دارای رتبه علمی – پژوهشی
از کمیسیون نشریات علوم پزشکی

جداسازی، شناسایی ملکولی و تعیین اثر ضد قارچی باسیلوس های جداشده از خاک ریزوسفریک منطقه گرگان علیه تریکوفیتون منتاگروفایتیس

حمیدرضا پردلی
دکتری قارچ شناسی ،دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان،گرگان،ایران

سید جمال هاشمی هزاوه
دانشیار قارچ شناسی ، دانشکده علوم دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران،تهران،ایران

محمود جمشیدیان
استاد میکروبیولوژی ، دانشکده علوم دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران،تهران،ایران

منصور بیات
دانشیار قارچ شناسی ، دانشکده علوم دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران،تهران،ایران

نویسنده مسئول: حمیدرضا پردلی

پست الکترونیک:h_pordeli@yahoo.com

تلفن: ۰۹۱۱۳۷۵۲۴۳۴

آدرس: گروه میکروبیولوژی،دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

دریافت:۹۱/۵/۱۴
ویرایش نهایی:۹۱/۱۲/۱۴
پذیرش:۹۱/۱۲/۱

چکیده

زمینه و هدف : *باکتری های خاک به ویژه جنس باسیلوس توانایی تولید دامنه وسیعی از مواد فعال زیستی با خاصیت ضد میکروبی و ضدقارچی را دارند و به نظر می رسد که گزینه مناسبی در کنترل زیستی قارچ های بیماریزا باشد.*

روش بررسی: *در این پژوهش نمونه خاک به منظور جداسازی باسیلوس های خاک و تعیین اثر ضدقارچی آنها علیه تریکوفیتون منتاگروفایتیس از مناطق مختلف شهر گرگان گرفته شد. جدایه هایی که بیشترین خاصیت ضدقارچی را نشان دادند با تکنیک PCRشناسایی و نهایتا به منظور تعیین توالی آنالیز 16s rRNA برای آنها انجام شد.*

یافته ها: *در کل از ۵۴ جدایه باسیلوس خاکزی ۱۴ جدایه دارای خاصیت ضد قارچی بودند، جدایه ای S4 و S12 که بر اساس آزمایش های بیوشیمیایی به ترتیب به عنوان B.cereus و B.thuringiensis شناسایی گردیدند دارای بیشترین اثر ضد درماتوفیتی بودند. این جدایه های بومی بر اساس آنالیز 16s rRNA به ترتیب با Bacillus cereus strain KU4 و Bacillus strain ucsc27 thuringiensisهمولوژی ۹۷درصد را نشان دادند.*

نتیجه گیری: *با توجه به نتایج به نظر می رسد باسیلوس های خاکزی بومی منطقه از توانایی کنترل زیستی مناسبی جهت مقابله با عوامل درماتوفیتی نظیر تریکوفیتون منتاگروفایتیس برخوردارند.*

واژه های کلیدی: *اثرات ضدقارچی ،باسیلوس،خاک ریزوسفریک،تریکوفیتون منتاگروفایتیس*

آدرس مقاله:
پردلی ح ر، هاشمی هزاوه ج، جمشیدیان م، بیات م" جداسازی، شناسایی ملکولی و تعیین اثر ضد قارچی باسیلوس های جداشده از خاک ریزوسفریک منطقه گرگان علیه تریکوفیتون منتاگروفایتیس"مجله علوم آزمایشگاهی،تابستان ۱۳۹۲،دوره هفتم(شماره۲):۲۲-۱۸

مقدمه

خاک مخلوط پیچیده ای از مواد معدنی جامد ، آب، هوا و جانداران و فرآورده های آنها می باشد. لایه فوقانی خاک از لحاظ حضور جانداران دارای اهمیت می باشد. بافت فیزیکی، ترکیب شیمیایی، منشا، عمق و حاصل خیزی این لایه فوق العاده متفاوت است. خاک یکی از مخازن عمده میکروب ها محسوب می شود. خاک به طور طبیعی زیستگاه گروه وسیعی از باکتری ها است که منشاء محصولات فعال زیستی با فعالیت های فارماکولوژیک متنوع هستند، این ترکیبات به طور وسیع به عنوان مواد دارویی و شیمیایی در پزشکی، دامپزشکی و کشاورزی استفاده می شوند(۱). باکتری های خاک به ویژه جنس باسیلوس طیف گسترده ای از مواد ضد میکروبی و فعال را تولید می کند که برخی از آنها خاصیت ضدقارچی دارند، به طور کلی این جنس توانایی تولید ۱۶۷ ترکیب بیولوژیک فعال و موثر علیه میکروارگانیسم ها را دارد(۲). امروزه آنتی بیوتیک های ضد قارچ سهم کوچکی را در بین داروهای موجود در بازار به خود اختصاص می دهند و تولید دارو در این قسمت به دلیل اینکه سلول های پستانداران و قارچ هر دو یوکاریوت هستند و عوامل موثر بر سنتز پروتئین،RNA و DNA می تواند منجر به آسیب در میزبان نیز شود به آهستگی پیشرفت کرده است(۱). در حال حاضر به دلیل افزایش میزان عفونت های فرصت طلب قارچی در میزبانانی با ایمنی ضعیف نظیر مبتلایان به ایدز نیاز به ترکیبات ضد قارچی جدید، سالم و موثر چالش مهمی در صنایع دارویی محسوب می گردد(۳). خانواده کراتین دوست آرترودرما تا سه (Arthrodermataceae) در زیرشاخه آسکومایکوتینا ، از قارچ های پاتوژن انسانی ، حیوانی و یک سری شکل‌های غیر بیماریزا تشکیل شده است که از خاک و مواد اولیه کراتین‌دار نظیر لانه پرندگان و پوست حیوانات جدا شده‌اند. انواع بیماریزای این خانواده تحت عنوان درماتوفیت شناخته می شوند و شامل یک گروه بزرگ و مرتبط از قارچ های کراتین دوست (Keratinophilic) است که در پوست، مو و نـاخـن هـا عـفـونت ایجاد می کنند(۴).عفونت ناشی از این قارچ ها درماتوفیتوزیس، تینه آ (Tinea) یا رینگ ورم (Ring worm) نامیده می شود و اغلب محدود به لایه های غیر زنده و شاخی پوست و زواید آن می شود، گاهی پوست و بافت های زیرجلدی ممکن است درگیر شده و بیماری هایی نظیر گرانولوم ماجوچی (Majocchi) و مایستومای کاذب (Pseudomycetoma) بروز کند. باوجودیکه نفوذ بافتی درماتوفیت ها معمولاً سطحی است ولی جذب محصولات قارچی منجر به حساسیت میزبان شده و به فرم ازدیاد حساسیت تاخیری و سایر پاسخ های آلرژیک می گردد(۶و۵) . این پژوهش منظور جداسازی باسیلوس های خاک و تعیین اثر ضد قارچی آنها علیه *تریکوفیتون منتاگروفایتس* انجام گرفته است.

روش بررسی

مقدار۱۰۰ تا ۲۰۰ گرم خاک ریزوسفریک (از ریشه و اطراف ریشه گیاه) و خاک غیر ریزوسفریک از ۴ منطقه شهر گرگان و از عمق ۷/۵ –۱۰سانتیمتری سطح زمین گرفته شده با افزودن۵ گرم از نمونه مذکور به ۵۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژی سوسپانسیونی از نمونه تهیه و ۱۰ رقت متوالی از آن آماده گردید. از تمام رقت ها روی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شد کلنی های مشکوک به باسیلوس انتخاب و با کمک آزمایش های بیوشیمایی استاندارد شناسایی شدند(۷و۱).گونه قارچی مورد استفاده در این بررسی درماتوفیت *تریکوفیتون منتاگروفایتس* بود که از نمونه کلینیکی جداسازی و شناسایی شده و هم به صورت سویه استاندارد از مرکز پژوهش های علمی و صنعتی ایران(کلکسیون قارچ ها و میکروب های ایران PTCC5054) تهیه گردید. جهت جداسازی قارچ ها از نمونه بیمار از محیط کشت SCC و Potato dextrose agar استفاده گردید و کلنی های حاصل با کمک خصوصیات ماکروسکوپی کلنی و نمای میکروسکوپی شناسایی شد.

محیط کشت PDA به منظور بررسی اثر ضد قارچی استفاده گردید. برای این منظور از کلنی قارچی رشد کرده در کشت SCC سوسپانسیون در سرم فیزیولوژی(NaCl- ۰۸۵٪)

تهیه گردیده و ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون قارچی به یک پلیت سترون ۱۵ سانتی متری منتقل گردید. سپس ۵۰ میلی لیتر محیط کشت PDA ذوب شده که به دمای ۵۰ درجه سانتیگراد رسیده است به پلیت اضافه و کاملاً با سوسپانسیون قارچی مخلوط گردیده و در دمای اتاق قرار داده شد تا منعقد شود. جدایه باسیلوس به پلیت منتقل و سپس ۳-۵ روز در دمای۲۶ درجه سانتیگراد انکوبه گردید و سپس هاله های عدم رشد اندازه گیری و درصد مهار رشد محاسبه گردید(۸،۱۱). بررسی اثر ضدقارچی جدایه ها در سه تکرار انجام و در نهایت میانگین هاله عدم رشد محاسبه و مقایسه گردید. آنالیز داده ها با نرم افزار MSTATC و میانگین با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن مقایسه گردید. پس از انتخاب جدایه های باکتریایی دارای بیشترین فعالیت ضدقارچی، برای شناسایی دقیق تر از روش PCR استفاده گردید. استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج : (Cat.No.DN8115C و شرکت سیناژن) و با استفاده از روش کار آن صورت گرفت. ۴۵ میکرولیتر از محصول PCR به منظور تعیین توالی و آنالیز 16s rRNA به شرکت ماکروژن(Macrogene) کره جنوبی ارسال گردید. تعیین توالی با استفاده از پرایمرهای عمومی، پرایمر رفت AGAGTTTGATCCTGGCTCAG و پرایمر برگشت GACGGGCGGTGTGTACAAانجام شد. توالی ها با نرم افزارChromas نسخه ۲/۳۳ و برنامه Blast در سایت NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) بررسی گردید .

یافته ها

پس از کشت سوسپانسیون خاک و انکوباسیون کلنی های مشکوک رنگ آمیزی و آزمایش کاتالاز، آزمایش های بیوشیمیایی هیدرولیز نشاسته، کازئین، سیترات، حرکت،تجزیه لسیتین انجام شد(۹). سپس خاصیت ضد قارچی جدایه ها علیه درماتوفیت *تریکوفیتون منتاگروفایتس* بررسی گردید، از ۵۴ جدایه باکتریایی خاکزی ۱۴ جدایه دارای خاصیت ضد قارچی بودند. با توجه به نتایج بدست آمده جدایه های *B.cereus* S14,S9,S7,S4,S2,S1، جدایه هایS13,S8,S6,S5,S3 به عنوان *B.subtilis* و جدایه های S12,S11,S10 نیز به عنوان*B.thuringiensis* شناسایی شدند. براساس نتایج جدایه های S14, S12 ,S8,S4 دارای بیشترین اثرضدقارچی علیه*T.mentagrophytes*بودند(جدول ۲). توجهی را نشان دادند. در میان جدایه های واجد خاصیت ضد درماتوفیتی جدایه های S12,S4 بیشترین فعالیت را از خود نشان دادند. این جدایه ها بر اساس آزمایش های بیوشیمیایی به ترتیب به عنوان *B.cereus* و *B.thuringiensis* شناسایی گردیدند. نتایج PCR و آنالیز ملکولی16s rRNA نمونهS4 تشابه ۹۷ درصد این جدایه را با باسیلوس سرئوسKU4 نشان داد.

جدول ۱.آزمایش های بیوشیمیایی جدایه های خاکزی دارای فعالیت ضد قارچی

جدایه	کاتالاز	حرکت	نشاسته	ژلاتین	لستین	نیترات	سیترات	VP	گلوکز	کازئین	پارا بازال بادی
S1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
S2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
S3	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
S4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
S5	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
S6	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
S7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
S8	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
S9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
S10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S13	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
S14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که باسیلوس های خاکزی منطقه به ویژه *B.cereus* و *B.thuringiensis* دارای اثرات ضد قارچی مناسبی علیه درماتوفیت *تریکوفیتون منتاگروفایتس* هستند و هاله عدم رشد قابل ملاحظه ای را نشان دادند. باسیلوس ها از مهمترین باکتری های خاکزی هستند که از طریق تهاجم به میسلیوم قارچ ها و هم به دلیل تولید متابولیت هایی با فعالیت

ضدقارچی نظیر ایتورین، می توانند در مبارزه بیولوژیک علیه قارچ ها مورد استفاده قرار گیرند ، *باسیلوس سرئوس* از مهمترین گونه های تولید کننده این ماده است(۹). این باکتری بازدارندگی وسیعی را در برابر بیش از۳۰ نوع از باکتری ها و قارچ های گیاهی بیماریزا نشان داده است. این باکتری دو لیپوپپتید ضدقارچی مهم به نام های ایتورین A و پلیپاستین ویک بیوسورفکتانت قوی به نام سورفاکتین تولید می کند. این سه ماده از آمینواسیدهایی با زنجیره های جانبی اسیدچرب تشکیل شده اند و بنابراین به سادگی در مقایسه با آفت کش های شیمیایی پایدار تجزیه پذیر هستند(۹). در بررسی منابع به مطالعه ای که به طور مستقیم اثرات آنتاگونیستی باسیلوس ها علیه *تریکوفیتون متاگروفایتس* بررسی کرده باشد یافت نشد، اما برخی گزارش ها باسیلوس ها به عنوان عوامل ضد قارچی مناسب در کنترل زیستی قارچ های بیماریزا به ویژه بیماریزاهای گیاهی تعریف شده اند، که این مسئله به تولید متابولیت های ثانویه با خاصیت ضدقارچی باکتری ارتباط دارد. Sepahi و selselеدر تحقیقی به منظور بررسی اثرات ضدقارچی چندین جدایه از باکتری *باسیلوس سرئوس* علیه برخی از قارچ های بیماریزای گیاهی و تعیین نوع متابولیت های ضدقارچی تولید شده توسط آنها، مشخص کردند که که این باکتری و متابولیت های آن می توانند از رشد قارچ های گیاهی جلوگیری کنند و این فعالیت را به پپتیدهای ضدقارچی‌گروه ایتورین شامل ایتورین A و سورفاکتین نسبت دادند(۱۰).Kumar و همکاران در تحقیقی اثر بیوکنترلی باسیلوس سوبتیلیس خاکزی و توانایی تولید ترکیبات ضدقارچی آن را نشان دادند، این باکتری اثرضدقارچی علیه *میکروسپوروم فولووم* و گونه های تریکوفایتون را بروز داد. (۱۱).Gebreel و همکاران در مصر به منظور بررسی خاصیت آنتاگونیستی جدایه های خاکزی علیه برخی قارچ های بیماریزا، از ۶ نمونه خاک که از ۳ نقطه مختلف تهیه شده بود ۱۰۰ جدایه باکتریایی به دست آوردند. در این تحقیق پس از شناسایی جدایه ها اثر ضد قارچی آنان را علیه سه گونه *آسپرژیلوس نایجر*، ترئوس و فلاووس با روش انتشار در آگار بررسی کردند. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که از ۱۰۰ جدایه به دست آمده فقط ۲۰ گونه باکتریایی خاصیت آنتاگونیستی و ضد قارچی داشتند که ۱۷ جدایه متعلق به جنس باسیلوس بود (۷).

Morsy و همکاران در مصر در بررسی اثر کنترل زیستی *باسیلوس سرئوس* در مبارزه با قارچ فوزاریوم بررسی کردند و مشخص نمودند که تلقیح باسیلوس به مزارع کشت گوجه فرنگی در کنترل بیماری فوزاریومی گیاه موثر است و فعالیت کنترل زیستی باسیلوس را با شمارش میکروبی خاک مرتبط دانستند(۱۲). در برخی مطالعات نیز فعالیت ضد قارچی باسیلوس به ویژه *باسیلوس سرئوس* را به تولید آنزیم کیتیناز مرتبط دانستند(۱۳و۱۴و۱۵). با توجه به این که باسیلوس به عنوان میکروب مقیم میکروبی خاک و رسوب‌های رودخانه ها است و توانایی بالایی در تولید متابولیت های فعال ضد میکروبی و ضد قارچی دارد به نظر می رسد بتوان از فراورده های این میکروب ها در کنترل و حذف میکروب ها و قارچ های بیماریزا استفاده کرد(۱۶و۱۷). سایر گونه های باسیلوس نظیر *باسیلوس سوبتیلیس* و تورینژینسیس نیز مولد ترکیبات ضدقارچی محسوب می‌شوند و در برخی تحقیقات اثر ضد قارچی بر علیه قارچ ها از آنها اشاره گردیده است(۱۸). در تحقیق حاضر باسیلوس تورینژینسیس که اغلب به عنوان حشره کش بیولوژیک از آن نام برده می شود نیز به عنوان یک عامل کنترل زیستی مهم معرفی گردیده است که در بررسی‌های گذشته کمتر به چشم می خورد.

جدول۲ .فعالیت ضدقارچی جدایه های باکتریایی نمونه خاک های مختلف

	قطر هاله عدم رشد(میلی متر)													
ایزوله	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	22	18	15	22	22	18	17	20	19	21	20	23	23	21
2	23	24	12	26	20	17	22	24	18	18	22	25	18	23
3	20	20	16	22	21	16	18	22	20	19	22	24	21	22
میانگین	21.6	20.6	14.3	23.3	22	17	19	22	19	19.3	21.3	24	20.6	22

نتیجه گیری

بـا تـوجـه به نتایج حاصل و مطالعات قبلی نقش باسیلوس های خاکزی در کنترل زیستی قارچ های بیماریزا مشخص شده و می توان از متابولیت های حاصل از این باکتری ها درکنترل و مبارزه علیه آنها استفاده کرد. علی رغم مطالعات قابل توجهی که در کنترل زیستی قارچ های گیاهی بیماریزا صورت گرفته است، کمتر به نقش این باکتری های مفید در مبارزه بیولوژیک علیه درماتوفیت ها که به عنوان قارچ های بیماریزا حیوانی و انسانی محسوب می شوند پرداخته شده است و به نظر می رسد که بایستی در این زمینه مطالعات بیشتری انجام پذیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان بوده و نویسندگان تشکر و قدردانی خود را بدینوسیله اعلام می دارند.

Refrences

1.Crawford DL, Lynch JM, Whipps JM, Ousley MA. *Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogent*.Applied and environmental Microbiology. 1993;59(11): 3899-3905.

2. El-Gendy MM, El-Bondkly AM. *Production and genetic improvement of a novel antimycotic agent, Saadamycin, against dermatophytes and other clinical fungi from endophyticstreptomyces sp. Hedaya48*. J Ind Microbiol Biotechnol. 2010; 37(8): 831-41.

3. El-Mehalawy AA, Gebreel HM, Rifaat HM, El-Kholy IM, Humid AA. *Effect of antifungal compounds produced by certain bacteria on physiological activities of human- and plant- pathogenic fungi*. Journal of Applied Sciences Research. 2008; 4(4): 425-432.

4. Weitzman I, Summerbell RC. *The Dermatophytes*. ClinMicrobiol Rev. 1995; 8(2): 240-259.

5. Hawranek T . *Cutaneous Mycology in Fungal allergy and pathogenicity*. Karger. 2002.

6. Howard D H, Weitzman I , Padhye A A. *Onygenales: Arthrodermataceae in Pathogenic fungi in humans and animals*/ second ed/2002/Marcel Dekker, inc.

7. Gebreel HM, El-Mehalawy AA, El-Kholy IM, Rifaat HM , Humid AA. *Antimicrobial activities of certain bacteria isolated from egyptian soil against pathogenic fungi*. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences. 2008; 4(4): 331-339.

8. Kumari KK, Ponmurugan P, Kannan N. *Isolation and characterization of Streptomyces sp. from soil samples for secondary metabolite production*. Biotechnology. 2006; 5(4): 478-480.

9. Sneath, PHA, Mair N S, Sharpe ME, Holt JG. Bergey'smanual of determinative bacteriology. Williams & wilkins. 1993; 667-675.

10. AkhavanSepahi A, SelseleZakeri S. *Evaluation antifungal activity of Bacillus Cereus against phytopathogenic fungi: VerticilliumDahliae and Phytophthora. Infestans*. JSIAU. 2010; 20(87/1): 41-52.[Persian].

11. Kumar A, Pragati S, Shrivastava JN. *Production of peptide antifungal antibiotic and biocotrol activity of Bacillus subtilis*. Ind J of Exprim Biol. 2009; 47(1): 57-62.

12. Morsy EM, Abdel-Kawi KA, Khalil MNA. *Efficiency of Trichodermaviride and Bacillus subtilis as Biocontrol Agents gainstFusariumsolani on Tomato Plants*. Egypt J Phytopathol. 2008; 37(1): 47-57.

13. Huang CJ, Wang TK., Chung SC, Chen CY. *Identification of an antifungal chitinase from a potential biocontrol agent, Bacillus cereus28-9*. J Biochem Mol Biol. 2005; 38(1): 82-88.

14. Kamil Z, Rizk M, Saleh M, Moustafa s. *Isolation and identification of rhizosphere soil chitinolytic bacteria and their potential in antifungal biocontrol*. Global Journal of Molecular Sciences. 2007; 2(2): 57-66.

15. Gohel V, Singh A, Vimal M, Ashwini P, Chhatpar HS. *Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms*.African Journal of Biotechnology. 2006; 5 (2): 54-72.

16. Mohapatra BR, Bapuji M, Sree A. *Antifungal Efficacy of Bacteria Isolated from Marine Sedentary Organisms.* Folia Microbiol. 2002; 47(1): 51-55.

17. Zara ML, Belc N, Bahrim G, Vasile A. *The study of antifungal action expressed by som bacterial selected strains.* The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati Fascicle VI-Food Technology. 2003; 80-84.

18. Sarhan MM, Ezzat SM, Tohamy AA, El-Essawy AA, Mohamed FA. *Biocontrol of Fusarium tomato wilt diseases by Bacillus subtilis.* Egypt J Microbiol. 2001; 36: 376-386.