

فعالیت ضدقارچی باکتری‌های بومی جداشده از خاک کشاورزی خرم‌آباد

امیر هادی چگنی^۱، فرانک هادی*^۲، مژگان کوثری^۳، مریم زارع^۴، عبدالناصر غلامی محمدی^۲

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، ایران.
۲. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.
۳. پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج، ایران.
۴. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

چکیده

زمینه ظهور گونه‌های مقاوم به داروها و همچنین محدودیت استفاده از داروهای ضدقارچی به دلیل اثرات سمی احتمالی در انسان، هزینه زیاد تولید آن‌ها و آلودگی محیط زیست ناشی از مصرف این داروها، تحقیقات برای یافتن ترکیبات ضدقارچی جدید را ضروری دانسته است. میکروارگانیسم‌ها، به‌ویژه باکتری‌های خاک، طیف گسترده‌ای از مواد ضد میکروبی و فعال را تولید می‌کنند که برخی از آن‌ها خاصیت ضدقارچی دارند. هدف از این مطالعه جداسازی باکتری‌های مؤثر بر رشد قارچ‌ها از خاک کشاورزی شهرستان خرم‌آباد است.

روش کار نمونه‌برداری از خاک کشاورزی مناطق مختلف شهرستان خرم‌آباد انجام شد. سپس جداسازی باکتری‌های خاک با استفاده از محیط نوترینت براث و نوترینت آگار صورت گرفت و به دنبال آن اثر ضدقارچی مایع رویی و همچنین عصاره آن به روش انتشار دیسک در محیط SCA بر روی چندین گونه قارچ بررسی شد.

یافته‌ها در کل چهار جدایه، دارای اثرات ضدقارچی بسیاری بر برخی قارچ‌ها شامل *Aspergillus niger*، *Aspergillus fumigatus* و *Candida albicans* بودند. این جدایه‌ها با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی و تعیین توالی ژن *rRNA* ۱۶S شناسایی شدند. پس از جست‌وجوی توالی آن‌ها از طریق BLAST در بانک اطلاعاتی NCBI جنس باکتری‌ها متعلق به دو جنس *Pseudomonas* و *Acinetobacter* بودند. نتیجه‌گیری این اولین گزارش از بررسی فعالیت ضدقارچی باکتری‌های جداشده از خاک کشاورزی خرم‌آباد است. این باکتری‌ها می‌توانند کاندید مناسبی برای کنترل زیستی قارچ‌های بیماری‌زا باشند. استخراج، شناسایی و به‌کارگیری متابولیت‌های مهاری آن‌ها می‌تواند در طراحی و تولید داروهای ضدقارچی استفاده شود.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۱/۰۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۷/۲۳

کلیدواژه‌ها:

جداسازی باکتری، ضدقارچ، روش انتشار دیسک، S rRNA ۱۶r

۱. مقدمه

قارچ‌ها مواد غذایی مختلف را آلوده می‌کنند و کیفیت آن‌ها را کاهش می‌دهند. همچنین با تولید متابولیت‌های ثانویه‌ای به نام مایکوتوکسین‌ها نظیر آفلاتوکسین، زیرالنون و دی اکسی‌نیوالنول می‌توانند اثرات سرطان‌زایی، تراژونیک،

جهش‌زایی و همچنین سرکوب سیستم ایمنی را از خود بروز دهند [۱].

گرچه داروهای ضدقارچی و قارچ‌کش‌ها نقش مهمی در کنترل بیماری‌های قارچی دارند، این داروها عوارض جانبی منفی بر روی بدن موجودات زنده و محیط زیست آن‌ها دارند. همچنین باعث ایجاد مقاومت در قارچ‌های بیماری‌زا

* نویسنده مسئول: فرانک هادی

نشانی: گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

دورنگار:

تلفن: ۰۶۶۳۳۱۲۰۱۰۶

رایانه: hadi.f@lu.ac.ir

شناسه ORCID: 0000-0003-4990-664X

شناسه ORCID نویسنده اول: 0000-0003-0417-5804

مجله علمی - پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دوره ۲۶، شماره ۳، مرداد و شهریور ۱۳۹۸، ص ۳۸۲-۳۹۱
آدرس سایت: <http://jsums.medsab.ac.ir> رایانامه: journal@medsab.ac.ir
شاپای چاپی: ۱۶۰۶-۷۴۸۷

میلی لیتر برداشته و به لوله آزمایش محتوی ۹ میلی لیتر آب مقطر استریل اضافه شد. بدین ترتیب، غلظت 10^{-2} به دست آمد. سپس از رقت‌های متوالی سوسپانسیون خاک، غلظت‌های 10^{-3} ، 10^{-4} ، 10^{-5} و 10^{-6} تهیه شد. به دنبال آن، ۱ میلی لیتر از رقت‌های متوالی 10^{-3} ، 10^{-4} ، 10^{-5} و 10^{-6} به دست آمده در هریک از پتری دیش‌های استریل ریخته (هر رقت در سه تکرار) و به مدت یک هفته در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بعد از چندین بار واکشت، تعدادی پلیت جامد محتوی کشت مخلوطی از باکتری‌ها به دست می‌آید. در نهایت کلنی‌های رشد یافته در محیط جامد به‌طور جداگانه با چند بار واکشت دادن در محیط نوترینت آگار خالص شد.

۲.۳. آزمون زیستی جهت تعیین فعالیت ضدقارچی

با استفاده از قارچ‌های (ABRII:10113) *Aspergillus fumigatus* (ABRII:10114) و *Aspergillus niger* (ABRII:10112) تهیه شده از بانک میکروبی پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی و (PTCC:5027) *Candida albicans* تهیه شده از بانک میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، فعالیت ضدقارچی با روش دیسک‌گذاری صورت پذیرفت.

۲.۴. تعیین مشخصات باکتری‌ها

کلنی‌های حاصل از نمونه باکتری‌های جدا شده از خاک با روش گرم، رنگ‌آمیزی شد و ریخت‌شناسی سلولی آن‌ها با میکروسکوپ نوری (بزرگ‌نمایی $100\times$) مورد بررسی قرار گرفت. شناسایی باکتری‌ها براساس واکنش‌های بیوشیمیایی و با استفاده از آزمون‌های افتراقی، کاتالاز، اکسیداز، MR، VP، TSI، ایندول، تحرک و H₂S انجام شد.

۲.۵. شناسایی مولکولی باکتری‌ها

به منظور شناسایی مولکولی باکتری‌ها، ابتدا با استفاده از کیت DNA Bacterial Genomic DNA Extraction ژنومیک باکتری‌ها استخراج گردید. پس از حصول اطمینان از خلوص و میزان DNA استخراج شده، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) به منظور تکثیر قطعه‌ای از توالی ژن S ۱۶rRNA باکتری‌ها با استفاده از آنزیم Pfu و آغازگرهای عمومی 5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3' و 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' انجام گرفت [۶]. واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه

و اثرات نامطلوب بر روی میکروارگانیسم‌های مطلوب غیرهدف می‌شوند. همچنین محدودیت کاربرد روش‌های پاک‌سازی فیزیکی و شیمیایی سموم قارچی از قبیل کاهش کیفیت و خواص تغذیه‌ای محصول و گرانی تجهیزات مورد نیاز، توجه محققان را به سمت روش‌های زیستی سوق داده است [۲، ۳].

باکتری‌ها مکانیسم‌های مختلفی برای مهار و کنترل رشد قارچ‌های بیماری‌زا دارند که برخی از آن‌ها شامل زندگی انگلی، تولید ترکیبات ضدقارچی، رقابت برای آهن، غذا و محل زندگی است. عمده‌تاً این سویه‌های کاربردی ضمن رقابت با قارچ توکسین‌زا، مکان و فضای مناسب برای قارچ را اشغال می‌کنند. بدیهی است که مخلوط سویه‌هایی با قدرت رقابتی بالا و مکانیسم‌های متنوع کنترل زیستی آلودگی را کاهش می‌دهد. این آنتاگونیست‌ها از طریق رقابت، ترشح متابولیت‌های ضد میکروبی و آنزیم‌های تجزیه‌کننده مؤثر واقع می‌شوند [۴]. همچنین باکتری‌ها بیشتر از سایر میکروارگانیسم‌ها قادرند تجزیه میکروبی را بدون ایجاد رنگ‌دانه در مواد غذایی و در زمان کوتاه‌تری انجام دهند [۵]. با توجه به مطالب بیان شده، تحقیق حاضر با هدف جداسازی باکتری‌های گرم منفی و بررسی خاصیت ضدقارچی آن‌ها علیه قارچ‌های بیماری‌زا، شامل اسپریلوس فلاووس، اسپریلوس نایجر، اسپریلوس فومیگاتوس و کاندیدا آلبیکنس، انجام گرفت.

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱. نمونه برداری

نمونه برداری در آبان ماه ۱۳۹۳ از خاک کشاورزی مناطق مختلف شهرستان خرم‌آباد انجام شد؛ به طوری که در هر منطقه از عمق ۱۰ تا ۲۰ سانتی‌متری، به میزان ۰/۵ کیلوگرم خاک برداشته شد. سپس نمونه‌های هر منطقه به‌طور جداگانه مخلوط و در دمای اتاق به مدت ۷-۱۰ روز در معرض هوا خشک شد. این نمونه‌ها پس از عبور از الک با مش ۰/۸ میلی‌متری، تا زمان آزمایش در کیسه‌های پلی‌اتیلنی و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۲.۲. جداسازی و کشت باکتری‌ها

به منظور جداسازی باکتری‌ها، ۱۰ گرم از نمونه خاک مورد نظر با ۹۰ میلی لیتر آب مقطر استریل مخلوط و روی شیکر (۳۰ دقیقه و ۱۳۰g) قرار داده شد. پس از آنکه به مدت ۱۰ دقیقه به حالت ساکن رها شد، از مایع رویی مقدار ۱

۲.۷. بررسی پتانسیل ضدقارچی عصاره‌های باکتریایی

به‌منظور عصاره‌گیری، هرکدام از باکتری‌های مورد نظر در ارلن‌های مجزایی به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر که حاوی محیط کشت مایع القایی است، کشت داده شدند. ارلن‌ها به انکوباتور شیکردار در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. پس از گذشت ۱۰ روز، هریک از این ارلن‌ها در کنار شعله به لوله‌آزمایش استریل منتقل شدند. سپس لوله‌ها با دور ۶ هزار به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. با این روش باکتری‌ها رسوب کردند و محلول رویی که حاوی متابولیت‌های فعال آزاد شده در محیط کشت بود، توسط سمپلر به آرامی جدا شد و درون میکروتیوپ‌های استریل در یخچال با ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شد. از این محلول به‌عنوان عصاره باکتریایی استفاده گردید.

۳. یافته‌ها**۳.۱. نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی جدایه‌های باکتریایی**

نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی برای جدایه‌های باکتریایی در جدول ۱ آمده است. همچنین تصاویر میکروسکوپی مربوط به آزمون گرم آن‌ها در شکل ۱ نمایش داده شده است.

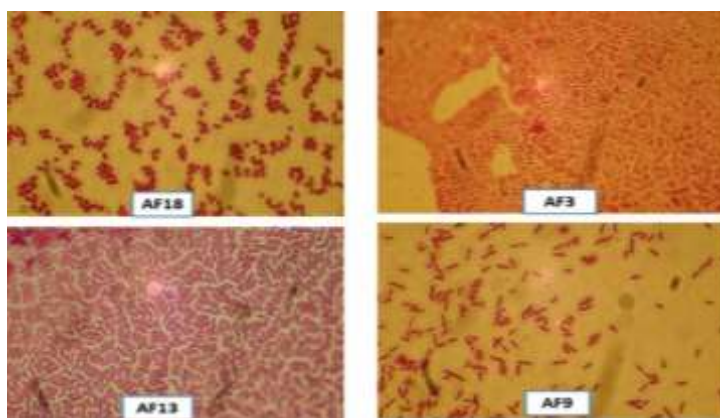
سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه برای ۱ سیکل، سپس واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه برای ۳۰ سیکل تکرار و در پایان بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصولات PCR با باند مطلوب جهت تعیین توالی به شرکت ژن فناوری ارسال گردید.

۲.۶. آنالیز داده‌های مولکولی

کروماتوگرام توالی‌های به‌دست‌آمده از شرکت ژن فناوری ابتدا به وسیله نرم‌افزار Chromas بررسی و ویرایش شد. به‌منظور مقایسه توالی نمونه‌ها با دیگر توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعات داده‌های ژنتیکی (NCBI: National Center for Biotechnology Information) از برنامه Blast که یکی از ابزارهای هم‌ردیفی توالی‌های DNA است، میزان تشابه نمونه‌ها و شناسایی اولیه به‌دست آمد. برای رسم درختچه فیلوژنتیکی از نرم‌افزار MEGA6 استفاده شد؛ به این صورت که توالی‌های DNA گونه‌های مشابه یا نزدیک با نمونه‌های مورد مطالعه از پایگاه داده‌های ژنتیکی استخراج گردید و به‌همراه توالی‌های DNA مورد مطالعه وارد این نرم‌افزار شد. درختچه‌های فیلوژنی به‌روش پیوند هم‌جواری (NJ: Neighbor joining) ترسیم شدند [۷].

جدول ۱. نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی جدایه‌های باکتریایی

آزمون‌ها	AF3	AF9	AF13	AF18
Morphology	کوکوس	کوکوباسیل	کوکوباسیل	کوکوس
Catalase	+	+	+	+
Oxidase	+	-	-	+
Growth on MacConkey agar	+	+	+	+
MR	-	-	-	-
VP	+	-	-	+
TSI	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-
Motility	+	-	-	+
Gram	-	-	-	-

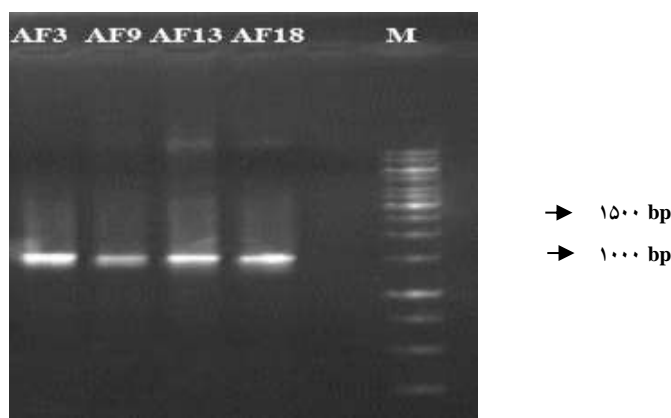


شکل ۱. نتایج آزمون گرم باکتری‌های جدا شده بعد از عکس برداری با میکروسکوپ نوری (بزرگ‌نمایی ۱۰۰)

مربوط به مارکر ۱ kb است. در مقایسه با مارکر، وزن قطعات تکثیر شده در حدود ۱۵۰۰ جفت باز است که در محدوده مورد انتظار است.

۳.۲. نتایج شناسایی مولکولی باکتری‌های جدا شده

نتایج الکتروفورز ژل آگارز مربوط به محصولات PCR ژن S rRNA ۱۶ در شکل ۲ نمایش داده شده است. ستون M



شکل ۲. الکتروفورز محصول PCR ایزوله‌های باکتریایی با آغازگرهای اختصاصی ژن S rRNA ۱۶ بر روی ژل آگارز ۱٪؛ جدایه‌ها به ترتیب از چپ به راست: AF3، AF9، AF13، AF18 و M: نشانگر وزن مولکولی ۱Kb (فرمنتاز)

۱۶rRNA آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. برای رسم درختچه‌های فیلوژنتیکی، توالی‌های مربوط به این جنس موجود در پایگاه بانک ژن با نرم‌افزار CLASTALW هم‌ردیف شد و سپس درختچه فیلوژنی آن با کمک نرم‌افزار MEGA 6.0 رسم شد که در شکل ۳ (الف، ب، ج، د) نشان داده شده است.

۳.۵. نتایج بررسی فعالیت ضدقارچی باکتری‌های جدا شده

فعالیت ضدقارچی عصاره‌های باکتریایی و باکتری‌ها علیه چهار قارچ بیماری‌زا به روش ایجاد چاهک و انتشار دیسک مورد آزمون قرار گرفت. انتشار دیسک تکرارپذیری بهتری داشت. همچنین باکتری بهتر از عصاره خاصیت

۳.۳. نتایج توالی‌یابی محصولات PCR

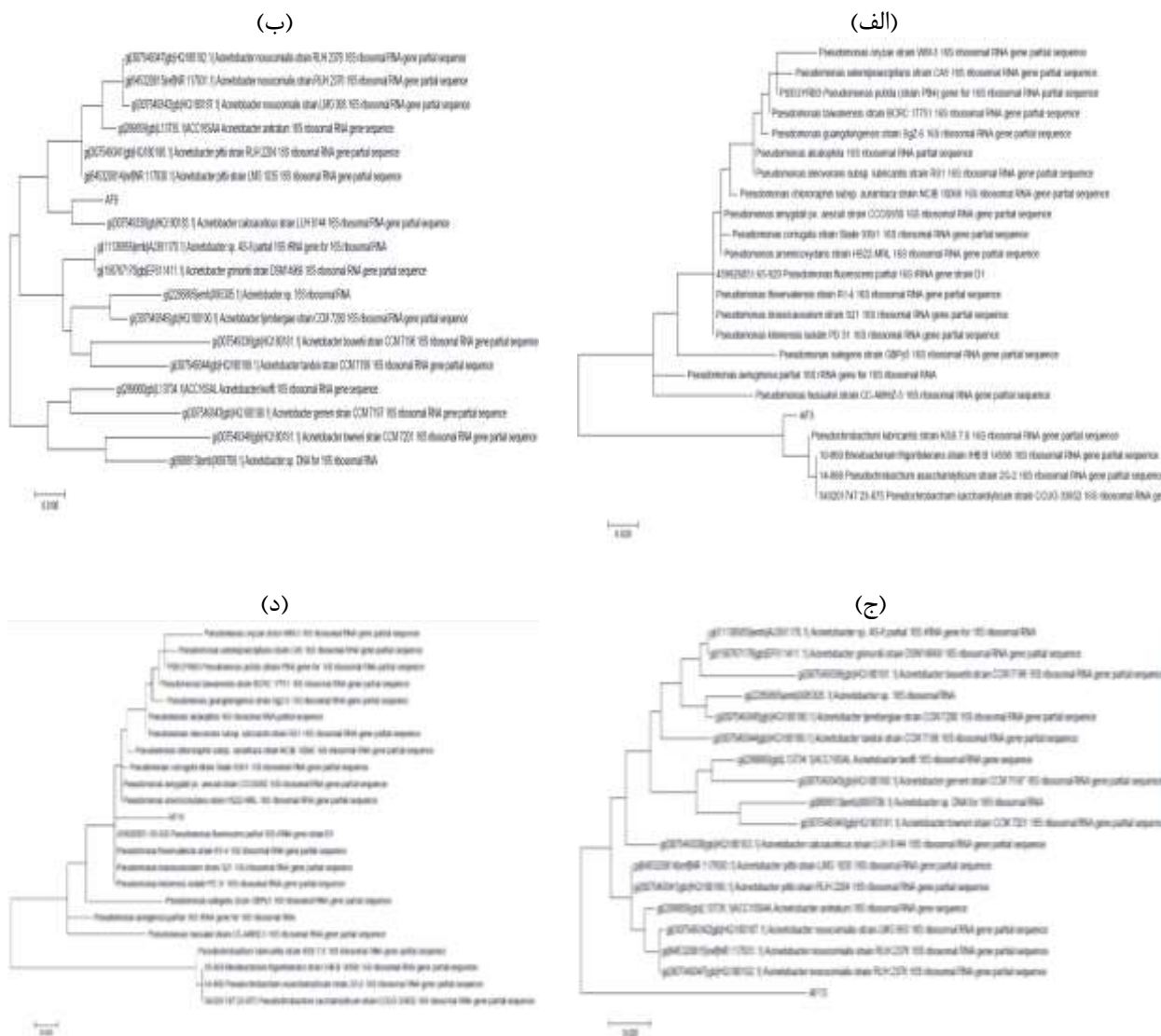
پس از دریافت نتایج توالی‌یابی، آنالیز داده‌ها در نرم‌افزار Chromas انجام شد. سپس توالی‌های به دست آمده از طریق BLAST در بانک اطلاعاتی NCBI بررسی و جنس باکتری‌ها شناسایی شد. نتایج نشان داد باکتری‌های جدا شده AF3 و AF18 مربوط به جنس Pseudomonas و باکتری‌های جدا شده AF9 و AF13 مربوط به جنس Acinetobacter است.

۳.۴. نتایج رسم درختچه فیلوژنی باکتری‌های جدا شده و مقایسه با گونه‌های مشابه

روابط فیلوژنتیکی باکتری‌های جدا شده با استفاده از ژن S

کرد. ایزوله‌های AF3 و AF13 بیشترین اثر مهاری را بر قارچ اسپریلوس فومیگاتوس نشان دادند. همچنین AF3 بیشترین اثر مهاری را بر قارچ کاندیدا آلبیکس نشان داد. نتایج در جدول ۲ آمده است.

ضدقارچی را نشان داد. هرکدام از چهار ایزوله حداقل بر یکی از قارچ‌ها مؤثر بودند. ایزوله AF3 و AF18 بیشترین اثر مهاری را بر قارچ اسپریلوس نیجر داشتند. چهار ایزوله اثرات مشابهی را بر قارچ اسپریلوس فلاووس نشان دادند؛ ولی ایزوله AF3 هاله شفاف‌تری با قطر ۱۶ میلی‌متر ایجاد



شکل ۳. رسم درختچه فیلوژنی جدایه‌های به‌روش پیوند هم‌جواری (NJ) براساس توالی ژن rRNA ۱۶S آن‌ها، الف - د به ترتیب AF9، AF3 و AF18

جدول ۲. فعالیت ضدقارچی باکتری‌های جداشده علیه قارچ‌های بیماری‌زا (برحسب میلی‌متر)

<i>C.albicans</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A.niger</i>	<i>A.flavus</i>	پاتوژن‌ها	عصاره‌ها
mm ۱۵	mm ۱۳	۲۴mm	mm ۱۶		AF3
mm ۱۳/۵	-	-	۱۷ mm		AF9
mm ۸	mm ۱۲	-	۱۸ mm		AF13
mm ۸	-	۲۶ mm	۱۶ mm		AF18

۴. بحث و نتیجه گیری

خاک منبعی مهم برای جداسازی میکروارگانیسم‌ها به ویژه باکتری‌هاست که منشأ محصولات فعال زیستی با فعالیت‌های فارماکولوژیک متنوع است. این ترکیبات به طور وسیع به عنوان مواد دارویی و شیمیایی در پزشکی، دامپزشکی و کشاورزی استفاده می‌شوند [۸]. به دلیل عدم توانایی در مطالعه ریزسازواره‌های خاک، دانسته‌های ما از تنوع میکروبی خاک محدود است. مطالعات نشان دادند یک گرم خاک دربرگیرنده ۴ هزار واحد ژنومیک مختلف باکتریایی است. همچنین تعداد گونه‌های شناخته شده را در حدود ۵ هزار مورد برآورد کرده‌اند؛ یعنی تقریباً ۱٪ جمعیت باکتریایی خاک توسط روش‌های آزمایشگاهی قابل کشت است و البته معلوم نیست که این ۱٪ نشان‌دهنده جمعیت باکتریایی باشد. فعالیت‌های مربوط به زندگی انسان مانند گسترش شهرها، کشاورزی، استفاده از علف‌کش‌ها و آلودگی‌ها می‌تواند بر تنوع جمعیت میکروبی تأثیرگذار باشد [۹]. میزان مرگ‌ومیر بیماری‌های عفونی در کشورهای در حال توسعه و توسعه یافته رو به افزایش است. تحقیقات نشان داده که ۳۳۵ مورد بیماری عفونی بین سال‌های ۱۹۴۰-۲۰۰۴ وارد جمعیت انسانی در دنیا شده است. بررسی‌های اخیر حاکی از آن است که سامانه‌های ژنتیکی در میکروارگانیسم‌ها قادر به برنامه‌ریزی برای مقابله با عوامل تهدیدکننده حیات آن‌هاست [۱۰]. همچنین بیماری‌های قارچی گیاه یکی از مهم‌ترین مباحث در کشاورزی و تولید غذا در کل دنیا محسوب می‌شود. تخمین زده می‌شود که آفت و زیان محصولات کشاورزی ناشی از بیماری‌های گیاهی در کشورهای غربی ۲۵٪ و در کشورهای در حال توسعه حدود ۵۰٪ است و یک سوم این صدمات مربوط به بیماری‌های قارچی است [۹]. محدودیت روش‌های سنتی فیزیکی و شیمیایی از قبیل کاهش کیفیت و خواص تغذیه‌ای محصول، مسائل ایمنی و گرانی تجهیزات مورد نیاز، توجه محققان را به روش‌های زیستی سوق داده است [۳].

در سال‌های اخیر، مطالعات در زمینه جداسازی و شناسایی باکتری‌ها از مناطق مختلف ایران گزارش شده است. بررسی این منابع و داده‌ها نشان می‌دهد تاکنون مطالعه جامعی در این باره به خصوص جداسازی و خاصیت ضدقارچی باکتری‌های گرم منفی انجام نشده است؛ لذا با توجه به اهمیت این باکتری‌ها در زمینه تولید ترکیبات ضدقارچی، این باکتری‌ها می‌توانند کاندیدهای مناسبی در کنترل زیستی قارچ‌های بیماری‌زا باشند و مورد توجه قرار گیرند. بیشتر مطالعات نشان داده است که باکتری‌های گرم مثبت مانند باسیلوس و اکتینومایست‌ها [۱۱] دارای خاصیت ضدقارچی هستند. برای مثال *B. subtilis* یکی از معمول‌ترین و

شناخته‌ترین باکتری‌هاست که به طور متوسط ۴-۵٪ ژنوم آن برای سنتز آنتی‌بیوتیک اختصاص یافته و توانایی تولید ترکیبات ضد میکروبی متعدد با ساختارهای متفاوت را دارد [۱۲]. کیمورا و همکار [۱۳] نشان دادند باکتری *Bacillus subtilis* (NK-330) همکار از رشد قارچ و تولید آفلاتوکسین در شرایط آزمایشگاه ممانعت می‌کند. پچکنکایف و همکاران [۱۴] در تحقیق دیگری نشان دادند باکتری *B. licheniformis* رشد قارچ‌های *A. flavus* و *A. westerdijkiae* را مهار می‌کند. در کل اغلب اعضای جنس باسیلوس به عنوان کارخانه‌های میکروبی جهت تولید طیف وسیعی از مولکول‌های فعال زیستی با خاصیت بازدارندگی از رشد عوامل بیماری‌زا مطرح هستند. برای نمونه لی و همکاران [۱۵] اخیراً ترکیبات ضدقارچی مختلفی، مانند باسیلومایسن آل، فنجیسین و سورفاکتین، را از باکتری *Bacillus amyloliquefaciens* SYBC H47 f جدا و فعالیت ضدقارچی آن را علیه چندین قارچ بیماری‌زا گزارش کرده‌اند. علاوه بر این، توانایی تولید اسپور در این جنس، قابلیت باسیلوس را به عنوان بهترین کاندید برای ساخت آفت‌کش‌های زیستی افزایش داده است [۱۶]. باکتری‌هایی دیگری متعلق به جنس‌های مختلف باکتریایی با توانایی فعالیت ضدقارچی گزارش شده‌اند؛ برای مثال گانه‌سینگا همکاران [۱۷] نشان دادند سویه‌های *Flavobacterium sp.* و *Pantoea agglomerans* توانایی غیرفعال‌سازی آفلاتوکسین را دارند. همچنین مان و همکار [۱۸] تجزیه آفلاتوکسین توسط باکتری *Corynebacterium rubrum* ATCC 14898 و کوالیرآسکا و همکار [۱۹] تجزیه آفلاتوکسین توسط باکتری *Streptococcus lactis* را گزارش کرده‌اند. علاوه بر این، تجزیه آفلاتوکسین توسط سویه‌هایی از *Lactobacillus* مشاهده شده است [۲۰]. برای مثال مهار رشد قارچ *A. nomius* توسط باکتری *L. rhamnosus* بیان شده است [۲۱]. گونایمی و همکاران [۲۲] مهار رشد قارچ *A. flavus* و *A. parasiticus* توسط *L. acidophilus* را نشان دادند. در مطالعه دیگری قزوینی و همکاران [۲۳] اظهار کردند *Bifidobacterium bifidum* و *L. fermentum* قادرند رشد قارچ *A. Parasiticus* را کاهش دهند. همچنین فعالیت ضدقارچی باکتری‌های *L. brevis* و *L. delbrueckii subsp. Lactis* مطالعه و اثبات شده است [۲۴]. مطالعات دیگری نشان داده است که باکتری (PTCC) *L. plantarum* (1058) از جوانه‌زنی اسپور قارچ *A. flavus* جلوگیری می‌کند [۲۵]. باکتری‌های *Nocardia corynebacterioides*، *Rhodococcus erythropolis* و *Mycobacterium fluoranthenorans* قادرند آفلاتوکسین را تجزیه کنند [۲۶]. مورایس و همکاران [۲۷] نشان دادند

مانند *Fusarium graminearum*، *Phytophthora capsici* و *Rhizoctonia solani* را تأیید کردند. تروتل - عزیز و همکاران [۳۴] سویه‌های مختلف باکتریایی شامل *Pseudomonas fluorescens*، *Bacillus subtilis*، *Pantoea agglomerans* و *Acinetobacter lwoffii* را از باغات انگور جدا کردند و فعالیت ضدقارچی آن‌ها علیه *Botrytis cinerea* را بررسی و تأیید نمودند. از سودوموناس آنتی‌بیوتیک‌های زیادی مانند ۲ و ۴ دی استیل فلوروگلوسینول (-2,4-DAPG: 2,4) (diacetylphloroglucinol)، پایولوتئورین (Pyrrolnitrin) و پیرولینیتترین (Pyrrolnitrin)، آگروسین (Agrocin84)، هریکولین (Herbicolin)، اومایسین (Oomycin)، فنازین (Phenazine) و سیانید هیدروژن استخراج شده است که باعث مهار رشد قارچ‌ها و کنترل بیماری‌ها می‌شود [۳۶-۳۸].

در نتیجه‌گیری این مطالعه باید گفت خاک کشاورزی می‌تواند منبع خوبی برای جداسازی باکتری‌ها از فعالیت ضدقارچی باشد. در این تحقیق، چهار ایزوله باکتریایی با استفاده از روش‌های ریخت‌زایی، بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی شد که متعلق به دو جنس سودوموناس و اسینتوباکتر بودند. با مطالعه و بررسی بیشتر به‌منظور جداسازی و ارزیابی ترکیبات ضدقارچی از این باکتری‌ها می‌توان از آن‌ها به‌عنوان کاندیدهای مناسبی در طراحی و ساخت داروها و ترکیبات ضدقارچی استفاده کرد. بنابراین بررسی‌های بیشتری باید در این زمینه صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

از دانشگاه لرستان و پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی کرج که امکان انجام شدن این تحقیق را فراهم کردند، تشکر می‌شود.

References

- [1]. Oueslati S, Romero-Gonzalez R, Lasram S, Frenich AG, Vidal JLM. Multi-mycotoxin determination in cereals and derived products marketed in Tunisia using ultrahigh performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Food Chem Toxicol* 2012; 50 (7): 2376-81.
- [2]. Ranjbarivan AR, Shams-Ghahfarokhi M, Kalantari S, Razzaghi-Abvaneh M. Molecular identification of antagonistic bacteria from Tehran soils and evaluation of their inhibitory activities toward pathogenic fungi. *Iran J Microbiol* 2011; 3 (3): 140-46.
- [3]. Ji C, Fan Y, Zhao L. Review on biological degradation of mycotoxins. *Anim Nutr* 2016; 2 (3): 127-33.
- [4]. Frev-Klett P, Burlinson P, Deveau A, Barret M, Tarkka M, Sarniguet A. Bacterial-fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists. *Microbiol Mol Biol R* 2011; 75(4): 583-609.
- [5]. Teniola OD, Addo PA, Brost IM, Farber P, Janv KD, Alberts JF, van Zyl WH, Stevn PS, Holzapfel WH. Degradation of aflatoxin B(1) by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoranthemivorans* sp. nov. *DSM44556* (T). *Int J Food Microbiol* 2005; 105 (2): 111-17.
- [6]. Lane DL. 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*; Stackenbradt, E., Goodfellow, M., Eds. New York: John Wiley: 1991.
- [7]. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013; 30 (12): 2725-29.
- [8]. Goheil V, Singh A, Vimal M, Ashwini P, Chhatpar HS. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. *Afr J Biotechnol* 2006; 5 (2): 54-72.
- [9]. Kirk JL, Beaudette LA, Hart M, Moutoglou P, Klironomos JN, Lee H et al. Methods of studying soil microbial diversity. *J Microbiol Methods* 2004; 58 (2): 169-88.
- [10]. Hashemi S, Nasrollahi Omra A, Pordeli H, Hosenian A. Study of Anti-fungal Effects of Isolated streptomycetes from Gorgan Areas. *Med Lab J Golestan Uni Med Sci* 2010; 4 (2): 7-16. (Persian)

- [11]. Janaki T, Navak BK, Ganesan T. Antifungal activity of soil actinomycetes from the mangrove *Avicennia marina*. *J Med Plants Stud*. 2016; 4 (2): 05-08.
- [12]. Stein T. Bacillus subtilis antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol* 2005; 56(4): 845-57.
- [13]. Kimura N, Hirano S. Inhibitory Strains of *Bacillus subtilis* for Growth and Aflatoxin production of Aflatoxigenic Fungi *Agric Biol Chem*. 1988; 52 (5): 1173-79.
- [14]. Petchkongkaew A, Taillandier P, Gasaluck P, Lebrihi A. Isolation of *Bacillus* spp. from Thai fermented soybean (Thua-nao): screening for aflatoxin B1 and ochratoxin A detoxification. *J Appl Microbiol*. 2008; 104: 1495-1502.
- [15]. Li X, Zhang Y, Wei Z, Guan Z, Cai Y, Liao X. Antifungal Activity of Isolated *Bacillus amyloliquefaciens* SYBC H47 for the Biocontrol of Peach Gummosis. *PLoS ONE* 2016; 11 (9): e0162125.
- [16]. Emmert EA, Handelsman J. Biocontrol of Plant Disease: a (Gram-) Positive Perspective. *FEMS Microbiol Lett* 1999; 171 (1): 1-9.
- [17]. Gunasinghe RN, Ikiiriwate CJ, Karunaratne AM. The use of *Pantoea agglomerans* and *Flavobacterium* sp. to control banana pathogens. *J Hort Sci Biotech* 2004; 79 (4): 1002-1006.
- [18]. Mann R, Rehm HJ. products from aflatoxin B₁ by *Corynebacterium rubrum*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride* and *Mucor ambiguus*. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* 1976; 2 (4): 297-306.
- [19]. Coallier-Ascah J, Idziak ES. Interaction between *Streptococcus lactis* and *Aspergillus flavus* on production of Aflatoxin. *Appl Environ Microbiol* 1985; 49 (1): 163-67.
- [20]. Gajbhiwe MH, Kapadnis BP. Antifungal-activity-producing lactic acid bacteria as biocontrol agents in plants. *Biocontrol Sci Technol* 2016; 26 (11): 1451-70.
- [21]. Munoz R, Arena ME, Silva J, González SN. Inhibition of mycotoxin-producing *Aspergillus nomius* vsc 23 by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*. *Braz J Microbiol* 2010; 41 (4): 1019-26.
- [22]. Ghonaimy GA, Yonis AA, Abol-Ela MF. Inhibition of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* fungal growth and its aflatoxins (B1, B2, G1 and G2) production by *Lactobacillus acidophilus*. *J Egypt Soc Toxicol* 2007; 37: 53-60.
- [23]. Ghazvini RD, Kouhsari E, Zibafar E, Hashemi SJ, Amini A, Niknejad F. Antifungal Activity and Aflatoxin Degradation of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus Fermentum* Against Toxigenic *Aspergillus Parasiticus*. *Open Microbiol J* 2016; 10:197-201.
- [24]. Bayankaram PP, Sellamuthu PS. Antifungal and anti-aflatoxigenic effect of probiotics against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Toxin Rev* 2016; 35 (1-2): 10-15.
- [25]. Khanafari A, Soudi H, Miraboulfathi M, Karamei Osboo R. An In vitro investigation of Aflatoxin B1 Biological Control by *Lactobacillus plantarum*. *Pak J Biol Sci* 2007; 4 (3): 163-168.
- [26]. Teniola OD, Addo PA, Brost IM, Farber P, Jany KD, Alberts IF, et al. Degradation of aflatoxin B(1) by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoranthenorans* sp. nov. *DSM 44556(T)*. *Int J Food Microbiol* 2005; 105 (2): 111-17.
- [27]. Moraes APR, Videira SS, Bittencourt VREP, Bittencourt AJ. Antifungal activity of *Stenotrophomonas maltophilia* in *Stomoxys calcitrans* larvae. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2014; 23: 194-199.
- [28]. Mickler CJ, Bowen KL, Kloepper JW. Evaluation of selected geocarophore bacteria for biological control of *Aspergillus flavus* in peanut. *Plant Soil* 1995; 175: 291-299.
- [29]. Leon M, Yaryura PM, Montecchia MS, Hernandez AL, Correa OS, Pucheu NL, et al. Antifungal Activity of Selected Indigenous *Pseudomonas* and *Bacillus* from the Soybean Rhizosphere. *Int J Microbiol* 2009; 2009: 572049.
- [30]. Sangare L, Zhao Y, Folly YM, Chang I, Li J, Selvaraj JN, Xing F, Zhou L, Wang Y, Liu Y. Aflatoxin B1 degradation by a *Pseudomonas* strain. *Toxins (Basel)*. 2014; 6 (10): 3028-40.
- [31]. Mannaa M, Oh JY, Kim KD. Microbe-mediated control of *Aspergillus flavus* in stored rice grains with a focus on aflatoxin inhibition and biodegradation. *Ann Appl Biol* 2017; 171 (3): 376-92.
- [32]. Mannaa M, Oh JY, Kim KD. Biocontrol activity of volatile-producing *Bacillus megaterium* and *Pseudomonas protegens* against *Aspergillus flavus* and aflatoxin production on stored rice grains. *Mycobiology* 2017; 45 (3): 213-19.
- [33]. Mannaa M, Kim KD. Biocontrol Activity of Volatile-Producing *Bacillus megaterium* and *Pseudomonas protegens* Against *Aspergillus* and *Penicillium* spp. Predominant in Stored Rice Grains: Study II. *Mycobiology*. 2018; 46 (1): 52-63.
- [34]. Trotel-Aziz P, Couderchet M, Biagiatti S, Aziz A. Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. mediating grapevine resistance against *Botrytis cinerea*. *Environ Exper Bot* 2008; 64 (1): 21-32.
- [35]. Liu CH, Chen X, Liu TT, Lian B, Gu Y, Caer V, et al. Study of the antifungal activity of *Acinetobacter baumannii* LCH001 in vitro and identification of its antifungal components. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007; 76 (2): 459-66.
- [36]. Raaijmakers JM, Vlam M, de Souza JT. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie Leeuwenhoek*. 2002; 81 (1-4): 537-47.
- [37]. Ramette A, Frapolli M, Defago G, Moenne-Loccoz Y. Phylogeny of HCN synthase-encoding hcnBC genes in biocontrol fluorescent pseudomonads and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability. *Mol Plant Microbe Interact* 2003; 16 (6): 525-35.
- [38]. van LL, Li YQ, Wang Y, Zhang XH, Xu YQ. Optimization of critical medium components using response surface methodology for Phenazine-1-carboxylic acid production by *Pseudomonas* sp. M-18Q. *J Biosci Bioeng*. 2008; 105(3): 232-37.

Antifungal Activity of Native Bacteria Isolated from Khorramabad Agricultural Soil

Amir Hadi Chegeni¹, Faranak Hadi^{2*}, Mojgan Kowsari³, Maryam Zare⁴, Abdolnaser Gholami Mohammadi²

1. Department of Biology, Faculty of science, Azad University, Brojerd, Iran.
2. Department of Biology, Faculty of Science, Lorestan University, Khorramabad, Iran.
3. Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj, Iran.
4. Department of Biology, Faculty of Science, Payam Noor University, Tehran, Iran.

Abstract

Background Emergence of drug resistant strains and the limited use of antifungal drug due to possible toxic effects on humans, the high cost of their production and environmental pollution has made the search for novel bio-antifungal compounds a necessity. Microorganisms, particularly soil bacteria produce a wide range of active antimicrobial substances that some of them have antifungal properties. The purpose of this study is isolation and identification of the bacteria affecting the growth of fungi from Khorramabad agricultural soil.

Materials & Methods Agricultural soils were collected from different areas of Khorramabad, Lorestan Province. The bacteria were isolated using nutrient broth and nutrient agar, then, the antifungal activity of their extracts and supernatant in the SCA media on several species of fungi was studied applying disk diffusion method.

Results Four strains showing a remarkable antifungal effect against some fungi, including *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. These isolates were identified by biochemical features and 16S rRNA sequence. Analysis of their sequencing through BLAST in NCBI data bank showed that these bacterial similarly closed to *Pseudomonas* sp. and *Acinetobacter* sp. genus.

Conclusion This study was the first report of antifungal analysis of soil isolated bacteria from Khorramabad. These bacteria could be a potential candidate for biocontrolling pathogenic fungi. The extraction, identification and development of their inhibitory metabolites can be used in the design and production of antifungal agents.

Received: 2018/08/02

Accepted: 2019/07/20

Keywords: Bacterial isolation, Antifungal, Disk diffusion method, 16SrRNA.