

جداسازی و شناسایی باکتری مهارکننده ی رشد قارچ های پاتوژن از اصفهان با استفاده از روش مولکولی

شیرین نقدی فر^۱، محبوبه مدنی^{۱*}، علی محمد احدی^۲

^۱گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران؛ گروه ژنتیک، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۵

تاریخ دریافت: ۹۴/۴/۱۳

چکیده:

زمینه و هدف: گونه های باسیلوس منبعی از متابولیت های ضد قارچی با توان مهار عفونت های قارچی هستند. هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی باکتری مهارکننده ی رشد قارچ های پاتوژن از اصفهان با استفاده از روش مولکولی بود.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی-مقطعی، تعداد ۱۵۰ نمونه (خاک، هوا و سطوح) از شهر اصفهان تهیه و تأثیر مهارتی باکتری های رشد یافته بر روی محیط کشت نوترینت آگار بر رشد قارچ های آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس فلاووس و موکور هیمالیس بررسی شد. بررسی کیفی مهارت رشد قارچ با روش نشاکاری و جهت بررسی کمی مهارت رشد قارچ ها تلقیح سوسپانسیون قارچی حاوی ۱۰^۸ اسپور بر میکرولیتر به صورت کشت خطی در فواصل ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳ سانتی متری از مرکز (محل تلقیح سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند باکتری ها) انجام شد. نمونه ها در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۹۶ ساعت نگهداری و شناسایی باکتری مهارتی با تست های بیوشیمیایی و روش مولکولی انجام گرفت.

یافته ها: تأثیر مهارتی باکتری ها بر رشد قارچ های آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس فلاووس و موکور هیمالیس در فواصل ۰/۵ تا ۳ سانتی متر مشاهده شد. بر اساس نتایج تست های بیوشیمیایی و روش کلنی-PCR، باکتری با بیشترین اثر مهارتی نسبت به قارچ های مذکور باسیلوس آتروفئوس سویه ی HNSQJYH170 شناسایی شد. نتیجه گیری: باسیلوس آتروفئوس سویه ی HNSQJYH170 بومی اصفهان قابل استفاده برای تولید آنتی بیوتیک و مصارف کنترل بیولوژیک است.

واژه های کلیدی: باسیلوس آتروفئوس، قارچ های پاتوژن، فعالیت ضد قارچی، کلنی PCR.

مقدمه:

طبیعی به عنوان فعال های زیستی مطرح بوده و ارزش آن ها در علوم زیستی و داروسازی ثابت شده است (۲،۱). از جمله قارچ های مهاجمی که در سال های اخیر سبب انواع عفونت ها شده اند، می توان به جنس های آسپرژیلوس و موکور اشاره کرد. اسپور قارچ آسپرژیلوس در طبیعت به حد وفور وجود دارد و بر روی میوه ها، شیرینی ها، نان، مرکبات، سبزی ها به خصوص گوجه فرنگی دیده می شود. این قارچ را می توان در آب، خاک، روی نباتات، پوست و مخاط

در سال های اخیر افزایش بیماری های خطرناک نظیر سرطان ها، بیماری های اتوایمیون، اثرات مضر داروها بر انسان، حیوان و محیط زیست و همچنین ظهور میکروب های مقاوم به داروها از مهم ترین مشکلات درمان عفونت ها در پزشکی بوده است. از این رو توجه محققان به بررسی منابع طبیعی همانند نقش انواع میکروارگانیسم ها برای کنترل و درمان های بیولوژیک معطوف گشته است. در این بین میکروارگانیسم های خاکزی و دریایی وجود دارند که با تولید ترکیبات

*نویسنده مسئول: اصفهان- دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان- گروه میکروبیولوژی- تلفن: ۰۹۱۳۴۰۹۷۶۲۹، E-mail: mmadani66@gmail.com

دارد. آنتی بیوتیک زوئترمایسین A نیز توسط باسیلوس سرئوس تولید می شود و با خاصیت ضد قارچی، در کنترل بیماری های گیاهی موثر است. این آنتی بیوتیک کمک به از بین بردن حشرات نیز می کند (۱۴، ۱۵). گونه هایی از *سودوموناس* ها با فعالیت آنتاگونیستی خود و تولید متابولیت های ضد قارچی از قبیل پیرولنترین قادر به مهار رشد درماتوفیت ها، آسکومیست ها و بازیدیومیست ها هستند (۱۶)؛ بنابراین جداسازی و شناسایی باکتری ها و استخراج متابولیت های تولیدی آن ها از ابزارهای بسیار کارآمد جهت کنترل بیولوژیک قارچ ها محسوب می شود. لازم به ذکر است اساس شیمیایی این ترکیبات در بسیاری موارد شناخته شده و در مواردی هنوز ناشناخته است. این باکتری ها ممکن است نتوانند با محیط های دیگر خود را تطبیق دهند و لذا ترکیبات فوق را ایجاد نکنند (۱۵). موقعیت جغرافیایی و ترکیبات خاک، گونه، وارسته و سیکل رشد باکتری شانس یافتن منبعی با طیف وسیعی از ترکیبات ضد قارچی که مناسب برای اکوسیستم خاص است را افزایش می دهد (۱۴)؛ لذا این مطالعه با هدف یافتن باکتری با توان تولید متابولیت های ضد قارچی فعال بر علیه قارچ های *آسپرژیلوس نایجر* PTCC 5010، *آسپرژیلوس فلاووس* PTCC 5006 و *موکور هیمالیس* PTCC 5292 از اصفهان انجام و باکتری دارای حداکثر فعالیت مهاری با روش های بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی شد.

روش بررسی:

این مطالعه از نوع توصیفی - مقطعی می باشد. در این تحقیق به منظور شناسایی باکتری های دارای متابولیت های ضد قارچی تعداد ۱۵۰ نمونه به طور مساوی از خاک، هوا و سطوح تهیه شد. تعداد ۵۰ نمونه خاک از مناطق مختلف شهر اصفهان نمونه برداری و در کیسه نایلون استریل به آزمایشگاه منتقل گردید؛ سپس ۰/۱ گرم از نمونه خاک در میکروتیوب های درب دار همراه با ۰/۵ میلی لیتر

انسان و حیوانات پیدا کرد. گونه های *آسپرژیلوس* در ایجاد عفونت های درونی، زیر جلدی، جلدی و ضایعات گوش، چشم و ناخن نقش اساسی دارند. به علاوه فرآورده های توکسیک حاصله از گونه های این قارچ نیز غالباً منجر به ایجاد واکنش های آلرژیک می گردد. اسپور قارچ *موکور* نیز به حد وفور در طبیعت (هوا، خاک و روی تمام میوه ها) یافت می شود. این قارچ می تواند در افراد با مقاومت طبیعی پایین، ایجاد بیماری جلدی، ریوی، مغزی و احشایی نموده، همچنین ایجاد حساسیت یا آلرژی کند. در ضمن در حیوانات به خصوص گاوها باعث سقط جنین می شود (۵-۳). ترکیبات شیمیایی سنتتیک نظیر داروهای ضد قارچی با تأثیر بر سیستم بیولوژیک، تأثیر بر ارگانیسم های غیر هدف و ایجاد اختلال در اکوسیستم مشکلاتی را ایجاد می کنند؛ لذا قارچ کش های دوستدار طبیعت که حداقل آسیب را برای انسان و اکوسیستم دارند اهمیت دارند و غربالگری نمونه های خاک، آب، حشرات و گیاهان اولین قدم برای شناسایی آن هاست (۶).

امروزه توجه محققان به یافتن ترکیبات مهارکننده ی رشد قارچ ها معطوف شده است که در این بین تأثیر میکروارگانیسم های مختلف به ویژه باکتری های خاکزی، هوازی و دریازی مانند اکتینومایسس ها، استریتومایسس ها، *سودوموناس* ها، باسیلوس ها و لاکتوباسیلوس ها بر روی رشد قارچ ها و متابولیت های تولید کننده ی آن ها با خواص ضد میکروبی شان، حائز اهمیت هستند (۱۱-۷). گونه های باسیلوس باکتری های گرم مثبت و هوازی هستند که برخی مانند باسیلوس سوتیلیس، باسیلوس سرئوس و باسیلوس *آنتراسیس* برای انسان بیماری زا می باشند. باسیلوس سوتیلیس قادر به تولید ترکیبات ایتورین A، باسیلومایسین، پلیاستاتین، مایکوسوتیلین و فنجایسین می باشد که دارای خاصیت مهاری بر علیه قارچ هایی نظیر گونه های *آسپرژیلوس* هستند (۱۲، ۱۳). علاوه بر آن باسیلوس سرئوس با تولید اسید آمینه آزوکسی باسیلین توانایی مهاری گونه های *آسپرژیلوس* را

کشت حاوی قارچ ها ریخته شد و توسط لوپ استریل به آرامی به سطح کلنی ضربه وارد شد تا اسپورها از میسلوم های قارچ جدا شوند. شمارش اسپور قارچی به کمک میکروسکوپ و لام نئوبار انجام گرفت (۶).

به منظور غربالگری اولیه باکتری های جدا شده، ۲ میکرولیتر از سوسپانسیون هر یک از قارچ های *آسپرژیلوس نایجر*، *آسپرژیلوس فلاووس* و *موکور هیمالیس* (10^4 اسپور بر میکرولیتر) به صورت نقطه ای در مرکز پلیت قرار داده شد و در ۴ گوشه ی دیگر پلیت ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون نمونه های باکتریایی جدا شده از خاک، هوا و سطوح با کدورت ۰/۵ مک فارلند تلقیح شدند. پلیت ها در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد به مدت ۳-۵ روز نگهداری شدند. کلنی دارای بیشترین اثر مهارتی جداسازی شد (۶، ۱۷).

همچنین مقدار یک لوپ از باکتری مهارتی در مرکز پلیت حاوی محیط کشت سابارود دکستروز آگار کشت داده شد و سپس در ۴ گوشه پلیت به اندازه یک آنس از هر یک از قارچ های *آسپرژیلوس نایجر* PTCC 5010، *آسپرژیلوس فلاووس* PTCC 5006 و *موکور هیمالیس* PTCC 5292 به صورت نشاکاری کشت داده شدند. برای هر یک از این پلیت ها یک پلیت شاهد نیز در نظر گرفته شد که فاقد باکتری مورد نظر بود؛ سپس پلیت ها در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۹۶ ساعت نگهداری شدند (۱۶، ۱۸).

طبق روش Hua و همکاران مقدار ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری مورد نظر با کدورت ۰/۵ مک فارلند به صورت یک خط مستقیم در مرکز پلیت حاوی محیط کشت سابارود دکستروز آگار کشت داده شد؛ سپس ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچ های *آسپرژیلوس نایجر* PTCC 5010، *آسپرژیلوس فلاووس* PTCC 5006 و *موکور هیمالیس* PTCC 5292 حاوی 10^4 اسپور بر میکرولیتر در فواصل (۱ و ۰/۵)، (۲ و ۱/۵) و (۳ و ۲/۵) سانتی متری از باکتری مورد نظر کشت داده شد. پلیت ها در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند (۱۷).

محلول NaCl ۹٪، به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس گردید. میکروتیوب ها به مدت ۳۰ ثانیه با دور ۲۵۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ شدند؛ سپس ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون هر نمونه خاک را بر روی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده و نمونه ها در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. با توجه به اثر مهارتی برخی باکتری ها بر برخی قارچ های رشد کرده بر روی پلیت ها، کلنی های دارای اثر مهارتی انتخاب و هر کدام جداگانه به پلیت های دیگری حاوی محیط کشت نوترینت آگار انتقال داده شدند. این عمل تا به دست آوردن کلنی های خالص ادامه پیدا کرد.

در مورد نمونه های هوا، ۵۰ پلیت حاوی محیط کشت نوترینت آگار به مدت ۲ ساعت در معرض هوای آزاد قرار داده شد و سپس درب پلیت ها بسته شد. در مورد نمونه های سطوح مختلف نیز با استفاده از سواب استریل و مرطوب از سطح قفسه های آزمایشگاه تشخیص طبی نمونه گیری کرده و بر روی ۵۰ پلیت حاوی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شدند. در تمام موارد محیط های کشت به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

کلنی های رشد یافته بر روی محیط کشت نوترینت آگار هر کدام جداگانه به پلیت های دیگری حاوی محیط نوترینت آگار انتقال داده شدند و این عمل تا به دست آوردن کلنی های خالص ادامه پیدا کرد؛ سپس هر کلنی خالص در ۲ میلی لیتر محیط تریپتیک سوی برات استریل وارد شد (۶).

قارچ های *آسپرژیلوس نایجر* PTCC 5010، *آسپرژیلوس فلاووس* PTCC 5006 و *موکور هیمالیس* PTCC 5292 از کلکسیون میکروبی مرکز پژوهش های علمی و صنعتی ایران خریداری شدند. پودرهای خریداری شده فعال سازی و بر روی محیط کشت سابارود دکستروز آگار کشت و به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. به منظور تهیه سوسپانسیون از اسپرهای قارچ، توین ۸۰ (۰/۱٪) به ۵ میلی لیتر آب مقطر استریل اضافه و سپس در سطح محیط

۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد و مرحله ی سوم به صورت یک سیکل به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد انجام گرفت. پس از بررسی کیفیت محصول PCR در ژل آگارز ۱ درصد، محصول مورد نظر تعیین توالی و به کمک سرور BLAST مورد ارزیابی و شناسایی قرار گرفت (۶).

یافته ها:

از بین ۱۵۰ نمونه های خاک، هوا و سطوح، ۱۰ مورد باکتری با اثر مهارتی جداسازی شدند که از بین آن ها، باکتری با بیشترین قدرت مهارتی نسبت به قارچ های آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس فلاووس و موکور هیمالیس رشد کرده بر روی محیط کشت سابورو دکستروز آگار انتخاب شد.

در بررسی کیفی، مهارت رشد شعاعی کلنی قارچ های آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس فلاووس و موکور هیمالیس توسط باکتری مورد نظر نشان دهنده توانایی باکتری در مهار قارچ های مذکور بود (تصویر شماره ۱).

باکتری با بیشترین اثر مهارتی جدا و جهت شناسایی آن از تست های بیوشیمیایی از قبیل کاتالاز، سیترات، هیدرولیز ژلاتین، تحرک، MR، VP، همولیز بتا و تولید اسید از گلوکز استفاده شد (۱۹).

همچنین شناسایی مولکولی باکتری به روش ریوتایپینگ انجام گرفت. در این روش جهت تکثیر ژن کد کننده 16S-rRNA، از یک کلنی رشد کرده بر روی محیط کشت نوترینت آگار نمونه برداری و جهت انجام کلنی-PCR به عنوان الگو بکار گرفته شد. واکنش PCR در حضور یک واحد آنزیم Taq پلیمرز، پرایمرهای جلوبر و معکوس یونیورسال با غلظت نهایی 0.4 μM از هر کدام، dNTP با غلظت نهایی 200 μM، MgCl2 با غلظت نهایی 1.5mM و غلظت 1X بافر PCR بهینه سازی شد. توالی پرایمرهای یونیورسال ORBU1(5'-AGGAGGTGATCCAACCGCA-3') OFBU1(5'-AACTGGAGGAAGGTGGGGAT-3') بود. مراحل زمانی جهت انجام PCR طی ۳ مرحله صورت گرفت. مرحله ی اول بصورت یک سیکل به مدت ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد، مرحله ی دوم به تعداد ۳۵ سیکل به مدت ۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی گراد، ۴۵ ثانیه در ۵۸ درجه سانتی گراد و



(ج)

(ب)

(الف)

تصویر شماره ۱: تأثیر مهارتی باکتری جداسازی شده بر رشد قارچ های پاتوژن پس از ۹۶ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد (سمت راست)، شاهد (سمت چپ)، الف. قارچ موکور هیمالیس، ب. قارچ آسپرژیلوس فلاووس، ج. قارچ آسپرژیلوس نایجر.

به ترتیب در جداول های ۱، ۲ و ۳ در زمان های مختلف مشاهده می شود. با توجه به کند رشد بودن قارچ ها، پس از گذشت ۲۴ ساعت نتایج قابل ملاحظه ای مشخص نشد، اما

نتایج مربوط به میزان رشد باکتری از مرکز و فاصله قارچ و باکتری از هم (ناحیه مهارتی) به روش کشت خطی در فواصل (۱ و ۰/۵)، (۲ و ۱/۵)، (۳ و ۲/۵) سانتی متری

تا ۳ سانتی متر بود. مقایسه ی ستون نتایج حاصل از اندازه گیری ناحیه ی مهارى نسبت به ستون نتایج رشد قارچ ها در عدم حضور باکتری، به وضوح مهار رشد قارچ ها در تمام فواصل ۰/۵-۳ سانتی متر را نشان می دهد (جدول شماره ۱-۳).

مقایسه ی نتایج فعالیت مهارى باکتری مورد نظر پس از گذشت ۹۶ ساعت نسبت به قارچ های ساپروفیت مذکور نشان دهنده ی قدرت مهارى باکتری بر قارچ های آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس فلاووس و موکور هیمالیس در تمام فواصل از ۰/۵

جدول شماره ۱: اثر مهارى باکتری بر روی رشد قارچ ها در فواصل ۱ و ۰/۵ سانتی متری (از راست به چپ)

فاصله ی بین قارچ و مرکز (میلی متر)	فاصله ی بین قارچ و باکتری (ناحیه مهارى) (میلی متر)	رشد باکتری از مرکز (میلی متر)	زمان (ساعت)	قارچ های پاتوژن
تشخیص داده نشد.	تشخیص داده نشد.	تشخیص داده نشد.	۲۴	آسپرژیلوس نایجر
۰	۱	۲	۴۸	
۰	۱	۲	۷۲	
۰	۰	۲	۹۶	
تشخیص داده نشد.	تشخیص داده نشد.	تشخیص داده نشد.	۲۴	آسپرژیلوس فلاووس
۰	۵	۳	۴۸	
۰	۴	۳	۷۲	
۰	۲	۳	۹۶	
تشخیص داده نشد.	تشخیص داده نشد.	تشخیص داده نشد.	۲۴	موکور هیمالیس
کاملاً پلیت را پوشاند.	۱	۲	۴۸	
کاملاً پلیت را پوشاند.	۱	۲	۷۲	
کاملاً پلیت را پوشاند.	۱	۲	۹۶	

جدول شماره ۲: اثر مهارى باکتری بر روی رشد قارچ ها در فواصل ۲ و ۱/۵ سانتی متری (از راست به چپ)

فاصله ی بین قارچ و مرکز (میلی متر)	فاصله ی بین قارچ و باکتری (ناحیه مهارى) (میلی متر)	رشد باکتری از مرکز (میلی متر)	زمان (ساعت)	قارچ های پاتوژن
تشخیص داده نشد.	تشخیص داده نشد.	تشخیص داده نشد.	۲۴	آسپرژیلوس نایجر
۳	۷	۴	۴۸	
۱	۲	۴	۷۲	
۰	۱	۴	۹۶	
تشخیص داده نشد.	تشخیص داده نشد.	تشخیص داده نشد.	۲۴	آسپرژیلوس فلاووس
۷	۱۳	۷	۴۸	
۳	۹	۷	۷۲	
۰	۵	۷	۹۶	
تشخیص داده نشد.	تشخیص داده نشد.	تشخیص داده نشد.	۲۴	موکور هیمالیس
کاملاً پلیت را پوشاند.	۵	۶	۴۸	
کاملاً پلیت را پوشاند.	۵	۶	۷۲	
کاملاً پلیت را پوشاند.	۵	۶	۹۶	

جدول شماره ۳: اثر مهارتی باکتری بر روی رشد قارچ ها در فواصل ۳ و ۲/۵ سانتی متری (از راست به چپ)

فاصله ی بین قارچ و باکتری (ناحیه مهارتی) (میلی متر)	فاصله ی بین قارچ و باکتری (ناحیه مهارتی) (میلی متر)	رشد باکتری از مرکز (میلی متر)	زمان (ساعت)	قارچ های پاتوژن
تشخیص داده نشد.	تشخیص داده نشد.	تشخیص داده نشد.	۲۴	آسپرژیلوس نایجر
۱۳	۱۱	۵	۴۸	
۱	۱۱	۵	۷۲	
۰	۱۱	۵	۹۶	
تشخیص داده نشد.	تشخیص داده نشد.	تشخیص داده نشد.	۲۴	آسپرژیلوس فلاووس
۱۷	۲۰	۴	۴۸	
۱۲	۱۸	۴	۷۲	
۷	۱۸	۴	۹۶	
تشخیص داده نشد.	تشخیص داده نشد.	تشخیص داده نشد.	۲۴	موکور هیمالیس
کاملاً پلیت را پوشاند.	۶	۴	۴۸	
کاملاً پلیت را پوشاند.	۶	۴	۷۲	
کاملاً پلیت را پوشاند.	۶	۴	۹۶	

تولید ترکیبات بیوکنترل کاملاً وابسته به پارامترهایی نظیر مکان و خصوصیات فیزیولوژیک ارگانیسم (نظیر گونه، وارسته و سیکل رشد آن)، موقعیت جغرافیایی و ترکیبات خاک است؛ لذا جداسازی باکتری ها از مناطق جغرافیایی متفاوت ممکن است شانس یافتن منبعی با طیف وسیعی از ترکیبات ضد قارچی را افزایش دهد (۶).

در این تحقیق غربالگری باکتری های مهارکننده ی جداسازی شده از خاک، هوا و سطوح مختلف نسبت به رشد قارچ های ساپروفیت آسپرژیلوس نایجر PTCC 5010، آسپرژیلوس فلاووس PTCC 5006 و موکور هیمالیس PTCC 5292 با هدف یافتن باکتری با توان تولید متابولیت های ضد قارچی فعال انجام شد. باکتری با بیشترین اثر مهارتی بر قارچ های مذکور به کمک تست های بیوشیمیایی و مولکولی باسیلوس آتروفئوس سویه ی HNSQJYH170 تشخیص داده شد.

تست های بیوشیمیایی انجام شده برای باکتری مهارتی مورد نظر شامل سترات +، کاتالاز +، هیدرولیز ژلاتین +، تحرک +، MR-، VP+، همولیز بتا + و تولید اسید از گلوکز + بود.

با انجام روش مولکولی کلنی-PCR، باکتری مورد نظر با بیشترین نزدیکی، باسیلوس آتروفئوس سویه ی HNSQJYH170 شناسایی شد.

بحث:

از میکروارگانیسم ها در تخمیر، تجزیه ی زیستی، کنترل حشرات و کنترل بیماری های گیاهی استفاده می شود. میکروارگانیسم ها قادرند آنتی بیوتیک هایی تولید کنند که قدرت مهار باکتری ها و قارچ ها را دارند. امروزه با پیشرفت بیوتکنولوژی پزشکی، بیشتر آنتی بیوتیک های موجود در نتیجه تغییرات ساختمانی بر روی آنتی بیوتیک های طبیعی حاصل شده اند (۱۴، ۲۰).

تحقیقات انجام شده توسط محققان نشان داده که جنس های *باسیلوس*، *لاکتوباسیلوس*، *سودوموناس*، *استریتومایسس*، *اکتینومیست* و *آگروباکتریوم* نقش موثری در کنترل زیستی و تولید دارو دارند که به عنوان جنس های اصلی تولیدکننده ی متابولیت های ضد قارچی در نظر گرفته می شوند. در این مطالعه بیشترین گروه باکتریایی جداسازی شده از خاک به جنس *باسیلوس* تعلق داشت (۲۱).

در این تحقیق فعالیت مهاري باکتری *باسیلوس آتروفئوس* سویه ی HNSQJYH170 نسبت به قارچ های *آسپرژیلوس نایجر*، *آسپرژیلوس فلاووس* و *موکور هیمالیس* پس از گذشت ۲۴ ساعت مشخص نشد که احتمالاً به دلیل کشت همزمان باکتری و قارچ بوده است و باکتری فرصت کافی برای تولید متابولیت را نداشته است؛ در حالی که اثر مهاري پس از گذشت زمان های ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت قابل اندازه گیری و بررسی بود. باکتری *باسیلوس آتروفئوس* سویه ی HNSQJYH170 جداسازی شده قادر بود، در تمام فواصل مورد بررسی، قارچ های مذکور را مهار کند. این مهار احتمالاً به دلیل توانایی باکتری *باسیلوس آتروفئوس* سویه ی HNSQJYH170 در تولید متابولیت پس از گذشت ۴۸ ساعت بوده، به طوری که پس از این زمان ناحیه ی مهاري به وضوح مشخص و قابل اندازه گیری بود.

محققان در بررسی میکسوباکتری های موجود در خاک، ترکیبی به نام *دیزورازول A* را جداسازی کردند که قادر به مهار رشد *آسپرژیلوس نایجر* و *موکور هیمالیس* بود (۲۲). در تحقیق حاضر باکتری جداسازی شده از خاک به جنس *باسیلوس* تعلق داشت و این باکتری قادر بود علاوه بر مهار رشد *آسپرژیلوس نایجر* و *موکور هیمالیس*، *آسپرژیلوس فلاووس* را نیز مهار کند. محققان دیگری نیز به متابولیت هایی از *باسیلوس پامیلوس* دست یافتند که قادر به مهار رشد *آسپرژیلوس نایجر* بودند، ولی توانایی مهار *آسپرژیلوس فلاووس* را نداشتند (۲). در این

تحقیق باکتری *باسیلوس آتروفئوس* جداسازی شد که بر خلاف *باسیلوس پامیلوس* جداسازی شده توسط *Munimbazi* و *Bullerman* قادر به مهار هر یک از ۳ قارچ *آسپرژیلوس نایجر*، *آسپرژیلوس فلاووس* و *موکور هیمالیس* بود؛ همچنین *Narayana* و همکاران *استریتومایسس آلیدوفلاووس* را از خاک سرخ جداسازی کردند که این باکتری قادر به تولید ترکیبی ضد قارچی به نام ۳- فنیل پروپیونیک اسید بود که اثر مهاري بر رشد قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* نشان داد (۱۱). *Narayana* و همکاران با جداسازی از خاک سرخ به بررسی *استریتومایسس آلیدوفلاووس* پرداختند؛ در حالی که در تحقیق حاضر نمونه برداری وسیع تری انجام گرفت. خاک های مختلف از مناطق مختلف شهر اصفهان تهیه و بررسی شد؛ همچنین نمونه برداری از هوا و سطوح گوناگون نیز انجام گرفت. جنس های جداسازی شده متعلق به جنس *باسیلوس* بود. رنجبریان و همکاران با بررسی ۱۴۸ نمونه از خاک مناطق مختلف تهران، تعدادی باکتری مهاري را جداسازی کردند که اکثر آن ها متعلق به جنس *باسیلوس* بودند و اثر مهاري علیه قارچ *آسپرژیلوس نایجر* را نشان دادند (۶). *Svanstrom* و همکاران با کار بر روی باکتری های *لاکتیک* اسید به ترکیباتی با خواص ضد قارچی دست یافتند که از جمله ی این ترکیبات فنیل *لاکتیک* اسید بود که خاصیت مهاري آن بر قارچ *آسپرژیلوس نایجر* نشان داده شد (۲۳). مشافی و همکاران با جداسازی گونه ای از *باسیلوس* از خاک پارک ها و مناطق سرسبز کرمان به بررسی تأثیر آن بر قارچ های *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس فلاووس* با روش چاهک و تعیین قطر هاله ی عدم رشد، پرداختند (۲۴). این در حالیست که در تحقیق حاضر علاوه بر بررسی قارچ های *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس فلاووس*، اثر مهاري *باسیلوس* جداسازی شده از خاک بر *موکور هیمالیس* نیز گزارش شد. ابراهیمی پور و همکاران با جداسازی *باسیلوس لیکنی فورمیس* از خاک های آلوده ی نفتی

بر علیه قارچ های پاتوژن می باشد. تحقیقات آینده در ارتباط با تشخیص متابولیت های ضد قارچی این باکتری و مکانیسم عمل آن ها مد نظر خواهد بود.

نتیجه گیری:

در این تحقیق فعالیت مهارتی باکتری باسیلوس آتروفئوس سویه ی HNSQJYH170 نسبت به قارچ های آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس فلاووس و موکور هیمالیس برای اولین بار ثابت شد. این باکتری از خاک اصفهان جداسازی شد که در این راستا بر اساس نتایج چشمگیر بر علیه عوامل قارچی فوق الذکر به عنوان یک منبع طبیعی ارزشمند حاوی ترکیبات ضد قارچی مطرح می باشد. احتمالاً متابولیت هایی نظیر ترکیبات تولید شده توسط باسیلوس ها از قبیل ایتورین A، ریزوکنسین A، باسروئتین، زونیترومایسین A، فونجیسین، سورفکتین و آنزیم ها عامل مهار رشد قارچ های ساپروفیت مذکور می باشند. بر اساس میزان قدرت مهار امکان وجود ترکیبات ضد قارچی مشابه به میزان بیشتر و یا متابولیت های جدید در این سویه وجود دارد. این متابولیت ها می توانند به عنوان زیست پالایی، همچنین آنتی بیوتیک استفاده شوند.

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از کلیه پرسنل آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان که امکانات لازم جهت اجرای این مطالعه را فراهم نمودند، تقدیر و تشکر به عمل می آید. لازم به ذکر است این مقاله مستخرج از پایان نامه شماره ۱۷۹۱۲۰۱۷۹۱۲۰۵۰۷۲۳۰ مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان می باشد.

اهواز، بیان نمودند پروتاز باکتری به عنوان یک بیوکاتالیک برای سنتز آنزیمی قابل استفاده است (۲۵). در تحقیق حاضر یک باکتری با توانایی مهار قارچ های ساپروفیت از خاک اصفهان جدا شد، امید است با تشخیص متابولیت های ضد قارچی آن بتوان کمک شایانی به تهیه آنتی بیوتیک جهت درمان عفونت های انسانی همچین زیست پالایی محیط زیست نمود. Ogunbanwo و Omowumi با جداسازی گونه های باسیلوس از خاک و ادویه های مختلف به عنوان یک عامل در کنترل بیولوژیکی، به بررسی اثر ضد قارچی آن ها بر روی قارچ هایی از قبیل آسپرژیلوس نایجر و آسپرژیلوس فلاووس پرداختند (۲۶). البته میزان تولید و نوع آنتی بیوتیک هایی که توسط باکتری ها تولید شده، تحت تأثیر فاکتورهایی از قبیل منابع کربن، نیتروژن و غیره بود. از جمله تحقیقات دیگری که توسط امین و همکاران در ایران انجام گرفت، جداسازی گونه های باسیلوس از خاک بود که در این مطالعه فعالیت مهارتی باسیلوس های جداسازی شده بر روی بعضی ارگانسیم های گرم مثبت و گرم منفی نشان داده شد (۲۷). در تحقیق حاضر باکتری باسیلوس آتروفئوس بومی اصفهان با قدرت مهارتی قابل توجه علیه قارچ های آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس فلاووس و موکور هیمالیس شناسایی شد. با توجه به دامنه وسیع تر تأثیر این سویه بر علیه قارچ های پاتوژن همچین قدرت مهارتی بیشتر آن نسبت به گزارش های مشابه امکان وجود ترکیبات ضد قارچی به میزان بیشتر و یا جدید در این سویه وجود دارد؛ بنابر این باکتری جدا شده در این مطالعه یک منبع طبیعی ارزشمند حاوی ترکیبات فعال

منابع:

1. Al-Bayati FA, Al-Mola HF. Antibacterial and antifungal activities of different parts of *Tribulus terrestris* L. growing in Iraq. J Zhejiang Univ Sci B. 2008; 9(2): 154-9.

2. Munimbazi C, Bullerman LB. Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of *Bacillus pumilus*. J Appl Microbiol. 1998; 84(6): 959-68.
3. Rippon JW. Medical mycology; the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes: Eastbourne, UK: WB Saunders Company; 1982.
4. Shadzi Sh. Medical mycology, 9th ed. Isfahan: Jahad daneshgahi Pub; 2005. [Persian]
5. Emami M. Kordbacheh P. Moghadami M. Zeyni F. Medical mycology. Tehran: Tehran University Pub; 1991. [Persian]
6. Ranjbariyan A, Shams-Ghahfarokhi M, Kalantari S, Razzaghi-Abyaneh M. Molecular identification of antagonistic bacteria from Tehran soils and evaluation of their inhibitory activities toward pathogenic fungi. Iran J Microbiol. 2011; 3(3): 140-6.
7. Strom K, Sjogren J, Broberg A, Schnurer J. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo (L-Phe-L-Pro) and cyclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. Appl Environ Microbiol. 2002; 68(9): 4322-7.
8. Cui TB, Chai HY, Jiang LX. Isolation and partial characterization of an antifungal protein produced by *Bacillus licheniformis* BS-3. Molecules. 2012; 17(6): 7336-47.
9. Zamani M, Sharifi Tehrani A, Ahmadzadeh M, Ali Abadi AA. Evaluation of production of some antifungal metabolites by fluorescent pseudomonads in vitro and their inhibitory effect on *Penicillium digitatum* in semi-commercial condition. Commun Agric Appl Biol Sci. 2007; 72(4): 935-9.
10. Maddox CE, Laur LM, Tian L. Antibacterial activity of phenolic compounds against the phytopathogen *Xylella fastidiosa*. Curr Microbiol. 2010; 60(1): 53-8.
11. Narayana KJ, Prabhakar P, Vijayalakshmi M, Venkateswarlu Y, Krishna PS. Biological activity of phenylpropionic acid isolated from a terrestrial *Streptomyces*. Pol J Microbiol. 2007; 56(3): 191-7.
12. Chitarra GS, Breeuwer P, Nout MJ, Van Aelst AC, Rombouts FM, Abee T. An antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* YM 10-20 inhibits germination of *Penicillium roqueforti* conidiospores. J Appl Microbiol. 2003; 94(2): 159-66.
13. Kugler M, Loeffler W, Rapp C, Kern A, Jung G. Rhizocticin A, an antifungal phosphono-oligopeptide of *Bacillus subtilis* ATCC 6633: Biological properties. Arch Microbiol. 1990; 153(3): 276-81.
14. Stabb EV, Jacobson LM, Handelsman J. Zwittermicin A-producing strains of *Bacillus cereus* from diverse soils. Appl Environ Microbiol. 1994; 60(12): 4404-12.
15. Kerr JR. Bacterial inhibition of fungal growth and pathogenicity. Microb Ecol Health Dis. 1999; 11(3): 129-42.
16. Cherif A, Sadfi-Zouaoui N, Eleuch D, Dhahri ABO, Boudabous A. Pseudomonas isolates have in vitro antagonistic activity against the dermatophytes *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes var interdigitale* and *Microsporum canis*. J Med Mycol. 2009; 19(3): 178-84.
17. Hua SST, Baker JL, Flores-Espiritu M. Interaction of saprophytic yeasts with a nor mutant of *Aspergillus flavus*. Appl Environ Microbiol. 1999; 65(6): 2738-40.
18. Tenorio-Salgado S, Tinoco R, Vazquez-Duhalt R, Caballero-Mellado J, Perez-Rueda E. Identification of volatile compounds produced by the bacterium *Burkholderia tropica* that inhibit the growth of fungal pathogens. Bioengineered. 2013; 4(4): 236-43.
19. Ramyasmruthi S, Pallavi O, Pallavi S, Tilak K and Srividya S. Chitinolytic and secondary metabolite producing *Pseudomonas fluorescens* isolated from Solanaceae rhizosphere effective against broad spectrum fungal phytopathogens. Asian J Plant Sci Res. 2012; 2(1): 16-24.
20. Vicente MF, Basilio A, Cabello A, Pelaez F. Microbial natural products as a source of antifungals. Clin Microbiol Infect. 2003; 9(1): 15-32.

21. Ongena M, Jacques P. Bacillus lipopeptides: Versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends Microbiol. 2008; 16(3): 115-25.
22. Irschik H, Jansen R, Gerth K, Hofle G, Reichenbach H. Disorazol A, an efficient inhibitor of eukaryotic organisms isolated from myxobacteria. J Antibiot. 1995; 48(1): 31-5.
23. Svanstrom A, Boveri S, Bostrom E, Melin P. The lactic acid bacteria metabolite phenyllactic acid inhibits both radial growth and sporulation of filamentous fungi. BMC Res Notes. 2013; 6: 464.
24. Moshafi MH, Forootanfar H, Ameri A, Ameri A, Shakibaie M, Dehghan-Noudeh G, et al. Antimicrobial activity of Bacillus sp. strain FAS₁ isolated from soil. Pak J Pharm Sci. 2011; 24(3): 269-75.
25. Ebrahimipour Gh, Sadeghi H, Khosravi babadi Z, Amiri S. Identification of a bacterium isolated from soil of Ahvaz contaminated by oil and determination of its protease stability in organic solvents. Jundishapur J Microbiol. 2013; 6(2): 105-11.
26. Omowumi O, Ogunbanwo A. Antifungal activities of Bacillus subtilis isolated from some condiments and soil. Afr J Microbiol Res. 2014; 8(18): 1841-9.
27. Amin M, Rakhisi Z, Zarei Ahmady A. Isolation and identification Bacillus species from soil and evaluation of their antibacterial properties. Avicenna J Clin Microb Infec. 2015; 2(1): e23233.

Isolation and identification of inhibitory bacteria against pathogenic fungi from Isfahan using molecular method

Naghdifar SH¹, Madani M^{1*}, Ahadi AM²

¹Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

²Department of Genetics, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

Received: 4/Jul/2015 Accepted: 26/Dec/2015

Background and aims: *Bacillus spp.* are sources of antifungal metabolites with the potential use of preventing fungal infection. This study was aimed to identify and isolate inhibitory bacterium against pathogenic fungi in Isfahan using molecular method.

Methods: In this cross-section descriptive, 150 samples (soil, air, and surface) from different parts of Isfahan were prepared and investigated the effect of inhibitory bacteria grown on nutrient agar medium on the growth of *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* and *Mucor hiemali*. Qualitative investigation of fungal growth inhibition was done by inoculation methods, and quantitative evaluation was conducted using linear culturing in distance of 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 and 3 cm of fungal suspension (10^4 spore/ μ l) from the center of plates (bacterial inoculation, 0.5 Macfarland). Samples were incubated in 30°C for 96 hours and identification of the inhibitory bacterium was done according to biochemical tests and molecular method of colony-PCR.

Results: The effect of inhibitory bacteria against *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* and *Mucor hiemali* was from 0.5 to 3 cm. According to biochemical tests and colony-PCR, the bacterium with the most inhibitory effect was *Bacillus atrophaeus* strain HNSQJYH170.

Conclusion: *Bacillus atrophaeus* strain HNSQJYH170 is endemic in Isfahan and can be used in antibiotic production and biological control.

Keywords: *Bacillus atrophaeus*, Pathogenic Fungi, Antifungal activity, Colony-PCR.

Cite this article as: Naghdifar SH, Madani M, Ahadi AM. Isolation and identification of inhibitory bacteria against pathogenic fungi from Isfahan using molecular method. J Shahrekord Univ Med Sci. 2016; 18(5): 83-93.

***Corresponding author:**

Department of Microbiology., Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, I.R. Iran.
Tel: 00989134097629, E-mail: mmadani66@gmail.com