مجله دنیای میکروب‌ها
سال هشتم شماره چهارم (پیاپی ۲۵) زمستان ۱۳۹۴
صفحات ۳۰۷-۲۹۹

Original Article

ارزیابی فعالیت ضد قارچی جدایه های *باسیلوس سوبتیلیس* تولید کننده ایتورین

آفاق محمدی[۱]، عباس اخوان سپهی*[۲]، رضا حسینی دوست[۳]

[۱] کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم داروئی، تهران، گروه میکروب شناسی، [۲] دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، گروه میکروب شناسی، [۳] استاد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم داروئی، تهران، گروه میکروب شناسی

چکیده

سابقه و هدف: *باسیلوس سوبتیلیس* با توانایی تولید طیف وسیعی از ترکیبات ضد میکروبی مانند لیپوپپتیدهای خانواده ایتورین در کنترل بیولوژیک تعداد زیادی از قارچ های بیماریزای گیاهی مؤثر می باشد. این مطالعه با هدف بررسی فعالیت ضد قارچی جدایه های بومی *باسیلوس سوبتیلیس* علیه *فوزاریوم مونیلیفورم* و *ورتیسیلیوم داهلیا* انجام شد.

مواد و روش ها: به منظور جداسازی *باسیلوس سوبتیلیس* از خاک پارک های جنگلی هفت منطقه از تهران نمونه برداری به عمل آمد. فعالیت ضد قارچی جدایه های *باسیلوس سوبتیلیس* به کمک روش چاهک گذاری بررسی شد. دو جدایه با بیشترین قطر هاله عدم رشد انتخاب و با روش PCR شناسایی شدند. محیط آگار مغذی مایع به منظور تولید بیشترین متابولیت ضدقارچی توسط جدایه های یاد شده بهینه سازی شد. سپس متابولیت های حاصل از کشت چهار روزه تخلیص و وجود ایتورین A با روش کروماتوگرافی تأیید گردید.

یافته ها: از ۹۱ سویه جداسازی شده از خاک، ۲۳ سویه به عنوان *باسیلوس سوبتیلیس* شناسایی شدند. جدایه های شماره ۳۶ و ۷۸ به ترتیب علیه *فوزاریوم مونیلیفورم* و *ورتیسیلیوم داهلیا* بیشترین قدرت مهارکنندگی را نشان دادند. نتایج تطبیق توالی شباهت ۱۰۰ درصدی این دو جدایه را به *باسیلوس سوبتیلیس* تأیید نمود. جدایه ها بیشترین فعالیت ضد قارچی را در محیط آگار مغذی مایع با منبع کربن گلوکز، منبع نیتروژن عصاره مخمر، pH خنثی و دمای ۳۰ درجه سلسیوس نشان دادند. بر اساس نتایج HPLC هر دو جدایه توانستند ایتورین A را در بازه زمانی مشابه با ایتورین استاندارد تولید کنند.

نتیجه گیری: جدایه های بومی به خوبی می توانند متابولیت های ضدقارچی تولید نمایند. بنابراین می توانند کاندیدای مناسبی برای کنترل زیستی قارچ های بیماریزای گیاهی و جایگزینی برای قارچ کش های شیمیایی باشند.

واژگان کلیدی: *باسیلوس سوبتیلیس*، کنترل زیستی، ایتورین.

دریافت مقاله: آبان ماه ۹۳ پذیرش برای چاپ: بهمن ماه ۹۳

مقدمه

در سال های اخیر استفاده مکرر از مواد شیمیایی به منظور تولید محصولات کشاورزی، سبب بروز مشکلاتی مانند آلودگی محیط زیست و بروز مقاومت در عوامل بیماری زای گیاهی شده است. علاوه بر این هزینه بالای استفاده از مواد شیمیایی را نیز باید در نظر گرفت. با توجه به نکات یاد شده، تحقیقات اخیر به سمت جایگزینی این روش با سایر شیوه ها از جمله کنترل بیولوژیک گسترش یافته است (۱).

باکتری های جنس *باسیلوس* (*Bacillus*) به ویژه *باسیلوس سوبتیلیس* (*Bacillus subtilis*) به دلیل توانایی در تولید ترکیباتی با خواص ضدمیکروبی مانند لیپوپپتیدهای ضد قارچی، علیه عوامل بیماریزای گیاهی مؤثر هستند (۲). *باسیلوس سوبتیلیس* یک میکروارگانیسم غالب خاک است که

*) آدرس برای مکاتبه: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال.
تلفن: ۰۲۱۲۲۹۴۶۰۱۸ پست الکترونیک: akhavansepahy@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

قادر به تولید تعداد زیادی ترکیبات ضد میکروبی مانند پپتیدها، لیپوپپتیدها، فسفولیپیدها و پلی ان ها (Polyene) می باشد. همچنین به عنوان عوامل کنترل بیولوژیک علیه برخی از باکتری ها و قارچ های بیماری زای گیاهی کاربرد دارد. توانایی تشکیل اسپور مقاوم به وسیله این باکتری نیز آن را به عنوان یکی از بهترین کاندیداها در فرآیند کنترل بیولوژیک معرفی نموده است (۲).

لیپوپپتیدهای سنتز شده به وسیله *باسیلوس سوبتیلیس* شامل خانواده های ایتورین (Iturin)، سورفاکتین (Surfactin) و فنجیسین (Fengycin) می باشد. این مواد که الیگوپپتیدهای سنتز شده به روش غیر ریبوزومی می باشند به وسیله کمپلکس های چند آنزیمی بزرگ تولید می شوند. این ترکیبات دارای فعالیت های ضد میکروبی وسیع و فعالیت های سورفاکتانتی می باشند (۳) .

لیپوپپتیدهای متعلق به خانواده ایتورین شامل ایزوفرم های ایتورین، باسیلومایسین (Bacillomycin) و مایکوسوبتیلین (Mycosubtilin)، پپتیدهای حلقوی آمفی فیلیک (Amphiphilic) هستند که شامل هفت α آمینواسید متصل به β آمینوفتی اسید می باشند. این ترکیبات می توانند از رشد طیف وسیعی از قارچ‌های بیماری زای گیاهی از طریق واکنش با استرول موجود در غشای قارچ و افزایش نفوذپذیری آن به خوبی ممانعت نمایند (٤ و ٥).

هدف از این مطالعه، بررسی فعالیت ضد قارچی جدایه های بومی *باسیلوس سوبتیلیس* علیه *فوزاریوم مونیلیفورم* (*Fusarium moniliforme*) و *ورتیسیلیوم داهلیا* (*Verticillium dahliae*) و انتخاب بهترین جدایه مولد آنتی بیوتیک از میان جدایه های جمع آوری شده بود. علاوه بر این بهینه سازی شرایط تولید آنتی بیوتیک برای جدایه های منتخب از نظر منبع کربن و نیتروژن، اسیدیته و دما نیز مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش ها

الف) جداسازی و شناسایی باسیلوس سوبتیلیس: در این مطالعه به منظور جداسازی باکتری *باسیلوس سوبتیلیس*، از خاک پارک های جنگلی هفت منطقه از تهران (چیتگر، طالقانی، شیان، سرخه حصار، پردیسان، مناطق جنگلی بوستان نهج البلاغه و مناطق جنگلی بوستان گفتگو) نمونه برداری صورت گرفت. نمونه ها از فاصله یک متری ریشه و از عمق ۳ تا ۱۰ سانتی متری خاک در شرایط استریل جمع آوری شدند (٦). نمونه ها با ثبت مشخصات و در دمای ٤ درجه سلیسیوس به آزمایشگاه منتقل گردیدند.

در ابتدا نمونه ها به منظور حفظ اسپورها و حذف سلول های رویشی، با روش غنی سازی حرارتی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سلیسیوس تیمار شدند (۷). سپس با استفاده از روش سریال رقت، رقت های متوالی از نمونه ها در آب مقطر استریل تهیه و میزان ۱ میلی لیتر از هر یک از سوسپانسیون های حاصله در پلیت استریل ریخته شد. پس از آن محیط کشت نوترینت آگار (مرک، آلمان) (شامل ۵ گرم بر لیتر پپتون، ۳ گرم بر لیتر عصاره گوشت و ۱۵ گرم بر لیتر آگار) اتوکلاو شد و در شرایط استریل به پتریدیش اضافه و به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس نگه داری شدند (۸).

کلنی های سفید رنگ، مایل به کرم با قوام کره ای، سطحی خشن و حاشیه ای مضرس انتخاب و طی کشت ٤ منطقه ای در محیط نوترینت آگار خالص سازی گردیدند. به منظور جداسازی انحصاری سویه های *باسیلوس سوبتیلیس*، بررسی های میکروسکوپی (رنگ آمیزی گرم و مالاشیت گرین) و بررسی های بیوشیمیایی شامل آزمون های کاتالاز، استفاده از سیترات، هیدرولیز لستین، حرکت، احیای نیترات و تخمیر قندهای گلوکز، آرابینوز، مانیتول و زیلوز انجام گرفت (۷).

ب) سویه های قارچی: سویه های قارچی مورد استفاده در این تحقیق شامل *فوزاریوم مونیلیفورم* (ATCC1495) عامل مرگ گیاهچه و *ورتیسیلیوم داهلیا* (ATCC29091) عامل بیماری خشکیدگی و پوسیدگی برخی گیاهان می باشند. سویه های مورد نظر در محیط کشت سابروز دکستروز آگار (مرک، آلمان) (شامل ۵ گرم پپتون کازئین، ۵ گرم پپتون گوشت، ٤٠ گرم دی-گلوکز و ۱۵ گرم آگار آگاردر یک لیتر آب) کشت داده

Archive of SID

www.SID.ir

شدند و در در دمای ۲۵ درجه سلیسیوس نگهداری گردیدند.

ج) بررسی فعالیت ضد قارچی جدایه های باسیلوس سوبتیلیس: برای این منظور از روش چاهک گذاری استفاده گردید (۹). در این روش از کشت ۷۲ ساعته هر قارچ، به طور جداگانه، مطابق با شاهد نیم مک فارلند ($۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ CFU/ml) در محیط سابروز دکستروز آگار، سوسپانسیون تهیه گردید. هر سوسپانسیون قارچی به یک پلیت منتقل و به کمک سواپ استریل کشت متراکم داده شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ۲٤ ساعته جدایه های باکتریایی تهیه شده در محیط نوترینت براث معادل شاهد نیم مک فارلند، به طور جداگانه در در داخل هر چاهک ریخته شد. پلیت ها در انکوباتور با دمای ۲۵-۲٦ درجه سلیسیوس به مدت ۷۲ ساعت گرماگذاری گردیدند. برای هر آزمایش ۳ بار تکرار در نظر گرفته شد. به عنوان شاهد عدم رشد، ۵۰ میکرولیتر محیط نوترینت براث استریل در یک چاهک ریخته شد. در نهایت قطر هاله های عدم رشد قارچ در اطراف چاهک ها و نیز میانگین قطر هاله ها اندازه گیری گردید (۹).

د) شناسایی مولکولی جدایه های باسیلوس سوبتیلیس با بیشترین میزان فعالیت ضد قارچی: به منظور استخراج DNA ابتدا باکتری ها بر روی محیط نوترینت آگار کشت چمنی داده شدند و به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس گرماگذاری گردیدند. سپس با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت سیناژن، ایران) نسبت به استخراج DNA ژنومی اقدام گردید. به منظور تکثیر ژن 16Sr RNA باکتریایی از آغازگرهای 27F: 5-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3 و 1492R: 5-GGTTACCTTGTTACGACTT-3، استفاده شد. واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۲/۵ میکرولیتر بافر (10x)، ۳/۵ میلی مول $MgCl_2$، ۲۰۰ میکرومول dNTPs، ۱/۲۵ واحد آنزیم از Taq DNA Polymerase، ۰/٤ میکرومول از هر آغازگر، ۱ میکرولیتر از نمونه DNA و ۱ میکرولیتر آب مقطر دی یونیزه انجام گرفت. واکنش PCR با شرایط دمایی واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ٥٦ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۹۰ ثانیه و طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد (۱۰).

محصول PCR با استفاده از الکتروفورز در ژل آگاروز ۰/۸ درصد بررسی گردید. محصول PCR برای تعیین توالی به مرکز ملی ذخایر ژنتیکی ایران فرستاده شد. به منظور تأیید شناسایی باکتری ها، توالی های حاصل با استفاده از نرم افزار Blast با توالی نوکلئوتیدی موجود در بانک اطلاعات ژنی تطبیق داده شدند.

ه) بهینه سازی پارامترهای محیطی به منظور بهینه سازی فعالیت ضد قارچی جدایه های منتخب: برای این منظور تعدادی از عوامل و پارامترهای محیطی و اکولوژیکی به شرح زیر تغییر داده شد تا به این وسیله تغییر احتمالی در میزان فعالیت ضد قارچی جدایه های برگزیده ارزیابی گردد.

۱- *منبع کربن:* به منظور بررسی تأثیر منبع کربن از سه قند گلوکز (منوساکارید)، لاکتوز (دی ساکارید) و نشاسته (پلی ساکارید) استفاده و جایگزین عصاره گوشت (منبع کربن در نوترینت براث) شدند. پس از کشت باکتری درمحیط های یاد شده، محیط ها در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس به مدت ۲٤ ساعت گرماگذاری گردیدند. سپس با استفاده از روش چاهک گذاری و آزمون آنالیزی دامنه دانکن میزان تولید متابولیت ضد قارچی ایتورین مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۱).

۲- *منبع نیتروژن:* در این مرحله تأثیر منابع نیتروژن مختلف شامل ازت آلی (عصاره مخمر) و ازت معدنی (نیترات آمونیوم) ارزیابی شد. این مواد جایگزین پپتون (منبع اصلی نیتروژن در محیط نوترینت براث) شدند. سوسپانسیون باکتری ها مطابق روش یاد شده در قسمت ۱ تهیه و پس از گرماگذاری، فعالیت ضد قارچی آن ها مورد بررسی قرار گرفت. سپس بهترین منبع نیتروژن با توجه به میانگین قطر هاله عدم رشد قارچ تعیین گردید (۱۱).

۳- *اسیدیته:* با استفاده از اسیدکلریدریک و هیدروکسیدسدیم،

Archive of SID

www.SID.ir

محیط کشت نوترینت براث حاوی مناسب ترین منابع کربن و نیتروژن به دست آمده از قسمت های ۱ و ۲، با pH اسیدی ۵ و قلیایی ۹ تهیه گردید. پس از کشت و گرماگذاری باکتری ها در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس، فعالیت ضد قارچی آن ها بررسی و با یکدیگر مقایسه شد (۱۲).

٤- *دما:* محیط کشت نوترینت براث حاوی مناسب ترین منابع کربن و نیتروژن و همچنین مناسب ترین میزان اسیدیته (طبق نتایج حاصله در مراحل قبل) ساخته و پس از تهیه و کشت سوسپانسیون باکتریایی، محیط ها در ۳ دمای ۲۵، ۳۰ و ۳۷ درجه سلیسیوس گرماگذاری شدند. پس از گذشت ۲٤ ساعت، میزان فعالیت ضد قارچی مورد بررسی قرار گرفت (۱۳). در همه مراحل، به عنوان شاهد در یک چاهک ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری بدون تغییر شرایط محیط کشت مورد استفاده قرار گرفت.

و) تخلیص متابولیت های ضدقارچی از جدایه های باسیلوس سوبتیلیس: جدایه های باکتریایی مورد بررسی در ۲۵۰ میلی لیتر محیط کشت بهینه، کشت و چهار روز در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۰ درجه سلیسیوس و دور گردشی ۱۰۰ دور در دقیقه گرماگذاری گردیدند. سپس محیط ها در دور g ۸۰۰۰ به مدت ۲۵ دقیقه و در دمای ۵ درجه سلیسیوس سانتریفیوژ شدند. روماند با اسید کلریدریک به pH معادل ۲ رسانده شد. رسوب شکل گرفته دوباره در دور g ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه و در ٤ درجه سلیسیوس سانتریفیوژ گردید. رسوب ایجاد شده در متانول حل و در دمای ٤ درجه سلیسیوس و دور g ۲۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. روماند حاوی متابولیت های ضد قارچی به صورت عصاره متانولی برداشته و در دمای ٤ درجه سلیسیوس نگه داری شد (۱٤).

ز) آنالیز متابولیت های ضد قارچی با استفاده از HPLC: میزان ۲۰ میکرولیتر از عصاره های متانولی متابولیت های ضد قارچی، به دستگاه کروماتوگرافی با شرایط زیر تزریق گردید: ستون C-18 به عنوان فاز ثابت (۲۵۰ mm × ٤ mm) و مخلوط استونیتریل و آب با نسبت ۳۰:۷۰ به عنوان فاز متحرک، سرعت ۱ میلی لیتر در دقیقه و مدت زمان ۲۰ دقیقه، طول موج دستگاه نیز بر روی ۲٤۰ نانومتر تنظیم گردید. پس از تزریق نمونه به دستگاه با شرایط یاد شده نتیجه به صورت پیک هایی در منحنی کروماتوگرام حاصله بر روی دستگاه مانیتور متصل به دستگاه کروماتوگرافی، ظاهر و زمان ظهور (Retention Time) و محدوده زیر هر پیک نیز جداگانه ثبت گردید. در این بررسی از متابولیت ضدقارچی ایتورین A که به صورت خالص از شرکت سیگما خریداری شد به عنوان شاهد استفاده گردید. به این منظور محلول ۱ میلی گرم در میلی لیتر آن در حلال متانول، تهیه و ۲۰ میکرولیتر از آن به عنوان شاهد، قبل از نمونه های مجهول به دستگاه تزریق گردید (۱٤).

ح) تجزیه و تحلیل داده ها: به منظور بررسی وجود اختلاف معنادار در میانگین هاله عدم رشد در باکتری ها و شرایط مختلف از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شد. برای تعیین بیشترین میانگین قطر هاله عدم رشد در شرایط مختلف از آزمون چند دامنه دانکن (*Duncan's Test*) استفاده شد. تمامی تحلیل ها با استفاده از نسخه شانزدهم نرم افزار *SPSS* و سطح معناداری بیشتر از ۰/۰۵ انجام گرفت.

یافته ها

الف) جداسازی و شناسایی جدایه های باسیلوس سوبتیلیس: در این مرحله بر اساس خصوصیات مورفولوژیک، ۹۱ کلنی سفید رنگ، مایل به کرم، دوکی-گرد با قوام کره ای، سطحی خشن، حاشیه ای مضرس و بویی نامطبوع جداسازی و از آن ها کشت ٤ منطقه ای تهیه گردید. با استفاده از آزمون های استاندارد باکتری شناسی جدایه های مشابه حذف و در نهایت، ۲۳ سویه به عنوان *باسیلوس سوبتیلیس* شناسایی شدند. این جدایه ها به منظور بررسی های بعدی در دمای ٤ درجه سلیسیوس در یخچال نگه داری شدند.

ب) بررسی فعالیت ضد قارچی جدایه های باسیلوس سوبتیلیس: با استفاده از روش چاهک گذاری مشخص گردید که از میان ۲۳ سویه جدا شده، ۵ جدایه دارای فعالیت ضدقارچی علیه *فوزاریوم مونیلیفورم* و *ورتیسیلیوم داهلیا* بودند.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱: میانگین ± انحراف استاندارد قطر هاله های عدم رشد *فوزاریوم مونیلیفورم* و *ورتیسیلیوم داهلیا* در اثر فعالیت ضد قارچی جدایه های *باسیلوس سوبتیلیس*.

نام قارچ / کد جدایه باکتریایی	۸	۱۷	۳۶	۵۷	۷۸
فوزاریوم مونیلیفورم	^{b}۱۶/۰±۰/۰	^{a,b}۱۵/۶±۰/۵۸	^{c}۱۷/۰±۰/۰	^{a,b}۱۵/۳۳±۰/۵۸	^{a}۱۵/۰±۰/۰
ورتیسیلیوم داهلیا	^{a}۱۷/۰±۰/۵۸	^{a}۱۷/۷±۰/۵۸	^{a}۱۷/۳±۰/۵۸	^{a}۱۸/۳±۰/۵۸	^{b}۰/۲۰±۰/۰

* موارد دارای حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه دانکن در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی دار ندارند.

جدول ۱ میانگین و انحراف استاندارد قطر هاله های عدم رشد را در جدایه های مختلف در دو قارچ یاد شده نشان می دهد. گروه بندی آماری تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن در سطح (p-value <۰/۰۰۱) انجام شد. جدایه شماره ۳۶ باکتری بر روی *فوزاریوم مونیلیفورم* وجدایه شماره ۷۸ آن بر روی *ورتیسیلیوم داهلیا* بیشترین فعالیت ضد قارچی را نشان دادند. نتایج حاصل از آنالیز 16S rRNA با استفاده از نرم افزارBlast، شباهت ۱۰۰ درصدی دو جدایه اخیر به *باسیلوس سوبتیلیس* را نشان دادند.

ج) بهینه سازی پارامترهای محیطی به منظور بهینه سازی فعالیت ضد قارچی جدایه های منتخب: بر اساس نتایج به دست آمده، بهترین منبع کربن، بهترین منبع نیتروژن، بهترین pH و بهترین دما به ترتیب شامل قند گلوکز، عصاره مخمر، pH خنثی و دمای ۳۰ درجه سلسیوس بودند (شکل ۱ و جدول ۲).

د) شناسایی متابولیت ضد قارچی ایتورین A در جدایه های باکتریایی: با بررسی کروماتوگرام های به دست آمده مشخص گردید که پیک مربوط به ایتورین A استاندارد در کروماتوگرام حاصل از آن، در زمان ٤ دقیقه و ٤٤ صدم ثانیه، ظاهر شد که با پیکی مشابه در همین بازه زمانی در کروماتوگرام حاصل از جدایه های مورد بررسی (۳٦ و ۷۸) مطابقت داشت (شکل های ۲ تا ٤). این نتیجه بیان کننده حضور ایتورین A در جدایه های مورد آزمایش می باشد.

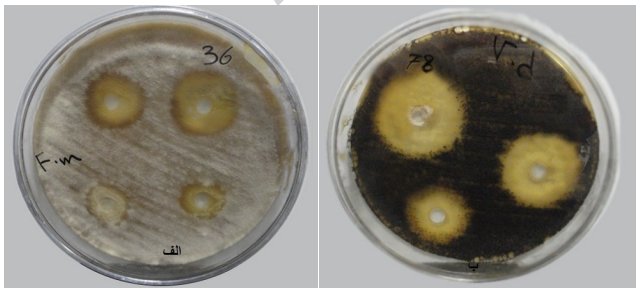
بحث

کنترل زیستی عوامل بیماری زای گیاهی با استفاده از میکروارگانیسم های مفید روش مؤثری جهت کنترل خسارات

جدول ۲: میانگین و انحراف استاندارد قطر هاله عدم رشد *فوزاریوم مونیلیفورم* و *ورتیسیلیوم داهلیا* (بر حسب میلی متر) در اثر فعالیت ضد قارچی جدایه های ۳٦ و ۷۸ *باسیلوس سوبتیلیس* در محیط هایی با منابع مختلف کربن، نیتروژن، دما و pH.

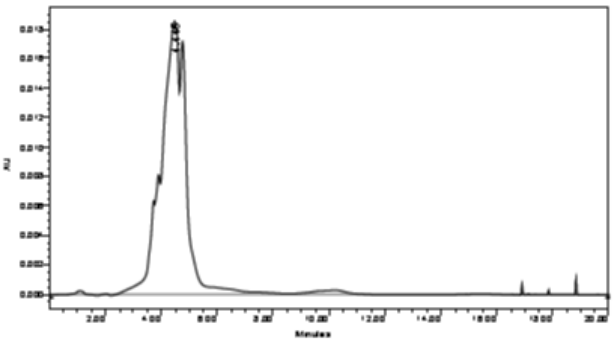
نام قارچ	*فوزاریوم مونیلیفورم*	*ورتیسیلیوم داهلیا*
منبع کربن		
گلوکز	^{c}۱۸/۰±۰/۰	^{c}۲۱/۰±۰/۰
لاکتوز	^{a}۱۰/۳±۰/۵۸	^{a}۱۱/۳±۰/۵۸
نشاسته	^{b}۱۳/۰±۰/۰	^{b}۱٤/۰±۰/۰
منبع نیتروژن		
پپتون	^{b}۱۸/۰±۰/۰	^{b}۲۱/۰±۰/۰
عصاره مخمر	^{c}۱۹/۳±۰/۵۸	^{c}۲۳/۷±۰/۵۸
نیترات آمونیوم	^{a}۱۰/۳±۰/۵۸	^{a}۱۰/۰±۰/۰
pH		
اسیدی	^{b}۱۳/۷±۰/۵۸	^{b}۱۸/۷±۰/۵۸
خنثی	^{c}۱۹/۳±۰/۵۸	^{c}۲۳/۷±۰/۵۸
قلیایی	^{a}۱۲/۰±۰/۰	^{a}۱۷/۰±۰/۰
دما (درجه سلسیوس)		
۲۵	^{a}۱۵/۳±۰/۵۸	^{a}۱۸/۰±۰/۰
۳۰	^{c}۱۹/۳±۰/۵۸	^{c}۲۳/۷±۰/۵۸
۳۷	^{b}۱۷/۷±۰/۵۸	^{b}۲۰/۷±۰/۵۸

* سلوله های جدول به صورت انحراف استاندارد ± میانگین گروه تعیین شده توسط آزمون دانکن ارائه شده اند.



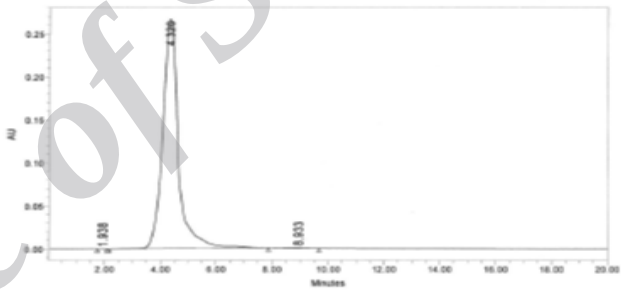
شکل ۱: قطر هاله عدم رشد *فوزاریوم مونیلیفورم* (الف) و *ورتیسیلیوم داهلیا* (ب) در اثر فعالیت ضد قارچی به ترتیب جدایه های ۳٦ و ۷۸ در شرایط بهینه (منبع کربن گلوکز، منبع نیتروژن عصاره مخمر، pH خنثی و دمای ۳۰ درجه سلسیوس)

Archive of SID
www.SID.ir



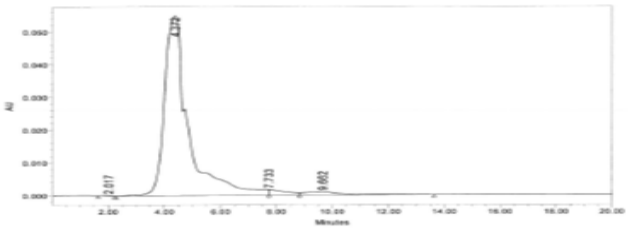
	RT (min)	Peak Type	Area (AU*sec)	% Area	Height (AU)	% Height	Integration Type	Points Across Peak	Start Time (min)	End Time (min)	Baseline Start (min)
1	4.446	Unknown	1211216	100.00	18542	100.00	BB	1199	0.017	20.000	0.017

شکل ۲: کروماتوگرام حاصل از ایتورین A. نتایج حاصل از کروماتوگرام نشان داد که پیک اصلی مربوط به ایتورین A استاندارد در زمان ٤ دقیقه و ٤٤ صدم ثانیه ظاهر گردید.



	RT (min)	Peak Type	Area (uV*sec)	% Area	Height (uV)	% Height	Integration Type	Peak Codes	Points Across Peak	Start Time (min)	End Time (min)
1	1.938	Unknown	498	0.00	55	0.02	BB		19	1.750	2.083
2	4.326	Unknown	10387065	99.73	266494	99.80	BB		341	2.167	7.867
3	8.933	Unknown	27986	0.27	467	0.17	BB		108	7.867	9.667

شکل ۳: کروماتوگرام حاصل از HPLC جدایه ۳٦ *باسیلوس سوبتیلیس*. با توجه به نتایج بدست آمده مشخص گردید که جدایه ۳٦ در زمان ٤ دقیقه و ۳۲ صدم ثانیه (مشابه ایتورین A استاندارد) پیک ظاهر شد که نشان دهنده وجود ایتورین A در این جدایه است.



	RT (min)	Peak Type	Area (uV*sec)	% Area	Height (uV)	% Height	Integration Type	Peak Codes	Points Across Peak	Start Time (min)	End Time (min)
1	2.017	Unknown	2000	0.06	102	0.18	BB		35	1.633	2.217
2	4.372	Unknown	3232224	94.74	54943	95.16	BV		327	2.283	7.733
3	7.733	Unknown	74832	2.19	1726	2.99	VV	BB	66	7.733	8.833
4	9.662	Unknown	102709	3.01	964	1.67	VB		268	8.833	13.633

شکل ۴: کروماتوگرام حاصل از HPLC جدایه ۷۸ *باسیلوس سوبتیلیس*. این کروماتوگرام ظهور پیک را در زمان ٤ دقیقه و ۳۷ صدم ثانیه (مشابه ایتورین A استاندارد) نشان داد که حاکی از حضور ایتورین در این جدایه است.

وارد آمده به محصولات کشاورزی می باشد. برخی از باکتری های خاکزی مانند *باسیلوس سوبتیلیس* با توانایی آنتاگونیستی علیه قارچ های بیماری زای گیاهی، جایگزین مناسبی برای قارچ کش های شیمیایی هستند (۲).

در این پژوهش از ۹۱ سویه باکتریایی، تعداد ۲۳ سویه به عنوان *باسیلوس سوبتیلیس* شناسایی شدند. آزمون های تکمیلی شامل بررسی فعالیت ضد قارچی جدایه ها با استفاده از روش چاهک گذاری نشان داد که دو جدایه ۳٦ و ۷۸ بیشترین توانایی را در کنترل بیولوژیک *فوزاریوم مونیلیفورم* و *ورتیسیلیوم داهلیا* دارند. نتایج کروماتوگرافی حضور متابولیت ضد قارچی را در این جدایه ها تأیید نمود. نتایج به دست آمده در آزمون بهینه سازی پارامترهای محیطی برای تعیین فعالیت ضد قارچی، نشان داد که دو سویه ۳٦ و ۷۸ در محیط نوترینت براث دارای قند گلوکز به عنوان منبع کربن، عصاره مخمر به عنوان منبع نیتروژن، pH خنثی و دمای ۳۰ درجه سلسیوس، بیشترین فعالیت ضد قارچی را دارا می باشند.

از مطالعات مشابه می توان به بررسی انجام شده توسط هانن (Hanene) و همکاران در سال ۲۰۱۲ اشاره کرد. آن ها ٦۹ سویه *باسیلوس سوبتیلیس* جدا شده از خاک های شور در شمال تونس را مورد بررسی قرار دادند. یافته های آنها نشان داد که سویه *باسیلوس سوبتیلیس* SR146، علیه *فوزاریوم کالموروم* دارای فعالیت آنتاگونیستی قوی می باشد (۷).

ژانگ (Zhang) و همکاران نیز در سال ۲۰۱۱، اثر ضد قارچی *باسیلوس سوبتیلیس* TS06 را علیه *ورتیسیلیوم داهلیا* و *فوزاریوم اکسی سپوروم* با استفاده از روش چاهک گذاری نشان دادند. در بررسی آن ها قطر هاله عدم رشد این قارچ ها در برابر سوسپانسیون باکتری، به ترتیب ١٤ و ١٥ میلی متر گزارش شد که در مقایسه با نتایج حاصل از پژوهش حاضر (۲۰ میلی متر در مورد قطر هاله عدم رشد *ورتیسیلیوم داهلی*) کمتر بود (۱۵). این تفاوت می تواند به دلیل تولید بیشتر متابولیت ضد قارچی و اثر مهارکنندگی بیشتر جدایه مورد بررسی علیه *ورتیسیلیوم* نسبت به جدایه *باسیلوس سوبتیلیس* TS06 باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

اونو (Ohno) و همکاران در سال ۱۹۹۵ تأثیر بهینه سازی پارامتر دما را در تولید ایتورین A توسط *باسیلوس سوبتیلیس* RB14 مورد بررسی قرار دادند. یافته های آنها نشان داد که دمای ۲۵ درجه سلیسیوس بهترین دما برای تولید ایتورین A است (۱۳). این یافته با نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر تفاوت دارد. این تفاوت را می توان به رشد بهتر جدایه های مورد بررسی در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس نسبت داد.

گراور (Grover) و همکاران در سال ۲۰۰۹، با روش HPLC دریافتند که اثر آنتی بیوتیکی و فعالیت ضد قارچی سویه *باسیلوس سوبتیلیس* RP24 به دلیل توانایی این سویه در تولید لیپوپپتید ایتورین A می‌باشد (۱٤). نتایج حاصل از تخلیص ماده مؤثره و مقایسه کروماتوگرام های حاصل از HPLC نشان داد که فعالیت ضد قارچی سویه های مورد مطالعه به دلیل تولید ایتورین A می باشد. اعضای این خانواده دارای فعالیت ضد قارچی قوی بوده و می توانند از رشد طیف وسیعی از قارچ های بیماری زای گیاهی ممانعت نمایند. مکانیسم تأثیر این ترکیبات از طریق واکنش با استرول موجود در غشای قارچ و ایجاد منافذ در آن و افزایش نفوذپذیری آن است که در نهایت موجب تخریب غشا و مرگ قارچ می گردد (٤).

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه، خاک های مناطق جنگلی منابع اکولوژیکی مناسبی به منظور جداسازی باکتری های بالقوه با توانایی تولید متابولیت های ضد قارچی می باشند. همچنین تأییدی بر توانایی *باسیلوس سوبتیلیس* در کنترل بیولوژیک عوامل بیماری زای گیاهی است که می توان از آن در کنترل زیستی قارچ های بیمارگر محصولات کشاورزی نیز استفاده نمود. از آنجایی که عوامل کنترل گر زیستی می توانند جایگزین مناسبی برای قارچ کش های شیمیایی باشند، بنابراین این روش از جذابیت های خاص زیست محیطی و اکولوژیکی برخوردار است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از جناب آقای دکتر زمانی زاده مدیر گروه محترم مقطع دکترای رشته مهندسی کشاورزی گرایش بیماری شناسی گیاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران، به دلیل اهدای سویه های قارچی و نیز از مرکز تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران پزشکی به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Nagorska K, Bikowski M, Obuchowski M. Multicellular behavior and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. Acta Biochim Pol. 2007; 54(3): 495-508.

2. Ongena M, Jacquea Ph. *Bacillus lipopeptids*: Versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends Microbiol. 2007; 16(3): 115-125.

3. Fickers P, Lecle`re V, Guez J, Be´chet M, Coucheney F, Joris B, Jacques Ph. Temperature dependence of mycosubtilin homologue production in *Bacillus subtilis* ATCC6633. Res Microbiol. 2008; 159: 449-457.

4. 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. J Antibiot. 1988; 41(11): 1699-1700.

5. Romero D, De Vicente A, Rakotoaly H, Dufour S, Veening J, Arrebola E, Cazorla F, Kuipers

Archive of SID
www.SID.ir

O, Paquot M, Garcia A. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward podosphaerafusca. Mol Plant Microbe Intract. 2007; 20 (4): 430-440.

6. Cazorla F, Romero D, Perez-Gorcia A, Lagtenberg B, De Vicente A, Bloemberg G. Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. Appl Microbiol. 2007; 1: 1364-5072.

7. 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. Afr J Biotecnol. 2012; 11(34): 8464-8475.

8. 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 Biol Tec. 2008; 48: 113-121.

9. Qi-qin L, Xian-yingl M, Xue W, Weil L, Cheng-jie D, Jia-xun F, Ji-liang T. Purification of two antimicrobial substances produced by *Bacillus subtilis* strain B11 and their properties. Agr Sci Chi. 2006; 5(5): 363-369.

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

11. Mizumoto Sh, Shoda M. Medium optimization of antifungal lipopeptide, iturinA, production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation by response surface methodology. Appl Microbiol Biotechnol. 2007; 76(1): 101-108.

12. 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*. Afr J Microbiol. 2012; 6(16): 3732-3738.

13. 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. J Ferment Bioeng. 1995; 80(5): 517-519.

14. 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. Curr Microbiol. 2010; 60: 99-106.

15. Zhang Y, Shi Z, Hu L, Wang F. Identification and characterization of a *Bacillus subtilis* strain TS06 as bio-control agent of strawberry replant disease (*Fusarium* and *Verticilium* wilts). Afr J Biotechnol. 2012; 11(3): 570-580.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Microbial World
Volume 8, No. 4, January 2016

Original Article

Evaluation of antifungal activity of iturin producing *Bacillus subtilis* strains

Afagh Mohammadi[1], Abbas Akhavan Sepahi[2], Reza Hosseinidoost[3]

[1]M.Sc., Department of Microbiology, Islamic Azad University, Pharmaceutical Sciences branch, Tehran, Iran.
[2]Associate Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University, North Tehran branch, Tehran, Iran.
[3]Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Pharmaceutical Sciences branch, Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objectives: *Bacillus subtilis* strains produce a wide variety of antimicrobial substances, such as iturin family lipopeptides, which are effective in biological control of many plant pathogens. The aim of present study was to investigation the antifungal activity of indigenous strains *Bacillus subtilis* against *Fusarium moniliforme* and *Verticillium dahliae*.

Materials & Methods: The forest soil samples were collected from seven different parks at Tehran. The isolates were screened by antifungal activity. Two best strains with greater inhibition zone were identified by PCR. Then, nutrient broth media were optimized to produce of large volumes of the antifungal metabolites from the selected native strains. Following 4 day incubation, the bacterial metabolites were purified, and the presence of iturin was confirmed by chromatography method.

Results: Totally, 23 isolated strains were confirmed as *B. subtilis*. In subsequent experiments, two strains 36 and 78 showed the greatest activity against the *Fusarium moniliforme* and *Verticillium dahliae* respectively. *16srRNA* sequence analyses for selected isolates confirmed 100% similarity to *B. subtilis*. The nutrient broth with glucose, yeast extract, neutral pH and 30 ^{0}C incubation temperature were optimized for the best production condition. The HPLC results showed that both the ability of these strains to produce iturin A in a specific period was as the same as standard iturin.

Conclusion: These indigenous strains showed the ability to produce antifungal metabolites. Therefore, these strains can be used as good candidates for the biological control of plant pathogenic fungi and as an alternative for chemical fungicides.

Keywords: *Bacillus subtilis*, Biological control, Iturin.

Correspondence to: Abbas Akhavan Sepahi

Tel: +98 2122946018

E-mail: akhavansepahy@gmail.com

Journal of Microbial World 2016, 8(4): 299-307.

Archive of SID

www.SID.ir