فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال ششم، شماره 21، بهار 1396، صفحه 14- 1
تاریخ دریافت: 1393/03/10 – تاریخ پذیرش:
1394/08/06

کنترل زیستی قارچ‌های *پیتیوم اولتیموم* و *فوزاریوم سولانی* توسط سویه‌های بومی *باسیلوس سوبتیلیس*

آفاق محمدی: دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی، تهران، ایران، afagh_mohamadi07@yahoo.com
عباس اخوان سپهی *: دانشیار میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران، akhavansepahy@gmail.com
سیدرضا حسینی‌دوست: استاد تمام میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی، تهران، ایران، rhdoust@gmail.com

چکیده

مقدمه: سویه‌های *باسیلوس سوبتیلیس* به‌جهت داشتن قابلیت کنترل بیماری‌های گیاهی ازطریق تولید متابولیت‌های ثانویه به‌ویژه لیپوپپتیدهای گروه ایتورین، مهم‌اند. هدف از این پژوهش، بررسی فعالیت ضدقارچی سویه‌های بومی *باسیلوس سوبتیلیس* علیه قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی *پیتیوم اولتیموم* و *فوزاریوم سولانی* است.

مواد و روش‌ها: سویه‌های *باسیلوس سوبتیلیس* از 7 نمونه خاک پارک‌های جنگلی تهران جداسازی و فعالیت ضدقارچی این سویه‌ها طی روش چاهک‌گذاری بررسی شد. بهترین سویه‌های باکتریایی با روش *16SrDNA* شناسایی شدند. محیط نوترینت براث ازنظر منابع کربن و نیتروژن، pH و دمای مناسب رشد جهت تولید بیشترین متابولیت ضدقارچی توسط سویه‌های بومی منتخب بهینه شد. سپس این متابولیت‌ها از کشت 4روزهٔ سویه‌های ذکرشده، تخلیص و وجود آنتی‌بیوتیک ایتورین A با استفاده از روش کروماتوگرافی تأیید شد.

نتایج: از مجموع 91 سویهٔ باکتریایی جداشده از نمونه‌های خاک، 23 سویه مطابق خصوصیات مرفولوژیک و بیوشیمیایی به‌عنوان *باسیلوس سوبتیلیس* تعیین هویت شدند. در آزمایش‌های بعدی، 2 سویهٔ 48 و 83 به‌ترتیب علیه قارچ‌های *پیتیوم اولتیموم* و *فوزاریوم سولانی* بیشترین فعالیت را نشان دادندکه نتایج حاصل از تطبیق توالی سویه‌های منتخب، 100درصد شباهت را به گونهٔ *باسیلوس سوبتیلیس* تأیید کرد. سپس سویه‌های منتخب در محیط نوترینت براث با منبع کربن گلوکز، منبع نیتروژن عصارهٔ مخمر، pH خنثی و دمای گرماگذاری 30 درجه سانتیگراد، بیشترین فعالیت ضدقارچی را از خود بروز دادند. نتایج HPLC نیز ازطریق مطابقت زمان ظهور پیک ایتورین A استاندارد در سویه‌های بومی نشان داد که هر 2 سویه توانستند در محدودهٔ زمانی مشابه با سویهٔ استاندارد، ایتورین A را تولید کنند.

بحث و نتیجه‌گیری: سویه‌های بومی ایران نیز توانایی تولید متابولیت‌های ضدقارچی را دارند. از این جهت این سویه‌ها می‌توانند کاندیدای مناسبی جهت کنترل زیستی قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی و جایگزینی برای قارچ‌کش‌های شیمیایی باشند.

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

www.SID.ir

واژه‌های کلیدی: کنترل زیستی، *باسیلوس سوبتیلیس*، ایتورین، *پیتیوم اولتیموم*، *فوزاریوم سولانی*

مقدمه

بیماری‌های گیاهی ایجادشده توسط عوامل بیماری‌زای موجود در خاک، از مشکلات عمده در تولید محصولات کشاورزی به شمار می‌آیند (1). قارچ‌های *پیتیوم اولتیموم*[1] و *فوزاریوم سولانی*[2] از جمله شایع‌ترین قارچ‌های مؤثر در ایجاد بیماری در گیاهان هستند. قارچ *پیتیوم اولتیموم* از معمول‌ترین قارچ‌های جداسازی‌شده در استرالیا، برزیل، چین، کره و بسیاری از مناطق جهان، عامل مرگ گیاهچه و بیماری‌های ریشه‌ای در گیاهانی ازجمله کلم، هویج، خیار، خربزه و گندم است. بیماری مرگ گیاهچه با پوسیدگی طوقه و ریشهٔ گیاهچه همراه است به‌طوری‌که قسمت پوسیده‌شده تحمل وزن اندام هوایی گیاهچه را نخواهد داشت و درنتیجه گیاهچه به زمین می‌افتد و می‌پوسد (2). قارچ *فوزاریوم سولانی* از قارچ‌های جداسازی‌شده در آرژانتین و سایر مناطق جهان عامل بیماری‌های پوسیدگی و خشکیدگی گیاهان است که در بسیاری از محصولات زراعی از جمله لوبیا، خیار و سیب زمینی شیرین ازطریق پژمردگی به‌میزان درخورِتوجهی سبب ازبین‌رفتن محصول می‌شود. سویه‌های *فوزاریوم سولانی* به‌قدری فراوانی‌شان در خاک و مواد گیاهی فاسد زیاد است که تجزیه‌کننده نیز محسوب می‌شوند (3). قارچ‌کش‌های شیمیایی برای مدت طولانی به‌عنوان عوامل قدرتمند جهت کاهش بروز بیماری‌های قارچی استفاده می‌شدند؛ اما به‌دلایل پرهزینه‌بودن، ایجاد آلودگی در محیط زیست و مقاومت عوامل بیماری‌زا نسبت به آن‌ها، استفاده از مواد شیمیایی کاهش یافته است. کنترل زیستی با استفاده از میکروارگانیسم‌ها از بروز بیماری‌های گیاهی جلوگیری می‌کند و جایگزین مناسبی برای روش‌های شیمیایی به حساب می‌آید (4). از میان باکتری‌های مؤثر در کنترل زیستی اعضای جنس *باسیلوس*[3] به‌دلیل داشتن مزایایی از قبیل تشکیل اندوسپور و مقاومت در شرایط دشوار نسبت به سایر عوامل کنترل زیستی مهم هستند (5). جنس *باسیلوس* شامل باکتری‌های میله‌ای شکل، گرم مثبت، هوازی و اکثراً ساپروفیت بوده که می‌توانند متابولیت‌های ثانویه با طیف وسیعی از فعالیت‌های آنتی‌بیوتیکی علیه قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی تولید کنند (6 و 7). تولید طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌های ضدقارچی از جمله خانواده‌های لیپوپپتیدی ایتورین[4]، سورفاکتین[5] و فنجیسین[6] توسط سویه‌های کنترل زیستی *باسیلوس سوبتیلیس*[7] می‌توانند نقش کلیدی در سرکوب بیماری‌های گیاهی ایفا کند زیرا این آنتی‌بیوتیک‌ها دارای مزایایی نسبت به دیگر آفت‌کش‌ها از جمله سمیت کم، تجزیه زیستی بالا و خصوصیات مساعد و سازگار با محیط زیست هستند و به‌خوبی می‌توانند از رشد و تکثیر قارچ‌ها و برخی باکتری‌های بیماری‌زا ممانعت کنند (8 و 9 و 10). مهم‌ترین عضو خانواده ایتورین، ایتورین A شامل 7 آمینواسید متصل به βآمینوفتی‌اسید است که فعالیت سمیت قارچی قوی علیه عوامل بیماری‌زای مختلف دارد (11). این آنتی‌بیوتیک با مولکول استرول غشای سلولی

www.SID.ir

قارچ‌های بیماری‌زا واکنش و نفوذپذیری غشا سلول را تغییر داده و و از هدایت یونی جلوگیری می‌کند و درنهایت سبب مرگ سلول هدف می‌شود (12). ازاین‌رو در این پژوهش به بررسی فعالیت ضدقارچی سویه‌های بومی *باسیلوس سوبتیلیس* در ایران علیه قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی *پیتیوم اولتیموم ATCC20692* و *فوزاریوم سولانی ATCC1460* و انتخاب بهترین سویهٔ مولد آنتی‌بیوتیک انجام شده است. همچنین شرایط تولید آنتی‌بیوتیک برای سویه‌های منتخب از نظر منبع کربن، منبع نیتروژن، اسیدیته و دما بهینه‌سازی شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی باسیلوس سوبتیلیس: سویه‌های *باسیلوس* استفاده‌شده در این پژوهش از 7 نمونه خاک پارک‌های جنگلی تهران (چیتگر، طالقانی، شیان، سرخه حصار، پردیسان، مناطق جنگلی بوستان نهج‌البلاغه، مناطق جنگلی بوستان گفتگو) جداسازی شدند، به این طریق که به‌فاصلهٔ 1 متر از ریشه و از عمق 3 تا 10سانتی‌متری خاک تحت شرایط استریل نمونه‌برداری انجام گرفت (13) و سپس نمونه‌ها سریعاً در دمای 4 درجه سانتیگراد جهت آزمایش به آزمایشگاه منتقل شدند. در ابتدا نمونه‌های موردنظر طی روش غنی‌سازی حرارتی به‌مدت 10 دقیقه در 80 درجه سانتیگراد جهت حفظ اسپورها و حذف سلول‌های رویشی تیمار شدند (14). سپس از روش تهیهٔ رقت استفاده شد به این صورت که طی روش پورپلیت[8] رقت‌های متوالی از نمونه‌ها در آب‌مقطر استریل تهیه شد و از رقت 0/1 رقت‌های متوالی تا 10/10 از هر نمونه خاک تهیه شد و میزان 1 میلی‌لیتر از هر یک از این رقت‌ها در داخل پلیت استریل ریخته شد و سپس محیط کشت نوترینت آگار[9](شامل 5 گرم بر لیتر پپتون، 3 گرم بر لیتر عصارهٔ گوشت و 15 گرم بر لیتر آگار) اتوکلاو شد و در شرایط استریل روی آنها ریخته شد و محیط‌ها به‌مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتیگراد گرماگذاری شدند (15). سپس از کلنی‌های مشابه *باسیلوس سوبتیلیس* براساس خصوصیات مرفولوژیکی (رنگ، شکل ظاهری کلنی و قوام) طی کشت 4 منطقه‌ای در محیط نوترینت آگار کشت خالص تهیه شد و به‌منظور جداسازی انحصاری سویه‌های *باسیلوس سوبتیلیس*، بررسی‌های میکروسکوپی (رنگ‌آمیزی گرم و مالاشیت‌گرین) و بررسی‌های بیوشیمیایی شامل تست‌های کاتالاز، استفاده از سیترات، هیدرولیز لستین، حرکت، احیای نیترات و تخمیر قندهای گلوکز، آرابینوز، مانیتول و گزیلوز انجام شد.

سویه‌های قارچی: سویه‌های قارچی *پیتیوم اولتیموم ATCC20692* و *فوزاریوم سولانی ATCC1460* که از بانک میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند، به‌ترتیب در محیط‌های کشت کورن میل آگار[10] (شامل 2 گرم بر لیتر کورن میل و 15 گرم بر لیتر آگار) و سابروز دکستروز آگار[11] (شامل 5 گرم بر لیتر پپتون کازئین، 5 گرم بر لیتر پپتون گوشت، 40 گرم بر لیتر دی-گلوکز و 15 گرم بر لیتر آگار) که پس از تهیه، در اتوکلاو با دمای 121 درجه سانتیگراد به‌مدت 15 دقیقه استریل شده بودند،کشت داده شدند و سپس در انکوباتور با دمای 25 درجه سانتیگراد گرماگذاری شدند.

بررسی فعالیت ضدقارچی سویه‌های بومی باسیلوس سوبتیلیس: جهت بررسی فعالیت ضدقارچی سویه‌های *باسیلوس سوبتیلیس* به‌دست‌آمده از نمونه‌های خاک علیه قارچ‌های *پیتیوم اولتیموم* و *فوزاریوم سولانی* از روش چاهک‌گذاری استفاده شد. در این روش از کشت

www.SID.ir

72ساعته هر قارچ، به‌طور جداگانه، مطابق با شاهد نیم‌مک‌فارلند ($1/5\times10^8$ CFU/ml) در محیط سابروز دکستروز براث[12]، سوسپانسیون تهیه شد، به این صورت که در ابتدا برای شاهد، یک استاندارد نیم‌مک‌فارلند تهیه شد به این منظور 0/5 میلی‌لیتر کلرور باریم را به 99/5 میلی‌لیتر اسیدسولفوریک اضافه کرد و جذب نوری این محلول برابر با 1 خوانده شد. سپس مقداری از کلنی رشدکرده روی پلیت 72ساعته قارچی در 3 تا 5 میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل حل شد و کدورت آن را با نیم‌مک‌فارلند تنظیم شد (مطابق با استاندارد نیم‌مک‌فارلند سوسپانسیون میکروبی تهیه‌شده با این روش باید کدورتی معادل $1/5\times10^8$ CFU/ml کلنی داشته باشد) (16). سپس هر سوسپانسیون قارچی به یک پلیت منتقل و به کمک سواپ استریل کشت متراکم داده شد. سپس 50 میکرولیتر از سوسپانسیون 24ساعته جدایه‌های باکتریایی تهیه شده در محیط نوترینت براث[13] معادل شاهد نیم‌مک‌فارلند، به‌طور جداگانه در داخل هر چاهک ریخته شد. پلیت‌ها در انکوباتور با دمای 25-26 درجه سانتیگراد به‌مدت 72 ساعت گرماگذاری شدند (17). برای هر آزمایش 3 بار تکرار در نظر گرفته شد. به‌عنوان شاهد عدم‌رشد 50 میکرولیتر محیط نوترینت براث استریل در یک چاهک ریخته شد. درنهایت قطر هاله‌های عدم‌رشد قارچ در اطراف چاهک‌ها و نیز میانگین قطر هاله‌ها با استفاده از خط‌کش آنتی‌بیوگرام اندازه‌گیری شد. آنالیز آماری داده‌های جمع‌آوری‌شده با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه[14] انجام شد که به‌منظور بررسی وجود اختلاف معنادار در میانگین مقادیر گروه‌های مورد آزمایش است.

شناسایی مولکولی سویه‌های *باسیلوس‌سوبتیلیس* با بیشترین میزان فعالیت ضدقارچی: شناسایی تکمیلی سویه‌های منتخب با تکثیر و تعیین توالی ژن *16srRNA* انجام شد. به این منظور ابتدا باکتری‌ها روی محیط نوترینت آگار کشت چمنی داده شدند و به‌مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتیگراد گرماگذاری شدند. سپس با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت سیناژن، ایران) DNA ژنومی استخراج شد و با استفاده از آغازگرهای 27F: 5- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3 و 1492R: 5- GGTTACCTTGTTACGACTT_3، برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد (18). واکنش PCR با حجم نهایی 25 میکرولیتر شامل: 2/5 میکرولیتر بافر (10x)، 3/5 میلی‌مول $MgCl_2$، 200 میکرو مول dNTPs، 1/25 واحد آنزیم از Taq DNA Polymerase، 0/4 میکرومول از هر آغازگر، 1 میکرولیتر از نمونه DNA و 1 میکرولیتر آب‌مقطر دی‌یونیزه انجام شد. واکنش PCR با شرایط دمایی واسرشت‌شدن ابتدایی در دمای 95 درجه سانتیگراد به‌مدت 5 دقیقه و در ادامه 30 چرخه شامل واسرشت در دمای 95 درجه سانتیگراد به‌مدت 0/5 دقیقه، اتصال در دمای 56 درجه سانتیگراد به‌مدت 30 ثانیه، طویل‌شدن در دمای 72 درجه سانتیگراد به‌مدت 90 ثانیه و طویل‌شدن نهایی در دمای 72 درجه سانتیگراد به‌مدت 10 دقیقه انجام شد. محصول PCR با استفاده از الکتروفورز در ژل آگاروز 0/8درصد بررسی شد. محصولPCR جهت تعیین توالی به مرکز ملی ذخایر ژنتیکی ایران فرستاده شد. جهت تأیید شناسایی باکتری‌ها، توالی‌های حاصله با استفاده از نرم‌افزار بلاست[15] با توالی نوکلئوتیدی موجود در بانک اطلاعات ژنی، تطبیق داده شد.

بهینه‌سازی پارامترهای محیطی جهت تعیین بهترین فعالیت

www.SID.ir

ضدقارچی سویه‌های منتخب: پس از سنجش فعالیت ضدقارچی سویه‌های *باسیلوس سوبتیلیس*، در این مرحله، تأثیر عوامل و پارامترهای محیطی و اکولوژیکی بر میزان فعالیت ضدقارچی سویه‌های برگزیده بررسی شد. در همهٔ مراحل فوق، به‌عنوان شاهد در یک چاهک 50 میکرولیتر سوسپانسیون باکتری بدون تغییر شرایط محیط کشت استفاده شد و برای هر آزمایش 3 تکرار در نظر گرفته شد. داده‌های جمع‌آوری‌شده در این مرحله با استفاده از آزمون دامنهٔ چندگانه دانکن[16] تحلیل شدند که یک شیوهٔ متداول برای مقایسهٔ تمام جفت‌های میانگین‌هاست.

الف- منبع کربن: به‌منظور بررسی تأثیر منبع کربن از سه قند گلوکز (منوساکارید)، لاکتوز (دی‌ساکارید) و نشاسته (پلی‌ساکارید) استفاده شد که جایگزین عصارهٔ گوشت (منبع کربن در محیط نوترینت براث) شدند. پس از کشت سویه‌های منتخب در این محیط‌ها، در دمای 30 درجه سانتیگراد به‌مدت 24 ساعت گرماگذاری شدند. پس از آن با استفاده از روش چاهک‌گذاری و اندازه‌گیری قطر هالهٔ عدم‌رشد ایجادشده با استفاده از خط‌کش آنتی‌بیوگرام و آزمون آنالیزی دامنهٔ دانکن تأثیر این مواد در روند میزان تولید متابولیت ضدقارچی ایتورین بررسی شد.

ب- منبع نیتروژن: در این مرحله تأثیر منابع نیتروژن مختلف شامل ازت آلی (عصارهٔ مخمر) و ازت معدنی (نیترات‌آمونیوم) ارزیابی شد. این مواد جایگزین پپتون شدند که به‌عنوان منبع اصلی نیتروژن در محیط نوترینت براث تلقی می‌شود. سوسپانسیون باکتری‌ها طبق روش ذکرشده در بند الف تهیه و پس از گرماگذاری، فعالیت ضدقارچی آنها بررسی شد. سپس بهترین منبع نیتروژن با توجه به میانگین قطر هالهٔ عدم‌رشد قارچ تعیین شد.

ج- اسیدیته: با استفاده از اسیدکلریدریک و هیدروکسیدسدیم محیط‌های کشت نوترینت براث حاوی مناسب‌ترین منابع کربن و نیتروژن با pH اسیدی و قلیایی تهیه شد. پس از کشت و گرماگذاری سوسپانسیون جدایه‌های منتخب در دمای 30 درجه سانتیگراد طبق روش ذکرشده در مراحل قبلی، فعالیت ضدقارچی آنها بررسی و با هم مقایسه شد.

د-دما: محیط کشت نوترینت براث حاوی مناسب‌ترین منابع کربن و نیتروژن و همچنین مناسب‌ترین میزان اسیدیته (طبق نتایج حاصله، pH 7) ساخته شد و پس از تهیه و کشت سوسپانسیون جدایه‌های منتخب، محیط‌ها در 3 دمای 25، 30 و 37 درجه سانتیگراد گرماگذاری شدند. پس از مدت‌زمان 24 ساعت، میزان فعالیت ضدقارچی بررسی شد (19 و 20).

تخلیص متابولیت‌های ضدقارچی از سویه‌های *باسیلوس سوبتیلیس*: باکتری‌های منتخب در داخل ارلن‌مایرهای 1 لیتری حاوی 250 میلی‌لیتر محیط کشت بهینه، کشت و به‌منظور تولید متابولیت ثانویه به‌مدت 4 روز در انکوباتور شیکردار (شرکت ژال تجهیز[17] مدل gtsl90) با دمای 30 درجه سانتیگراد و دور گردشی معادل 100 دور در دقیقه (100 rpm/min) گرماگذاری شدند. سپس محیط‌ها در دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار (شرکت هتیک[18]) با دورg × 8000 به‌مدت 25 دقیقه در دمای 5 درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شدند. مایع رویی فاقد سلول‌های باکتری با اسیدکلریدریک به pHمعادل 2 رسانده شد و رسوب شکل‌گرفته مجدداً با دور g× 12000 به‌مدت 15 دقیقه در 4 درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. رسوب ایجادشده در 2 تا 3 میلی لیتر متانول حل و در دمای 4 درجه سانتیگراد و دور گردش

www.SID.ir

20000 ×g برای مدت‌زمان 10 دقیقه سانتریفیوژ شد و درنهایت مایع رویی حاصله حاوی متابولیت‌های ضدقارچی به‌صورت عصارهٔ متانولی برداشته و در دمای 4 درجه سانتیگراد نگهداری شد (5).

آنالیز متابولیت‌های ضدقارچی با استفاده از HPLC: میزان 20 µl از عصاره‌های متانولی سویه‌های منتخب به‌دست‌آمده از مرحلهٔ قبل به دستگاه کروماتوگرافی با شرایط زیر تزریق شد: ستون C- 18 به‌عنوان فاز ثابت (250mm× 4mm) و مخلوط استونیتریل و آب با نسبت 30:70 به‌عنوان فاز متحرک، سرعت 1 میلی‌لیتر در دقیقه و مدت‌زمان 20 دقیقه، طول موج دستگاه نیز روی 240 نانومتر تنظیم شد. پس از تزریق نمونه به دستگاه با شرایط ذکرشده نتیجه به‌صورت پیک‌هایی در منحنی کروماتوگرام حاصله بر روی دستگاه مانیتور متصل به دستگاه کروماتوگرافی ظاهر و زمان ظهور[19] و محدوده زیر هر پیک نیز جداگانه ثبت شد. در این بررسی از متابولیت ضدقارچی ایتورین A که به‌صورت خالص از شرکت سیگما خریداری شد به‌عنوان شاهد استفاده گردید. به این منظور محلول 1 میلی‌گرم در میلی‌لیتر آن در حلال متانول، تهیه و 20 µl از آن به‌عنوان شاهد، قبل از نمونه‌های مجهول به دستگاه تزریق شد (5).

نتایج

جداسازی و شناسایی سویه‌های *باسیلوس‌سوبتیلیس*: در مرحلهٔ جداسازی سویه‌های *باسیلوس‌سوبتیلیس* از نمونه‌های خاک براساس خصوصیات مرفولوژیک، 91 کلنی سفیدرنگ، مایل به کرم، دوکی- گرد با قوام کره‌ای، سطحی خشن، حاشیه‌ای مضرس و بویی نامطبوع جداسازی و از آنها کشت 4منطقه‌ای تهیه شد و طی بررسی‌های میکروسکوپی و بیوشیمیایی با کنارگذاشتن سویه‌های مشابه در هر نمونه، درنهایت 23 سویه به‌عنوان *باسیلوس‌سوبتیلیس* تعیین هویت شدند که در مرحلهٔ بعد براساس فعالیت ضدقارچی علیه قارچ‌های ذکرشده غربالگری شدند.

سویه‌های قارچی: قارچ *پیتیوم‌اولتیموم* قارچی تند رشد، دارای کلنی‌های مخملی سفیدرنگ است که به‌تدریج خاکستری می‌شود. طبق بررسی‌های انجام‌شده و نتایج به‌دست‌آمده از مقالات مشابه، مشخص شد که این قارچ در محیط‌کشت کورن‌میل‌آگار بهتر و بیشتر از سایر محیط‌ها رشد می‌کند (21).

قارچ *فوزاریوم‌سولانی* قارچی تندرشد، دارای کلنی‌های مخملی سفید- صورتی‌رنگ است که به‌سرعت تغییر رنگ داده و به کلنی‌هایی با سطح مخملی یا پنبه‌ای تبدیل می‌شوند. می‌توان از محیط‌های کشت پوتیتودکستروزآگار[20]، سابروزدکستروزآگار و کورن میل آگار برای رشد این قارچ استفاده کرد که طی 24- 72 ساعت روی این محیط‌ها رشد می‌کند.

بررسی فعالیت ضدقارچی سویه‌های بومی *باسیلوس‌سوبتیلیس*: نتایج بررسی فعالیت ضدقارچی سویه‌های بومی جداسازی‌شده از خاک پارک‌های جنگلی تهران با استفاده از روش چاهک‌گذاری نشان داد که از میان 23 سویهٔ منتخب در مرحلهٔ قبل، 7 سویه علیه *پیتیوم‌اولتیموم* و *فوزاریوم‌سولانی* فعالیت ضدقارچی از خود نشان دادند که طبق بررسی‌های آماری صورت گرفته، از این میان فعال‌ترین سویه‌ها دربارهٔ قارچ *پیتیوم‌اولتیموم*، سویهٔ شماره 48 با میانگین قطر هالهٔ عدم‌رشد 15/3 میلی‌متر و دربارهٔ قارچ *فوزاریوم‌سولانی* سویهٔ شماره 83 با میانگین قطر هالهٔ عدم‌رشد 20/6 میلی‌متر بودند (جدول 1).

www.SID.ir

جدول 1- میانگین ± انحراف استاندارد قطر هاله‌های عدم‌رشد قارچ‌های *پیتیوم‌اولتیموم* و *فوزاریوم‌سولانی* در اثر فعالیت ضدقارچی به‌ترتیب سویه‌های منتخب 48 و 83

شماره باکتری / قارچ	5	19	31	46	48	72	83	p-مقدار
پیتیوم اولتیموم	0/67±0/58 12 d	0/00±0/00 13 d	0/33±0/58 14 b	0/00±0/00 13 d	0/33±0/58 15 a*	0/00±0/00 14 b,c	0/33±0/58 13 c,d	0/001 >
فوزاریوم سولانی	0/00±0/00 18 c	0/33±0/58 18 c	0/67±0/58 19 b	0/33±0/58 19 b	0/33±0/58 18 c	0/67±0/58 19 b	0/67±0/58 20 a*	0/001 >

گروه‌بندی آماری تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنهٔ دانکن در سطح (p-value<0/001) انجام شد و در هر ردیف تیمارهای دارای حروف مشابه در سطح احتمال 0/01 اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند (با توجه به نزدیک‌بودن مقادیر میانگین‌های سویه‌ها، هر سویه ممکن است در چندین گروه قرار بگیرد. میانگین هالهٔ عدم‌رشد سویه‌هایی که در یک گروه قرار گرفتند، تفاوت معناداری ندارد). طبق جدول دربارهٔ قارچ *پیتیوم‌اولتیموم* سویهٔ شماره 48 و دربارهٔ قارچ *فوزاریوم‌سولانی* سویهٔ شماره 83 در گروه آماری a قرار گرفته‌اند و درنتیجه بیشترین میزان فعالیت ضدقارچی را دارند که طبق نتایج حاصل از آنالیز *16srDNA* و بررسی‌های ژنتیکی انجام‌شده شباهت 100درصد به گونهٔ *باسیلوس سوبتیلیس* را نشان دادند.

بهینه‌سازی پارامترهای محیطی جهت رسیدن به بهترین فعالیت ضدقارچی سویه‌های منتخب: طبق نتایج حاصل از مرحلهٔ بهینه‌سازی که در جداول شماره 2، 3، 4 و 5 آمده است، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که بهترین منبع کربن، بهترین منبع نیتروژن، بهترین pH و بهترین دما به‌ترتیب قند گلوکز، عصارهٔ مخمر، pH خنثی و دمای 30 درجه سانتیگراد است.

با توجه به جدول 2، در هر دو قارچ بررسی‌شده، منابع کربن مختلف بر میزان هالهٔ عدم‌رشد تأثیرگذارند (p-value<0/001). با توجه به آزمون دامنهٔ دانکن، میزان فعالیت ضدقارچی سویه‌های منتخب *باسیلوس سوبتیلیس* در حضور قندگلوکز به‌عنوان منبع کربن در بالاترین گروه آماری (a) قرار گرفتند و درنتیجه گلوکز به‌عنوان مناسب‌ترین منبع کربن در نظر گرفته می‌شود.

با توجه به جدول 3، در هر دو قارچ بررسی‌شده، منابع نیتروژن مختلف بر میزان هالهٔ عدم‌رشد تأثیرگذارند (p-value<0/001). با توجه به آزمون دامنهٔ دانکن، میزان فعالیت ضدقارچی سویه‌های منتخب *باسیلوس سوبتیلیس* در حضور عصارهٔ مخمر به‌عنوان منبع نیتروژن در بالاترین گروه آماری (a) قرار گرفتند و درنتیجه عصارهٔ مخمر به‌عنوان مناسب‌ترین منبع نیتروژن در نظر گرفته می‌شود.

جدول 2- میانگین ± انحراف استاندارد قطر هاله‌های عدم رشد قارچ‌های *پیتیوم‌اولتیموم* و *فوزاریوم‌سولانی* در اثر فعالیت ضدقارچی به‌ترتیب سویه‌های منتخب شماره 48 و 83 کشت داده شده در محیط نوترینت براث با منابع کربن مختلف برحسب میلی‌متر

منبع کربن / قارچ	گلوکز	لاکتوز	نشاسته	p-مقدار
پیتیوم اولتیموم	16/00±0/00	10/33±0/58	11/00±0/00	<0/001

www.SID.ir

	b	c	a*	
<0/001	15/67±0/58 b	11/67±0/58 c	22/00±0/00 a*	*فوزاریوم سولانی*

جدول 3- میانگین ± انحراف استاندارد قطر هاله‌های عدم‌رشد قارچ‌های *پیتیوم‌اولتیموم* و *فوزاریوم‌سولانی* در اثر فعالیت ضدقارچی به‌ترتیب سویه‌های منتخب شماره 48 و 83 کشت‌داده‌شده در محیط نوترینت براث با منابع نیتروژن مختلف بر حسب میلی‌متر

منبع نیتروژن / قارچ	پپتون	عصاره مخمر	نیترات آمونیوم	p-مقدار
پیتیوم‌اولتیموم	16/00±0/00 b	17/00±0/00 a*	7/33±0/58 c	<0/001
فوزاریوم سولانی	22/00±0/00 b	25/00±0/00 a*	13/33±0/58 c	<0/001

با توجه به جدول 4، در هردو قارچ بررسی‌شده، pHهای مختلف بر میزان هالهٔ عدم‌رشد تأثیرگذارند (p-value<0/001). با توجه به آزمون دامنهٔ دانکن، مشخص شد که مناسب‌ترین pH، خنثی است که در بالاترین گروه آماری (a) قرار گرفته است.

با توجه به جدول 5، در هردو قارچ بررسی‌شده، دماهای مختلف بر میزان هالهٔ عدم‌رشد تأثیرگذارند (p-value<0/01). با توجه به آزمون دامنهٔ دانکن مشخص شد که مناسب‌ترین دما، 30 درجه سانتیگراد است که در بالاترین گروه آماری (a) قرار گرفته است.

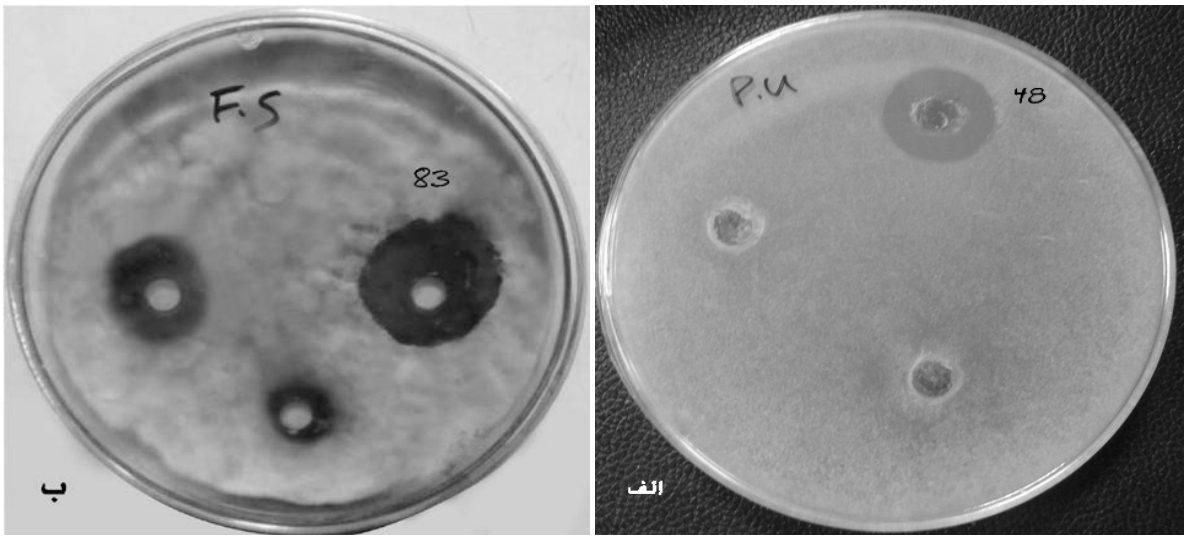
جدول 4- میانگین ± انحراف استاندارد قطر هاله‌های عدم رشد قارچ‌های *پیتیوم‌اولتیموم* و *فوزاریوم‌سولانی* در اثر فعالیت ضدقارچی به‌ترتیب سویه‌های منتخب شماره 48 و 83 کشت‌داده‌شده در محیط نوترینت براث با pHهای مختلف برحسب میلی‌متر

pH / قارچ	اسیدی	خنثی	قلیایی	p-مقدار
پیتیوم اولتیموم	12/33±0/58 b	17/00±0/00 a*	10/67±0/58 c	<0/001
فوزاریوم سولانی	14/33±0/58 b	25/00±0/00 a*	13/67±0/58 c	<0/001

جدول 5- میانگین ± انحراف استاندارد قطر هاله‌های عدم‌رشد قارچ‌های *پیتیوم‌اولتیموم* و *فوزاریوم‌سولانی* در اثر فعالیت ضدقارچی به‌ترتیب سویه‌های منتخب شماره 48 و 83 کشت‌داده‌شده در دماهای مختلف برحسب میلی‌متر

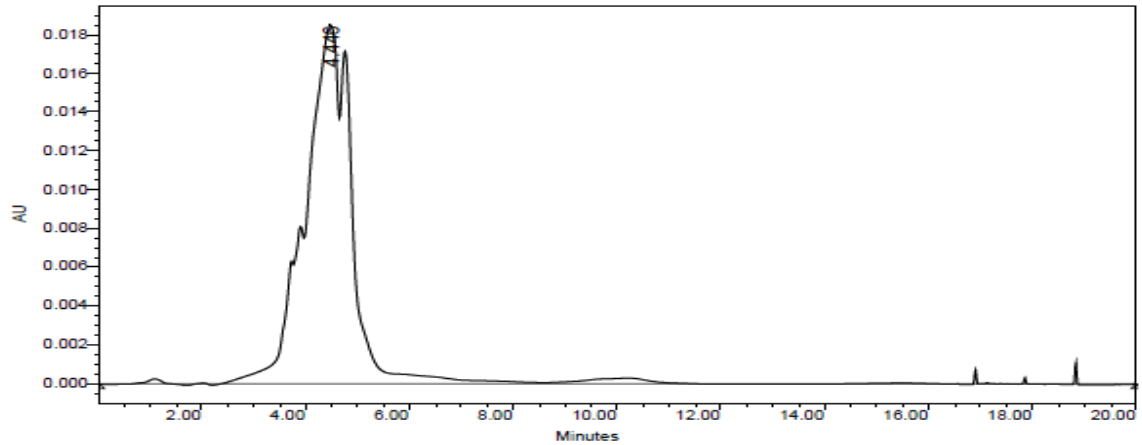
دما / قارچ	25درجه سانتیگراد	30درجه سانتیگراد	37درجه سانتیگراد	p-مقدار
پیتیوم اولتیموم	14/67±0/58 c	17/00±0/00 a*	16/33±0/58 b	0/002
فوزاریوم سولانی	20/00±0/00 c	25/00±0/00 a*	22/33±0/58 b	<0/001

www.SID.ir



شکل 1- قظر هالهٔ عدمِ‌رشد قارچ‌های *پیتیوم‌اولتیموم* (الف) و *فوزاریوم‌سولانی* (ب) در اثر فعالیت ضدقارچی به‌ترتیب سویه‌های منتخب 48 و 83 در بهینه‌ترین شرایط (منبع کربن گلوکز، منبع نیتروژن عصارهٔ مخمر، pH خنثی و دمای 30 درجه سانتیگراد)

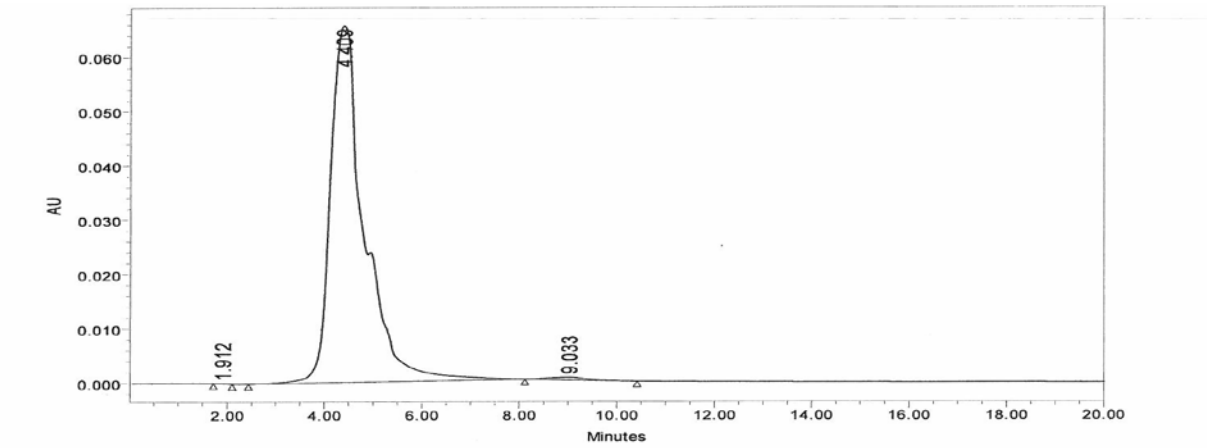
شناسایی متابولیت ضدقارچی ایتورین A در سویه‌های منتخب: با بررسی کروماتوگرام‌های به‌دست‌آمده از نمونهٔ شاهد و سویه‌های منتخب مشخص شد که پیک مربوط به ایتورین A استاندارد در کروماتوگرام حاصل از آن، در زمان 4 دقیقه و 44 صدم ثانیه ظاهر شد که با پیکی مشابه در همین بازهٔ زمانی در کروماتوگرام حاصل از سویه‌های منتخب مطابقت دارد که این هم‌پوشانی در زمان ظهور یکسان این پیک در نمونه‌ها بیان‌کنندهٔ حضور ایتورین A در سویه‌های بومی مورد آزمایش است. شکل‌های 2، 3 و 4 کروماتوگرام‌های حاصل از HPLC نمونهٔ شاهد (ایتورین A) و سویه‌های بومی منتخب را نشان می‌دهد.



	RT (min)	Peak Type	Area (VSec)	%Area	Height (V)	%Height	Integration Type	Points Across Peak	Start Time (min)	End Time (min)
1	4/446	Unknown	1211216	100/00	18542	100/00	BB	1199	0/017	20/000

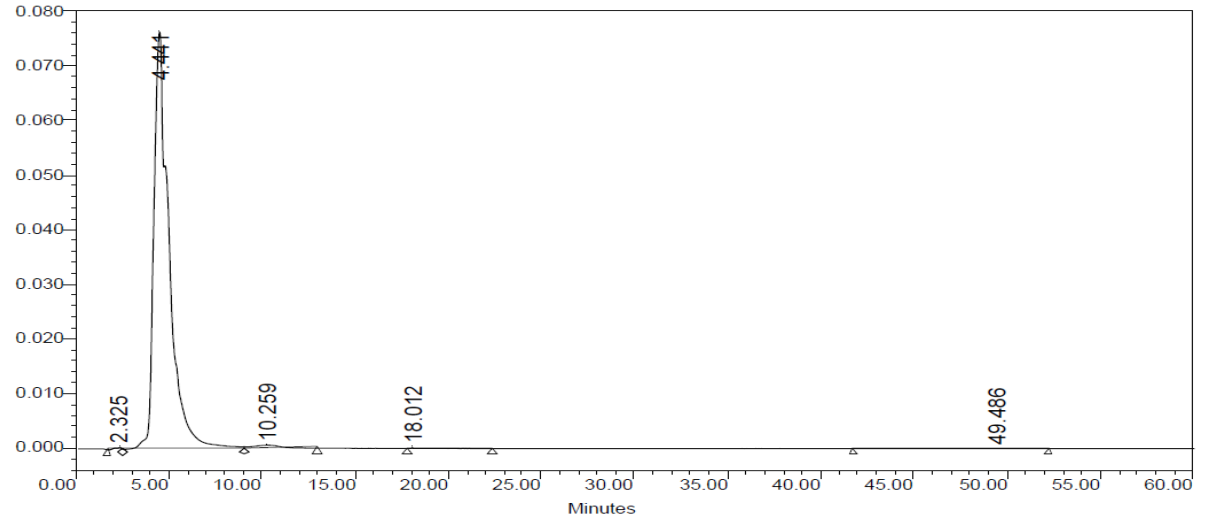
شکل 2- کروماتوگرام حاصل از ایتورین A

www.SID.ir



	RT (min)	Peak Type	Area (VSec)	%Area	Height (V)	%Height	Integration Type	Points Across Peak	Start Time (min)	End Time (min)
1	1/912	unknown	1065	0/03	88	0/13	BB	23	1/717	2/100
2	4/409	unknown	3173034	99/16	65689	99/08	BB	341	2/433	8/117
3	9/033	unknown	25967	0/81	525	0/79	BB	138	8/117	10/417

شکل 3- کروماتوگرام حاصل از HPLC سویهٔ بومی شماره 48



	RT (min)	Peak Type	Area (VSec)	%Area	Height (V)	%Height	Integration Type	Points Across Peak	Start Time (min)	End Time (min)
1	2/325	unknown	10850	0/24	0/55	BV	49	1/683	2/500	1/683
2	4/441	unknown	4382524	98/12	98/44	VV	393	2/500	9/050	1/683
3	10/249	unknown	68137	1/53	0/80	VB	236	9/050	12/983	1/683
4	18/012	unknown	1611	0/04	0/19	BB	271	17/817	22/350	17/817
4	49/486	unknown	3309	0/07	0/02	BB	628	41/733	52/217	41/733

شکل 4-کروماتوگرام حاصل از HPLC سویهٔ بومی شماره 83

بحث و نتیجه‌گیری

به این دلیل که استفاده از مواد شیمیایی به‌عنوان

www.SID.ir

آفت‌کش برای ازبین‌بردن عوامل بیماری‌زای گیاهی، سبب آلودگی محیط زیست می‌شود و نیز به‌دلیل مقاومت عوامل بیماری‌زای گیاهی نسبت به این آفت‌کش‌ها، تلاش‌های زیادی جهت جایگزینی روش‌های مؤثرتر برای حفاظت از گیاهان انجام شده است (22). کنترل زیستی عوامل بیماری‌زای گیاهی با استفاده از میکروارگانیسم های مفید روش مؤثری جهت کنترل خسارات واردشده به محصولات کشاورزی است (8). *باسیلوس سوبتیلیس* به‌واسطهٔ داشتن یک سری ویژگی‌های خاص، ازقبیل تولید ترکیبات آنتی‌بیوتیکی ضدقارچی به‌ویژه ایتورین و نیز آنزیم‌های هیدرولیتیک و توانایی تولید اسپور پایدار، به‌عنوان عامل کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی مهم است (23). قارچ *پیتیوم اولتیموم* عامل بیماری مرگ گیاهچه و بیماری‌های ریشه‌ای (2) و قارچ *فوزاریوم سولانی* عامل بیماری خشکیدگی و پوسیدگی در گیاهان در بسیاری از مناطق جهان (3) هستند. بر همین اساس در پژوهش حاضر با توجه به اهمیت این دو قارچ بیماری‌زا در ایجاد خسارات عمده به محصولات کشاورزی و نقش مؤثر *باسیلوس سوبتیلیس* در سرکوب این قارچ‌ها، به مطالعهٔ سویه‌های *باسیلوس سوبتیلیس* جداشده از خاک پارک‌های جنگلی تهران و بررسی اثر آنتاگونیستی آن‌ها روی این عوامل بیماری‌زا پرداخته شده است. 23 سویه از مجموع 91 سویهٔ بومی جداسازی‌شده از خاک پارک‌های جنگلی تهران براساس خصوصیات ماکروسکوپی، میکروسکوپی و بیوشیمیایی به‌عنوان *باسیلوس سوبتیلیس* تعیین هویت شدند. آزمون‌های تکمیلی شامل بررسی فعالیت ضدقارچی سویه‌ها با استفاده از روش چاهک‌گذاری نشان داد که دو سویهٔ 48 و 83 بیشترین توانایی را در کنترل زیستی *پیتیوم اولتیموم* و *فوزاریوم سولانی* دارند. در مقایسه با مطالعاتی که در گذشته در زمینه اثر ضدقارچی سویه‌های *باسیلوس سوبتیلیس* علیه قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی انجام‌شده این دو باکتری توانایی بالاتری در مهارکنندگی رشد قارچ‌های ذکرشده داشتند. براساس مطالعهٔ گروور[21] و همکاران سویهٔ *باسیلوس سوبتیلیس* RP24 جداسازی‌شده از ریزوپلن[22] لوبیای سودانی قادر است علیه قارچ‌های *پیتیوم اولتیموم* و *فوزاریوم سولانی*، قطر هالهٔ عدم‌رشد به‌ترتیب 7/50 و 7/85 میلی‌متر را با استفاده از روش چاهک‌گذاری ایجاد کند که در مقایسه با نتایج حاصل از پژوهش حاضر که قطر هالهٔ بازدارندگی به‌ترتیب 17 و 25 میلی‌متر مشاهده شد، بسیار کمتر بود که این تفاوت می تواند به‌علت تولید بیشتر متابولیت ضدقارچی ایتورین و اثر مهارکنندگی بیشتر سویه‌های بررسی‌شده علیه *پیتیوم اولتیموم* و *فوزاریوم سولانی* نسبت به جدایهٔ *باسیلوس سوبتیلیس* RP24 باشد (5). از این‌رو سویه‌های *باسیلوس سوبتیلیس* به‌دست‌آمده از مطالعهٔ حاضر علی‌رغم بومی‌بودن و دسترسی ساده‌تر به آنها و نیز اثر مهارکنندگی بیشتر قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی در مقایسه با سویه‌های غیربومی می‌توانند مهم باشند. پیش‌تر نیز کومار[23] و همکاران استفاده از روش چاهک‌گذاری و اندازه‌گیری قطر هالهٔ عدم‌رشد با استفاده از خط‌کش آنتی‌بیوگرام را نیز جهت تعیین سنجش اثر مهاری سویهٔ *باسیلوس سوبتیلیس* *MTCC8114* جداشده از نمونه‌های خاک باغ‌های ایالت آگرا در هند، روی قارچ‌های پاتوژن میکروسپوروم فولوُم[24] و تریکوفیتون[25] را ارزیابی شدند و به نتایج قابل‌ملاحظه‌ای دست یافتند که دال بر تأیید این روش است (24).

نتایج ما نشان داد که باکتری‌های جداسازی‌شده در

www.SID.ir

مرحلهٔ بهینه‌سازی در محیط نوترینت براث دارای قند گلوکز به‌عنوان منبع کربن، عصارهٔ مخمر به‌عنوان منبع نیتروژن، pH خنثی و دمای 30 درجه سانتیگراد، بیشترین فعالیت ضدقارچی را به‌ترتیب علیه قارچ‌های بیماری‌زای *پیتیوم اولتیموم* و *فوزاریوم سولانی* نشان دادند. اوهنو[۲۶] و همکاران تأثیر بهینه‌سازی پارامتر دما را در تولید ایتورین A توسط *باسیلوس سوبتیلیس RB14* بررسی شدند. آنها مشخص کردند بهترین دما برای تولید ایتورین A، 25 درجه سانتیگراد است که با نتایج به‌دست‌آمده در پژوهش حاضر تفاوت دارد که می‌تواند به‌علت رشد بهتر جدایه‌های بررسی‌شده در دمای 30 درجه باشد (19). از طرفی ژانگ[۲۷] طی مطالعات خود تأیید کرد *باسیلوس سوبتیلیس B-FS06* گرماگذاری‌شده در دمای 30 درجه سانتیگراد بیشترین فعالیت ضدقارچی را علیه قارچ *آسپرژیلوس فلاووس*[۲۸] دارد که با نتایج به‌دست‌آمده از پژوهش حاضر همسو است (25).

نتایج حاصل از تخلیص ماده مؤثره و بررسی و مقایسهٔ کروماتوگرام‌های حاصل از HPLC حضور متابولیت ضدقارچی ایتورین A را در پژوهش جاری تأیید کرد. گروور وهمکاران، با روش HPLC به این نتیجه رسیدند که اثر آنتی‌بیوتیکی و فعالیت ضدقارچی سویهٔ *باسیلوس سوبتیلیس RP24* به‌علت توانایی این سویه در تولید لیپوپپتید ایتورین A است (5).

لیپوپتیدهای متعلق به خانوادهٔ ایتورین، پپتیدهای حلقوی آمفی‌فیلیک‌اند که شامل 7 αآمینواسید متصل به βآمینوفتی‌اسید هستند و طول نیمه اسیدچرب ممکن است از C_{14} تا C_{17} برای آنها متنوع باشد (11). اعضای این خانواده فعالیت ضدقارچی قوی دارند و می‌توانند از رشد طیف وسیعی از قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی ازطریق واکنش با استرول موجود در غشای قارچ و ایجاد منافذی در غشا و افزایش نفوذپذیری آن که درنهایت منجر به تخریب غشا و مرگ قارچ می‌شود، به‌خوبی ممانعت کنند (12). با توجه به آنچه گفته شد می‌توان نتیجه گرفت که سویه‌های بومی *باسیلوس سوبتیلیس* منتخب در این بررسی فعالیت ضدقارچی قوی علیه قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی *پیتیوم اولتیموم* و *فوزاریوم سولانی* دارند که این توانایی آنها به‌علت تولید متابولیت‌های ثانویه به‌ویژه آنتی‌بیوتیک‌های لیپوپپتیدی خانوادهٔ ایتورین است که با توجه به اثر مهارکنندگی بیشتر سویه‌های منتخب در مقایسه با سویه‌های غیربومی علیه قارچ‌های ذکرشده (5) می‌توان استدلال کرد که این سویه‌ها از سویه‌های غیربومی متابولیت بیشتری تولید کرده‌اند، ازاین‌رو این پژوهش تأییدی بر توانایی باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* در کنترل زیستی عوامل بیماری‌زای گیاهی است که می‌توان از آن در جهت کنترل زیستی قارچ‌های بیماری‌زای محصولات کشاورزی که سبب بازده پایین این محصولات می‌شوند استفاده کرد و درنتیجه می‌توانند جایگزین مناسبی برای قارچ‌کش‌های شیمیایی شوند که با تجمع‌یافتن در خاک، سبب آلودگی محیط زیست شوند و نیز عوامل بیماری‌زا نسبت به آنها مقاومت حاصل می‌کنند.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از جناب آقای دکتر زمانی‌زاده مدیرگروه محترم مقطع دکتری رشته مهندسی کشاورزی گرایش بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پژوهشات تهران، برای اهدای سویه‌های قارچی و نیز از مرکز پژوهشات دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران پزشکی تشکر و قدردانی می‌کنیم.

www.SID.ir

Engineering 2008; 39(6): 635–43.

(5) Grover M., nain L., singh S., saxena A. Molecular and Biochemical Approaches for Characterization of Antifungal Trait of a Potent Biocontrol Agent *Bacillus subtilis* RP24. *Current Microbiology* 2010; 60(2): 99-106.

(6) Liu B., Huang L., Buchenauer H., Kang Zh. Isolation and partial characterization of an antifungal protein from the endophytic *Bacillus subtilis* strain EDR4. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 2010; 98(2): 305-11.

(7) Earl A., Losick R., Kolter R. Ecology and Genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology* 2008; 16(6): 269-75.

(8) Ongena M., Jacquea Ph. Bacillus lipopeptids: versatile weapons for plant diseas biocontrol. *Trends in Microbiology* 2007; 16(3): 115-25.

(9) Fickers P., Lecle`reV., Guez J., Be´chet M., Coucheney F., Joris B., et al. Temperature dependence of mycosubtilin homologue production in *Bacillus subtilis* ATCC6633. *Research in Microbiology* 2008; 159(6): 449-57.

(10) Cho K., Math R., Hong S., Islam S., Mandanna D., Cho J., et al. Iturin produced by *Bacillus pumilus* HY1 from korean soybean sauce (kanjang) inhibits growth of aflatoxin producing fungi. *Food Control* 2009; 20(4): 402–6.

(11) Romero D., De Vicente A., Rakotoaly H., Dufour S., Veening J., Arrebola E., et al. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Molecular Plant Microbe Interaction* 2006; 20(4): 430-40.

(12) Latoud C., Peypoux F., Michel G. Action of iturin A on membrane vesicles from *Saccharomyses cerevisiae*: activation of phospholipase A and B activities by picomolar amounts of iturin A. *Journal of Antibiotics* 1988; 41(11): 1699-700.

(13) Cazorla F., Romero D., Perez-Gorcia A.,

References

(1) Bennet A., Leifert C., Whipps J. Survival of the biocontrol agents *Coniothyrium minitans* and *Bacillus subtilis* MBI600 introduced into pasteurised, sterilised and non-sterile soils. *Soil Biology & Biochemistry* 2003; 35(12): 1565–73.

(2) Hendrix F., Campbell W. *Pythiums* as plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 1973; 11(1): 77-98.

(3) Khatiri Y., Bahador N., Pordeli H. A study on isolated endophytic bacteria from glycine sp. And their role on control of some plant pathogenic fungi. *Biological Journal of Microorganism* 2013; 2(5): 51-61.

(4) Shin I., Kuo C., Hsieh F., Kao S., Hsieh C. Use of surface response methodology to optimize culture conditions for iturinA production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation. *Chinese Journal of Chemical* Lagtenberg B., De Vicente A., Bloemberg G. Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. *Applied Microbiology* 2007; 103(5): 1950-59.

(14) Hanene R., Abdeljabbar H., marc R., Abdellatif B., Feried L., Najla S. Biological control of *Fusarium* foot rot of wheat using fengycin-producing *Bacillus subtilis* isolated from salty soil. *African Journal of biotechnology* 2012; 11(34): 8464-75.

(15) Leelasuphakul W., Hemmanee P., Chuenchitt S. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen *(Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology* 2008; 48(1): 113–21.

(16) klepser M., Wolfe E., Pfaller M. Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazole and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1998; 41(1): 397–401.

(17) Qi-qin L., Xian-yingl M., Xue W., Weil L., Cheng-jie D., Jia-xun F., et al.

www.SID.ir

Purification of two antimicrobial substances produced by *Bacillus subtilis* strain B11 and their properties. *Agricultural Sciences in China* 2006; 5(5): 363-9.

(18) Joo M., Hur S., Han Y., Kim J. Isolation, identification and characterization of *Bacillus subtilis* strains from the traditional korean soybean-fermented food, Chungkookjang. *Journal of Applied Biological Chemistry* 2007; 50(4): 202-210.

(19) Ruangwong O., Chang C., Lamine S., Liang WJ. Identification of antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* LB5 with ability to control anthracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *African Journal of Microbiology* 2012; 6(16): 3732-8.

(20) Ohno M., Ano T., Shoda M. Effect of Temperature on Production of Lipopeptide Antibiotics, Iturin A and Surfactin by a dual Producer, *Bacillus subtilis* RB14, in Solid-State Fermentation. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 1995; 80(5): 517-9.

(21) Akhavansepay A., Selselehzakeri S., Rezapanah M., Motevaze K. Aninvestigation of antifungal activity of *Bacillus subtilis* against some pathogens plant fungi. *Journal of Biological Sciences* 2007; 2(2): 1-10.

(22) Nagórska K., Bikowski M., Obuchowski M. Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis*as a powerfulbiocontrol agent. *Acta Biochimica Polonica* 2007; 54(3): 495-508.

(23) Jacobsen BJ., Zidack NK., Larson BJ. The role of *Bacillus*-based biological control agents in integrated pest management systems: Plant diseases. *Phytopathology* 2004; 94(11): 1272-5.

(24) Kumar A., Saini P., Shirvastava JN. Production of peptide antifungal antibiotic and biocontrol activity of *Bacillus subtilis*. *Indian Journal of Experimental Biology* 2009; 47(1): 57-62.

(25) Zhang T., Shi Z., Hu L., Wang F. Antifungal compound from *Bacillus subtilis* B-FS06 inhibiting The growth of *Aspergillus flavus*. Word Journal of Microbiology and Biotechnology 2007; 93(10): 142-146.

---

[1]-*Pythimultimum*
[2] -*Fusariumsolani*
[3]-*Bacillus* sp.
[4]-Iturin
[5] -Surfactin
[6] - Fengycin
[7]-*Bacillus subtilis*
[8]- Pour plate
[9] -Nutrient Agar
[10]-Corn Meal Agar
[11] -Sabouraud Dextrose Agar
[12] -Sabouraud Dextrose Broth
[13] - Nutrient Broth
[14] One-way Analysis of Variance (ANOVA)
[15] - Blast
[16] Duncan's Test
[17] - JAL Tajhiz
[18] - Hettich
[19] - Retention Time
[20] - Potato Dextrose Agar
[21] - Grover
[22] - Rizoplane
[23]- Kumar
[24]-*Microsporum fulvum*
[25]-*Trichophyton*
[26] - Ohno
[27] - Zhang
[28] - *Aspergillus flavus*

www.SID.ir