تعیین خواص ضدقارچی *Bacillus* sp. و *Staphylococcus haemolyticus* جدا شده از اسفنج بومی خلیج فارس

- **ماندانا زارعی***: گروه زیست فناوری دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران، صندوق پستی: ۷۵۱۶۹-۱۳۸۱۷
- **مرضیه جاهدی**: گروه زیست فناوری دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران، صندوق پستی: ۷۵۱۶۹-۱۳۸۱۷

تاریخ دریافت: آذر ١٣٩٦ تاریخ پذیرش: اسفند ١٣٩٦

چکیده

حضور تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌ها، درون مزوهیل بسیاری از گونه‌های اسفنج به‌اثبات رسیده است. هدف از این تحقیق تعیین خواص ضدقارچی باکتری‌های همراه با اسفنج بومی خلیج فارس می‌باشد که تاکنون در ایران گزارشی در این مورد ارائه نشده است. برای این منظور بافت مزوهیل اسفنج *Haliclonia simulanse* به‌دست آمده از آب‌های ساحلی استان بوشهر در رقت‌های مختلف در محیط کشت‌های مناسب تلقیح گردید. در غربال‌گری اولیه ۸ سویه به‌دست آمد که برای تعیین خواص ضدقارچی باکتری‌های جداشده، دو روش انتشار از دیسک و دیسک آگار علیه ۳ سویه قارچی *Rhizoctonia solani*، *Penicillium italicum* و *Fusarium oxysporum* مورد استفاده قرار گرفت. هم‌چنین تعیین ترکیبات عصاره متانولی با استفاده از GC-MS انجام شد. شناسایی مولکولی سویه‌های شماره ٤ و ٧ که بالاترین خواص ضدقارچی را داشتند مشخص نمود که سویه شماره ٤ بیش‌ترین شباهت را در حد ۹۸٪ با سویه *Bacillus* sp. (با فاصله ژنتیکی ۰/۰۰٤) و سویه شماره ٧ بیش‌ترین شباهت را در حد ۹۵٪ با سویه *Staphylococcus haemolyticus* (با فاصله ژنتیکی ۰/۰۲) دارا می‌باشند. سویه‌های شماره ٤ و ٧ به‌ترتیب با شماره‌های دسترسی KY31376 و KY71394 در NCBI ثبت شدند. در روش دیسک آگار *Bacillus* sp. با ایجاد هاله عدم رشد به قطر ۲۸/۳۳ میلی‌متر بیش‌ترین تاثیر ضدقارچی را بر گونه *R. solani* و *Staphylococcus haemolyticus* با ایجاد هاله عدم رشد به قطر ۲۷/٤۱ میلی‌متر بیش‌ترین تاثیر ضدقارچی را بر گونه *F. oxysporum* نشان دادند. در روش انتشار از دیسک نیز به‌ترتیب عصاره‌های متانولی سویه‌های *Bacillus* sp. و *Staphylococcus haemolyticus* بیش‌ترین تاثیر ضدقارچی را داشتند.

کلمات کلیدی: شناسایی مولکولی، عصاره متانولی، مزوهیل، بوشهر

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: zarei.mandana@yahoo.com

مقدمه

اسفنج‌ها از ساده‌ترین و قدیمی‌ترین جانوران پرسلولی به‌شمار می‌آیند که یاخته‌های بدن آن‌ها دارای سازماندهی سست بوده و بافت معینی تشکیل نمی‌دهند. این موجودات اغلب بی‌تقارن و دریازی بوده و تا حدودی قادر به‌حرکت می‌باشند (LE و همکاران، ۱۹۹۸). اسفنج‌ها ارتباط پیچیده‌ای با طیف بسیار متنوعی از میکروارگانیسم‌ها ازجمله باکتری‌ها، سیانوباکتری‌ها، آرکی‌باکتری‌ها، دینوفلاژله‌ها و ... دارند. اگر چه نسبت باکتری‌های هم‌زیست به‌طور چشمگیری از اسفنجی به اسفنج دیگر متفاوت است ولی معمولا" تعداد باکتری‌های موجود در اسفنج‌ها بیش‌تر از تعداد آن باکتری‌ها در ستون آبی اطراف اسفنج است (Webster و همکاران، ۲۰۰۱). میکروارگانیسم‌های هم‌زیست اسفنج طیف وسیعی از مزایا را برای اسفنج میزبان به‌دنبال دارند از جمله می‌توان به کسب مواد مغذی، تثبیت اسکلت اسفنج، فرآیندهای سوخت و ساز اضافی، حفاظت در برابر اشعه ماوراء بنفش و دفاع شیمیایی اشاره نمود (shick و Dunlap، ۲۰۰۲). در سال‌های اخیر استفاده از ترکیبات طبیعی با منشاء دریایی در علوم پزشکی و دارویی مورد توجه قرار گرفته است. مقایسه ترکیبات طبیعی به‌دست آمده از آبزیان با جانوران خشکی‌زی نشان می‌دهد در موجودات دریایی ترکیبات بیش‌تر و موثرتری یافت می‌شود که شاید علت آن فرصت تکاملی بیش‌تری است که آبزیان نسبت به جانوران خشکی‌زی از آن برخوردار بوده‌اند (Blunt و همکاران، ۲۰۰۵). علی‌رغم تنوع و کارایی بالای ترکیبات زیستی به‌دست آمده از موجودات دریایی، فرآیند تولید تجاری آن‌ها دشوار و گران است. زیرا میزان متابولیت‌های موجود در موجودات دریایی که به‌عنوان مواد فعال بیولوژیک مورد استفاده قرار می‌گیرند معمولا" به اندازه‌ای نیست که بتوان از آن‌ها برای آزمایش‌های بالینی استفاده کرد. افزایش میزان ترکیب مورد نظر با برداشت گسترده از موجود منبع نیز به‌دلیل تاثیر اکولوژیکی مخرب و خطر انقراض موجود، گزینه مناسبی نیست. آبزی‌پروری گزینه دیگری است که در این مورد مطرح می‌شود، در دسترس نبودن تکنولوژی پرورش برای بسیاری از موجودات دریایی، هزینه بالا و مشکل بیماری‌های مختلف در شرایط پرورشی این راه حل را نیز غیرقابل اعتماد می‌کند. در برخی موارد ممکن است بتوان یک ترکیب را به‌طور شیمیایی سنتز کرد با این وجود در اغلب موارد پیچیدگی‌های بیش از حد مولکول‌های به دست آمده از موجودات دریایی یا هزینه بالا، مانع انجام آن می‌شود. با توجه به این که بسیاری از ترکیبات باارزش زیستی که از موجودات دریایی به‌دست آمده است در واقع تولیدکننده آن‌ها میکروارگانیسم‌های هم‌زیست با موجودات دریایی می‌باشند جداسازی، خالص‌سازی، شناسایی مولکولی و استخراج ترکیبات باارزش این میکروارگانیسم‌ها، یک منبع قابل اعتماد برای تولید پایدار ترکیبات فعال زیستی دریایی ایجاد کرده و امکان توسعه کاربرد چنین محصولاتی فراهم خواهد شد (Chelossi و همکاران، ۲۰۰۶). قارچ‌ها برخلاف باکتری‌ها، یوکاریوت بوده و از نظر بیوشیمیایی شباهت بیش‌تری به سلول‌های پستانداران دارند، بنابراین درمان انتخابی آلودگی‌های قارچی مشکل‌تر است (نجف‌زاده، ۱۳۸۶). قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی در کشت گیاهانی که از نظر اقتصادی اهمیت دارند مشکلات جدی ایجاد کرده‌اند که امروزه مهم‌ترین روش مقابله با آن‌ها استفاده از قارچ‌کش‌های شیمیایی است. استفاده از این روش علاوه بر آلودگی محیط زیست، تخریب اکوسیستم‌ها و مقاومت پاتوژن‌ها با ورود و ماندگاری در منابع آبی و غذایی انسان سلامتی جوامع انسانی را نیز مختل کرده و هم‌چنین بسیاری از موجودات مفید در سطوح مختلف زنجیره غذایی را نیز با خطر انقراض مواجه کرده است (Seyed و همکاران، ۲۰۰۵). استفاده از قارچ‌کش‌های زیستی راهکار مناسبی است که برای جلوگیری از مشکلات فوق ارائه شده است. با توجه به این‌که تاکنون گزارشی از خواص ضدقارچی باکتری‌های همراه با اسفنج‌های بومی خلیج فارس ارائه نشده است هدف از این مطالعه بررسی خواص ضدقارچی باکتری‌های جداسازی شده از اسفنج بومی خلیج فارس تعیین گردید.

مواد و روش‌ها

غربال‌گری: نمونه‌های سالم اسفنج *Haliclona simulans* با استفاده از غواصی از سواحل شمال‌غربی خلیج فارس (استان بوشهر) جمع‌آوری شده و در یخ و در شرایط استریل به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس ۳ سانتی‌مترمکعب از بافت مزوهیل اسفنج برش داده شد و پس از هموژنیزه کردن، رقت‌های مختلف آن‌ها در محیط کشت حاوی: پودر عصاره مخمر (۹ گرم بر لیتر)، گلوکز (۱ گرم در لیتر)، کلرید سدیم (۲/۵ گرم در لیتر) و آگار (۲۰ گرم بر لیتر) تلقیح گردید و به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد (Raczkowski، ۲۰۱۰).

تعیین خواص ضدقارچی: برای تعیین میزان خواص ضدقارچی دو روش انتشار از دیسک و دیسک آگار به‌کار برده شد. ۳ سویه قارچی *Rhizoctonia solani* (عامل مرگ گیاهچه)، *Penicillium*

italicum (آفت مرکبات) و *Fusarium oxysporum* (عامل پژمردگی آوندی) که بیماری‌زای آن‌ها در گیاهان تایید شده بود در محیط کشت PDA کشت شده و مورد استفاده قرار گرفتند. در روش دیسک آگار که برای ۸ سویه جدا شده در غربال‌گری اولیه انجام شد ابتدا از حاشیه محیط کشت‌های حاوی باکتری و محیط کشت EA و کشت‌های یک هفته‌ای قارچ‌های نام برده شده در بالا، دیسک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر توسط چوب پنبه سوراخ کن تهیه گردید. دیسک قارچ در وسط پلیت حاوی محیط کشت PDA قرار داده شد و ۲ دیسک تهیه شده از محیط کشت حاوی باکتری و بدون باکتری در ۲ طرف دیگر پلیت قرار داده شد. پلیت‌های آماده شده به‌ترتیب فوق به‌مدت یک هفته در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. پس از یک هفته سویه‌هایی که هاله ممانعت از رشد ایجاد کردند به‌عنوان نمونه‌های فعال درنظر گرفته شدند (Aghighi و همکاران، ۲۰۰۴؛ Baniasadi و همکاران، ۲۰۰۹). برای ۴ تا از سویه‌های جدا شده که در روش دیسک آگار نتایج بهتری نشان داده بودند یعنی سویه‌های ۴، ۶، ۷ و ۸ تعیین خواص ضدقارچی با استفاده از روش انتشار از دیسک نیز انجام شد. به‌منظور انجام روش انتشار از دیسک ابتدا دیسک‌های ۶ میلی‌متری از کاغذ سلولزی تهیه و به‌مدت ۲۴ ساعت در عصاره‌های متانولی و کلروفرمی قرار گرفتند (روش تهیه آن‌ها در زیر شرح داده شده است). سپس از حاشیه کشت‌های یک هفته‌ای قارچ‌ها روی محیط PDA دیسک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر به‌وسیله چوب پنبه سوراخ کن استریل تهیه گردید. دیسک قارچ در وسط پلیت حاوی محیط کشت PDA قرار داده و سپس پلیت‌ها تا زمانی‌که قطر پرگنه قارچ‌ها به حدود ۲/۵ سانتی‌متر برسند در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. پس از آن دیسک‌های حاوی عصاره‌های کلروفرمی و متانولی و دیسک‌های حاوی کلروفرم و متانول (به‌عنوان کنترل منفی) در فاصله یک‌سانتی‌متری از محل رشد قارچ قرار داده شدند در شکل ۱ تصویری از این روش نمایش داده شده است. بعد از گذشت ۴ روز شعاع هاله ممانعت از رشد از ۴ طرف دیسک کاغذی اندازه‌گیری گردید (محسنی و نوروزی، ۱۳۹۲).

تهیه محیط کشت مایع و عصاره‌گیری: به‌منظور گرفتن عصاره از سویه‌های ۴، ۶، ۷ و ۸ ابتدا محیط کشت مایع مناسب با استفاده از نوترینت براث (۸ گرم بر لیتر)، پپتون و عصاره مخمر (هر کدام ۱۰ گرم بر لیتر)، کلرید سدیم (۱۰ گرم بر لیتر) و ۲٪ حجمی/ حجمی گلیسرول تهیه گردید. پس از تلقیح، پلیت‌ها به‌مدت یک هفته در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند.

شکل ۱: نحوه دیسک‌گذاری و موقعیت دیسک‌ها نسبت به قارچ در روش انتشار از دیسک

در مرحله بعد محیط کشت حاوی باکتری با کاغذ صافی سلولزی صاف‌شده و رسوب در پلیت‌های شیشه‌ای استریل به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از پودر کردن کلنی‌های خشک‌شده، به‌ازای هر گرم رسوب خشک باکتری، یک میلی‌لیتر حلال اضافه گردید و نمونه‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت مخلوط شدند. پس از سانترفیوژ (به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه)، محلول رویی به در روتاری در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد تغلیظ گردید و در نهایت با حلال اولیه به حجم ۵ میلی‌لیتر رسانده شد (Toth و Marialigeti، ۲۰۱۳؛ Zhao و همکاران، ۲۰۰۹). لازم به ذکر است که در این مطالعه از ۲ نوع عصاره کلروفرمی و متانولی استفاده گردید.

جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری‌ها: پس از رشد کلنی باکتری‌ها و خالص‌سازی آن‌ها، ۲ سویه از باکتری‌ها که در غربال‌گری خواص ضدقارچی کارایی بیش‌تری نشان دادند یعنی سویه‌های شماره ۴ و ۷ مورد شناسایی مولکولی قرار گرفتند. به این منظور، ابتدا استخراج DNA با استفاده از روش CTAB تغییر یافته انجام شد و از روش‌های اسپکتروفوتومتری و الکتروفورز ژل آگارز جهت سنجش کیفیت و کمیت DNA استخراج شده استفاده گردید (Sambrok و Russell، ۲۰۰۱). تکثیر ژن srRNA ۱۶ با استفاده از پرایمر مستقیم با توالی AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG و پرایمر معکوس با توالی TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T وانجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) صورت گرفت. به‌منظور بهینه‌سازی واکنش

PCR گرادیانت دما از دمای ۴۶ تا ۵۷ درجه سانتی‌گراد و گرادیانت غلظت DNA در غلظت‌های ۵۰ تا ۲۵۰ میکروگرم انجام گرفت. حجم و غلظت مواد استفاده شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز عبارت بودند از: ۳ میکرولیتر DNA الگو با غلظت ۷۵ میکروگرم، ۵ میکرولیتر بافر PCR، ۲ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای مستقیم و معکوس با غلظت ۲۰ پیکومولار، ۲ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی‌مولار، ۳ میکرولیتر منیزیم کلراید ۵۰ میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر آنزیم DNA-Taq پلیمراز، ۴ میکرولیتر DMSO ۵۰ میلی‌مولار که با ۲۸ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه به حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر رسانده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با مرحله واسرشتی اولیه به‌مدت ۵ دقیقه و در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ چرخه با مرحله واسرشتی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر به‌مدت یک دقیقه در ۵۴ درجه سانتی‌گراد و طویل شدن در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه و نهایتا" یک چرخه طویل شدن نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه انجام شد.

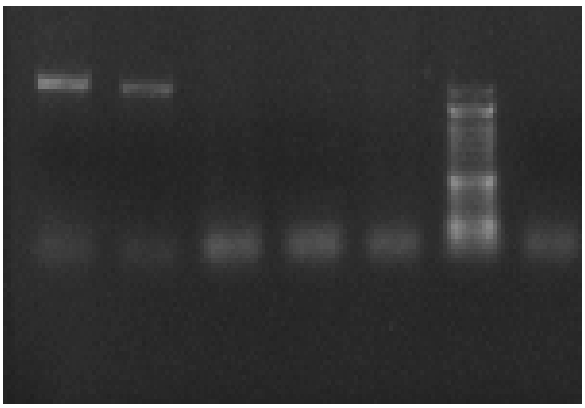
به‌منظور اطمینان یافتن از تکثیر قطعات مورد نظر، محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شدند (به‌جای استفاده ار اتیدیوم بروماید، در هنگام تهیه ژل، ۲ میکرولیتر رنگ safe stain به آگارز مذاب اضافه شد). برای این کار ۴ میکرولیتر محصول PCR با ۳ میکرولیتر بافر بارگزاری مخلوط شده و به چاهک‌ها تزریق گردید. نوارهای تکثیر شده ژن ۱۶srRNA به‌صورت تک باند و با اندازه‌ای در حدود ۱۵۰۰جفت‌باز بااستفاده از دستگاه مستند ساز ژل (XRBiorad) مشاهده و ذخیره گردیدند. در مرحله بعد با استفاده از دستورالعمل کیت خالص سازی (ساخت شرکت بیونیر کره جنوبی)، محصول PCR تخلیص شده به‌دست آمد. محصول خالص شده PCR توسط شرکت Bioneer کره جنوبی به‌صورت ۲ بار خوانش تعیین توالی گردید.

تعیین ترکیبات عصاره متانولی باکتری با استفاده از GC-MS: برای این منظور عصاره متانولی تهیه شده از سویه ۴ که بیش‌ترین فعالیت ضدقارچی را نشان داده بود به‌میزان یک میکرولیتر به دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف نگار جرمی (GC-MS) تزریق شد. دستگاه گاز کروماتوگرافی از نوع Agilent 6890 با ستون HP5-MS به ابعاد ۳۰ متر در ۰/۲۵ میلی‌متر و ۰/۳ میکرومتر مورد استفاده قرار گرفت. برنامه‌دمایی نیز به‌صورت ۳ دقیقه‌در دمای ۶۰درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۰ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه تا ۲۷۰ درجه سانتی‌گراد بود. از گاز هلیوم نیز به‌عنوان گاز حامل استفاده گردید.

آنالیز آماری: تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار spss نسخه ۱۹ انجام‌شد. تمام‌آزمون‌های‌انجام شده در این تحقیق میانگینی از خداقل ۳ بار تکرار می‌باشند. هم‌چنین از نرم‌افزار MEGA نسخه ۵/۲ برای رسم درخت فیلوژنیک و محاسبه فاصله زنتیکی بین گونه‌ها استفاده گردید.

نتایج

شناسایی مولکولی: سویه باکتری‌جداسازی شده شماره ۴ بعد از انجام بلاست بیش‌ترین شباهت را در حد ۹۸٪ با سویه *Bacillus* .sp نشان داد که فاصله ژنتیکی آن ۰/۰۰۴ به‌دست آمد. باکتری شماره ۷ پس از انجام بلاست بیش‌ترین نزدیکی در حد ۹۵٪ را با سویه *Staphylococcus haemolyticus* نشان‌داد و فاصله ژنتیکی آن با استفاده از نرم‌افزار MEGA 5.2 ۰/۰۲ به‌دست آمد. تصویر باند محصول PCR بر روی ژل آگارز در شکل ۲ آورده شده است.



شکل ۲: محصول PCR روی ژل آگارز ۱٪

هم‌چنین سویه شماره ۴ با شماره دسترسی KY 71376 و سویه شماره ۷ با شماره دسترسی KY271394 در NCBI ثبت شده‌اند که توالی کامل آن‌ها در سایت مذکور در دسترس می‌باشد.

خواص ضدقارچی: در جدول ۱ خواص ضدقارچی سویه‌های جداسازی شده بر مبنای روش دیسک آگار آورده شده است. با توجه به نتایج به‌دست آمده از بین ۸ میکروارگانیسم مورد آزمون، ۷ سویه حداقل دربرابر یک قارچ بیماری‌زای گیاهی فعالیت آنتاگونیستی نشان دادند و از بین آن‌ها سویه‌های شماره ۴ ،۶، ۷ و ۸ بیش‌ترین فعالیت ضدقارچی را علیه این ۳ قارچ بیماری‌زای گیاهی داشتند.

جدول ۱: نتایج روش دیسک آگار (قطر هاله عدم رشد در قارچ بر حسب میلی‌متر)

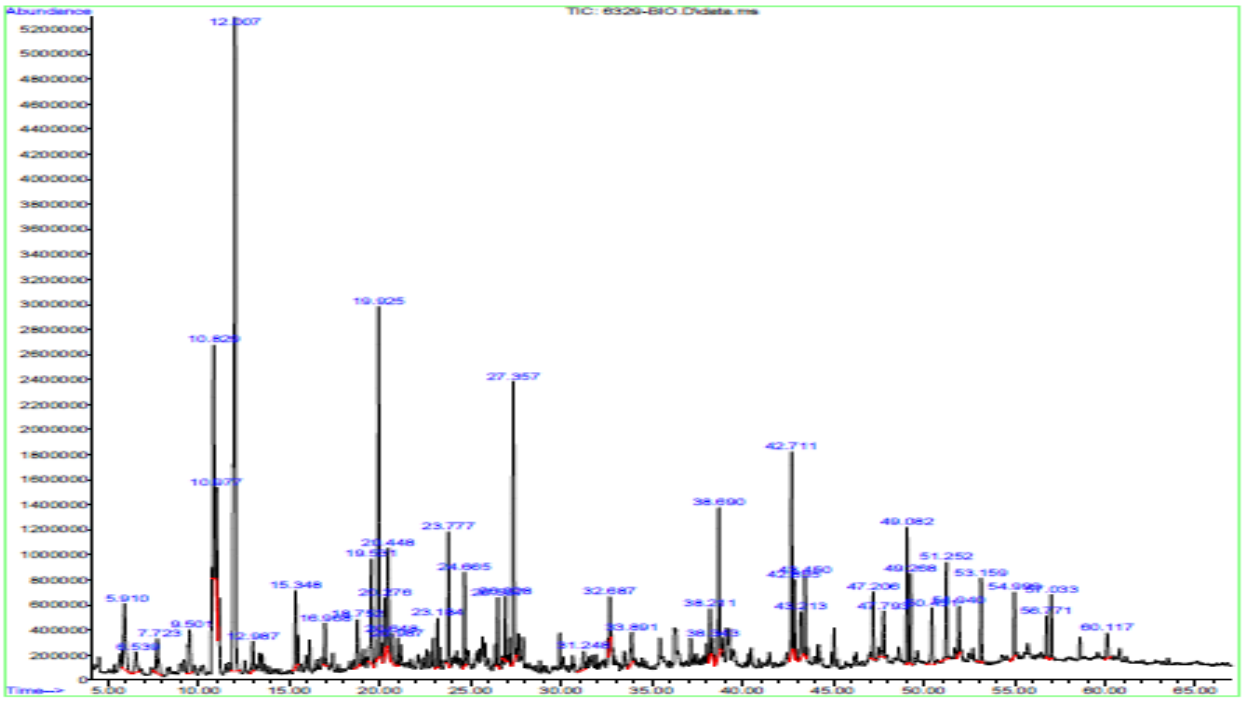
شماره سویه	*F.oxysporum*	*P.italicum*	*R.solani*
۱	۱±۰/۶۹	۰	۰
۲	۲۵/۳۳±۰/۵۱	۱۱/۳۳±۰/۸۴	۱۸/۶۶±۱/۱۵
۳	۲۰±۰/۷۹	۷/۶۶±۰/۵۸	۱۳±۱/۲۹
۴	۲۴/۶۶±۰/۵۸	۱۹/۳۳±۰/۲۳	۲۸/۳۳±۰/۵۸
۵	۱۸/۶۶±۱/۱۵	۱۳±۰/۲۱	۲۲±۰/۱۴
۶	۲۳/۶۶±۰/۲۶	۱۶±۰/۱۱	۲۵/۶۶±۰/۵۸
۷	۲۷/۴۱±۰/۵۸	۲۰±۰/۲۶	۲۳±۰/۸۴
۸	۲۳±۰	۱۸/۶۶±۰/۴۴	۲۱±۰/۸۳

در جدول ۲ نتایج خواص ضدقارچی سویه‌های شماره ۴ ،۶، ۷ و ۸ براساس روش انتشار از دیسک آورده شده است. در این روش از دو نوع عصاره متانولی و کلروفرمی استفاده شد که با توجه به این‌که عصاره کلروفورمی هر چهار سویه مورد بررسی، هاله عدم رشد ایجاد نکردند فقط نتایج عصاره متانولی ارائه شده است.

جدول ۲: نتایج روش انتشار دیسک با استفاده از عصاره متانولی (قطر هاله عدم رشد قارچ بر حسب میلی‌متر)

شماره سویه	*F.oxysporum*	*P.italicum*	*R.solani*
۴	۲۲/۶۶±۰/۳۹	۲۵/۳۳±۰/۷۵	۲۲±۱/۱۵
۶	۱۷±۰/۸۵	۱۸/۶۶±۰/۶۳	۱۷/۳۳±۰/۱۴
۷	۲۲/۳۳±۰/۲۱	۱۸±۰/۳۸	۲۰/۶۶±۰/۹۸
۸	۱۸/۶۶±۰/۵۰	۲۰/۶۶±۱/۲۸	۱۶±۰/۷۸

نتایج GC-MS: آنالیز نتایج کروماتوگرافی گازی عصاره متانولی باکتری ۳۴ پیک را نشان داد که براساس آن ترکیبات موجود در عصاره سویه مذکور به‌دست آمد (شکل ۳). از ۳۴ ترکیب شناسایی شده ۶۷٪ ترکیبات مربوط به۱۱ ماده شیمیایی بود که در جدول ۳ به آن‌ها اشاره شده است. لازم به ذکر است که در جدول مذکور به ترکیبات اساسی از لحاظ دارا بودن بیش‌ترین درصد اشاره شده و از ذکر سایر ترکیبات پرهیز شده است.



شکل ۳: نمودار کروماتوگرام GC-MS عصاره متانولی باکتری *Bacillus sp.*

از ۳۴ ترکیب شناسایی شده ۶۷٪ ترکیبات مربوط به ۱۱ ماده شیمیایی بود که در جدول ۳ به آن‌ها اشاره شده است. لازم به ذکر است که در جدول مذکور به ترکیبات اساسی از لحاظ دارا بودن بیش‌ترین درصد اشاره شده و از ذکر سایر ترکیبات پرهیز شده است.

جدول ۳: آنالیز ترکیبات عصاره متانولی باکتری *Bacillus* sp. با استفاده از GC-MS

ردیف	نام ترکیب	زمان بازداری*(دقیقه)	درصد مساحت زیر پیک
۱	Gamma-terpinene	۱۲	۲۷
۲	Limonene	۱۰/۹۷	۸
۳	Phenol, 2,4-bis (1,1-dimethylethyl)	۲۷/۳۵	۷
۴	Phenol, 2,4-bis (1,1-dimethylethyl)	۱۰/۸۲	۴/۸۴
۵	۹،۱۲-Octadecadienoic acid	۴۲/۷	۳/۷۲
۶	Methyl palmitate	۳۸/۶۹	۳/۱۴
۷	Tridecane	۲۰/۴۴	۳
۸	P-Xylene	۵/۹	۲/۹۵
۹	Hexanedioic acid	۴۹/۱	۲/۵
۱۰	Tetradecane	۲۳/۷۷	۲/۴
۱۱	Trans-Caryophyllene	۲۴/۶۶	۲

* زمان بازداری (Retention time) زمان میان تزریق و شستشوی هر جزء است.

بحث

در سرتاسر جهان قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی در کشت گیاهانی که از لحاظ اقتصادی اهمیت دارند مشکلات جدی ایجاد کرده‌اند، از جمله‌این‌مشکلات می‌توان به آسیب‌سیستم آوندی و بافت‌های گیاهی اشاره کرد که به کاهش قابل توجه بسیاری از محصولات کشاورزی منجر می‌شود (Labeda و همکاران، ۲۰۱۰). حمله قارچ‌های بیماری‌زا به گیاهان کشاورزی گاه به‌حدی است که رشد گیاه را غیرممکن می‌سازد. یکی از راه‌های کنترل بیماری‌های قارچی استفاده از قارچ کش‌ها به‌مقدار زیاد است. استفاده از این روش علاوه بر هزینه‌های سنگینی که به‌بار می‌آورد باعث به‌خطر افتادن سلامتی انسان، آلودگی محیط زیست، توسعه مقاومت پاتوژن‌ها نسبت به قارچ‌کش‌ها و تخریب اکوسیستم‌ها و جمعیت در سطوح مختلف زنجیره غذایی می‌شود. یکی از راه‌های مناسب جهت کنترل بیماری‌های ناشی ازقارچ‌های بیماری‌زا که تأثیرات نامطلوب فوق را نیز نداشته باشد، استفاده از روش‌های کنترل بیولوژیک است (Prapagdee و همکاران، ۲۰۰۸). برخلاف ترکیبات شیمیایی، ترکیبات‌زیستی‌که از گونه‌های موثر گرفته شده‌اند سمیت کم‌تر داشته، به‌راحتی قابل تجزیه بوده و آلرژی‌زایی کمی دارند. به‌علاوه این مواد در محصولات غذایی انباشته نمی‌شوند (Joo، ۲۰۰۵). تاکنون تحقیقات گسترده‌ای بر روی خواص ضدقارچی سویه‌های مختلف جنس باسیلوس صورت گرفته است که از آن جمله می‌توان به مطالعات انجام شده توسط آتی (۱۳۷۷)، اکبری (۱۳۸۲) و کاظمی (۱۳۸۳) اشاره نمود. با این وجود عمده مطالعات صورت گرفته بر روی باسیلوس‌های خاکزی بوده و بر روی خواص ضدقارچی باسیلوس‌های‌دریایی به‌ویژه‌سویه‌هایی که هم‌زیست با جانوران دریایی و ازجمله اسفنج‌ها هستند به‌ندرت مطالعاتی در خارج از کشور صورت گرفته است. سویه‌های ۴، ۶، ۷ و ۸ که در روش دیسک آگار نتایج بهتری نشان داده بودند، خواص ضدقارچی عصاره‌های متانولی و کلروفرمی آن‌ها با استفاده از روش انتشار از دیسک نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به‌دست آمده نشان داد که از بین ۴ سویه اکتینومیست، سویه شماره ۴ بیش‌ترین اثرضدقارچی‌را دربرابر هر۳ سویه قارچ بیماری‌زای گیاهی داشته است. هم‌چنین نتایج ارائه شده در جدول ۳ نشان می‌دهند که عصاره‌های کلروفرمی هیچ‌یک از اکتینومیست‌هادر برابر قارچ‌های بیماری‌زا هاله عدم رشد ایجاد نکردند که این نشان‌دهنده عدم‌حلالیت‌ترکیبات‌ضدقارچی‌اکتینومیست‌هادر حلال‌های غیرقطبی چون کلروفرم می‌باشد نتایج این آزمون از این منظر به نتایج به‌دست آمده از مطالعات انجام شده توسط Aghighi و همکاران(۲۰۰۴)، Baniasadi و همکاران(۲۰۰۹) و سالاری و همکاران

(۱۳۸۹) مشابهت داردکه بیان می‌کنند ماده مؤثر موجود در عصاره اکتینومیست‌های مورد مطالعه در حلال‌های آلی غیرقطبی نظیر کلروفرم حل نمی‌گردد درحالی‌که این مواد در حلال‌های قطبی چون آب مقطر و متانول و اتانول قابلیت حل داشته و ایجاد هاله ممانعت از رشد می‌نمایند. عصاره متانولی سویه شماره ۴ که بهترین نتایج را در آزمون‌های غربال‌گری داشت برای کروماتوگرافی گازی با طیف‌سنجی جرمی انتخاب شد. نتایج به‌دست آمده از آنالیز GC حضور ۳۴ ترکیب را در عصاره مذکور نشان داد که ترکیبات با بیش‌ترین درصد حضور در عصاره در زیر آورده شده‌اند. ازجمله ترکیبات به‌دست آمده در عصاره متانولی gamma-Terpinene را می‌توان نام برد این ترکیب با ۲۷ درصد بیش‌ترین ترکیب موجود در عصاره بود. این ترکیب یکی از اسیدهای چرب ضروری می‌باشد که در برابر پاتوژن‌ها مختلف انسانی خواص ضدمیکروبی از خود نشان می‌دهد. این ترکیب یکی از اسیدهای چرب فرار مشتق شده از درخت چای باریک می‌باشد که از گیاه *Lippia multiflora* نیز جداسازی شده‌است. فعالیت‌های آنتی‌اکسیدان، ضدالتهاب و ضد رشد سلولی این ترکیب در دست مطالعه می‌باشد. این ترکیب در مطالعاتی که پیش‌تر از این نیز انجام شده از اکتینومیست‌ها جداسازی شده است برای نمونه می‌توان به مطالعه انجام شده توسط Wang و Cane (۲۰۰۸) اشاره‌کرد. در این مطالعه gamma.-Terpinene یکی‌از ترکیبات موجود در عصاره Streptomyces coelicolor بود که‌بااستفاده‌از آنالیز GC-MS به‌دست آمده بود. دومین پیک شاخص موجود در کروماتوگرام به‌دست آمده با ۸ درصد مربوط به ترکیب Limonene می‌باشد.این ترکیب یک هیدروکربن می‌باشد که نام خود را از لیمو گرفته است و از پوست لیمو و سایر مرکبات قابل جداسازی است این ترکیب که به‌عنوان طعم دهنده در انواع نوشیدنی-ها و سایر مواد غذایی کاربرد دارد و دارای خواصی چون جلوگیری از سرطان، درمان برونشیت نیز هست و در داروسازی هم مورد استفاده قرار می‌گیرد. در مطالعاتی که پیش از این نیز انجام شده این ترکیب از اکتینومیست‌ها جداسازی شده بود از میان این مطالعات می‌توان به مطالعه انجام شده توسط Wang و Cane (۲۰۰۸) اشاره کرد که در آن Limonene با ۳۲ درصد یکی از ترکیبات موجود در عصاره اکتینومیست Streptomyces coelicolor بود. یکی دیگر از ترکیبات موجود در عصاره مذکور Phenol, 2,4-bis (1,1-dimethylethyl) می‌باشد این ترکیب با ۷درصد سومین پیک شاخص موجود در کروماتوگرام عصاره مورد نظر را به‌خود اختصاص داده است. این ماده یک ترکیب فنولی اشباع نشده است که می‌تواند فعالیت آنتی‌اکسیدانی از خود نشان دهد و رادیکال‌های آزاد را مهار کند این ترکیب در مطالعاتی که در گذشته انجام شده نیز از اکتینومیست‌ها جداسازی شده است که ازجمله آن‌ها می‌توان به مطالعه انجام شده توسط Balachandran و همکاران (۲۰۱۲) اشاره نمود در این مطالعه با استفاده از آنالیز GC-MS شناسایی اولیه ترکیبات عصاره به‌دست آمده از Streptomyces sp انجام شد که یکی از ترکیبات موجود در این عصاره Phenol, 2,4-bis (1,1-dimethylethyl) با میزان ۱۶/۶ درصد بود. چهارمین پیک شاخص مربوط به Phenol, ((۲،۴-bis (1,1-dimethylethyl است که یک ترکیب آلی آروماتیک طبیعی است که آن را به عنوان یک آلکیل بنزن مرتبط به مونوترپن‌ها طبقه‌بندی می‌کنند. این ترکیب در آب نامحلول بوده ولی در اتانول و اتیل اتر محلول می‌باشد. این ترکیب یکی از مواد رایج موجود در عصاره زیره سیاه و آویشن می‌باشد. پنجمین پیک شاخص مربوط به ۹،۱۲-Octadecadienoic acid با ۳/۷۲ درصد بود این ترکیب یک اسیدچرب غیراشباع است که برای تغذیه پستانداران ضروری است و در بیوسنتز پروستاگلاندین و غشای سلولی کاربرد دارد این ترکیب دارای خواص ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدان، ضدالتهاب، ضدسرطان و غیره می‌باشد و از گیاه *Azadirachta indica* (Akpuaka و همکاران، ۲۰۱۳) و *Pterocarpus marsupium* (Maruthupandian و Mohan، ۲۰۱۱) نیز جداسازی شده‌است. با توجه به این‌که باکتری‌های به‌دست آمده از اسفنج‌ها در این مطالعه خواص ضدقارچی قابل توجهی از خود نشان دادند به‌نظر می‌رسد پتانسیل انجام تحقیقات تکمیلی در این زمینه وجود دارد. هم‌چنین انجام بررسی‌های مشابه بر روی سایر اسفنج‌های بومی خلیج فارس در حفظ ذخایر ژنتیکی این جانوران منحصر به‌فرد تاثیر به‌سزایی خواهد داشت.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از کارشناسان و اساتید پژوهشکده خلیج فارس کمال تشکر و قدر دانی را دارند.

منابع

۱. **آتی، ف.، ۱۳۷۷.** بررسی اثر چند باکتری آنتاگونیست روی قارچ *Phytophthpra capsici* عامل بیماری بوته‌میری فلفل. طرح تحقیقاتی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران.

۲. **اکبری‌کیارودی، ل.، ۱۳۸۲.** تاثیر باکتری‌های آنتاگونیست علیه عامل پوسیدگی سفید ساقه کلزا در اثر *Sclerotinia sclerotiorum*. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان. ۹۲ صفحه.

۳. **سالاری، م.؛ شهیدی‌بنجار، غ.ح.؛ صادقی، ب.؛ پنجه، ن.؛ امینایی، م.م. و شاکری، ط.، ۱۳۸۹** . ارزیابی کنترل بیولوژیکی دو جدایه از اکتینومیست‌های ضدقارچی ایرانی برعلیه *Phytophthora parasitica* و *P. citrophthora* در شرایط آزمایشگاه و گلخانه. نشریه حفاظت گیاهان. جلد ۲۴، شماره ۴، صفحات ۴۳۷ تا ۴۴۴.

۴. **کاظمی، ش.، ۱۳۸۳.** بررسی تأثیر باکتری‌های آنتاگونیست ناحیه ریزوسفر گندم علیه قارچ *Bioolaris* spp عامل پوسیدگی ریشه و طوقه گندم در همدان. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینای همدان. ۱۳۳ صفحه.

۵. **محسنی، م. و نوروزی، ح.، ۱۳۹۲.** بررسی فعالیت ضدقارچی اکتینومیست‌های جداشده از رسوبات بستر دریای مازندران. مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران. جلد ۲۳، شماره ۱۰۴، صفحات ۷۹ تا ۸۷.

۶. **نجف‌زاده‌ورزی، ح.، ۱۳۸۶.** آنتی‌بیوتیک‌ها و داروهای ضدمیکروب (مفاهیم بنیادی و کاربردهای بالینی). انتشارات تراوا. ۱۲۵ صفحه.

۷. **Aghighi, S.; Shahidi Bonjar, G.H.; Rawashdeh, R.; Batayneh, S. and Saadoun, I., 2004.** First report of antifungal spectra of activity of Iranian actinomycetes strains against *Alternaria solani*, *Alternaria alternate*, *Fusarium solani*, *Phytophthora megasperma*, *Verticillium dahliae and Saccharomyces cerevisiae*. Asian Journal of Plant Sciences. Vol. 3, No. 4, pp: 463-471.

۸. **Akpuaka, A.; Ekwenchi, M.M.; Dashak, D.A. and Dildar, A., 2013.** Biological activities of characterized isolates of n-hexane extract of Azadirachta indica A. Juss (Neem) leaves. Nature and Science. Vol. 11, No. 5, pp: 141-147.

۹. **Balachandran, C.; Duraipandiyan, V.; Balakrishna, K. and Ignacimuthu, S., 2012.** Petroleum and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation and naphthalene metabolism in Streptomyces sp. (ERI-CPDA-1) isolated from oil contaminated soil. Bioresource technology. Vol. 112, pp: 83-90.

۱۰. **Baniasadi, F.; Bonjar, G.S.; Baghizadeh, A.; Nik, A.K.; Jorjandi, M.; Aghighi, S. and Farokhi, P.R., 2009.** Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum*, causal agent of sunflower head and stem rot disease, by use of soil borne actinomycetes isolates. American Journal of Agricultural and Biological Sciences. Vol. 4, No. 2, pp: 146-151.

۱۱. **Blunt, J.W.; Copp, B.R.; Munro, M.H.; Northcote, P.T. and Prinsep, M.R., 2005.** Marine natural products. Natural Product Reports. Vol. 22, pp: 15-61.

۱۲. **Chelossi, E.; Pantile, R.; Pronzato, R.; Milanese, M. and Hentschel, U., 2007.** Bacteria with antimicrobial properties isolated from the Mediterranean sponges *Chondrilla nucula and Petrosia ficiformis*. Aquatic Microbial Ecology. Vol. 49, pp: 157-163.

۱۳. **Joo, G.J., 2005.** Purification and characterization of an extracellular chitinase from the antifungal biocontrol agent *Streptomyces halstedii*. *Biotechnology letters*. Vol. 27, No. 19, pp: 1483-1486.

۱۴. **Labeda, D.P.; Price, N.P.; Tan, G.Y.A.; Goodfellow, M. and Klenk, H.P., 2010.** Emended description of the genus *Actinokineospora Hasegawa* 1988 and transfer of *Amycolatopsis fastidiosa* Henssen et al. 1987 as *Actinokineospora fastidiosa* comb. nov. International journal of systematic and evolutionary microbiology. Vol. 60, No. 6, pp: 1444-1449.

۱۵. **Li, C.W.; Chen, J.Y. and Hua, T.E., 1998.** Precambrian sponges with cellular structures. Science. Vol. 279, No. 5352, pp: 879-882.

۱۶. **Maruthupandian, A. and Mohan, V.R., 2011.** GC-MS analysis of some bioactive constituents of *Pterocarpus marsupium Roxb*. Int J Chem Tech Res. Vol. 3, No. 3, pp: 1652-1657.

۱۷. **Prapagdee, B.; Kuekulvong, C. and Mongkolsuk, S., 2008.** Antifungal potential of extracellular metabolites produced by Streptomyces hygroscopicus against phytopathogenic fungi. International Journal of Biological Sciences. Vol. 4, No. 5, pp: 330-337.

۱۸. **Raczkowski, J.V., 2010.** Biodiversity of actinomycetes associated with Caribbean sponges of Puerto Rico, and their metabolic profiles (Doctoral dissertation, University of North Carolina Wilmington).

۱۹. **Sambrook, J.; Russell, D. and Russell, D.W., 2001.** Molecular Cloning: A Laboratory manual. (3 - Volume set). Vol. 999-2001: Cold spring harbor laboratory press, New York.

۲۰. **Seyed- Asli, N.; Zamani, M.R,; Motallebi, M. and Harighi M.J., 2005.** Study of chitinase enzyme production in the Trichoderma fungus. Iranian journal of biology. Vol. 17, pp: 227-233.

۲۱. **Shick, J.M. and Dunlap, W.C., 2002.** Mycosporine-like amino acids and related gadusols: biosynthesis, accumulation, and UV-protective functions in aquatic organisms. Annual review of Physiology. Vol. 64, No. 1, pp: 223-262.

۲۲. **Toth M, E.; Kerine Borsodi, A.; Felfoldi, T.; Vajna, B.; Sipos, R. and Marialigeti, K., 2013.** Practical Microbiology: based on the Hungarian practical notes entitled" Mikrobiologiai Laboratoriumi Gyakorlatok". A. Nafradi Editor.

۲۳. **Wang, C.M. and Cane, D.E., 2008.** Biochemistry and molecular genetics of the biosynthesis of the earthy odorant methylisoborneol in *Streptomyces coelicolor*. Journal of the American Chemical Society. Vol. 130, No. 28, pp: 8908-8909.

۲۴. **Webster, N.S. and Hill, R.T., 2001.** The culturable microbial community of the Great Barrier Reef sponge *Rhopaloeides odorabile* is dominated by a α-Proteo bacterium. Marine Biology. Vol. 138, No. 4, pp: 843-851.

۲۵. **Zhao, G.Z.; Li, J.; Qin, S.; Zhang, Y.Q.; Zhu, W.Y.; Jiang, C.L.; Xu, L.H. and Li, W.J., 2009.** *Micrococcus yunnanensis* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from surface-sterilized *Polyspora axillaris* roots. International journal of systematic and evolutionary microbiology. Vol. 59, No. 10, pp: 2383-2387.