوصیات ماکروسکوپی و میکروسکوپی و غلظت جدایه‌های استرپتومیست

جدایه منتخب	خصوصیات ماکروسکوپی	خصوصیات میکروسکوپی	غلظت باکتری	میزان حلالیت فسفات	متابولیت ضدقارچ	تولید هیدروژن سیانید	شدت جذب نوری هورمون اکسین
D	فرورفته، سفید، گچی	رشته‌ای، بسیار نازک، کوتاه	۰,۷۹۶	۹/۱	+	زیاد	۱/۳۷
A	گچی، برآمده، سفید	رشته‌ای، نازک	۰,۰۶	۱۷/۳	+	زیاد	۰/۹
C	برآمده، پودری، خاکستری	رشته‌ای، مارپیچ، باانشعاب	۱,۴۱۱	۱۱/۹	+	خیلی زیاد	۱/۲۴
B	برآمده، گچی، سفید طوسی	فنری، اسپوردار	۱,۶۹۴	۱۹/۷	+	زیاد	۱/۰۲
E	برآمده، زرد	رشته‌ای، ضخیم، انشعاب‌دار	۱,۸۴۷	۱۲/۶	+	خیلی زیاد	۱/۶۵

۳-۲. شناسایی مولکولی توالی RNA 16s

ژنوم ۴ جدایه استرپتومیست بر روی ژل الکتروفورز نمایش داده شده است (تصویر۳). rRNA 16s، ۴ جدایه استرپتومیست بر روی ژل قرار دارد (تصویر ۴).

تصویر ۳- استخراج ژنوم جدایه‌های استرپتومیست

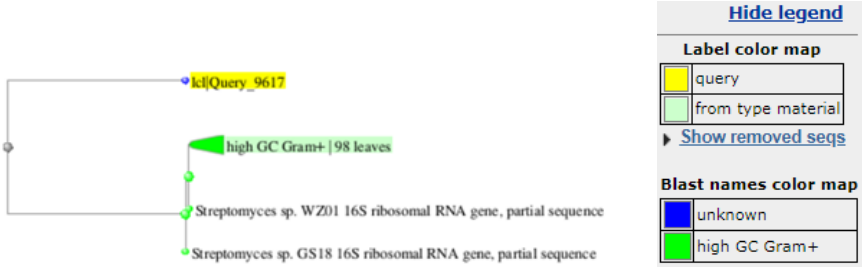


تصویر ٤- نتیجه الکتروفورز rRNA 16s

جدایه A با ۶ گونه استرپتومیست موجود در NCBI با مقدار ۹۷/۳۴ درصد تا ۹۷/۴۵ درصد شباهت داشتند. درخت فیلوژنی نشان داد که جدایه A در خوشه‌ای جدا از سایر نمونه‌های مشابه استرپتومیست قرار دارد.

جدایه B با ۸ گونه استرپتومیست موجود در اطلاعات NCBI بین ۹۶/۳۳ درصد شباهت داشتند. درخت فیلوژنی نشان داد که جدایه B در خوشه‌ای جدا از سایر نمونه‌های مشابه استرپتومیست قرار دارد. جدایه C با ۹ استرپتومیست موجود در اطلاعات NCBI و ۹۷/۷۰ درصد شباهت داشتند. درخت فیلوژنی نشان داد که جدایه C در خوشه‌ای جدا از سایر نمونه‌های مشابه استرپتومیست قرار دارد. جدایه D با ۹ گونه استرپتومیست موجود در اطلاعات NCBI دارای ۹۸/۶۴ درصد شباهت داشتند. درخت فیلوژنی نشان داد که جدایه D در خوشه‌ای جدا از سایر

نمونه‌های مشابه استرپتومیست قرار دارد (تصویر ۵).



تصویر ۵- نتایج سکانس و درختچه فیلوژنی جدایه D

برای تهیه سوپرناتانت، تعداد ۱۱ ارلن ۲۵۰ سی سی برداشته شده و داخل هر کدام۹۰ میلی لیتر محیط ISP2 براث ریخته و به مدت ۱۵دقیقه با دمای ۱۲۱درجه سانتی گراد اتوکلاو می‌شود، سپس در هر کدام ۳ تا۴ لوپ باکتری استرپتومیست با کدورت نیم مک فارلند اضافه می‌گردد و به مدت ۳ الی ۷ روز با دمای۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۸۰، داخل شیکر انکوباتور قرار می‌گیرد. سپس سوسپانسیون بدست آمده را داخل فالکون ریخته، و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰، سانتریفیوژ می‌شود، سپس محلول سطح جدا می‌گردد. انتهای ساقه‌ها با سوسپانسیون و متابولیت‌های جدایه‌های باکتری انتخابی با مقدار ۱۰۰۰ ماکرولیتر تیمار شدند. پس از ۱۴ روز بعد از تیمار، طول ریشه‌ها و تعداد ریشه‌های هر ساقه مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که تیمار با جدایه‌های باکتری A, B, C, D, E موجب افزایش تعداد ریشه‌ها در هر نمونه گیاه زیتون شده است. نتایج نشان می‌دهد که تیمار با جدایه‌های باکتری D موجب افزایش طول ریشه‌ها می‌گردد.

آنالیز واریانس داده‌ها نشان می‌دهد که تفاوت در میانگین تعداد ریشه‌ها، در تیمارهای مختلف در حد P=0.05 معنی‌دار است؛ به طوری که میانگین تعداد ریشه در تیمارهای جدایه استرپتومیست‌ها نسبت به کنترل (فاقد سوسپانسیون جدایه باکتری) معنی‌دار است. میانگین بیشترین تعداد ریشه‌ها در تیمار D با کنترل و سایر تیمارها معنی‌دار است. آنالیز واریانس داده‌ها نشان می‌دهد که تفاوت در میانگین طول ریشه‌ها در تیمارهای مختلف در سطح P=0.05 معنی‌دار است؛ به طوری که تفاوت در میانگین طول ریشه‌ها در تیمارهای کنترل و D با سایر تیمارها معنی‌دار است (جدول ۸ ، ۹).

جدول ۸- آنالیز واریانس میانگین تعداد و طول ریشه تحت تیمار جدایه‌ها و متابولیت باکتری‌های انتخاب شده

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
NUMBER	Between Groups	304.307	9	33.812	4.578	.000
	Within Groups	2304.252	312	7.385		
	Total	2608.559	321			
LENGTH	Between Groups	6657.291	9	739.699	6.614	.000
	Within Groups	34893.310	312	111.838		
	Total	41550.601	321			

جدول ۹- میانگین تعداد و طول ریشه تحت تیمار جدایه‌ها و متابولیت باکتری‌های انتخابی

طول ریشه	تعداد ریشه	تیمار
3.1559 b	0.7941 d	Control
5.8075 b	2.4250 bc	SA
3.8237 b	2.7373 bc	SB
2.6976 b	2.6429 bc	SC
3.4031 b	2.2525 bcd	SD
2.8219 b	2.1563 cd	BA
3.846 b	1.6563 cd	BB
4.8174 b	3.5652 ab	BC
17.9571 a	4.342 a	BD

پس از خالص‌سازی جدایه‌های باکتری مورد نظر، جدایه‌ها را باید نگهداری کرد تا آلوده نگردند و یا محیط کشت خشک نشود. سویه‌ها را در سطح محیط ISP2 کشت داده و دور پلیت‌ها پارافیلم پیچیده می‌شود و در یخچال نگهداری می‌گردد. نگهداری سویه‌ها داخل پلیت برای مدت طولانی مناسب نیست؛ چرا که محیط کشت پس از مدتی خشک شده و یا محیط آلوده شده و حتی کپک می‌زند. پس، برای نگهداری طولانی مدت آن، از دو روش تهیه میکروتیوپ و محیط اسلنت استفاده می‌شود. جهت حفظ و نگهداری طولانی مدت سویه‌های بدست آمده، آن‌ها را در میکروتیوپ‌های ۱/۵cc حاوی محیط مایع ISP2 ریخته و پس از ۷۲ ساعت انکوبه شدن، با دمای ۳۷ درجه، ۳ الی ۴ قطره گلیسرول استریل به آن اضافه می‌شود، سپس درِ آن را پارافیلم پیچیده و در فریزر قرار می‌گیرد (۲۲). محیط کشت Isp2 را داخل لوله شیشه‌ای به صورت مورب ریخته و پس از آن باکتری موردنظر در سطح آن کشت داده می‌شود و به مدت یک هفته در انکوباتور ۳۷ درجه قرار می‌گیرد. سپس چند قطره گلیسرول روی آن ریخته می‌شود، به طوری که سطح کلنی‌ها را

بپوشاند، سپس دور آن را پارافیلم پیچیده و در یخچال قرار می گیرد (۲۲). از منطقه C باغ فدک ۲۰ منطقه خاک نمونه‌برداری انجام شد، که ۴۰ باکتری اکتینومیست جدا گردید، از این میان ۱۱ سویه با خصوصیات مورفولوژی متفاوت مشاهده شد که جهت اطمینان از نوع گونه‌ها، تست‌های شناسایی بیوشیمیایی انجام گرفت که نشان‌دهنده صحّت وجود جدایه‌های استرپتومیست در خاک بود. پس از آن خواص ریزوباکتر بررسی گردید، و ۵ سویه که دارای بیشترین میزان انحلال فسفات، تولید اندول استیک اسید، متابولیت ضد قارچ و تولید هیدروژن سیانید بودند، انتخاب و شناسایی RNA 16s روی آن‌ها انجام شد. سپس این ۵ جدایه استرپتومیست با خواص ریزوباکتر به بذرهای زیتون رقم کنسروالیا تلقیح داده شد. بدین صورت که سوپرناتانت و سوسپانسیون استرپتومیست‌ها با سه بار تکرار، به هر بذر تلقیح شد و پس از ۱۴روز، نتیجه بدین صورت بود که بذرهای تیمارشده با استرپتومیست‌ها، دارای رشد طولی و تعداد ریشه زنی بیشتری نسبت به نمونه کنترل بود؛ از این میان بیشترین میزان رشد متعلق به بذر تیمار شده با سوسپانسیون باکتری با کد D بود.

٤. بحث

در پژوهش حاضر به جداسازی اکتینومیست‌ها از نمونه‌های خاک پرداخته شد. سپس شناسایی کلنی‌های اکتینومیست‌ها انجام گرفت. شناسایی باکتری اکتینومیست، شناسایی ماکروسکوپی و شناسایی میکروسکوپی با رنگ‌آمیزی گرم نیز بررسی گردید. سپس خالص‌سازی باکتری انجام گرفت و برای شناسایی استرپتومیست‌ها، تست‌های بیوشیمیایی انجام شد. برای بررسی صفات ریزوباکتر استرپتومیست‌ها، تولید هیدروژن سیانید، تولید هورمون رشد اکسین (اندول استیک اسید)، اندازه‌گیری میزان حلالیت فسفات در محیط مایع و متابولیت‌های ضدقارچ، مورد بررسی قرار گرفت. سپس از بین ۱۱ سویه جدا شده، ۵ سویه دارای خواص ریزوباکتر بهتری بودند که انتخاب و جدا شدند. شناسایی مولکولی توالی RNA 16s نیز انجام گرفت. تاثیر باکتری استرپتومیست بر ریشه‌زایی زیتون رقم کنسروالیا بر تعداد و طول ریشه‌ها هم بررسی شد. نتایج نشان داد که تیمار با جدایه‌های باکتری A, B, C, D, E موجب افزایش تعداد ریشه‌ها در هر نمونه گیاه زیتون شده است. همچنین تیمار با جدایه‌های باکتری D موجب افزایش طول ریشه‌ها شده است. در نهایت، نگهداری سویه‌ها به دو طریق کوتاه مدت و بلند مدت (میکروتیوپ و اسلنت) انجام شد. در واقع در این تحقیق از ۲۰ ناحیه خاک باغ فدک منطقه C نمونه‌برداری شد که ۴۰ سویه اکتینومیست جدا گردید و تاثیر این باکتری‌ها بر رشد دانه زیتون رقم کنسروالیا بررسی گردید.

در نهایت ۵ جدایه انتخاب شد که از این بین جدایه D تاثیر بیشتری بر افزایش تعداد ریشه و طول ریشه گیاه زیتون رقم کنسروالیا داشت.

۵. نتیجه‌گیری

امروزه مطالعه بر روی اکتینومیست‌ها در جنبه‌های مختلف فیزیولوژی، اکولوژی، ژنتیک و بیوتکنولوژی توسعه یافته است (۲۳). استرپتومیست‌ها بزرگ‌ترین جنس Actinobacteria و نوع جنس آن خانواده Streptomycetaceae است. استرپتومایس‌ها، ساپروفیت‌های خاک هستند و مسئولیت بوی خاک تازه را با تولید ژئوسمین برعهده دارند. به دلیل اینکه استرپتومایسس‌ها نیز در افزایش رشد گیاه نقش داشته و باعث فعالیت و سرکوب بیماری‌های گیاهی می‌شوند و نیز بعضی از متابولیت‌های ثانویه را مانند اسیدهای استیکول و کیتیناز تولید می‌کنند، به عنوان ریزوباکتری‌های تقویت‌کننده رشد گیاه و همچنین سرکوب‌کننده بیماری‌های گیاهی توسط مکانیسم‌های مختلفی از جمله افزایش عرضه مواد مغذی مانند فسفر، گوگرد، آهن، مس، تولید IAA، سیتوکینین و تولید سیدروفور به‌شمار می‌روند. آن‌ها همچنین باعث تولید هورمون‌های گیاهی و کنترل قارچ‌ها و بیماری‌های باکتریایی می‌شوند (۲۰). توانایی تولید هورمون گیاهی IAA بسیار گسترده است، در میان میکروارگانیسم‌هایی که معمولاً با گیاه ارتباط دارند، تقریباً ۸۰% باکتری‌های ریزوسفر می‌توانند آن را ترشح کنند. اکسین از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه بوده و تولید آن باعث افزایش عملکرد گیاه می‌شود و از طریق آن PGPR رشد گیاه را تحریک می‌کند (۲۴). نتایج تحقیق تولید بیوسورفکتانت در اکتینومیست‌های هالوتولرانت جدا شده از خاک دریاچه نمک قم نشان داد که خاک دریاچه نمک قم دارای اکتینومیس‌های هالوتولرانت مولد بیوسورفکتانت بوده و با توجه به کاربرد گسترده بیوسورفکتانت در جوامع امروزی می‌توان از این جدایه‌ها در صنایع مختلف استفاده کرد (۱۰).

با توجه به نتایج تحقیق جداسازی، شناسایی مولکولی و آنالیز فیلوژنتیکی اکتینومیست‌های مولد مواد ضدمیکروبی علیه پاتوژن‌های بیماری‌زا از خاک‌های زراعی شور شهر قم، از غربالگری اکتینومیست‌های جداسازی شده از خاک‌های زراعی شور استان قم، از ۱۰ سویه جدا شده تنها یک سویه توانایی تولید ماده ضد میکروبی علیه متی‌سیلین (MRSA[1]) را دارا بود.

1. Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus

٦. پیشنهادات

خاک‌های زراعی شور استان قم می‌تواند منبع خوبی برای جداسازی استرپتومیست و اکتینومیست‌های مولد ماده آنتی میکروبیال باشد و در تحقیقات زراعی و همچنین کاربرد باکتری‌ها در کشاورزی قابل استفاده می‌باشند.

References

1. Usha R, Ananthaselvi P, Venil CK & Palaniswamy M. Antimicrobial and antiangiogenesis activity of Streptomyces parvulus KUAP106 from mangrove soil. *European Journal of Biological Sciences.* 2010; 2:77-83.
2. Vurukonda SS, Giovanardi D & Stefani E. Plant growth promoting and biocontrol activity of streptomyces spp. As endophytes. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018; 19(4). **DOI:** https://doi.org/10.3390/ijms19040952
3. Chaudhary HS, Soni B, Shrivastava AR & Shrivastava S. Diversity and versatility of actinomycetes and its role in antibiotic production. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2013; 3(8). **DOI:** https://doi.org/10.7324/JAPS.2013.38.S14
4. Narayana KJP, Prabhakar P, Vijayalakshmi M, Venkateswarlu Y & Krishna PSJ. Study on bioactive compounds from Streptomyces sp. ANU 6277. *Polish Journal of Microbiology*. 2008; 57(1): 35-39.
5. Compant S, Clément C & Sessitsch A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*. 2010; 42(5): 669–678.
   DOI: https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024
6. Karimi I & Sadeghi A. The effect of silver nanoparticles on the bacterial flora of balk soil and cotton rhizosphere. *Modern Genetics*. 2018; 4(1): 27-33.
7. Zakir Bostan Abad S, Hashemi Shahraki AR, Haydaria P & Hosseinai M. Isolation and antimicrobial properties of actinomycetes isolated from the deserts of Iran. *News of cellular-molecular biotechnology*. 2013; 4(16): 4-15.
8. Yousefi Z, Aghaei SS, Marvotti A & Zulfiqari MR. Isolation, molecular identification and phylogenetic analysis of actinomycetes producing antimicrobial substances against pathogenic pathogens from saline agricultural soils of Qom city. *Journal of Qom University of Medical Sciences*. 2018; 13(3): 63-73.
9. Jabari M, Matroudi S, Zulqarnain H, Sharfi A & Zamani I. Isolation of Actinomyces tahai from the intertidal sediments of Dilem beach and study of their antifungal properties. *Iranian Medical Microbiology*. 2014; 9(4): 15-25.
10. Aghai SS, Fakharian F, Zulfiqari MR & Soleimani Darjag M. Production of biosurfactant in halotolerant actinomycetes isolated from the soil of Namak Qom lake. *Applied Biology*. 2014; 4(3): 1-11.
11. Golinska P & Dahm H. Occurrence of actinomycetes in forest soil. *DendroBiology.* 2011; 66: 3-13.
12. Shivalee A, Mahesh D, Sandhya G, Sarfaraz A & Lingappa K. Isolation and screening of soil microbes for extracellular chitinase activity. *Journal of Advanced Scientific Research.* 2011; 7(2): 10-14.
13. Hotam S, Jayprakash Y, Smriti S & Natarajan G. Antibacterial activity of actinomycetes isolated from different soil samples of Sheopur (A city of central India). *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*. 2013; 4(2): 45-57.

14. Bharti A, Kumar V, Gusain O & Bisht GS. Antifungal Activity of Actinomycetes Isolated from Garhwal Region. *Journal of Science Engglish and Technology*. 2010; 2:3-9.
15. Deepthi MK, Sudhakar MS & Devamma MN. Isolation and Screening of Streptomyces Sp. From Coringa Mangrove Soils for Enzyme Production and Antimicrobial Activity. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*. 2012; 2(1): 110-116.
16. Pandey A, Ali, I, Butola KS, Chatterji T & Singh V. Isolation and characterization of actinomycetes from soil and evaluation of antibacterial activities of actinomycetes against pathogens. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*. 2011; 2(4): 384-392.
17. Toumatia O, Compant S, Yekkour A, Goudjal Y, Sabaou N, Mathieu F, Sessitsch A & Zitouni A. Biocontrol and plant growth promoting properties of Streptomyces mutabilis strain IA1 isolated from a Saharan soil on wheat seedlings and visualization of its niches of colonization. *South African Journal of Botany*. 2016; 105: 234-239. **DOI:** https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.03.020
18. Ghadeer S. Molecular studies on some soil- Streptomyces strains of western region, Kingdom of Saudi Arabia (KSA). *African Journal of Biotechnology*. 2013; 12(19): 2558–2564. **DOI:** https://doi.org/10.5897/AJB2013.11945.
19. Song J, Lee SC, Kang JW, Baek HJ & Suh JW. Phylogenetic analysis of Streptomyces spp. isolated from potato scab lesions in Korea on the basis of 16S rRNA gene and 16S–23S rDNA internally transcribed spacer sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2004; 54(1): 203–209. **DOI:** https://doi.org/10.1099/ijs.0.02624-0
20. Gowdar SB, Deepa H & Amaresh YS. A brief review on biocontrol potential and PGPR traits of Streptomyces sp. for the management of plant diseases. *Journal of Pharmacology and Phytochemistry*. 2018; 7(5): 3-7.
21. Drahansky M. We are IntechOpen, the world's leading publisher of Open Access books Built by scientists, for scientists TOP 1 %. *Intech*, *i*(tourism). 2016; 13.
22. Cho SH, Han JH, Chi NS & Seung BK. Phylogenetic diversity of acidophilic sporoactinobacteria isolated from various soils. *Journal of Microbiology*. 2006; 44(6): 600–606.
23. Leontopoulos S, Skenderidis P, Kalorizou H & Petrotos K. Bioactivity Potential of Polyphenolic Compounds in Human Health and their Effectiveness Against Various Food Borne and Plant Pathogens. *A Review International Journal of Food and Biosystems Engineering*. 2017; 7(1): 1-19.
24. Salla TD, Ramos dS, Astarita LV & Santarém, ER. Streptomyces rhizobacteria modulate the secondary metabolism of Eucalyptus plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2014; 85: 14-20**. DOI:** https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.10.008