

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

غلامعباس کاظمی<sup>۱\*</sup>، دکتر مریم تاج آبادی ابراهیمی<sup>۲</sup>، دکتر حسن جلیلی<sup>۳</sup>، مهسا دمشقیان<sup>۴</sup>، لیلا شریف پور<sup>۵</sup>  
<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی - دانشکده علوم - دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات اراک، اراک، ایران  
<sup>۲</sup> استادیار دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران  
<sup>۳</sup> استادیار دانشکده علوم و فنون، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه تهران، تهران، ایران  
<sup>۴</sup> مربی دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران  
<sup>۵</sup> دبیر زبان انگلیسی، آموزش پرورش منطقه ۲ تهران، تهران، ایران

### چکیده:

**سابقه و هدف:** هدف از این تحقیق شناسایی و جدا سازی باکتری های ترموفیل از چشمه آب گرم دالاکو واقع در استان بوشهر به روش بیوشیمیایی و مولکولی و بررسی خواص آنزیمی، ضد باکتریایی و ضد قارچی سویه های جدا شده می باشد.

**مواد و روش ها:** نمونه برداری از سطح آب، لجن و عمق ۱ متری در شرایط استریل انجام شد. نمونه ها به مدت یک هفته گرما گذاری و سپس باکتری های رشد کرده خالص سازی شدند. شناسایی به دو روش بیوشیمیایی و مولکولی انجام شد. خواص ضد باکتریایی علیه باکتری های اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس به روش کدورت سنجی و خواص ضد قارچی براساس قدرت بازدارندگی علیه آسپرژیلوس نایجر<sup>۱</sup> مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته ها:** ۱۲ سویه (A1-A12) جدا سازی و خالص سازی شدند. سویه های A1، A8، A9، A11 و A12 ۱٪ نمک کلرید سدیم را تحمل کردند. سویه های A1 و A11 توانایی رشد در pH=۳-۱۲ و دمای ۵۶-۲۰ درجه سانتی گراد داشتند. نتایج اثر ضد باکتریایی علیه استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد که در سویه های A5، A6، A7، A10، A11، A9، A12 با افزایش غلظت عصاره سویه ها از ۵٪ به ۲۰٪، خاصیت ضد باکتریایی به صورت معنی دار افزایش یافت. در حالیکه تنها سویه A12 سبب مهار رشد اشرشیا کلی در غلظت ۲۰٪ شد. موثر ترین سویه علیه قارچ آسپرژیلوس A2 و A6 بود. با توجه به توان رشد سویه A11 در طیف وسیع دما، pH و همچنین ارجحیت توانایی آنتاگونیستی، ترادف ناحیه ۱۶ SrDNA مذکور تکتیرو توالی یابی شد. بر این اساس سویه A11 با تشابه ۹۸٪ با سیلوس سویتی لیس زیر گونه آسپیززنی NRRL (کد رهگیری |48269| Icl) شناسایی شد.

**نتیجه گیری:** باکتری های ترموفیل به دلیل اثر ضد باکتریایی و ضد قارچی در تحقیقات آینده گزینه مناسبی در زمینه درمان بیماریها و مبارزه میکروبی می باشند.

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

### مقدمه:

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 این گونه چشمه ها، شهرت و اهمیت یافته اند. برخی از چشمه های آب گرم ها به علت داشتن پاره های مواد شیمیایی، دارای رنگ، بو یا مزه خاصی می شوند. برخی ترکیبات گوگرد (سولفور و سولفات) به آب رنگ شیرینی یا آبی می دهند و آبی

چشمه ی آب گرم، به چشمه های اطلاق می شود که گرمای آب آن بالاتر از اندازه های معمول (۳۷ درجه سانتی گراد)، دارای برخی نمکها و مواد معدنی است و گاه اثر درمانی دارد. آب از اعماق زمین سرچشمه می گیرد و

آدرس نویسنده مسئول: گروه میکروبیولوژی - دانشکده علوم - دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات اراک، اراک، ایران  
Email: Kazemi4949@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۱۱/۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۸

<sup>۱</sup> *Aspergillus niger*

<sup>۲</sup> *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* strain NRRL

که ئیدروژن سولفورده داشته باشد، بوی تخم مرغ فاسد دارد. آب گرم های دارای ترکیبات آهن، رنگ سرخ دارند. نمک های دیگر، مانند کلرور سدیم (نمک طعام) و یدور سدیم، آب را شور یا تلخ می سازند (۱۴، ۱۶، ۶). این چشمه ها به دلیل وجود باکتری هایی که سازگار با این محیط ها هستند تولید آنزیم ها، مواد شیمیایی ضد میکروبی مختلف می کنند که هر کدام از آنها خواص ویژه خود را دارند و بررسی و شناسایی آنها دارای اهمیت فوق العاده ای است. به عنوان مثال، بعضی از این باکتریها تولید مواد ضد قارچی می کنند که حضور این مواد در این چشمه ها باعث درمان بیماریهای قارچی پوستی می شود (۱۷، ۱۶). ترموفیل ها گروهی از میکروب ها هستند که در دمای بالا ماهیت شان عوض نمی شود بلکه فعال هم می شوند. آنزیم های این میکروارگانیسم ها نظر دانشمندان سر تا سر دنیا را به خود جلب کرده است. زیرا این آنزیم ها به واکنش گر های شیمیایی و مقادیر pH بالا در مقایسه با همولوگ مزوفیلیک مقاوم هستند. به علاوه مطالعه بر روی خواص درمانی، ضد سرطانی، ضد میکروبی و نقش آن ها در صنایع پتروشیمی، داروسازی، نفت و پاکسازی فلزات سنگین از محیط زیست بسیار با اهمیت می باشد (۱، ۲، ۷، ۹، ۱۱، ۱۲). شناخت خواص درمانی آب های گرم و معدنی و بهره گیری از آنها پیشینه ای بسیار کهن دارد، به طوری که زمان آغاز این امر به درستی روشن نیست. چنین می نماید که ساکنان مناطق پیرامون چشمه های آب گرم در نتیجه آزمون های مکرر به خواص این آب ها پی برده اند. چشمه ی آبگرم دالاکو در ۱۳ کیلومتری شهر برازجان در استان بوشهر قرار دارد. سه چشمه در این منطقه نزدیک به هم با آبها و ویژگی های متفاوت مشاهده می شود. اولین چشمه دارای آب شفاف ترو بیشتر برای آبیاری نخل ها استفاده می شود نخل های که با این چشمه آبیاری می شوند کیفیت رطب بهتری دارند ولی از نظر اندازه ریز می باشند. دومین چشمه، بالاتر از چشمه اول قرار دارد و زمستان از آن بخار ساطع می شود. در سطح آب، لکه

های نفتی و در برخی از قسمت های آن موجودات کرمی شکلی مشاهده می شود. آب سومین چشمه، چرب و رنگ آن متمایل به سفیداست. در این چشمه حباب هایی در سطح مشاهده می شود که به نظر می رسد مربوط به گاز است. در تحقیقات محلی که از چشمه های آب گرم صورت گرفت از این چشمه هادر درمان بیماری های رماتیسمی و مفصلی، بیماری های قارچی و التیام زخم ها بسیار استفاده شده است. هدف از این تحقیق شناسایی، جدا سازی و بررسی توانایی ضد میکروبی باکتری های ترموفیل چشمه ی آب گرم دالاکو واقع در استان بوشهر به دو روش بیوشیمیایی و مولکولی است.

### مواد و روش ها:

چشمه اب گرم دالاکو واقع در استان بوشهر به عنوان محلی برای جداسازی باکتری های 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 ۱ ml از هر نمونه به وسیله سرنگ های استریل برداشته و به بطری های محتوی ۱۰ ml محیط کشت استریل (نوترین برات) 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، ۱۰ میلی لیتر از نمونه به بطری شامل ۱۰۰ ml کشت نوترین برات منتقل شد. نمونه ها به مدت یک هفته در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و pH=۸/۶ در انکوباتور شیکر دار (۹۰ rpm) 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 شد باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC ۶۴۵۴۲) و اشرشیا کلی (ATCC ۲۱۴۳) در محیط بی اچ آی برات یا نوترین برات به مدت ۲۴ ساعت در شرایط هوازی و دمای ۳۷ °C انکوبه شدند. پس از آن باکتری های اندیکاتور که در فاز لگاریتمی رشد قرار گرفتند به میزان ۱٪

با توالی ۳'-CAKAAAGGAGGTGATCC-۵' R: ۶۳۰ و ۳'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-۵' 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 (با غلظت ۳۰۰ ng/ml یا کمتر)، ۱۰ ng/ml از پرایمرهای ۶۳۰V و ۶۱۶R، ۲ ماکرولیتر (۵۰mM) MgCl<sub>2</sub>، ۰.۵ ماکرولیتر dNTP (۱۰mM)، ۲.۵ ماکرولیتر از بافر ۱۰ x PCR، ۰.۳ ماکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase ۵۰۰ u (۵ u/ml) (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 EDTA ۰.۵ mM، PH=۸.۵ و ۴۴.۵ mM Tris/Borate) ساخته شده بود، الکتروفورز گردید و نهایتاً با رنگ اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد و با نور UV مورد بررسی قرار گرفت. نمونه های تک باند و واضح را در ناحیه ۱۲۵۰ bp 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 NCBI مورد 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. میکروآگانیسم ها با توجه به کتاب مرجع برگگی باسیلوس شناسایی شدند. نتایج آزمون های

به محیط کشت نوترین براث تلقیح شدند. در مرحله بعد، ابتدا عصاره ی خنثی<sup>۳</sup> سوپه ها ی مورد آزمایش راتهییه شد. بدین صورت که ایزوله ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴۰ °C گرمخانه گذاری شدند. سپس این کشت ها به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۵۰۰ rpm در دمای ۴ °C سانتریفیوژ شدند و مایع رویی از توده باکتریایی جدا شد. عصاره ها با عبور از فیلتر ۰/۲ μ استریل شدند. وبا غلظت های ۰.۵٪، ۱.۰٪، ۱.۵٪، ۲.۰٪ از عصاره ی باسیلوس به محیط کشت نوترین براث اضافه شد.

در مرحله ی آخر محیط نوترین براث (شامل باکتری اندیکاتور و عصاره سوپه ها) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به 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 سوپه های مورد آزمایش، تکه ای از محیط کشت قارچ به همراه اسپور ها به ابعاد چند میلی متر از محیط جدا نموده و در مرکز پلیت حاوی محیط کشت سوپه مورد نظر قرار داده (کشت همزمان) و به مدت یک هفته در گرم خانه ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد (۲۰، ۱۵، ۸).

**شناسایی بیوشیمیایی و ملکولی:** شناسایی سوپه های جدا شده با استفاده از روش های بیوشیمیایی و ملکولی انجام شد. الف- شناسایی بیوشیمیایی:

در روش بیوشیمیایی بر اساس صفات شکلی کلنی ها و آزمون های بیوشیمیایی مانند توانایی رشد در دما های مختلف، توانایی رشد در pH های ۲ تا ۱۲، توانایی رشد در غلظت نمک (۲٪ تا ۲۰٪)، تخمیر قندهای مختلف، تولید اندول، مصرف سیترات، توانایی حرکت، تست اکسیداز، تست کاتالاز و تست MRVP شناسایی شدند.

#### ب- شناسایی ملکولی

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

استخراج DNA با استفاده از کیت MBST<sup>۴</sup> انجام شد. جهت تکثیر ناحیه ۱۶ rDNA از پرایمر های R ۶۳۰ و V ۶۱۶،

<sup>۳</sup> supernatant

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	اوراز
A1	+	+	-	+	-	-	+	+	-
A2	+	+	-	+	-	-	+	+	-
A3	+	+	-	+	-	-	+	+	-
A4	+	+	-	+	-	-	+	+	-
A5	+	+	-	+	-	-	+	+	-
A6	+	+	-	+	-	-	+	+	-
A7	+	+	-	+	-	-	+	+	-
A8	+	+	-	+	-	-	+	+	-
A9	+	+	-	+	-	-	+	+	-
A10	+	+	-	+	-	-	+	+	-
A11	+	+	-	+	-	-	+	+	-
A12	+	+	-	+	-	-	+	+	-

مقاومت و رشد در pHهای مختلف یکی از ویژگی‌ها پارامترهای 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 در pH های مختلف

نام باکتری	pH									
	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
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 درصد 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	نمک ۲٪	نمک ۵٪	نمک ۷٪	نمک ۱۰٪	نمک ۱۵٪	نمک ۲۰٪
A1	+	+	+	+	+	+
A2	+	+	+	+	ضعیف	-
A3	+	+	+	+	ضعیف	-
A4	+	+	+	ضعیف	ضعیف	-
A5	+	+	+	+	-	-
A6	+	+	+	ضعیف	ضعیف	-
A7	+	+	+	ضعیف	ضعیف	-
A8	+	+	+	+	+	+
A9	+	+	+	+	+	+
A10	+	+	+	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 دماهای متفاوت بسیار حائز اهمیت می باشد. جدول (۴) خلاصه فعالیت باکتری های جدا شده از چشمه آبگرم دالاکو رادر دماهای متفاوت نشان می دهد.

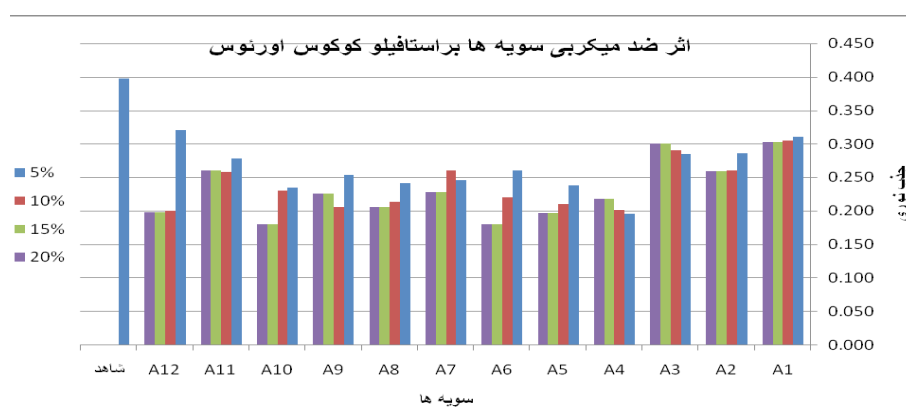
جدول ۴ - نمایش رشد باکتری های جدا شده در دماهای مختلف

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

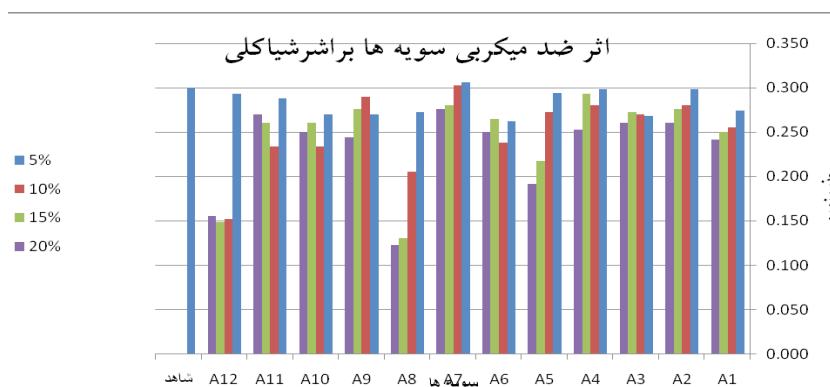
## تعیین ویژگی ضد میکروبی

### 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 و اشرشیا کلی در غلظت های مختلف عصاره ایزوله ها در نمودار های ۱ و ۲ نمایش داده شده است (۲۴،۲۳،۱۰).



نمودار ۱- 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 اسپرژیلوس نایجر انتخاب شد. نتایج بررسی خواص ضد قارچی ایزوله های جدا شده در جدول ۵ خلاصه شده است.

## 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 باشد و اکثر 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 باکتری های گرم مثبت و میله ای شکل می باشند. این گروه از باکتری ها بزرگترین و متنوع ترین گروه باکتری ها را تشکیل می دهند و در خانواده باسیلاسه<sup>۶</sup> طبقه بندی می شوند. این خانواده تولید اسپور درونی<sup>۷</sup> می کنند. در این جا می توان با تست های ساده ای مثل واکنش گرم واسپور، اکسیداز، کاتالاز، توانایی حرکت، احیاء نیترات، تست همولیز و رشد در شرایط بی هوازی ویا میکروآنروئوفیل باسیلوس ها را از سایر گونه های نزدیک تشخیص داد. نواحی ۱۶ SrDNA نواحی حفظ شده و بسیار 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 با سیل های گرم مثبت اسپوردار بودند. با بررسی تست های بیو شیمیایی، همان طور که در جدول ۱ مشاهده می شود، خصوصیات مورفولوژیکی میکروسکوپی و ماکروسکوپی در این سویه ها متنوع بود. در برخی سویه ها (A1, 7, 8, 9, 11) کلنی خشک و در سویه A3 کلنی بسیار کشدار 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

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

سویه های جدا شده از چشمه آب گرم دالاکی	اثر بازدارندگی بر اسپرژیلوس نایجر
A1	++
A2	++++
A3	++
A4	++
A5	+
A6	+++
A7	+
A8	+کم
A9	++
A10	-
A11	+
A12	+



شکل ۱- مهار رشد اسپرژیلوس نایجر توسط ایزوله های جدا شده از چشمه آب گرم

شناسایی ملکولی باکتری A11:

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 ۱۵۰۰ bp در سایت NCBI بلست شد (کد رهگیری |48269|). مقایسه ژنوم تکثیری نشان داد که باکتری A11 ۹۸٪ باسیلوس سوبتی لیس سوش اسپیی ززنی<sup>۵</sup> مشابهت دارد.

<sup>۶</sup> Bacillaceae

<sup>۷</sup> Endospore

<sup>۵</sup> Bacillus subtilis subsp. spizizenii strain NRRL B-23049



## 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, Beveridge T, Reysenbach J and A-L. a thermophilic hydrogen-oxidizing microaerophile from terrestrial hot springs in the Azores. IJSEM,2004; 54: 33-39.
- (3) Aimon 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, Norway. 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 Rapid Pcr. NCMBJ, 1390; 3: 33.
- (25) Schallmeyer 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