بسم الله الرحمن الرحیم

«فرم تأییدیه اعضای هیأت داوران مندرج در پایان‌نامه کارشناسی ارشد»

بدینوسیله پایان‌نامه کارشناسی ارشد آقای علیرضا رنجبریان رشته: قارچ شناسی گرایش: ----- تقدیم می‌شود. اینجانبان نسخهٔ نهائی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتـوی بررسـی و تأییـد کـرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجهٔ کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنیم.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

دکتر معصومه شمس (استاد راهنما)

دکتر مهدی رزاقی ابیانه (استاد مشاور)

۸۹/۱۰/۶

دکتر علی قجری (استاد ناظر)

دکتر شهلا رودبار محمدی (استاد ناظر و نماینده تحصیلات تکمیلی)

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامه-های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **علیرضا رنجبریان** دانشجوی رشته **قارچ شناسی** ورودی سال تحصیلی **۸۷** مقطع **کارشناسی ارشد** دانشکده **علوم پزشکی** متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم ».

امضا

تاریخ

آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت‌های علمی پژوهشی دانشگاه است. بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱ : در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل **پایان‌نامه کارشناسی ارشد** نگارنده در رشته **قارچ شناسی پزشکی** است که در سال **۸۹** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **دکتر معصومه شمس قهفرخی** ، مشاوره دکتر مهدی رزاقی ابیانه از آن دفاع شده است.

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴ : در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵ : دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت‌های بهای خسارت، دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶ : اینجانب علیرضا رنجبریان دانشجوی رشته قارچ شناسی پزشکی مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی

تاریخ و امضا

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان‌نامه

دوره کارشناسی ارشد در رشته قارچ شناسی پزشکی

عنوان

جداسازی و شناسایی میکروارگانیسم های مهارکننده رشد برخی از قارچ های بیماری زا با استفاده از روش های ملکولی

نگارش

علیرضا رنجبریان

استاد راهنما

دکتر معصومه شمس قهفرخی

استاد مشاور

دکتر مهدی رزاقی ابیانه

زمستان ۸۹

تقدیم به:

پدرم

مادرم

همسرم

خواهرم

تشکر و قدر دانی:

با سپاس یزدان پاک را که توفیق اتمام این پایان نامه را نصیبم کرد، جا دارد از عزیزانی که در این کار مرا یاری کردند کمال تشکر و قدر دانی را داشته باشم:

سرکار خانم دکتر معصومه شمس قهفرخی(استادیار بخش قارچ شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس) که در سمت استاد راهنمای اینجانب، دلسوزانه با راهنمایی ها و کمک های بسیار خویش مرا در انجام هرچه بهتر این کار یاری کردند.

جناب آقای دکتر مهدی رزاقی ابیانه(دانشیار پژوهش بخش قارچ شناسی انستیتو پاستور ایران)در سمت استاد مشاور که هم فکری و راهنمایی های ایشان در به ثمر رسیدن مطلوب تر این اثر بسیار موثر بود.

سرکار خانم دکتر شهلا رودبار محمدی(مدیر محترم گروه قارچ شناسی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس)که همواره برای ارتقاء و پیشرفت گروه و دانشجویان تلاش کرده اند و از راهنمایی های ایشان بهره برده ام.

جناب آقای دکتر یادگاری مدیر محترم پیشین گروه.

جناب آقای دکتر قجری که زحمت داوری این پایان نامه را تقبل کردند.

سرکار خانم کلانتری (دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی) که ازهم فکری و مساعدت های ایشان در انجام قسمت ملکولی این پایان نامه بهره برده ام.

سرکار خانم رازقی(کارشناس گروه قارچ شناسی) به علت همکاری صمیمانه ایشان با این جانب.

هم گروهی ها و هم کلاسی ها آقایان: مجتبی تقی زاده واحسان فرح بخش که درانجام این کار از هم فکری ها و کمک های ایشان استفاده کرده ام، و آقایان: دکتر سپهوند .خانم ها حقیقی ، سعادت ،دکتر جهانشیری ،امانی و حسینی .

در انتها جا دارد تشکر ویژه از خانواده ام داشته باشم که کمکهای روحی ایشان در پیشبرد این اثر موثر بوده است. همچنین از همکاران در اداره امور آزمایشگاه های دانشگاه تهران،پرسنل انیستیتو پاستور و دوست خوبم جناب آقای عمار رضایی که در تهیه این پایان نامه به اینجانب کمک کرده اند.

چکیده

جداسازی و شناسایی باکتریهای آنتاگونیست بعنوان بخشی از ذخایر زیستی از منابع طبیعی بدلیل قابلیت استفاده در کنترل بیولوژیک و فراهم آوردن شانس استحصال متابولیت های مهاری باارزش با قابلیت استفاده در برنامه های طراحی و تولید داروهای ضدقارچی جدید، توجه محققین را بیش از هر زمان دیگر به خود معطوف داشته است. تحقیق حاضر با هدف جداسازی و شناسایی باکتری های مهار کننده رشد برخی از قارچ های بیماریزا در انسان و حیوانات شامل درماتوفیت ها و ساپروفیت های دارای اهمیت پزشکی انجام گرفته است. تعداد ۱۴۸ نمونه خاک مناطق مختلف تهران بصورت نقطه ای در مجاورت *آسپرژیلوس نایجر* در محیط کشت جامد گلوکز- عصاره مخمر (GY) از نظر حضور باکتریهای مهاری مورد غربالگری قرار گرفتند. باکتری های موجود در خاک های مهاری از طریق کشت سوسپانسیون خاک در پلیت های GY جداسازی و انتقال به پلیت های جدید، جداسازی و خالص شدند. باکتریهای مهاری از طریق روش غربالگری کشت خطی بر روی محیط GY در مجاورت قارچ *آسپرژیلوس نایجر*، شناسایی شدند. تاثیر مهاری این باکتریها بر رشد سایر قارچ های مورد بررسی به روش کشت خطی در محیط GY مورد ارزیابی قرار گرفت. باکتریهای دارای بیشترین تاثیر مهاری با استفاده از روش PCR و تکثیر ژن 16S rRNA و مقایسه توالی های ژنومی با توالی های شناخته شده موجود در Gene Bank شناسایی گردیدند. بر اساس نتایج بدست آمده، از میان ۱۴۸ نمونه خاک مورد بررسی، تعداد ۳۶ نمونه قادر به مهار رشد قارچ بودند. از کشت ۳۶ نمونه خاک با خاصیت مهارکنندگی قارچ، ۹۷ باکتری مختلف جدا گردید که ۱۶ ایزوله قادر به مهار رشد بالا، ۳۲ ایزوله قادر به مهار رشد متوسط تا ضعیف و ۴۹ ایزوله قادر به مهار رشد قارچ نبودند. بر اساس آنالیز توالی ژن 16S rRNA باکتریهای با مهار رشد بالا بصورت *آسینتوباکتر بومانی* (۱ استرین)، *باسیلوس سابتیلیس* (۵ استرین)، *باسیلوس آمیلولیکوفاسینس* (۶ استرین)، *باسیلوس والیسمورتیس* (۲ استرین)، *سودوموناس کلرورافیس* (۱ استرین) و اکتینومیست (۱ استرین) شناسایی گردیدند. نتایج حاصل از کشت باکتریهای فوق در مجاورت قارچ های مورد بررسی شامل *آسپرژیلوس فلاووس*، *آسپرژیلوس نایجر*، *میکروسپوروم کانیس*، *میکروسپوروم جیپسئوم*، *ترایکوفایتون منتاگروفایتس*، *ترایکوفایتون روبروم*، *ترایکوفایتون تونسورانس*، *ترایکوفایتون ویولاسئوم*، *اپیدرموفایتون فلوکوزوم*، *فوزاریوم مونیلی فورم* و *پنیسیلیوم* با استفاده از روش کشت خطی در محیط جامد GY نشان داد که تمامی باکتریهای مذکور قادر به مهار معنی دار رشد کلیه قارچ های مورد بررسی در سطوح مختلف از ۱۰ تا ۱۰۰ درصد بودند. در مجموع، باکتریهای مهاری تاثیر ضدقارچی بیشتری برعلیه درماتوفیت ها در مقایسه با قارچهای رشته ای داشتند. در میان باکتریهای مورد بررسی، سودوموناس کلرورافیس بیشترین تاثیر ضدقارچی را از خود نشان داد که در کشت مایع در محیط GY براث از حداقل ۵۸/۳۴ درصد برای قارچ *پنیسیلیوم* تا حداکثر ۹۷/۸۸ درصد برای *ترایکوفیتون تونسورانس* متغییر بود. باکتریهای مهاری شناسایی شده در تحقیق حاضر میتوانند بعنوان کاندیدی مناسب جهت کنترل بیولوژیک قارچهایی نظیر *آسپرژیلوس فلاووس*، *آسپرژیلوس نایجر* و *فوزاریوم مونیلیفورم* و همچنین استخراج، شناسایی و بکارگیری متابولیت های مهاری آنها در طراحی و تولید داروهای ضدقارچی مورد استفاده قرار گیرند.

واژگان کلیدی: باکتریهای آنتاگونسیت، درماتوفیت ها، *آسپرژیلوس*، *فوزاریوم*، *پنیسیلیوم*، شناسایی ملکولی، اثرات ضدقارچی

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول: مقدمه ---------- ۱
۱-۱. کلیات ---------- ۲
۱-۲. مروری بر قارچ شناسی ---------- ۴
۱-۳. اهمیت قارچ ها در پزشکی ---------- ۵
۱-۴. مشخصات برخی از قارچ های بیماریزا و ساپروفیت مورد استفاده در تحقیق حاضر ---- ۷
۱-۴-۱. درماتوفیت ها ---------- ۷
۱-۴-۱-۱. *میکروسپوروم کانیس* ---------- ۸
۱-۴-۱-۲. *میکروسپوروم جیپسئوم* ---------- ۸
۱-۴-۱-۳. *ترایکوفایتون منتاگروفایتیس* ---------- ۹
۱-۴-۱-۴. *ترایکوفایتون روبروم* ---------- ۹
۱-۴-۱-۵. *ترایکوفایتون ویولاسئوم* ---------- ۹
۱-۴-۱-۶. *ترایکوفایتون تونسورانس* ---------- ۱۰
۱-۴-۱-۷. *اپیدرموفایتون فلوکوزوم* ---------- ۱۰
۱-۴-۲. *آسپرژیلوس* ---------- ۱۱
۱-۴-۲-۱. *آسپرژیلوس فلاووس* ---------- ۱۲
۱-۴-۲-۲. *آسپرژیلوس نایجر* ---------- ۱۲
۱-۴-۳. *فوزاریوم* ---------- ۱۳
۱-۵. ترکیبات ضد قارچی ---------- ۱۴
۱-۶. آنتی بیوتیک ها بعنوان ترکیبات ضدمیکروبی ---------- ۱۶
۱-۷. میکروارگانیسم های خاک ---------- ۱۹
۱-۸. اثرات متقابل میکروارگانیسم های خاک بر یکدیگر ---------- ۲۰
۱-۸-۱. آرتروباکترها ---------- ۲۲
۱-۸-۲. سودوموناس ها ---------- ---------- ۲۲

۱-۸-۳. آسینتوباکترها---------- ۲۴
۱-۸-۴. باسیلوس ها ---------- ۲۴
۱-۸-۵. باکتریهای میله‌ای غیراسپورزا ---------- ۲۷
۱-۸-۶. اکتینومیستها ---------- ۲۷
۱-۸-۶-۱. استرپتومیسس ها ---------- ۲۸
۱-۸-۷. آکروموباکترها---------- ۳۰
۱-۸-۸. لاکتوباسیلوس ها ---------- ۳۰
۱-۸-۹. سیانوباکتری ها ---------- ۳۱
۱-۹. شناسایی ملکولی باکتری ها بر اساس تعین توالی DNA ژنومی---------- ۳۲
۱-۹-۱.اصول و مبانیPCR----------۳۳
۱-۹-۲. شناسایی ملکولی میکروارگانیسم ها بر اساس تعیین توالی 16S rRNA ---------- ۳۴

فصل دوم: مروری بر مطالعات انجام شده---------- ۳۷

فصل سوم: مواد و روشها---------- ۴۸
۳-۱. ارگانیسم ها---------- ۴۹
۳-۲. محیطهای کشت ---------- ۴۹
۳-۳. نمونه های خاک---------- ۵۰
۳-۳-۱. نمونه برداری---------- ۵۰
۳-۳-۲. آماده سازی سوسپانسیون خاک ---------- ۵۰
۳-۴. غربالگری اولیه نمونه های خاک ---------- ۵۰
۳-۵. جداسازی باکتریهای مهارکننده---------- ۵۱
۳-۶. بررسی میزان مهار رشد عوامل قارچی توسط باکتری های انتخاب شده با استفاده از روش کشت خطی---------- ۵۲
۳-۷. بررسی فعالیت مهاری در کشت مایع---------- ۵۴
۳-۷-۱. تهیه سوپ حاوی متابولیت مهار کننده رشد قارچ از محیط کشت باکتری---------- ۵۴
۳-۷-۲. سنجش فعالیت مهاری در پلیتهای ۶ خانه---------- ۵۴
۳-۸. شناسایی ملکولی باکتری های مهارکننده رشد قارچ براساس توالی ژن 16S rRNA -----۵۵
۳-۸-۱. تهیه کلنی خالص از باکتری---------- ۵۵

۳-۸-۲. شناسایی باکتریهایی گرم مثبت و گرم منفی---------- ۵۵
۳-۸-۳. استخراج و ارزیابی DNA باکتریهای مهارکننده---------- ۵۶
۳-۸-۳-۱. استخراج DNA باکتریهای گرم مثبت---------- ۵۶
۳-۸-۳-۲. استخراج DNA باکتریهای گرم منفی---------- ۵۷
۳-۸-۳-۳. الکتروفورز ژل آگارز---------- ۵۷
۳-۸-۴. انجام PCR ---------- ۵۹
۳-۸-۴-۱. توالی آغازگر های استفاده شده ---------- ۵۹
۳-۸-۴-۲. محلول های مورد نیاز جهت انجام PCR ---------- ۵۹
۳-۸-۴-۳. بهینه‌سازی PCR ---------- ۶۱
۳-۸-۵. تعیین توالی نوکلئوتیدی 16S rRNA تکثیر شده---------- ۶۲

فصل چهارم: نتایج---------- ۶۴
۴-۱. غربالگری اولیه نمونه های خاک حاوی ارگانیسم های مهار کننده ی رشد قارچ------ ۶۵
۴-۲. جداسازی میکروارگانیسم های مهار کننده رشد قارچ از نمونه های خاک---------- ۶۸
۴-۳. شناسایی ملکولی باکتری های مهارکننده رشد عوامل قارچی---------- ۷۱
۴-۴. نتایج حاصل از بررسی میزان مهار رشد عوامل قارچی توسط باکتریهای مهار کننده با استفاده از روش کشت خطی ---------- ۷۵
۴-۵. نتایج حاصل از بررسی تاثیر *سودوموناس کلرورافیس* بر رشد عوامل قارچی در کشت مایع---------- ۸۸

فصل پنجم: بحث، نتیجه گیری و پیشنهادها---------- ۹۱

۵-۱.بحث و نتیجه گیری----------۹۲
۵-۲.پیشنهادها---------- ۱۰۰
فهرست منابع---------- ۱۰۱

چکیده انگلیسی ---------- ۱۱۲

فهرست جداول

عنوان صفحه

جدول ۱-۱ . تعدادی از متابولیت های تولید شده توسط باکتریها ---------- ۱۸

جدول ۱-۲. میزان تقریبی میکروارگانیسم های خاک---------- ۱۹

جدول ۳-۱. مراحل زمانی جهت انجام PCR ---------- ۶۱

جدول ۴-۱. نتایج شناسایی اولیه نمونه های خاک حاوی ارگانیسم های مهار کننده ی رشد قارچ----------۶۶

جدول ۴-۲. جداسازی میکروارگانیسم های مهار کننده رشد قارچ ازنمونه های خاک------- ۶۹

جدول۴-۳. میزان رشد قارچ های مورد بررسی بر حسب میلیمتر بدنبال مجاورت با باکتری های دارای اثرات مهار کنندگی در کشت خطی در محیط GY آگار---------- ۷۶

جدول ۴-۴. تاثیر مهاری فیلترای کشت *سودوموناس کلرورافیس* بر رشد درماتوفیت های بیماریزا و ساپروفیت های مهم در کشت مایع در محیط GY ---------- ۸۹.

فهرست نمودارها

عنوان **صفحه**

نمودار ۴-۱. تاثیر مهاری *آسینتوباکتر بومانی* ایزوله ۱-۱ بر رشد برخی از درماتوفیت های بیماریزا و قارچهای ساپروفیت----------۷۷

نمودار ۴-۲. تاثیر مهاری *باسیلوس سوبتیلیس* ایزوله ۱-۲۳ بر رشد برخی از درماتوفیت های بیماریزا و قارچهای ساپروفیت----------۷۸

نمودار ۴-۳. تاثیر مهاری *باسیلوس سوبتیلیس* ایزوله ۱-۱۱۵ بر رشد برخی از درماتوفیت های بیماریزا و قارچهای ساپروفیت----------۷۹

نمودار ۴-۴. تاثیر مهاری *باسیلوس سوبتیلیس* ایزوله ۲-۲ بر رشد برخی از درماتوفیت های بیماریزا و قارچهای ساپروفیت----------۷۹

نمودار ۴-۵. تاثیر مهاری *باسیلوس سوبتیلیس* ایزوله ۵-۱۰۵ بر رشد برخی از درماتوفیت های بیماریزا و قارچهای ساپروفیت----------۸۰

نمودار ۴-۶. تاثیر مهاری *باسیلوس سوبتیلیس* ایزوله ۱-۱۴۰ بر رشد برخی از درماتوفیت های بیماریزا و قارچهای ساپروفیت----------۸۰

نمودار ۴-۷. تاثیر مهاری *باسیلوس آمیلولیکوفاسینس* ایزوله ۲-۲۳ بر رشد برخی از درماتوفیت های بیماریزا و قارچهای ساپروفیت---------- ۸۱

نمودار ۴-۸. تاثیر مهاری *باسیلوس آمیلولیکوفاسینس* ایزوله ۲-۱۲۳ بر رشد برخی از درماتوفیت های بیماریزا و قارچهای ساپروفیت---------- ۸۲

نمودار ۴-۹. تاثیر مهاری *باسیلوس آمیلولیکوفاسینس* ایزوله ۲-۱۲۴ بر رشد برخی از درماتوفیت های بیماریزا و قارچهای ساپروفیت----------۸۲

نمودار ۴-۱۰. تاثیر مهاری *باسیلوس آمیلولیکوفاسینس* ایزوله ۳-۱۰۲ بر رشد برخی از درماتوفیت های بیماریزا و قارچهای ساپروفیت---------- ---------- ---------- ۸۳

نمودار ۴-۱۱. تاثیر مهاری *باسیلوس آمیلولیکوفاسینس* ایزوله ۱-۸۵ بر رشد برخی از درماتوفیت های بیماریزا و قارچهای ساپروفیت---------- ۸۳

نمودار ۴-۱۲. تاثیر مهاری *باسیلوس آمیلولیکوفاسینس* ایزوله ۲-۱۴۳ بر رشد برخی از درماتوفیت های بیماریزا و قارچهای ساپروفیت----------۸۴

نمودار ۴-۱۳. تاثیر مهاری اکتینومیست ایزوله ۱-۴۰ بر رشد برخی از درماتوفیت های بیماریزا و قارچهای ساپروفیت----------۸۵

نمودار ۴-۱۴. تاثیر مهاری *باسیلوس والیسمورتیس* ایزوله ۱-۱۲۱ بر رشد برخی از درماتوفیت های بیماریزا و قارچهای ساپروفیت----------۸۶

نمودار ۴-۱۵. تاثیر مهاری *باسیلوس والیسمورتیس* ایزوله ۳-۲۴ بر رشد برخی از درماتوفیت های بیماریزا و قارچهای ساپروفیت----------۸۶

نمودار ۴-۱۶. تاثیر مهاری *سودوموناس کلروارافیس* ایزوله ۲-۱۰۵ بر رشد برخی از درماتوفیت های بیماریزا و قارچهای ساپروفیت----------۸۷

فهرست تصاویر

عنوان **صفحه**

تصویر ۴-۱. مهار رشد *آسپرژیلوس نایجر* بدنبال رشد باکتری های موجود در خاک (شماره ۱۴ در سمت چپ و شماره ۷۵ در سمت راست) در محیط عصاره مخمر-گلوکز آگار (GY) --------۶۵

تصویر ۴-۲. مهار رشد *آسپرژیلوس نایجر* توسط ایزوله های باکتری شماره های ۱-۲۳ و ۲-۲۳ (راست) و ۱-۸۵ (چپ)---------- ۶۸

تصویر ۴-۳. ارزیابی استخراج DNA باکتریهای مهارکننده بوسیله الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد--- ----------۷۲

تصویر ۴-۴. تکثیر 16S rRNA باکتری های مهارکننده با استفاده از پرایمر های یونیورسال (از سمت چپ ستون۱: مارکر DNA، ستون های ۲ و ۳: کنترل منفی، ستون های ۴ تا ۱۲: DNA باکتریهای مورد بررسی). ----------۷۲

تصویر۴-۵. آنالیز توالی 16s rRNA *آسینتوباکتر بومانی*----------۷۳

تصویر ۴-۶. تاثیر مهاری باکتری *سودوموناس کلروارافیس* (ایزوله ۲-۱۰۵) بر رشد *آسپرژیلوس فلاووس* در مقایسه با کنترل(چپ)و توسط *باسیلوس سوبتیلیس* ایزوله ۲-۲ بر رشد *ترایکوفایتون منتاگروفایتس* در مقایسه با کنترل (راست) به روش کشت خطی ----------۷۵

تصویر۴-۷. **تاثیر مهاری فیلترای کشت *سودوموناس کلروارافیس* بر رشد *آسپرژیلوس نایجر* در محیط کشت مایع GY**----------۸۸

فصل اول

مقدمه

۱-۱. کلیات

جستجو برای یافتن ترکیبات ضد میکروبی موثر از گذشته تا کنون یکی از مسائل مهمی است که جامعه انسانی با آن مواجه بوده است [۳-۱]. شیوع عفونت های قارچی در سالهای اخیر باتوجه به محدودیت در استفاده از داروهای ضد قارچی بدلیل اثرات جانبی شدید آنها در انسان و حیوان و همچنین پیدایش مقاومت میکروبی نسبت به آنها بطور چشمگیری افزایش یافته است [۱۷-۴]. علی رغم پیشرفت های وسیعی که امروزه در درمان و پیشگیری از عفونت های قارچی پاتوژن صورت گرفته به موارد بروز این قبیل عفونت ها افزوده شده است. با پیشرفت های درمانی که در زمینه بیماری های بدخیم ،خود ایمن و پیوند اعضا حاصل شده است میزان موارد ابتلا به عفونت های قارچی در این افراد در حال افزایش می باشد به طوری که امروزه شاهد افزایش چشمگیر عفونت های قارچی فرصت طلب نسبت به گذشته می باشیم [۱۷-۴]. در همین راستا، بویژه در سالهای اخیر، اساس اکثر مطالعات انجام گرفته در درمان عفونت های قارچی بر یافتن ترکیبات جدید مهارکننده رشد عوامل قارچی استوار بوده و توجه محققین به بررسی تاثیر میکروارگانیسم های مختلف، بویژه باکتریها و متابولیت های تولید شده توسط آنها بر رشد قارچها معطوف گردیده است . برخی از متابولیت های موثر در این رابطه از منابع زنده استخراج و مورد شناسایی قرار گرفته اند [۲۲-۱۸]. میکروارگانیسمها ، از جمله منابع اصلی، جهت یافتن ترکیبات ضد میکروبی موثر بر علیه باکتریها، قارچ ها، ویروس ها و انگلها می باشند. میکروارگانیسم های خاک و متابولیت های تولید شده توسط آنها بعنوان بهترین منبع حاوی ترکیباتی با خاصیت ضد میکروبی برای درمان بیماری های عفونی ، مطرح شده اند [۲۸-۲۳]. این میکروارگانیسم منبع بسیاری از ترکیبات طبیعی فعال با فعالیت زیستی هستند که به طور گسترده در

علوم زیستی و داروسازی مورد استفاده قرار می گیرند. در همین رابطه، گزارشات متعددی از حضور باکتری ها به عنوان میکروارگانیسم های غالب در اغلب خاکها که می توانند به عنوان عاملی در جهت کنترل زیستی قارچهای بیماریزا استفاده شوند، وجود دارد [۳۶-۲۸]. مکانیسم های مختلفی در خصوص کنترل زیستی بوسیله باکتری ها عنوان شده است که شامل زندگی انگلی، تولید ترکیبات ضد قارچ، رقابت برای آهن، غذا و محل زندگی می باشد. به طور مثال گونه های باسیلوس[۱] که بعنوان یکی از رایجترین ارگانیسم های خاک مطرح می باشند، قادر به تولید آنتی بیوتیکی به نام باسیلومایسین D[۲] هستند که قادر به کنترل زیستی *آسپرژیلوس فلاووس*[۳] می باشد [۲۰]. بنهامایسین[۴] و آفلاستاتین[۵] تولید شده توسط برخی از استرپتومیستها[۶] و همچنین ترکیباتی نظیر ایتورین ها[۷]، باسیلومایسین ها، مایکوسابتیلین[۸]، سورفکتین[۹] و فنژیسین[۱۰] که توسط *باسیلوس سوبتیلیس*[۱۱] تولید می شوند ، قادر به مهار رشد بسیاری از قارچهای بیماریزا در انسان، حیوانات و گیاهان هستند [۴۷-۳۷ و ۲۰]. با توجه به گزارش انواع باکتریهای خاکزی بعنوان عوامل پرقدرت مهارکننده رشد قارچهای فیتوپاتوژن، انجام تحقیق در خصوص باکتریهای آنتاگونیست موجود در خاک میتواند به یافتن باکتریهای جدید و یا سویه های با تاثیر بیشتر از باکتریهای شناخته شده کمک کند. این ارگانیسمها میتوانند بعنوان کاندیدهای بالقوه ی کنترل بیولوژیک قارچها در طبیعت مطرح باشند. همچنین تخلیص و افزایش تولید متابولیتهای ضدقارچی در آنها با استفاده از بهینه سازی شرایط کشت و مهندسی ژنتیک میتوانند ارزش زیادی در طراحی داروهای ضد قارچی جدید داشته باشد.

---

[1] *Bacillus*
[2] Bacillomycin D
[3] *Aspergillus flavus*
[4] Benhamycin
[5] Aflastatin
[6] Streptomycet
[7] Iturins
[8] Mycosubtilin
[9] Surfactin
[10] Fengycin
[11] *B. subtilis*

با توجه به اهمیت مطالب فوق در تحقیق حاضر، باکتریهای مهارکننده رشد عوامل قارچی از خاک مناطق مختلف در تهران با استفاده از محیط های کشت اختصاصی جداسازی گردیدند. غربالگری اولیه جهت جداسازی ارگانیسم های مهار کننده رشد عوامل قارچی بر روی *آسپرژیلوس نایجر*[1]، بعنوان یکی از شایعترین عوامل قارچی آلوده کننده محیط زیست که در اتیولوژی بیماریهای مختلف بویژه اتومایکوزیس[2] در پستانداران دخیل است و از جمله مهمترین قارچهای بیماریزای گیاهی نیز محسوب میگردد، صورت گرفت. سپس باکتری های انتخاب شده با اثرات مهار کنندگی بالا در مجاورت برخی از قارچهای بیماریزا نظیر تعدادی از *درماتوفیت ها*[3] و فرصت طلب هایی چون *آسپرژیلوس فلاووس* و *فوزاریوم مونیلی فرم*[4] قرار گرفتند. نهایتا باکتری های دارای فعالیت ضد قارچی بالا با استفاده از روشهای فیزیولوژیک و با توجه به آنالیز توالی RNA ریبوزومی 16S با استفاده از روش PCR توسط پرایمرهای اختصاصی در سطح جنس و گونه مورد شناسایی قرار گرفتند.

۱-۲. مروری بر قارچ شناسی

قارچ ها ارگانیسم های یوکاریوت هتروتروف هستند که انواع دارای اهمیت پزشکی آنها عمدتا به اشکال مخمری و رشته ای مشاهده می شوند. هر چند تا کنون متجاوز از یک صد هزار گونه مختلف قارچی کشف شده است و تعداد گونه موجود در حدود ۱/۵ میلیون تخمین زده میشود، اما از میان گونه های شناخته شده عمدتا حدود ۲۰۰ گونه هستند که توانایی ایجاد بیماری در انسان و حیوانات را دارا می باشند. عفونت های حاصله از قارچ ها دارای طیف وسیعی بوده و بسته به محل آن به پنج گروه عفونت های سطحی، جلدی، مخاطی، زیر جلدی و احشائی طبقه بندی می شوند [۴۸و۴]. هرچند عفونت های احشایی ناشی از قارچ ها می تواند کشنده باشد اما انواع سطحی و جلدی غالبا محدود و قابل بهبود می باشند.

---

[1] *A. niger*

[2] Otomycosis

[3] Dermatophytes

[4] *Fusarium moniliforme*

از نظر بیماریزایی قارچ ها را می توان به دو گروه بیماری زای حقیقی و فرصت طلب طبقه بندی کرد. در حالی که گروه اول قادر به درگیری در افراد سالم می باشند، قارچ های فرصت طلب معمولا تنها در افرادی که دارای فاکتورهای مستعد کننده نسبت به ابتلا به عفونت قارچی باشند، ایجاد بیماری می نمایند. به عبارت دیگر در این قبیل عفونت ها بیش از آنکه ارگانیسم مسئول بروز عفونت باشد، عوامل مستعد کننده میزبان را آماده پذیرش عفونت می سازند. از جمله قارچ های فرصت طلب می توان به گونه های آسپرژیلوس، پنی سیلیوم، فوزاریوم و از قارچ های بیماری زا به درماتوفیت ها اشاره کرد [۴و۴۸-۵۱].

۱-۳. اهمیت قارچ ها در پزشکی

امروزه انسانها به دلایل مختلف از جمله بیماریهای نقص سیستم ایمنی، انواع سرطان ها، دیابت، شیمی درمانی، و مصرف طویل المدت آنتی بیوتیک های وسیع الطیف، مستعد ابتلا به عفونت قارچی شده اند. همچنین افزایش تعداد گیرندگان مغز استخوان و کبد، تغذیه از راه وریدی و عواملی مانند درمان با استروئید ها، شیوع عفونت های قارچی را بشدت افزایش داده است [۴و۷و۱۱و۴۸-۵۲]. عفونتهای قارچی سیستمیک تحت عنوان کلی عفونت های بیمارستانی در بیمارستانهای مدرن روزبروز در حال افزایش است. اینگونه عفونت ها معمولا در سه گروه از بیماران دیده میشوند:

۱- بیماران نوتروپنیک[1] به دنبال شیمی‌درمانی و سایر بیماران انکولوژی که سیستم ایمنی سرکوب شده‌ای دارند.

۲- افرادیکه بعلت عفونت HIV سیستم ایمنی مختل شده‌ای دارند.

۳- بیماران بستری در بخشهای مراقبت ویژه که لزوما نوتروپنیک نیستند اما سیستم دفاعی آنها بعلت استفاده طولانی مدت از کاتترهای داخل عروقی و یا رخنه و شکست سد دفاعی پوست، بیماریهای سیستمیک شدید یا سوختگیها و درمان طولانی مدت با آنتی بیوتیکهای وسیع‌الطیف آسیب دیده و مختل گردیده است. سایر فاکتورهای مستعد کنندهٔ در ابتلا به عفونت های قارچی

[1]Neutropenic