مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره چهارم، شماره چهاردهم، بهار ۱۳۹۳

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

جدا سازی، شناسایی و بررسی خاصیت آنتاگونیستی باکتری های چشمه آبگرم واسیدی استان بوشهر

غلامعباس کاظمی[1*]،دکتر مریم تاج آبادی ابراهیمی [2]،دکتر حسن جلیلی[3]،مهسا دمشقیان[4]،لیلا شریف پور[5]
[1] دانشجوی کارشناسی ارشد ،گروه میکروبیولوژی –دانشکده علوم -دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات اراک،اراک،ایران
[2] استادیار دانشکده علوم،گروه زیست شناسی ،دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی،تهران،ایران
[3] استادیار دانشکده علوم وفنون ،گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه تهران،تهران،ایران
[4] مربی دانشکده علوم، گروه زیست شناسی ،دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی،تهران،ایران
[5] دبیر زبان انگلیسی ،آموزش پرورش منطقه ۲تهران،تهران،ایران

چکیده:

سابقه وهدف:هدف از این تحقیق شناسایی و جدا سازی باکتری های ترموفیل از چشمه آب گرم دالاکی واقع در استان بوشهر به روش بیوشیمیایی وملکولی وبررسی خواص آنزیمی، ضد باکتریایی وضد قارچی سویه های جدا شده می باشد.

مواد و روش ها:نمونه برداری از سطح آب ،لجن وعمق ۱متری در شرایط استریل انجام شد. نمونه ها به مدت یک هفته گرما گذاری وسپس باکتری های رشد کرده خالص سازی شدند. شناسایی به دو روش بیوشیمایی وملکولی انجام شد. خواص ضد باکتر یایی علیه باکتری های اشرشیا کلی واستافیلو کوکوس اورئوس به روش کدورت سنجی وخواص ضد قارچی براساس قدرت بازدارندگی علیه آسپرژیلوس نایجر [1]مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: ۱۲ سویه(A۱-A۱۲) جدا سازی و خالص سازی شدند. سویه های A۱,A۸,A۹,A۱۱۲۰٪نمک کلرید سدیم را تحمل کردند.سویه هایA۱ و A۱۱ توانایی رشد در pH=۳-۱۲ و دمای ۵۶-۲۰ در جه سانتی گراد داشتند.نتایج اثر ضد باکتریایی علیه استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد که در سویه های A۵,A۶,A۷,A۱۰,A۱۱,A۹,A۱۲ با افزایش غلظت عصاره سویه ها از۵ ٪ به ۲۰٪ ،خاصیت ضدباکتریایی به صورت معنی دار افزایش یافت.در حالیکه تنها سویهA۱۲سبب مهاررشد اشرشیا کلی در غلظت ۲۰٪ شد. موثر ترین سویه علیه قارچ آسپرژیلوس A۲و A۶ بود.با توجه به توان رشد سویه A۱۱در طیف وسیع دما،pH وهمچنین ارجحیت توانایی آنتاگونیستی، ترادف ناحیه ۱۶ SrDNA مذکور تکتیروتوالی یابی شد. بر این اساس سویهA۱۱با تشابه ۹۸٪باسیلوس سوبتی لیس زیر گونه [2]اسپیززنی NRRL (کد رهگیری lcl|۴۸۲۶۹)شناسایی شد.

نتیجه گیری: باکتری های ترموفیل به دلیل اثر ضد باکتریایی وضد قارچی درتحقیقات آینده گزینه مناسبی در زمینه درمان بیماریها ومبارزه میکربی می باشند.

کلمات کلیدی:چشمه ی آب گرم،ترموفیل، آنتاگونیستی،باسیلوس

مقدمه:

چشمه ی آب گرم، به چشمه‌ای اطلاق می شود که گرمای آب آن بالاتر از اندازه‌های معمول(۳۷در جه سانتی گراد)، دارای برخی نمکها و مواد معدنی است و گاه اثر درمانی دارد. آب از اعماق زمین سرچشمه می‌گیرد و معمولا از شکافهای سطح زمین بیرون می آید.چشمه های آب گرم در مناطق مختلف جهان پراکنده اند و بسیاری از آبادی ها به علت داشتن این‌گونه چشمه‌ها، شهرت و اهمیت یافته اند.برخی ازچشمه های آب گرم ها به علت داشتن پاره‌ای مواد شیمیایی، دارای رنگ، بو یا مزه خاصی می‌شوند. برخی ترکیبات گوگرد(سولفور و سولفات) به آب رنگ شیری یا آبی می‌دهند و آبی

آدرس نویسنده مسئول : گروه میکروبیولوژی –دانشکده علوم -دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات اراک،اراک،ایران
Email :Email:Kazemi4949@yahoo.com
تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۱/۲۹
تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۲/۸

۱ Aspergillus niger
۲ Bacillus subtilis subsp. spizizenii strain NRRL

Archive of SID
www.SID.ir

کـه ئیـدروژن سـولفوره داشـته باشـد، بـوی تخم‌مـرغ فاسـد دارد. آب گـرم هـای دارای ترکیبـات آهـن، رنـگ سـرخ دارنـد. نمـک هـای دیگـر، ماننـد کلـرور سـدیم (نمـک طعـام) و یدور سـدیم، آب را شـور یـا تلـخ می‌سـازند (۶،۱۶،۱۴). ایـن چشـمه هـا بـه دلیـل وجـود باکتـری هایـی کـه سـازگار بـا ایـن محیـط هـا هسـتند تولیـد آنزیـم هـا، مـواد شـیمیایی وضـد میکروبـی مختلـف مـی کننـد کـه هـر کـدام از آنهـا خـواص ویـژه خـود را دارنـد و بررسـی وشناسـایی آنهـا دارای اهمیـت فـوق العـاده ای اسـت. بـه عنـوان مثـال، بعضـی از ایـن باکتریهـا تولیـد مـواد ضـد قارچـی مـی کننـد کـه حضـور ایـن مـواد در ایـن چشـمه هـا باعـث درمـان بیماریهـای قارچـی پوسـتی مـی شـود (۱۶،۱۷). ترموفیـل هـا گروهـی از میکـروب هـا هسـتند کـه در دمـای بـالا ماهیـت شـان عـوض نمـی شـود بلکـه فعـال هـم مـی شـوند. آنزیـم هـای ایـن میکروارگانیسـم هـا نظـر دانشـمندان سـرتا سـر دنیـا را بـه خـود جلـب کـرده اسـت. زیـرا ایـن آنزیـم هـا بـه واکنـش گـر هـای شـیمیایی ومقادیـر pH بـالا در مقایسـه بـا همولـوگ مزوفیلیـک مقـاوم هسـتند. بـه عـلاوه مطالعـه بـر روی خـواص درمانـی ، ضـد سـرطانی،ضد میکربـی ونقـش آن هـا در صنایـع پتروشیمی،داروسـازی ،نفـت وپاکسـازی فلـزات سـنگین از محیـط زیسـت بسـیار بـا اهمیـت مـی باشـد (۱۲،۱۱،۹،۷،۲،۱).شـناخت خـواص درمانـی آب هـای گـرم و معدنـی و بهره‌گیـری از آنهـا پیشـینه‌ای بسـیار کهـن دارد، بـه طـوری کـه زمـان آغـاز ایـن امـر بـه درسـتی روشـن نیسـت. چنیـن می‌نمایـد کـه سـاکنان مناطـق پیرامـون چشـمه‌های آب گـرم در نتیجـۀ آزمـون هـای مکـرر بـه خـواص ایـن آب هـا پـی برده‌انـد. چشـمه ی آبگـرم دالاکـی در ۱۳ کیلـو متـری شـهر برازجـان در اسـتان بوشـهرقرار دارد. سـه چشـمه در ایـن منطقـه نزدیـک بـه هـم بـا آبهـا و ویژگی هـای متفـاوت مشـاهده مـی شـود .اولیـن چشـمه دارای آب شـفاف تـرو بیشـتر بـرای آبیـاری نخـل هـا اسـتفاده مـی شـود نخـل هـای کـه بـا ایـن چشـمه آبیـاری مـی شـوند کیفیـت رطـب بهتـری دارنـد ولـی از نظـر انـدازه ریـز مـی باشـند. دومیـن چشـمه، بالاتـر از چشـمه اول قـرار داردو زمسـتان از آن بخارسـاطع مـی شـود. در سـطح آ ب، لکـه هـای نفتـی ودر برخـی از قسـمت هـای آن موجـودات کرمـی شـکلی مشـاهده مـی شـود. آب سـومین چشـمه، چـرب و رنـگ آن متمایـل بـه سفیداسـت. دراین چشـمه حبـاب هایـی در سـطح مشـاهده مـی شـود کـه بـه نظـر مـی رسـد مربـوط بـه گاز اسـت.در تحقیقـات محلـی کـه از چشـمه های آّب گـرم صـورت گرفـت از ایـن چشـمه هـادر درمـان بیمـاری هـای رماتیسـمی ومفصلـی، بیمـاری هـای قارچـی و التیـام زخـم هـا بسـیار اسـتفاده شـده اسـت. هـدف از ایـن تحقیـق شناسـایی، جـدا سـازی و بررسـی توانایـی ضـد میکربـی باکتـری هـای ترموفیـل چشـمه ی آب گـرم دالاکـی واقـع در اسـتان بوشـهر بـه دو روش بیوشـیمیایی و ملکولـی اسـت.

مواد و روش ها:

چشمه اب گرم دالاکی واقع در استان بوشهر به عنوان محلی برای جداسازی باکتری ها ی ترموفیلیک انتخاب شد.نمونه های آب ، لجن و رسوبات از سطح و عمق یک متری برداشته شد . از دو روش برای نمونه برداری استفاده شد.در اولین روش، در هر محل ۱ml از هر نمونه به وسیله سرنگ های استریل برداشته و به بطری های محتوی ۱۰mlمحیط کشت استریل (نوترین براث) منتقل شد. در روش دوم ، نمونه ها با استفاده از بطری استریل از سطح آب ، لجن و رسوبات جمع آوری و ظرف مدت کوتاهی (کمتر از ۲۴ ساعت) به آزمایشگاه انتقال داده شد. به منظور غنی سازی،۱۰میلی لیتراز نمونه به بطری شامل ۱۰۰ml کشت نوترین براث منتقل شد.نمونه ها به مدت یک هفته در دمای ۴۰درجه سانتی گراد و۸/=pH ۶در انکوباتور شیکر دار (۹۰rpm) گرم خانه گذاری شد. در نهایت از هر نمونه به محیط نوترینت آگار منتقل و در مراحل بعدی با روش رقت و خطی پراگنه های تک خالص سازی شد (۵).

بررسی فعالیت ضد میکروبی:

الف:خاصیت ضد باکتریایی:

در این تحقیق از روش کدورت سنجی جهت بررسی خاصیت ضد باکتریایی استفاده شدباکتری های استافیلوکوکوس اورئوس(ATCC۶۴۵۴۲)و اشرشیا کلی(ATCC۲۱۴۳) در محیط بی اچ آی براث یا نوترین براث به مدت ۲۴ ساعت در شرایط هوازی و دمای ۳۷ °C انکوبه شدند. پس ازآن باکتری های اندیکاتور که در فاز لگاریتمی رشد قرار گرفتند به میزان ۱٪

Archive of SID

www.SID.ir

به محیط کشت نوترین براث تلقیح شدند. در مرحله بعد،ابتدا عصاره ی خنثی[۳]سویه ها ی مورد آزمایش راتهیه شد. بدین صورت که ایزوله ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴۰ ºC گرمخانه‌گذاری شدند. سپس این کشت ها به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰ rpm در دمای ۴ ºC سانتریفیوژ شدند و مایع رویی از توده باکتریایی جدا شد. عصاره ها با عبور از فیلتر ۰/۲ µ استریل شدند. وبا غلظت های ۵٪،۱۰٪،۱۵٪،۲۰٪ از عصاره ی باسیلوس به محیط کشت نوترین براث اضافه شد.

درمر حله ی آخرمحیط نوترین براث (شامل باکتری اندیکاتور و عصاره سویه ها) در دمای ۳۷درجه سانتی گرادبه مدت ۲۴ ساعت گرم خانه گذاری شدند.میزان رشد باکتری های اندیکاتور در حضور عصاره باکتری ها پس از خواندن جذب نوری با دستگاه اسپکتروفوتومتر در ۶۰۰ نانومتر تعیین شد (۲۱،۱۹).

ب-بررسی اثر ضد قارچی: در این تحقیق برای بررسی خواص ضد قارچی سویه های مورد آزمایش، تکه ای از محیط کشت قارچ به همراه اسپور ها به ابعاد چند میلی متر از محیط جدا نموده ودر مرکز پلیت حاوی محیط کشت سویه مورد نظر قرار داده (کشت همزمان) وبه مدت یک هفته در گرم خانه ۳۷ در جه سانتی گراد انکوبه شد (۲۰،۱۵،۸).

شناسایی بیو شیمیایی وملکولی: شناسایی سویه های جدا شده با استفاده از روش های بیوشیمیایی و ملکولی انجام شد . الف-شناسایی بیوشیمیایی:

در روش بیوشیمیایی بر اساس صفات شکلی کلنی هاوآزمون های بیوشیمیایی مانند توانایی رشد در دما های مختلف ،توانایی رشد در pH های ۲تا ۱۲،توانایی رشد در غلظت نمک (۲٪ تا۲۰٪)،تخمیر قندهای مختلف،تولید اندول ،مصرف سیترات،توانایی حرکت، تست اکسیداز،تست کاتالازوتست MRVP شناسایی شدند.

ب-شناسایی ملکولی

به منظور شناسایی قطعی سویه باکتریایی از روش شناسایی ژنتیکی ۱۶S rDNA استفاده شد.(۲۲،۱۳،۳)

استخراج DNA با استفاده از کیت MBST[۴]انجام شد. جهت تکثیر ناحیه۱۶ SRDNA از پرایمر های ۶۳۰ R و ۶۱۶ V، با توالی ۵'-CAKAAAGGAGGTGATCC-۳' :R ۶۳۰ و۵'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-۳' :۶۱۶V استفاده شد. برای بهینه سازی PCR، زمان Annealing ، غلظت نمونه و تعداد سیکل مورد ارزیابی قرار گرفت. مواد تشکیل دهنده واکنش PCR متشکل از یک ماکرولیتر DNA الگو (باغلظت ۳۰۰ ng/ml یا کمتر)، ۱۰ ng/ml از پرایمرهای ۶۳۰V و ۶۱۶R، ۲ ماکرولیتر (۵۰mM) MgCl۲، ۰.۵ ماکرولیتر dNTP(۱۰mM)، ۲.۵ ماکرولیتر از بافر ۱۰ x PCR ، ۰.۳ ماکرولیتر آنزیم Termostable Taq DNA Polymerase ۵۰۰u (۵ u/µl)شرکت سیناژن بود که با اضافه نمودن آب مقطر استریل به حجم کلی ۲۵µl رسید.واکنش زنجیره ای پلیمرازی PCR در دستگاه SENQUEST آلمان مدل Labcycler انجام شد. دمای واسرشته شدن اولیه ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه صورت پذیرفت. به دنبال آن ۳۰ سیکل واکنش پلیمرازی به شرح زیر انجام شد:

واسرشته شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال در دمای ۵۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و طویل سازی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه صورت پذیرفت. جهت طویل سازی نهایی یک سیکل دمای واسرشته شدن ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و طویل سازی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه در نظر گرفته شد. محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد که با استفاده از بافر ۰.۵ x TBE(شامل ۰.۵ mM EDTA با PH=۸ و ۴۴.۵ mM Tris/Borate) ساخته شده بود، الکتروفورز گردید و نهایتاًبا رنگ اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد و با نور UV مورد بررسی قرار گرفت. نمونه های تک باند و واضح را در ناحیه ۱۲۵۰bp با استفاده از کیت Accuprep Gel Purification Kit از ژل آگارز استخراج نموده و جهت توالی یابی دو طرفه به شرکت تکاپوزیست ارسال گردید.ترادف قطعات تعیین توالی شده در بانک اطلاعاتی NCBIمورد مقایسه قرار گرفت (۲۴،۲۳،۱۰).

نتایج:از نمونه های ارسال شده به آزمایشگاه ۱۲ ایزوله جدا سازی شد. آزمون گرم تمام ایزوله ها نشان داد،تمام باکتری ها جدا شده گرم مثبت بودند. میکرواگانیسم ها با توجه به کتاب مرجع برگی باسیلوس شناسایی شدند.نتایج آزمون های

۳ supernatant

Archive of SID

www.SID.ir

بیوشیمیایی در جدول (۱) نشان داده شده است.

جدول ۱ - مشخصات بیوشیمیایی سویه ها

نام باکتری	واکنش گرم	کاتالاز	اکسیداز	حرکت	تولید اندول	MR	VP	مصرف گلوکز	اورآز
A1	+	+	-	+	–	-	+	+	–
A2	+	+	-	+	–	–	+	+	–
A3	+	+	-	+	–	–	+	+	–
A4	+	+	-	+	–	–	+	+	–
A5	+	+	-	+	–	–	+	+	–
A6	+	–	-	+	–	+	–	+	–
A7	+	+	-	–	–	+	–	+	–
A8	+	+	-	+	–	–	+	+	–
A9	+	+	-	+	–	+	–	+	–
A10	+	–	-	+	–	+	–	+	–
A11	+	+	-	+	–	+	–	+	–
A12	+	–	-	+	–	+	–	+	–

مقاومت ورشد در pHهای مختلف یکی از ویژگیهاو پارامتر های مهم در شناسایی باکتری است جدول شماره ۲ خلاصه فعالیت ۱۲ سویه جدا شده در pHهای مختلف را نشان می دهد.

جدول -۲ نمایش رشد باکتری های جدا شده درpH های مختلف

نام باکتری	pH									
	۱۲	۱۱	۱۰	۹	۸	۷	٦	٥	٤	۳
A1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–
A2	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–
A3	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–
A4	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–
A5	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–
A6	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–
A7	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–
A8	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–
A9	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–
A10	–	+	+	+	+	+	کم	کم	–	–
A11	+	+	+	+	+	+	+	+	کم	کم
A12	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–

یکی از نکات مهم در شناسایی باسیلوس ها از یکدیگر توانایی رشد یا مقاومت به در صد های مختلف نمک است، که نتایج این آزمون در جدول(۳) ارائه شد.

جدول ۳- نمایش رشد باکتری های جدا شده در درصد های متفاوت نمک

نام باکتری	نمک۲٪	نمک۵٪	نمک۷٪	نمک۱۰٪	نمک۱۵٪	نمک۲۰٪
A1	+	+	+	+	+	+
A2	+	+	+	+	+ضعیف	–
A3	+	+	+	+	–	–
A4	+	+	+	+ضعیف	+ضعیف	–
A5	+	+	+	–	–	–
A6	+	+	+	+ضعیف	+ضعیف	–
A7	+	+	+	+	+ضعیف	–
A8	+	+	+	+	+	+
A9	+	+	+	+	+	+
A10	+ ضعیف	+	+	+ضعیف	–	–
A11	+	+	+	+	+	+
A12	+	+	+	+	+	+

بر طبق جدول، شناسایی باسیلوس ها در کتاب برگی توانایی رشد باسیلوس ها در دماهای متفاوت یکی از خصوصیات مهم در تشخیص می باشد .از طرفی در صنایع مختلف به دلیل فعالیت آنزیمی این باکتری ها در دما های متفاوت بسیار حائز اهمیت می باشد .جدول(۴) خلاصه فعالیت باکتری های جداشده از چشمه آبگرم دالاکی رادر دماهای متفاوت نشان می دهد.

Archive of SID

www.SID.ir

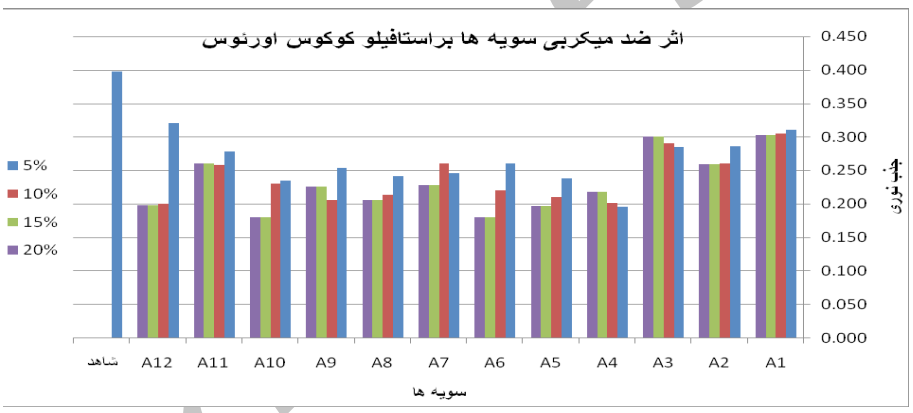
جدول ۴ - نمایش رشد باکتری های جدا شده در دماهای مختلف

نام باکتری	دما								
	۶۰	۵۶	۵۵	۵۰	۴۵	۴۰	۳۷	۳۰	۲۰
A1	–	+	+	+	+	+	+	+	+
A2	–	–	–	+	+	+	+	+	+
A3	–	–	+	+	+	+	+	+	+
A4	–	–	+کم	+کم	+	+	+	+	+
A5	–	–	+	+	+	+	+	+	+
A6	–	–	+	+	+	+	+	+	+
A7	–	–	+	+	+	+	+	+	+
A8	–	–	–	+	+	+	+	+	+
A9	–	–	–	+کم	+کم	+	+	+	+
A10	–	–	–	+	+	+	+	+	+
A11	–	+	+	+	+	+	+	+	+
A12	–	–	–	+	+	+	+	+	+

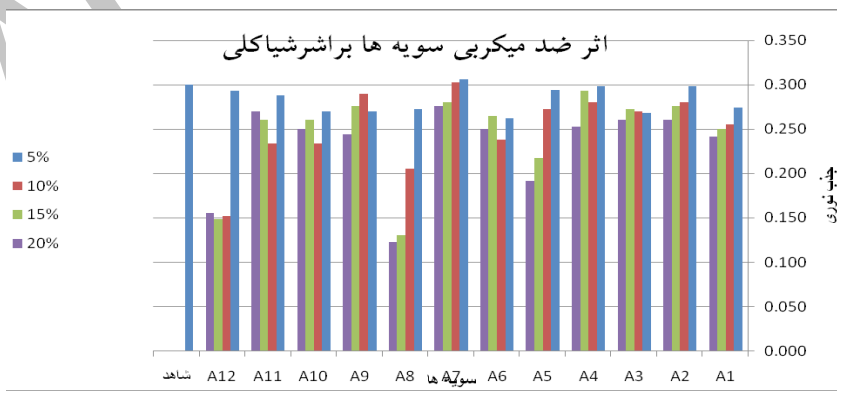
تعیین ویژگی ضد میکروبی

الف-تعیین ویژگی ضد باکتری

پس از تهیه مقدمات، آزمایش به روش کدورت سنجی انجام شد . اثر ضد باکتریایی ایزوله ها بر باکتری گرم مثبت استافیلو کوکوس اورئوس و باکتری گرم منفی اشرشیا کلی با روش کدورت سنجی تعیین شد .مهار رشد استافیلو کوکوس اورئوس واشرشیا کلی در غلظت های مختلف عصاره ایزوله ها درنمودار های ۱و۲ نمایش داده شده است (۲۴،۲۳،۱۰).



نمودار۱- اثر ضد میکروبی غلظت های مختلف عصاره های استخراج شده از سویه ها بر روی استافیلو کوکوس اورئوس



نمودار ۲- اثر ضد میکروبی غلظت های مختلف عصاره های استخراج شده از سویه ها بر روی اشرشیا کلی

تعیین ویژگی ضد قارچی: از میان قارچ های پوستی مناطق گرمسیر آسپرژیلوس نایجر انتخاب شد.نتایج بررسی خواص ضد قارچی ایزوله های جدا شده در جدول ۵ خلاصه شده است.

www.SID.ir

جدول-۵- اثر ایزوله های جدا شده بر مهار رشد آسپرژیلوس نایجر

سویه های جدا شده از چشمه آبگرم دالاکی	اثر بازدارندگی بر آسپرژیلوس نایجر
A1	++
A2	++++
A3	++
A4	++
A5	+
A6	+++
A7	+
A8	+کم
A9	++
A10	–
A11	+
A12	+

شکل۱- مهار رشدآسپرژیلوس نایجر توسط ایزوله های جدا شده از چشمه آب گرم

شناسایی ملکولی باکتری A۱۱ :

از DNA استخراج شده ایزوله ها با استفاده از پرایمر ذکر شده PCR انجام شد.

توالی تکثیر یافته ناحیه ۱۶S rDNA روی ژل الکتروفورز برش خورد و پس از تخلیص برای توالی یابی ارسال شد. نتایج توالی یابی قطعه bp ۱۵۰۰ در سایت NCBI بلست شد (کد رهگیری lcl|۴۸۲۶۹).مقایسه ژنوم تکثیری نشان داد که باکتری A۱۱ ۹۸٪ باسیلوس سوبتی لیس سوش اسپی ززنی [۵] مشابهت دارد.

بحث

در سال های اخیر تحقیقات زیادی روی میکروب های چشمه آب گرم صورت گرفته و شناسایی و جداسازی آن ها اهمیت پیدا کرده است. آنزیم های میکروبی حائز اهمیت فوق العاده ای در بیو تکنولوژی مدرن می باشدواکثر آنزیم های صنعتی که تا این تاریخ شناخته شده اند از باکتری ها و قارچ ها مشتق شده اند. جدا سازی و شناسایی ترموفیل ها از چشمه های آب گرم با توجه به توصیه های لازم در ادبیات میکروبی مشکل نیست.

باسیلوس ها در زیر میکروسکوپ باکتری‌های گرم مثبت و میله‌ای شکل می‌باشند. این گروه از باکتری ها بزرگترین و متنوع ترین گروه باکتری‌ها را تشکیل می‌دهند و در خانواده باسیلاسه[۶] طبقه بندی می‌شوند. این خانواده تولید اسپور درونی[۷] می کنند.در این جا می توان با تست های ساده ای مثل واکنش گرم واسپور، اکسیداز،کاتالاز،توانایی حرکت،احیاء نیترات،تست همولیزو رشد در شرایط بی هوازی ویا میکروآئروفیل باسیلوس ها را از سایر گونه های نزدیک تشخیص داد. نواحی ۱۶ SrDNA نواحی حفظ شده وبسیار کم تغییری در گونه های مختلف پروکاریوتی نسبت به نواحی دیگر کروموزومی هستند و خاص هر گونه می باشند. تغییرات فنوتیپی که نتیجه ی تغییرات ژنوتیپی به علت جهش می باشند کار تشخیص به روش بیوشیمیایی را مشکل کرده است. بنابراین شناسایی گونه های باسیلوس براساس توالی ۱۶ SrDNA روش مناسبی است.این نتایج با مشاهدات هازم اکیل و همکارانش در سال ۲۰۰۸ تطابق داشت(۴). در این تحقیق باکتری ترموفیلیک از چشمه آب گرم دالاکی بوشهر جدا شد. ایزوله ها باسیل های گرم مثبت اسپوردار بودند.با بررسی تست های بیو شیمیایی ،همان طور که در جدول۱مشاهده می شود ، خصوصیات مورفولوژیکی میکروسکوپی و ماکروسکوپی در این سویه ها متنوع بود.در برخی سویه ها(A۱,۷,۸,۹,۱۱) کلنی خشک ودرسویهA۳ کلنی بسیارکشدار بود.در مشاهده میکروسکوپی نیز باسیل ها متنوع بودند(کشیده و کوتاه و بعضی به دنبال هم).جداسازی ترموفیل ها از رسوبات بهتر از آب و لجن بود.از طرفی بعضی سویه ها در محیط نوترین براث قادر به رشد نبودند که با اضافه کردن ۱٪ نمک رشد مشاهده شد و بعضی از

۵ Bacillus subtilis subsp. spizizenii strain NRRL B-23049

۶ Bacillaceae

۷ Endospore

Archive of SID

www.SID.ir

نمونه ها در سطح محیط کشت مایع(محیط نوترین براث) رشد کردند. در بررسی بیوشیمیایی سویه های A۱,۸,۹,۱۱,۱۲مقاوم به نمک ۲٪تا۲۰٪ بودند. سویه های A۱,۱۱ بیشترین طیف رشد را در pHهای۱۲-۳ و دماهای ۵۶-۲۰ در جه سانتی گراد نشان دادند .در غلظت ۲۰٪ عصاره باکتری به ترتیب بیشترین و کمترین اثر ضد باکتریایی بر علیه استافیلوکوکوس اورئوس مر بوط به سویهA۳,A۷ ودر غلظت ۵٪ مربوط بهA۱۲,A۴ است . در غلظت ۲۰٪ عصاره باکتری به ترتیب بیشترین و کمترین اثر ضد باکتریایی علیه اشرشیا کلی مر بوط به سویه A۷,A۸ودر غلظت ۵٪ مربوط به A۶و A۷است و در غلظت ۵٪ عصاره سویه A۷بر علیه اشرشیا کلی اثر بازدارندگی ندارد. از طرفی تحلیل آماری اثر ضد باکتریایی بر علیه استافیلوکوکوس اورئوس نشان دادکه سویه هایA۱,A۲,A۳,A۴,A۸ اختلاف معنی داری بین خاصیت ضد باکتریایی در درصدهای مختلف عصاره وجود نداشت در صورتیکه در سویه های A۵,A۶,A۷,A۱۰,A۱۱,A۹,A۱۲ با افزایش غلظت عصاره از ۵ به ۲۰٪ خاصیت ضدباکتریایی به صورت معنی دار افزایش یافت.همچنین اثر ضد باکتریایی بر علیه اشرشیا کلی نشان داد که هیچکدام از سویه هایA۱,۲,۳,۴,۵,۶,۷,۸,۹,۱۰,۱۱ در هیچ غلظتی از عصاره توانایی ضد میکروبی نداشته است و تنها سویه A۱۲با افزایش غلظت عصاره فعالیت ضد میکروبی افزایش یافته است غلظت ۲۰٪ سبب کاهش معنی دار رشد شده است. موثر ترین سویه بر علیه قارچ آسپرژیلوس A۶,A۲ می باشد. محققی بنام حسین اکمردر سال ۲۰۱۱ از آب ،رسوبات و لجن، باکتری های ترموفیل بالای ۵۰درجه سانتی گراد جدا نمودودریافت که استفاده از رسوبات گزینه ی بهتری برای جداسازی این باکتری هااست.(۵) همچنین می توان رسوبات را به صورت محلول یخچالی بمدت ۵روز نگهداری نمود که این یافته با نتایج ما در این تحقیق همخوانی داشت وما نیزدریافتیم که نمونه ها را به مدت بیشتری می توان نگهداری کرد و جدا سازی ایزوله ها از نمونه آب ورسوبات انتقال داده شده به آزمایشگاه بهتر و بیشتر صورت گرفت. آقای Danial Bin Ahmad Meri در سال ۲۰۰۸ اهمیت ترموفیل و شناسایی و جدا سازی این باکتری هاوآنزیم های آن ها از جمله آمیلاز ها رامورد توجه قرار داد (۶). درمطالعه ای مارکوس اسشارمی و همکارانش در سال ۲۰۰۴ فعالیت هاو فرآورده های باسیلوس ها را بطور گسترده بررسی نمودند. در این تحقیق تولیدات آنزیمی ، اهمیت و کاربرد آن ها، نقش باسیلوس ها در تخمیر مواد غذایی،تولیدات پروتئینی ازجمله اینترفرون ها و فاکتور های رشدنشان داده شده است . کشت های باسیلوس سوبتی لیس باکتریهای بیماریزا را از کانال روده از بین برد و بخش هایی از عصاره های باسیلوس سوبتی لیس (natto) فعالیت ضد سرطانی نشان داد و فشار خون را در نمونه های آزمایشگاهی کاهش داد.جنس باسیلوس، گروه های مختلفی از آنتی بیو تیک ها را در مرا حل هاگ سازی تولید کرد .باسیلوس لیکنی فورمیس و باسیلوس سوبتی لیس تولید کنندگان بالقوه سورفاکتین هستند.سورفکتین به علت داشتن فعالیت سورفاکتانت استثنایی وویژگی های امولسیون سازی کاربرد بالقوه ای در اصلاح زیستی دارد.این لیپوپپتید ها بالقوه بعنوان یک عامل آنتی توموری ،آنتی ویروسی،آنتی باکتریایی وهیپو کلسترولیمیک هستند.پیشرفت های اخیر در کلون کردن ریبوفلاوین ،کوبالامین و ژن های بیوسنتز بیوتین استفاده از گونه های باسیلوس در تولید ویتامین را فراهم می کند(۲۵).مقایسه نتایج بدست آمده در این بررسی با نتایج گزارش شده نشان می دهد باسیلوس سوبتی لیس جدا شده دارای طیف وسیعی از فعالیت های مختلف می باشد که می توان از آن به عنوان یک عامل ضد قارچی وضد باکتریایی استفاده نمود.پیشرفت اخیر در کلون کردن ژن های بیوسنتز ریبو فلاوین ،کوبالامین وبیوتین برای استفاده از گونه های باسیلوس در تولید ویتامین موثر می باشد. با توجه به اثر ضد باکتریایی وضد قارچی سویه های جدا شده ضرورت بررسی بیشتر روی باکتری ها وقارچ های محک را می طلبد. شناسایی بیوشیمیایی و ژنتیکی باسیلوس ها مکمل یکدیگر در تشخیص باکتری ها می باشند.. امیداینکه در آینده نزدیک شاهد استفاده ازاین باکتری ها ومحصولات آن ها در درمان باشیم .

تشکر وقدر دانی:

بدینوسیله از اساتید محترم ،پرسنل دانشگاه آزاد واحد تهران مرکزی ،دانشکده علوم پایه ،جهادسازندگی ومردم خوب برازجان و دالاکی که با فراهم آوردن امکانات لازم زمینه تحقیق را فراهم آورده اند تشکر و قدر دانی می شود.

Archive of SID
www.SID.ir

منابع:

(1) Acharya S. Effect of nutritional and environmental factors on cellulases activity by thermophilic bacteria isolated from hot spring . J. Sci. Ind. Res, 2011;70:142-148.
(2) Aguiar P, BeveridgeT, Reysenbach J and A-L. a thermophilic hydrogen-oxidizing microaerophile from terrestrial hot springs in the Azores. IJSEM,2004; 54: 33–39.
(3) Ainon H,Tan C. Biological Characterization of Rhodomicrobium vannielii Isolated from a Hot Spring at Gadek, Malacca.Malaysia.Malaysian Journal of Microbiology, 2006;2:15-21
(4) Akel H, Al-Quadan F, Atoum M, Battikhi M. Phenotypic and Genotypic Characterization of Three Novel Halophilic Bacillus Strains from Jordanian Hot Springs. JJBS,2008;1:19 - 25
(5) Akmar H, Asma I, Venugopal B, Yoga Latha L and Sasidharan S. Identification of appropriate sample and culture method for isolation of new thermophilic bacteria from hot spring. AJMR,2011; 5: 217-221.
(6)Bin D, Mehri A. Isolation of starch degrading microorganism from local hot spring. FCNREUMP,2008
(7)Bisht S and Amrita K. Biochemical Characterization and 16S rRNA Sequencing of Few Lipase-Producing Thermophilic Bacteria from Taptapani HotWater Spring, Orissa, India. BiotRI,2011;10: 61-65.
(8)Chuang P, Lee C, Chou J, Shieh B, Tromsø H, Norwayy.Anti-fungal activity of crude extracts and essential oil of Moringa oleifera Lam. BIORESOURCE TECHNOL,2007;98:232–236.
(9)Ding J, Zhang R. A Novel acidophilic, thermophilic iron and sulfur-oxidizing archaeon isolated from a hot spring of Tengchong, Yunnan, China.BRAZ J MICROBIOL,2011;42: 514-525.
(10)Ebrahimi Taj Abadi M, Hejazi M, Ghaffari R,Jafari P. Potential antagonism acid and bile resistant lactobacilli isolated from dairy products. J *Med Sci*, 1388;47: 17-27.
(11)Jones D, Albrecht H, Dawson K, Irene S,Katherine H , Yundan P, Jennifer L. Community genomic analysis of an extremely acidophilic sulfur-oxidizing biofilm . ISME Journal ,2011:1–13
(12)Karanth K, Deo G , Veenanadig K. Microbial production of biosurfactants and their importance. *Dept of Biochemistry* IISC,1999;77:116-126.
(13)Khalil A. Isolation and characterization of thermophilic Bacillus Species from Thermal Ponds in Jordan Pakistan. JBS,2002;5:1272-1273,
)14(Scale M , Chapter 3, Geology Considerations,1997,110-290.
(15)Moyne A, Shelby R, Cleveland T , Tuzun S.Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against Aspergillus avus.J Appl. Microbiol ,2001;90:622-629.
(16)James C .National Park.Distribution of the Hot Springs.2002;301:1-12.
(17)Shieh W.A halophilic thermophilic bacterium isolated from a coastal hot spring in Lutao, Taiwan. J. Gen Microbiol ,1993;139:2505-25 10.
(18)Satpal S, Bisht and Amrita K. Biochemical Characterization and 16S rRNA Sequencing of Few Lipase-Producing Thermophilic Bacteria from Taptapani HotWater Spring, Orissa, India. IJAMBR,2011:5-10.
(19)Tadesse M, Gulliksen B, Strøm M, Styrvold O and Haug T.Screening for antibacterial and antifungal activities in marine benthic invertebrates from northern Norway. BISMiS,2011.
(20)Tendulkar S, Saikumari Y K, Patel V, Raghotama S, Munshi T K, Balaram P and Chattoo B. Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by Bacillus licheniformis BC98, and its
effect on phytopathogen Magnaporthe grisea. J Appl. Microbiol. Biotechnol,2007.
(21)Zhenna Y.Antimicrobial compound and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria : structures and properties AJB,2011; 10:8834-8839.
(22)Roberto P, Trott A, David J, Peter L, Bergquist, Walter M. A Culture-Independent Survey of the Bacterial Community in a Radon Hot Spring.Astrobiology, 2002; 2 .
(23)Tafvizi F, Ebrahimi Taj Abadi M, Khjarh L. Genotyping and phylogenetic study of Bacteriocin producing Lactobacillus isolated from local dairy products and traditional food. J *Med Sci*, 1391: 284.
(24)Tafvizi F, Ebrahimi Taj Abadi M, Heydari nasrabadi M, Bahrami H.Genetic Diversity of lactobacilli isolated from traditional dairy products by Rapd Pcr.NCMBJ,1390; 3: 33.(25)Schallmey M, Singh A, and Owen P Ward. Developments in the use of Bacillus species for industrial production. Can. J. Microbiol, 2004 ; 50.Isolation, identification and considering the antagonistic properties of bacteria from hot water acidic spring in Boushehr province

Archive of SID

www.SID.ir