Original Article

Optimizing conditions for the production of antifungal agents using the native *Bacillus cereus* SB15

Motamedi H[1,2*], Zahedi E[1], Zarei-Mahmoud Abadi A[3]

1- Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, I. R. Iran.
2- Biotechnology and Biological Science Research Center, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, I. R. Iran.
3- Department of Mycology, Faculty of Medicine, JundiShapur University of Medical Sciences, Ahvaz, I. R. Iran.

Received January 23, 2016; Accepted October 20, 2016

Abstract:

Background: With regard to the occurrence of fungal infections, finding new antifungal agents is necessary. Due to its biologic properties *Bacillus spp*. are suitable sources for this purpose. The aim of this study was to find native bacillus species with potential of antifungal agent production.

Material and Methods: In this experimental study, bacillus species were isolated from heat-treated soil samples and following culturing in TSB, anti-fungal effects of their supernatants were determined by disc diffusion method. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) levels of the selected strains were obtained against two fungal pathogens. Growth curve of the isolate was obtained in different pH and temperatures. The effects of pH, temperature, carbon and nitrogen sources on antibiotic production by the isolate were also investigated. This isolate was identified through biochemical and molecular tests.

Results: Three out of six bacillus isolates were able to produce the antifungal agents, among them *Bacillus cereus* strain SB15 showed the most significant antifungal effects against a wide range of fungi. Optimized conditions for antibiotic production by this isolate were: temperature=37˚C, pH=7, 48 h incubation and manitol and urea as the best carbon and nitrogen sources, respectively. The MIC and MFC of the produced antibiotic against *Aspergillus niger* were: 2 and 4 and against *Aspergillus flavus* 4 and 16 mg/ml, respectively.

Conclusion: Based on the obtained results it may be concluded that this bacillus strain has optimum potential for antifungal agent production. The strain can be used for the control of fungal infections and also fungal growth in food industry and environment.

Keywords: Antifungal agents, Bacillus, Antibiotic, Optimization, Antibiotic resistance

* **Corresponding Author.**
Email: hhmotamedi@yahoo.com
Tel: 0098 613 333 1045
Fax: 0098 613 333 1045

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, April, 2017; Vol. 21, No 1, Pages 9-18

Please cite this article as: Motamedi H, Zahedi E, Zarei-Mahmoud Abadi A. Optimizing conditions for the production of antifungal agents using the native *Bacillus cereus* SB15. ***Feyz*** 2017; 21(1): 9-18.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-28]

تعیین شرایط بهینه برای تولید ترکیبات ضدقارچی از جدایه بومی *باسیلوس سرئوس* SB15

حسین معتمدی[۱و۲*]، الناز زاهدی[۳]، علی زارعی محمودآبادی[۴]

خلاصه:

سابقه و هدف: با توجه به گسترش عفونت‌های قارچی یافتن ترکیبات ضدقارچی جدید ضروری است و گونه‌های مختلف باسیلوس به‌دلیل ویژگی‌های زیستی منبع مناسبی برای این منظور است. هدف این مطالعه دست‌یابی به‌گونه‌های بومی باسیلوس با توان تولید ترکیبات ضدقارچی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه گونه‌های باسیلوس از نمونه‌های خاک تیمار شده با حرارت، جداسازی شده و با استفاده از روش انتشار دیسک اثر ضدقارچی مایع رویی حاصل از کشت براث آن‌ها بررسی شد. شاخص‌های MIC و MFC جدایه منتخب علیه دو قارچ استاندارد سنجیده شد و منحنی رشد آن در مقادیر مختلف دما و pH رسم شد. اثر pH، دما، زمان، منبع کربن و نیتروژن بر تولید ترکیب ضدقارچی توسط جدایه منتخب بررسی شده و جدایه با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی و مولکولی تعیین هویت شد.

نتایج: از ۶ جدایه باسیلوس، ۳ جدایه توانایی تولید ترکیب ضد قارچ را داشتند و جدایه *Bacillus cereus* SB15 بیشترین توان ضدقارچی را نشان داد. شرایط بهینه تولید ترکیب ضدقارچ توسط این جدایه عبارت بود از: دمای ۳۷°C، pH=۷، ۴۸ ساعت انکوباسیون و مانیتول و اوره به‌عنوان بهترین منابع کربن و نیتروژن. MIC و MFC ترکیب ضدقارچی تولیدی علیه *آسپرژیلوس نیجر* به‌ترتیب برابر ۲ و ۴ و علیه *آسپرژیلوس فلاوس* ۴ و ۱۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌دست آمد.

نتیجه‌گیری: در مجموع می‌توان گفت باسیلوس جداسازی شده قابلیت مناسبی جهت تولید ترکیب ضدقارچ دارد و می‌توان از آن در راستای تولید ترکیبات ضدقارچی جهت کنترل عفونت‌های قارچی و نیز کنترل قارچ‌ها در صنایع غذایی و محیط استفاده کرد.

واژگان کلیدی: عوامل ضدقارچ، باسیلوس، آنتی‌بیوتیک، بهینه‌سازی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

دو ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره بیست و یکم، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۶، صفحات ۱۸-۹

مقدمه

از حدود ۱/۵ میلیون گونه در شاخه قارچ‌ها، حدود ۴۰۰ گونه به‌عنوان پاتوژن انسان‌ها، حیوانات و گیاهان شناسایی شده‌اند که اکثر آن‌ها متعلق به جنس‌های آسپرژیلوس، پنی‌سیلیوم و فوزاریوم می‌باشند [۱]. افزایش وسیع شیوع عفونت‌های قارچی در ۳۰ سال گذشته و بروز عوامل قارچی بیماری‌زای فرصت‌طلب به‌خصوص در موارد ضعف سیستم ایمنی مشکلاتی را در پزشکی به‌وجود آورده است [۳،۲]. این مسأله تحقیقات درخصوص تولید ترکیبات ضدقارچی جدید را الزامی می‌کند [۴].

از طرف دیگر به‌دلیل محدودیت در استفاده از قارچ‌کش‌های شیمیایی برای کنترل بیماری‌هایی گیاهی، یافتن قارچ‌کش‌های جدید و کم‌خطر ضروری می‌باشد [۵]. هم‌چنین، اثرات جانبی مضر و امکان عود بیماری، موجب شده در طی دو قرن گذشته تلاش‌های بسیاری برای یافتن ترکیبات ضدقارچی جدید انجام شود [۶]. از بین منابع موجود، محصولات حاصل از باکتری‌ها گزینه مناسبی جهت تولید ترکیبات ضدقارچی جدید هستند و تحقیقات درباره تقابل باکتری‌ها با قارچ‌های بیماری‌زا به‌سرعت روبه‌افزایش است [۷]. باکتری‌ها از طریق تولید آنتی‌بیوتیک‌ها که متابولیت‌های ثانویه هستند و یا ایجاد رقابت باعث مهار رشد قارچ‌ها می‌شوند [۹،۸]. در بین باکتری‌ها، اعضاء جنس‌های باسیلوس و سودوموناس به‌عنوان باکتری‌های برگزیده در روش‌های کنترل زیستی، طراحی و تولید دارو مطرح هستند. گونه‌های باسیلوس با پراکندگی وسیع در ریزوسفر رشد سریعی داشته، به‌راحتی کشت داده می‌شوند و قادر به تولید متابولیت‌های مختلف هستند [۷]. اعضاء این جنس در میان گسترده‌ترین میکروارگانیسم‌های تولیدکننده آنتی‌بیوتیک می‌باشند که برخی از این ترکیبات ارزش کلینیکی داشته و برخی دیگر در شرایط برون‌تنی برای کنترل فساد مواد غذایی و بیماری‌های گیاهی استفاده می‌شوند [۱۰،۹]. ترکیبات ضدقارچی تولید شده به‌وسیله باسیلوس‌ها اغلب بیوسورفاکتانت‌های حلقوی هستند که به‌دلایلی از جمله

[۱] استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

[۲] مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی و علوم زیستی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

[۳] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

[۴] استاد، گروه قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، اهواز، ایران

* **نشانی نویسنده مسئول:**
خوزستان، اهواز، میدان دانشگاه، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تلفن: ۰۶۱۳۳۳۳۱۰۴۵ **دورنویس:** ۰۶۱۳۳۳۳۱۰۴۵

پست الکترونیک: hhmotamedi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۳ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۹۵/۷/۲۹

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-28]

سمیت پایین، تجزیه‌پذیری بالا و عدم آسیب به محیط زیست از قارچ‌کش‌های مهم محسوب می‌شوند [۱۱]. جستجو برای یافتن ترکیبات ضدقارچ مؤثر از مسائل مهمی است که جامعه انسانی از دیرباز با آن مواجه بوده است، لذا امروزه برای رفع و کاهش مشکلات موجود تحقیق پیرامون داروهای ضدقارچ منطقی به‌نظر می‌رسد [۱۲]. به‌همین دلیل، غربال‌گری زیستگاه‌های جدید و دارای خصوصیات متفاوت از سایر زیستگاه‌ها می‌تواند امکان دست‌یابی به سویه‌های جدید برای این منظور را فراهم آورد. شرایط اقلیمی خوزستان به‌دلیل دمای بالا شرایط انتخابی را برای حضور و بقاء باسیلوس‌ها فراهم کرده است و گونه‌های باکتریایی موجود در آن توانایی‌های بیولوژیک منحصر به‌فردی را نشان می‌دهند. لذا، این زیستگاه می‌تواند گزینه مناسبی برای دست‌یابی به باکتری‌های مولد ترکیبات ضدمیکروبی باشد. هدف از مطالعه حاضر دست‌یابی به گونه‌های باسیلوس دارای فعالیت ضدقارچی است که بتوان از آنها به‌عنوان منابع مناسب تولید ترکیبات طبیعی ضدقارچ برای کنترل عفونت‌ها استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

به‌منظور جداسازی و خالص‌سازی باکتری، نمونه‌های خاک از ۳ ناحیه منطقه زنبورداری واقع در دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز جمع‌آوری شد. سپس، برای غربال‌گری باسیلوس‌ها پس از حرارت دادن نمونه‌ها (۲۰ دقیقه در ۸۰ درجه سانتی‌گراد)، ۱۰ گرم از نمونه خاک به همراه ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر به‌مدت ۲۰ دقیقه در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۰ درجه سانتی-گراد قرارداده شد. یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاصل به ۲۵ میلی-لیتر محیط نوترینت براث استریل تلقیح شد و در انکوباتور شیکردار (۴۸ ساعت، ۳۰ درجه سانتی‌گراد) انکوبه شد. جدایه‌ها از طریق کشت روی محیط نوترینت آگار خالص‌سازی شد و بر اساس خصوصیات مورفولوژیک (شکل کلونی، رنگ‌آمیزی گرم، و رنگ-آمیزی اسپور) و تست‌های تشخیصی بیوشیمیایی (کاتالاز، تجزیه نشاسته، مصرف سیترات، MR/VP، تولید اندول، هضم ژلاتین، و رشد در $10^{\circ}C$) شناسایی شدند [۱۳،۱۲]. به‌علاوه، به‌منظور تایید تشخیص، ژن 16S rRNA جدایه‌ها تکثیر و تعیین توالی شد. برای این منظور استخراج ژنوم طبق مراحل زیر انجام شد [۱۴]. یک میلی-لیتر از سوسپانسیون باکتری با کدورت نیم مک‌فارلند سانتریفیوژ شد و پس از حل کردن رسوب حاصل در ۱ میلی‌لیتر آب Mili Q به-مدت ۱۵ دقیقه جوشانده شد. پس از سانتریفیوژ (۱ دقیقه، ۵۰۰۰ دور در دقیقه)، به اندازه ۲/۵ برابر مایع رویی اتانول ۹۹ درصد سرد افزوده شد و به‌مدت ۱ ساعت در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در نهایت، پس از سانتریفیوژ (۱۰ دقیقه، ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه) مایع رویی دور ریخته شد و رسوب حاصل در ۵۰ میکرولیتر آب Mili Q حل گردید و به‌عنوان الگو در واکنش PCR استفاده شد [۱۴]. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از پرایمرهای رفت (5'-CCGAATTCGTCGACAAC-3' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-) و پرایمر برگشت (5'-CCCGGGATCCAAGCTTACGGTTACCT-3' TGTTACGACTT-) در شرایط زیر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (بیوراد، آمریکا) انجام شد [۱۵]: یک میکرولیتر ژنوم، ۱۰ پیکومول از هرکدام از بافرهای (1X) PCR، $dNTP_s$ (200mM)، $MgCl_2$ (1.5M)، ۱/۵ واحد آنزیم Taq پلیمراز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و در شرایط دناتوراسیون اولیه (۵ دقیقه، $94^{\circ}C$)، ۳۰ سیکل شامل دناتوراسیون (۱ دقیقه، $94^{\circ}C$)، اتصال پرایمرها (۴۰ ثانیه، $58/1^{\circ}C$) و سنتز (۱۵۰ ثانیه، $72^{\circ}C$) و مرحله سنتز نهایی (۲۰ دقیقه، $72^{\circ}C$). تولید محصول ۱۵۰۰ جفت بازی حاصل با الکتروفورز (۸۰ ولت، ۴۵ دقیقه) روی ژل آگارز یک درصد و با مقایسه اندازه‌ی باندهای تشکیل شده با مارکر وزن مولکولی یک کیلو باز تایید شد [۱۶]. محصول واکنش توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی تعیین توالی شد و پس از اصلاح کردن آن با استفاده از نرم‌افزار Bioedit با داده‌های موجود در بانک ژن مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی مقایسه شده و باکتری شناسایی شد. جهت سنجش اولیه تولید ترکیبات ضدقارچی، کشت ۴۸ ساعته باکتری در محیط TSB سانتریفیوژ شد (۲۰ دقیقه، ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه، $4^{\circ}C$) و دیسک‌های کاغذی استریل با افزودن ۴۰ میکرولیتر از مایع رویی محیط کشت باکتری اشباع شد [۱۷]. کشت چمنی از سوسپانسیون معادل نیم مک‌فارلند قارچ‌های *Aspergillus niger* PTCC 5013، *Aspergillus flavus* PTCC 5004، *Fusarium* sp.، *Penicillium* sp.، *Aspergillus terreus* و *Rhodotorulla* sp. در آب مقطر حاوی ۰/۱ درصد توین ۸۰ روی پلیت PDA آماده شد و دیسک‌های تهیه شده روی پلیت‌های تلقیح شده با اسپور قارچ قرار داده شد. پس از انکوباسیون (۲۴ ساعت، $35^{\circ}C$) قطر هاله عدم رشد برحسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد [۱۸،۱]. جدایه‌هایی که اثر ضدقارچی نشان دادند در محیط مایع کشت داده شدند و مایع رویی آن‌ها به شرح زیر تخلیص شده و اثر ضدقارچی آن‌ها سنجیده شد. پس از سانتریفیوژ کردن (۲۰ دقیقه، ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه) کشت ۴۸ ساعته باکتری، اتیل استات یا دیگر حلال‌ها مانند متانول، بوتانول، کلروفرم و DMSO با حجمی معادل حجم مایع رویی اضافه گردید و پس از مخلوط کردن و یکنواخت کردن آنها، به‌منظور تفکیک فازها، سانتریفیوژ (۴۰۰۰ دور در دقیقه،

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-28]

۴°C) انجام شد و فاز حلال که حاوی ترکیب ضدقارچی است جمع‌آوری گردید. این فرآیند سه مرتبه تکرار شد و نهایتا حلال با انکوباسیون به‌مدت ۳۶ ساعت در دمای ۳۷ °C تبخیر شد [۱۹،۵]. پودر به‌دست آمده با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در آب مقطر حل شد و اثر ضدقارچی آن به روش انتشار دیسک مورد بررسی قرار گرفت. از دیسک‌های استاندارد فلوکونازول (۱۰۰ میکروگرم، لیوفیلکم، ایتالیا)، مایکونازول (۱۰ میکروگرم، لیوفیلکم، ایتالیا)، و تربینافاین (۵۰ میکروگرم، تولید شده در تحقیق حاضر) به‌عنوان کنترل مثبت و از دیسک بلانک آغشته به حلال استفاده شده برای استخراج ترکیب ضدقارچی به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. توانمندترین جدایه مولد ترکیب ضدقارچی بر اساس قطر هاله عدم رشد انتخاب شد و حداقل غلظت مهاری و کشنده ترکیب ضدقارچی آن علیه *A. niger* PTCC 5013، *A. flavus* PTCC 5004 به‌روش میکرودیلوشن براث تعیین شد. در این روش ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون قارچ (کدورت نیم مک‌فارلند) و ۸۰ میکرولیتر محیط RPMI1640 و ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره باکتری (۶۴، ۳۲، ۱۶، ۸، ۴، ۲، ۱، ۰/۵، ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به درون چاهک‌های میکروپلیت‌های ۹۶ خانه افزوده شد. سپس، میکروپلیت‌ها در دمای ۳۰°C درجه گرم‌خانه‌گذاری شد و بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت توسط دستگاه ELISA Reader (بیوراد، آمریکا) میزان جذب آنها در طول موج ۵۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و با مقایسه با میزان جذب شاهد مثبت (محیط RPMI 1640 و سوسپانسیون قارچ) و منفی (محیط RPMI 1640) حداقل غلظت مهاری مشخص شد؛ بدین‌منظور حداقل غلظتی که میزان جذب آن از جذب شاهد مثبت کمتر و نزدیک به جذب شاهد منفی به‌دست آمد، به‌عنوان MIC (حداقل غلظتی که از رشد قارچ جلوگیری کرده است) در نظر گرفته شد و غلظت‌های بالاتر از آن باتوجه به افزایش مهار قارچ میزان جذب کاهش می‌یابد. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی یک لوپ استاندارد از چاهک‌هایی که فاقد رشد بودند روی پلیت حاوی PDA کشت (۳۰، ۲۴ ساعت °C) شد. حداقل غلظتی که از رشد قارچ روی محیط جلوگیری نماید به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی (MFC) درنظر گرفته شد [۲۰]. به‌منظور افزایش دسترسی به ترکیبات ضدقارچی تولید شده توسط جدایه توانا، ۳ میلی‌لیتر از محیط کشت تولید حاوی باکتری با استفاده از دستگاه سونیکاسیون (۴۰ ثانیه، ۴ °C) در فرکانس ۱۲۰ مگاهرتز سونیکه گردید [۱۶]. سپس، اثر ضدقارچی آن علیه چند سویه قارچ بیماری‌زا مشابه آنچه گفته شد، اندازه‌گیری گردید. در ادامه، جهت تعیین مقاومت دمایی متابولیت ضدقارچی تولید شده تیمار حرارتی انجام شد. یک میلی‌لیتر از محیط کشت باکتری که دارای اثر ضدقارچی بود در دماهای ۴، ۳۰، ۳۷، ۴۵ و ۶۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه و ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد (اتوکلاو) به‌مدت ۱۵ دقیقه تیمار دمایی شد و نتیجه این تیمار با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد علیه قارچ استاندارد *A. niger* PTCC5013 سنجیده شد [۱۰]. به‌علاوه، ۲۰۰ میکرولیتر از مایع رویی محیط کشت باکتری با ۲۰ میکرولیتر از آنزیم‌های پروتئیناز K و پپسین با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تیمار شد و نتیجه این تیمار با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد علیه قارچ استاندارد *A. niger* PTCC5013 سنجیده شد [۱۶،۱۰]. در مرحله بعد، شرایط رشد باکتری منتخب بهینه‌سازی شد. برای این منظور ابتدا منحنی رشد در سه دمای ۳۰، ۳۷ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد در محیط TSB رسم شد و پس از انتخاب مناسب‌ترین دمای رشد با ثابت نگه داشتن دما، pH مناسب رشد در محدوده ۵/۵، ۷ و ۸/۵ تعیین گردید. جهت رسم منحنی رشد، از سوسپانسیون باکتری معادل نیم مک‌فارلند به‌میزان ۱ درصد حجم محیط کشت به TSB تلقیح شد و در شیکر انکوباتور (۱۵۰ دور در دقیقه) گرماگذاری شد و هر ۲ ساعت میزان جذب باکتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد و منحنی رشد در طی ۶۰ ساعت رسم گردید [۱۸]. در مرحله بهینه‌سازی تولید ترکیب ضدقارچ، پس از انتخاب جدایه برتر اثر شرایط فیزیکی و شیمیایی محیط کشت بر میزان تولید ترکیب ضدقارچی توسط این جدایه بررسی شد. در این مرحله از دو محیط تولید TSB و محیط انتخابی حاوی ۵ درصد NaCl، ۲ درصد ترپتون، ۰/۱۵ درصد $MgSO_4$، ۰/۱۵ درصد K_2HPO_4 و ۱ درصد گلوکز استفاده شد. از سوسپانسیون معادل نیم مک‌فارلند حاصل از کشت باکتری در محیط نوترینت براث به‌میزان یک درصد حجم به محیط کشت تولید تلقیح شد و تأثیر پارامترهای زیر بر میزان تولید ترکیب ضدقارچی توسط جدایه برتر بررسی شد. دمای گرم‌خانه‌گذاری از عوامل مهم جهت رشد باکتری و تولید متابولیت‌های ثانویه مانند آنتی‌بیوتیک درنظر گرفته می‌شود. برای تعیین بهترین دمای گرم‌خانه‌گذاری جهت تولید ترکیب ضدقارچ، محیط تولید در دماهای ۳۰، ۳۷ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شد و در فواصل زمانی ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بعد از آن از محیط تولید نمونه‌برداری انجام شد و اثر عصاره رویی به‌روش انتشار دیسک علیه *A. niger* PTCC5013، *A. flavus* PTCC5004 اندازه‌گیری شد [۲۲،۲۱]. به‌منظور تعیین تأثیر pH اولیه محیط کشت بر میزان تولید ترکیب ضدقارچ با لحاظ کردن دمای بهینه و بهترین زمان به‌دست آمده در مرحله قبل، pH محیط کشت در سه pH ۵/۵، ۷ و ۸/۵ تنظیم شد و اثر ضدقارچی عصاره رویی مشابه روش بهینه‌سازی دما اندازه‌گیری شد [۲۲،۲۱].

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-28]

باتوجه به اینکه منبع کربن و نیتروژن از عوامل تأثیرگذار در تولید ترکیب ضدقارچ می‌باشد، بهینه سازی این منابع با در نظر گرفتن دما و pH بهینه به‌دست آمده از مراحل قبل انجام شد. بنابراین، جهت تعیین بهترین منبع کربن در این مرحله، به‌جای افزودن گلوکز به محیط کشت انتخابی، منابع کربن مختلف از جمله ساکاروز و مانیتول به‌میزان یک درصد اضافه گردید و اثر ضدقارچی آن مشابه روش بهینه‌سازی دما اندازه‌گیری شد [۲۲]. جهت تعیین بهترین منبع نیتروژن نیز به‌جای افزودن تریپتون به محیط کشت انتخابی، منابع نیتروژن آلی و معدنی شامل اوره، سولفات آمونیوم و نیترات سدیم استفاده شد و اثر ضدقارچی آن‌ها ارزیابی گردید [۲۲]. درنهایت، به‌منظور شناسایی بهترین حلال جهت استخراج ترکیب ضدقارچی، مایع رویی دارای اثر ضدقارچی در جدایه منتخب به‌کمک طیف وسیعی از حلال‌ها شامل اتیل استات (۹۹/۵ درصد)، متانول (۹۹/۹۹ درصد)، اتانول (۹۹/۶ درصد)، بوتانول (۹۹/۶ درصد)، کلروفرم (۹۹/۴-۹۹ درصد)، DMSO و کلروفرم/متانول (۲ : ۱) مورد استخراج قرار گرفت و اثر حلال بر قدرت ضد قارچی عصاره بررسی شد [۲۳،۱۸].

نتایج

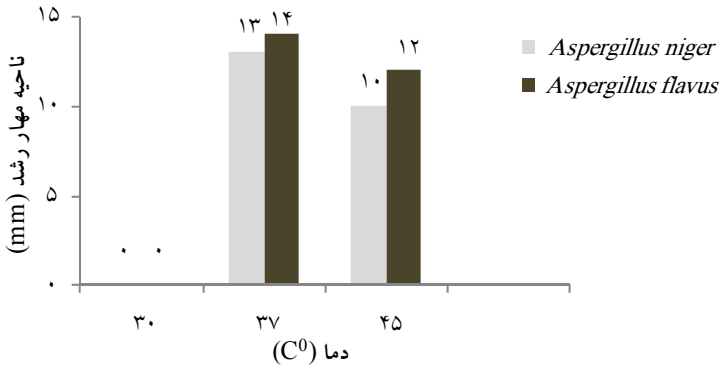
در غربال‌گری اولیه ۶ گونه باسیلوس از خاک منطقه زنبوردار جداسازی شد و بررسی اثر ضدقارچی آنها نشان داد که نیمی از جدایه‌ها دارای اثر ضدقارچی هستند؛ از این بین جدایه SB_{15} دارای تفاوت اثر قابل ملاحظه‌ای در مقایسه با سایر جدایه‌ها بود. از داروهای ضدقارچ استاندارد نیز برای کنترل و مقایسه استفاده شد (جدول شماره ۱). شاخص‌های MIC و MFC برای ترکیب ضدقارچی تولیدی توسط جدایه SB_{15} علیه *A. niger* PTCC5013 به‌ترتیب برابر ۲ و ۴ و علیه *A. flavus* PTCC5004 ۴ و ۱۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌دست آمد. نتایج سوزنیکاسیون نشان داد که اثر ضدقارچی جدایه SB_{15} قبل و بعد از سونیکه کردن تغییری در اندازه هاله عدم رشد ایجاد نمی‌کند. بنابراین، تمامی ترکیب ضدقارچ تولیدی توسط این باکتری ترشحی است و به محیط خارج سلولی منتقل شده که از این نظر مزیت محسوب می‌شود. به‌منظور بهینه‌سازی شرایط رشد، منحنی رشد جدایه SB_{15} به‌ترتیب در دمای ۳۰، ۳۷ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد رسم شد. دمای بهینه رشد این جدایه دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌دست آمد که پس از ۲۸ ساعت در این دما به حداکثر رشد رسید. منحنی رشد سویه SB_{15} در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در مقادیر pH ۵/۵، ۷ و ۸/۵ نشان داد که این جدایه در هر سه pH اسیدی، خنثی و بازی توانایی رشد دارد، ولی در pH اسیدی رشد بهتری دارد. در بهینه‌سازی دمای اولیه محیط تولید مشخص شد که جدایه SB_{15} علیه قارچ‌های *A. niger* و *A. flavus* در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بیشترین قدرت مهاری را دارد و اثر مهاری آن علیه قارچ *A. flavus* بیشتر از *A. niger* است (شکل شماره ۱- الف). هم‌چنین، نتایج بهینه سازی pH اولیه محیط تولید مشخص کرد که جدایه SB_{15} در دمای بهینه ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ بیشترین تولید ترکیب ضدقارچی و قدرت مهاری را علیه قارچ‌های *A. niger* و *A. flavus* داراست و حداکثر قدرت مهاری را علیه قارچ *A. flavus* ایجاد می‌کند (شکل شماره ۱- ب). زمان بهینه گرم‌خانه‌گذاری برای جدایه SB_{15} مطابق شکل، ۴۸ ساعت است که پس از این مدت بیشترین میزان تولید ترکیب ضدقارچی و اثر مهاری را علیه قارچ *A. flavus* نشان داد (شکل شماره ۱- ج). نتایج بهینه سازی منبع کربن محیط تولید نشان داد که جدایه SB_{15} در حضور هر سه منبع کربن گلوکز، سوکروز و مانیتول توانایی تولید ترکیب ضدقارچی دارد، ولی بیشترین میزان تولید در این جدایه در حضور مانیتول مشاهده شد. در مورد منبع بهینه نیتروژن، بهترین منبع نیتروژن جهت تولید ترکیب ضدقارچ توسط جدایه SB_{15} در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، pH=۷، ۴۸ ساعت انکوباسیون و در حضور مانیتول به‌عنوان منبع کربن، و اوره می‌باشد. نتایج مقاومت دمایی نشان داد که ترکیب ضدقارچ تولید شده در شرایط بهینه (دما، زمان، pH، منبع کربن و منبع نیتروژن) در دماهای مختلف (۴، ۳۰، ۳۷، ۴۵، ۶۵) غیرفعال نمی‌شود، اما پس از قرارگیری در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد غیرفعال می‌شود. هم‌چنین، نتایج مقاومت آنزیمی نشان داد که آنزیم‌های پپسین و پروتئیناز K قادر به غیرفعال کردن ترکیب ضدقارچی تولید شده در جدایه SB_{15} نمی‌باشند. باتوجه به این نتیجه می‌توان بیان کرد که احتمالا ساختار ترکیب ضدقارچی تولید شده غیرپروتئینی بوده و باتوجه به حل شدن آن در آب می‌توان پیش‌بینی نمود که یک بیوسورفاکتانت آمفی‌پاتیک می‌باشد. از بین حلال‌های مورد استفاده، استخراج توسط دو حلال اتیل استات و مخلوط کلروفرم/ متانول موفقیت‌آمیز بود که مخلوط کلروفرم/متانول به‌عنوان بهترین حلال جهت استخراج ترکیب ضد قارچی شناسایی شد. نتیجه شناسایی جدایه SB_{15} بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی و تست‌های تشخیصی بیوشیمیایی نشان داد که این جدایه *باسیلوس سرئوس* می‌باشد. در شناسایی فیلوژنتیکی این جدایه نیز پس از تعیین توالی محصول PCR ژن 16S rRNA و اصلاح آن توسط نرم‌افزار Bioedit، در برنامه BLAST ارزیابی گردید و بر اساس نتایج به‌دست آمده این جدایه تشابه ۱۰۰ درصدی با *Bacillus cereus* داشت که با نتایج شناسایی فنوتیپی نیز مطابقت داشت (شکل شماره ۲).

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-28]

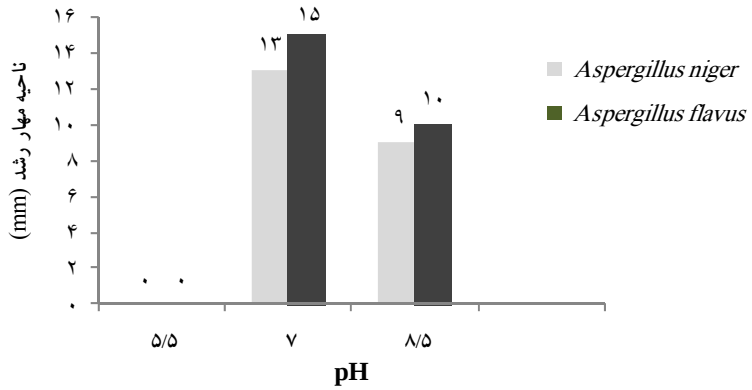
جدول شماره ۱- قدرت مهاری ناشی از جدایه‌ها و داروهای ضد قارچی استاندارد روی چند نمونه قارچ

جدایه قارچ	SB_{12}	SB_{13}	SB_{15}	Miconazol	Fluconazol
Aspergillus terreus	-	-	13*	-	-
Aspergillus niger	-	-	14	-	-
Aspergillus flavus	-	-	10	14	-
Penicillium sp.	14	-	-	-	-
Rhodotorulla sp.	-	-	15	-	-
Fusarium sp.	15	21	16	14	-

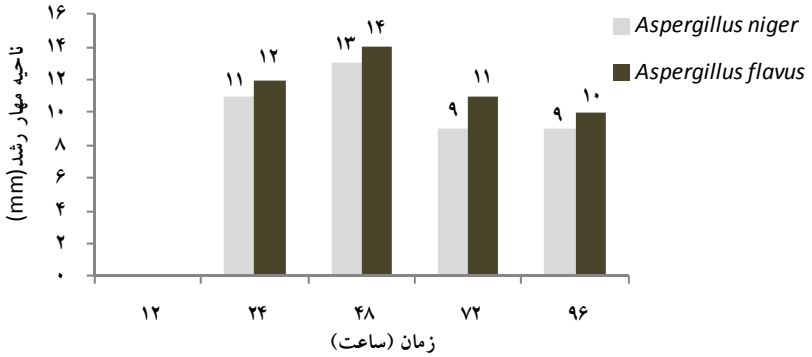
* قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر (دیسک ۶ میلی‌متر)



الف-



ب-

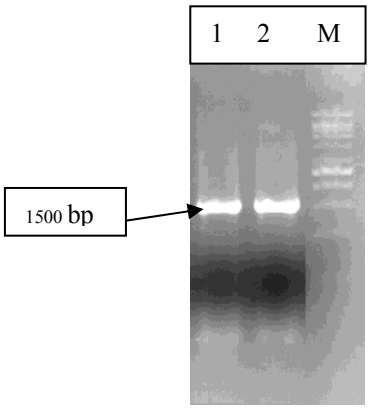


ج-

شکل شماره ۱- میزان تولید آنتی‌بیوتیک توسط جدایه SB_{15} در مقادیر مختلف دما، pH و زمان.

الف- میزان تولید آنتی‌بیوتیک توسط جدایه SB_{15} در دماهای مختلف. ب- میزان تولید آنتی‌بیوتیک توسط جدایه SB_{15}در مقادیر مختلف pH. ج- میزان تولید آنتی‌بیوتیک توسط جدایه SB_{15}در زمان‌های مختلف.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-28]



شکل شماره ۲- الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ایی پلیمراز. M: مارکر وزن مولکولی یک کیلو باز.
۱ و ۲: دو تکرار از PCR ژنوم جدایه SB_{15} با وزن ۱۵۰۰ جفت باز.

بحث

در سال‌های اخیر برای درمان عفونت‌های قارچی مطالعات بسیاری در زمینه یافتن ترکیبات جدید مهار کننده رشد عوامل قارچی صورت گرفته و توجه محققین به بررسی تأثیر میکروارگانیسم‌های مختلف به‌ویژه باکتری‌ها و متابولیت‌های آنها بر رشد قارچ‌ها معطوف گردیده است. برخی از متابولیت‌های موثر در این رابطه از منابع زنده استخراج و مورد شناسایی قرار گرفته‌اند [۲۶-۲۴]. ترکیبات ضدقارچی مختلفی مثل پلی‌پپتیدهای ضد-قارچی با منشاء باکتریایی همانند لیپوپپتید ایتورین A، مایکو-سوبتیلین، باسیلومایسین و فنجایسین دارای فعالیت قوی بر علیه طیف وسیعی از قارچ‌های بیماری‌زا هستند [۲۸،۲۷]. میکرو-ارگانیسم‌های خاک از جمله منابعی هستند که می‌توان جهت استخراج ترکیبات ضدقارچی جدید به آنها اشاره کرد و در این میان گونه‌های باسیلوس کاربرد وسیعی دارند [۱۰]. در نتیجه این پژوهش ۶ گونه باسیلوس جداسازی شد که نیمی از آنها دارای اثر ضدقارچی بودند و جدایه SB_{15} که مشابهت ۱۰۰ درصدی با *باسیلوس سرئوس* داشت دارای اثر ضدقارچی قابل ملاحظه‌ای بود. در پژوهشی مشابه با مطالعه حاضر *باسیلوس سرئوس* از خاک‌های شور در جنوب تونس جداسازی شد که توانایی تولید ترکیب ضدقارچی و مهار رشد قارچ‌ها از جمله فوزاریوم را نشان داد [۲۹]. در پژوهش ما هم از زیستگاه گرم و خاک شور مشابه شرایط زیستگاه استفاده شده در تحقیق مذکور باکتری مشابه با توان تولید ترکیب ضدقارچی جداسازی شده است. این یافته‌ها این فرضیه که زیستگاه‌های دارای خصوصیات ویژه برای غربال-گری سویه‌های خاص مناسب هستند، را تایید می‌کند. بسیاری از گونه‌های باسیلوس مثل *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس سابتیلیس* و *باسیلوس مایکوئیدز* شناخته شده‌اند که قادر به مهار قارچ‌های بیماری‌زا مثل ریزوکتونیا، اسکلروتنیا، فوزاریوم و پیتیوم می‌باشند که نقش مهمی در کنترل زیستی بیماری‌زاهای گیاهان دارند [۲۹]. در سایر مطالعات عوامل زیر به‌عنوان عوامل مولد ترکیب ضدقارچ شناسایی و معرفی شده‌اند: مهار *رایزوکتونیا سولانی* توسط *باسیلوس سابتیلیس* NCD-2 [۵]، مهار *آسپرژیلوس فلاووس* توسط *باسیلوس سابتیلیس* AU195 [۲۵]، مهار گونه فوزاریوم توسط *باسیلوس سرئوس* [۲۹]، مهار رشد *آسپرژیلوس کربوناریوس* [۳۰]، *آسپرژیلوس فلاووس* [۳۳،۲۳-۳۱]، *فوزاریوم مونیلی‌فرم* [۳۴]، و *بایسوکلامیس فولوا* H25 [۳۵] توسط *باسیلوس سابتیلیس*، مهار قارچ فوزاریوم توسط *باسیلوس آمیلولیکوئی فاشینس* AS 43.3 [۳۶]، و *باسیلوس پومیلوس* SQR-N43 [۳۷]، مهار گونه پنی‌سیلیوم توسط *باسیلوس آمیلولیکوئی فاشینس* *PPCB004* [۲۷]، و مهار گونه فوزاریوم توسط *پائنی باسیلوس پلی‌میکسا* *PKB1* [۳۸]. بیوسنتز آنتی‌بیوتیک توسط باسیلوس‌ها تحت تأثیر شرایط فیزیکی و شیمیایی محیط کشت مانند دما، زمان انکوباسیون، pH، منبع کربن و منبع نیتروژن می‌باشد و برای تولید آنتی‌بیوتیک لازم است این شرایط بهینه شوند. بیشترین میزان تولید ترکیب ضدقارچی در این جدایه در pH خنثی، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و بعد از ۴۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری دیده شد. به‌طور مشابه Zhao و همکاران بهترین شرایط فعالیت پپتیدهای ضد-قارچی جداشده از باسیلوس BH072 را دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد و pH=۷/۴ گزارش کرده‌اند [۱۰]. در برخی مطالعات مشابه هم pH=۷ به‌عنوان pH مناسب تولید ترکیب ضدقارچی گزارش شده است [۴۰،۳۹]. فعالیت بهینه ترکیب ضدقارچی در pH محدوده خنثی از این نظر حائز اهمیت است که بهترین فعالیت را در شرایط بدن موجود زنده می‌توانند داشته باشند و بیشترین اثر ضدقارچی در این حالت محقق می‌شود. ازآنجایی‌که آنتی‌بیوتیک جزء متابولیت‌های ثانویه محسوب می‌شود، در ساعات اولیه بعد از انکوباسیون تولید دیده نشد و از روز سوم به بعد نیز تولید کاهش یافت که این کاهش به‌دلیل تولید متابولیت‌های سمی و ورود به فاز مرگ می‌باشد. طی پژوهش‌هایی که انجام شده محیط کشت-های مختلفی برای تولید آنتی‌بیوتیک استفاده شده است. در پژوهش حاضر نیز محیط‌های مختلفی مثل NB، TSB، LB، و MHB استفاده شد، اما بیشترین میزان تولید در محیط کشت TSB دیده شد که مطابق با نتایج به‌دست آمده در مطالعه Kumar و همکاران (۲۰۰۹) است [۱۸]، ولی در مطالعه Moshafi و همکاران (۲۰۱۱) محیط LB طی غربال‌گری میکروارگانیسم‌های

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-28]

مولد ترکیبات ضدقارچی بهترین محیط برای تولید گزارش شده است [۴۱]. دلیل این تفاوت می‌تواند مربوط به ترکیب شیمیایی محیط کشت و ساختار ترکیب ضدقارچی باشد و در محیطی که اجزاء سازنده جهت سنتز ترکیب ضدقارچی فراهم باشد، بیشترین میزان تولید به‌دست خواهد آمد. به‌طور کلی در باسیلوس‌ها زمان تولید ترکیب ضدقارچی ۲۴ تا ۷۲ ساعت بعد از انکوباسیون می‌باشد که مناسب‌ترین زمان بستگی به گونه باسیلوس دارد؛ چراکه گونه‌های مختلف مسیرهای متابولیکی متفاوتی دارند [۲۲]. در مطالعه حاضر بیشترین تولید ترکیب ضد قارچی در حضور مانیتول به‌عنوان منبع کربن و اوره به‌عنوان منبع نیتروژن دیده شد. در تحقیق Al-Ajlani و همکاران (۲۰۰۷) ساکارز به‌عنوان منبع کربن موجب افزایش سورفاکتین تولید شده توسط *B. subtilis* MZ-7 شناخته شد [۴۲] و در پژوهشی دیگر مشخص شد که گلوکز موجب تحریک و افزایش تولید Lichenysin توسط *Bacillus lichenformis* می‌شود [۴۳]. تفاوت در مسیرهای متابولیسم قند در باکتری‌ها مهمترین عاملی است که بر میزان مصرف آن تاثیرگذار است و ازاین‌رو در مطالعات مختلف که جدایه‌های متفاوتی به‌دست آمده‌اند منابع قندی متفاوتی به‌عنوان منبع بهینه کربن گزارش شده است. هم‌چنین، مسیرهای متفاوت جذب قند در باکتری‌ها بر این نتایج بهینه‌سازی تاثیرگذار است. طبق نتایج به‌دست آمده در پژوهش حاضر ترکیب ضدقارچی تولید شده پس از تیمار دمایی فعالیت خود را از دست نداد. در تحقیق Sadfi و همکاران ترکیب ضدقارچی تولید شده توسط *باسیلوس سرئوس* جدا شده از خاک شور پس از قرارگیری در دماهای مختلف (۴، ۳۰، ۳۷، ۴۵ و ۶۵ درجه سانتی‌گراد) فعالیت خود را از دست نداد، اما پس از قرارگیری در دمای ۱۰۰ یا ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد غیرفعال شد [۲۹]. این نتایج در توافق با نتایج تحقیق حاضر می‌باشد. ترکیب ضدقارچی تولید شده در جدایه SB_{15} به آنزیم‌های پروتئازی مقاوم بود و ازآنجایی‌که پودر به‌دست آمده از خالص‌سازی ترکیب ضدقارچی در آب حل شد، می‌توان بیان کرد که احتمالاً یک بیوسورفاکتانت آمفی‌پاتیک می‌باشد. مشابه این نتایج نیز پس از جداسازی گونه‌های مختلف باسیلوس با فعالیت ضدقارچی توسط Moshafi و همکاران به‌دست آمده است و بیان شده که ترکیب ضدقارچی تولید شده تحت تأثیر پروتئازهایی مثل تریپسین و پروتئیناز K فعالیت خود را از دست نمی‌دهد [۴۱].

نتیجه‌گیری

نتایج اولیه این مطالعه نشان داد که ترکیبات تولید شده توسط *Bacillus cereus* strain SB_{15} اثر بالقوه ضدقارچی نشان می‌دهد. این جدایه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ بیشترین میزان تولید ترکیب ضدقارچی را دارد و ترکیب ضدقارچی تولید شده در این جدایه تماماً خارج سلولی و مقاوم به پروتئازها می‌باشد. این باکتری باتوجه به اینکه از زیستگاه گرم خوزستان جدا شده است، مقاومت محیطی بالایی دارد و ازاین‌رو برای اهداف تولید انبوه و تجاری ترکیب ضدقارچ مناسب می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله نویسندگان مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به‌دلیل تامین منابع مالی انجام این تحقیق از محل پژوهانه شماره ۲۷۱۷۱ و نیز اعتبار پایان نامه کارشناسی ارشد تقدیر و تشکر می‌نمایند.

References:

[1] Ranjbariyan A, Shams-Ghahfarokhi M, Kalantari S, Razzaghi-Abyaneh M. Molecular identification of antagonistic bacteria from Tehran soil and evaluation of their inhibitory activities toward pathogenic fungi. ***Iran J Microbiol*** 2011; 3(3): 140-6.

[2] Kantarcioglu AS, Yucel A. The presence of fluconazole-resistant *Candida dubliniensis* strain among *Candida albicans* isolated from immunocompromised or otherwise debilitated HIV-negative Turkish patients. ***Rev Iberoam Micol*** 2002; 19(1): 44-8.

[3] Vaezi A, Haghani I, Davoudi MM, Mousavi B, Ansari S, Noshak MA, et al. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* Isolates. ***J Mazandaran Univ Med Sci*** 2013; 23(103): 120-37. [in Persian]

[4] Moshafi MH, Forootanfar H, Ameri A, Ameri A, Shakibaie M, Dehghan-Noudeh G, et al. Antimicrobial activity of *Bacillus sp*. Strain FAS isolated from soil. ***Pak J Pharm Sci*** 2011; 24(3): 269-75.

[5] Guo Q, Dong W, Li Sh, Lu Z, Wang P, Zhang X, et al. Fengycin produced by *Bacillus subtilis NCD-2* plays a major role in biocontrol of cotton seedling damping-off disease. ***Microbiol Res*** 2014; 169(7): 533-40.

[6] Kathiravan MK, Salake AB, Chothe AS, Dudhe PB, Watode RP, Mukta MS, et al. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. ***Bioorg Med Chem*** 2012; 20(19): 5678–98.

[7] Handelsman J, Stabb EV. Biocontrol of soilborne plant pathogens. ***Plant Cell*** 1996; 8(10): 1855-69.

[8] Jankiewicz U, Kuzawinska O. Purification and partial characterization of pyoverdine synthesized by *Pseudomonas putida*. ***E J P A U*** 2009; 12(1):11.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-28]

[9] Fiddaman PJ, Rossall S. The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. ***J Appl Microbiol*** 1993; 74(2): 119- 126.
[10] Zhao X, Zhou Z, Han Y, Wang Z, Fan J, Xiao H. Isolation and identification of antifungal peptides from *Bacillus* BH072 a novel bacterium isolated from honey. ***Microbiol Res*** 2013; 168(9): 598-606.
[11] Yuan J, Raza W, Huang Q, Shen Q. The ultrasound-assisted extraction and identification of antifungal substances from *B. amyloliquefaciens* strain NJN-6 suppressing *Fusarium oxysporum*. ***J Basic Microbiol*** 2012; 52(6): 721-30.
[12] Cochrane SA, Vederas JC. Lipopeptides from Bacillus and Paenibacillus spp.: A Gold Mine of Antibiotic Candidates. ***Med Res Rev*** 2016; 36(1): 4-31.
[13] Garrity G, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JR. Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed. Vol 2. Part B. Springer; 2005.
[14] Ausubel FM, Brent R, Kingstone RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, et al. Short protocols in molecular biology. 2nd ed. New York: John wiley and Sons; 1992.
[15] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. ***J Bacteriol*** 1991; 173(2): 697-703.
[16] Darabpour E, Roayaei Ardakani M, Motamedi H, Ronagh M. Isolation of a potent antibiotic producer bacterium, especially against MRSA, from northern region of the Persian Gulf. ***Bosn J Basic Med Sci*** 2012; 12(2): 108- 21.
[17] Song M, Yun HY, Kim YH. Antagonistic Bacillus species as a biological control of ginseng root rot caused by *Fusarium cf. incarnatum*. ***J Ginseng Res*** 2014; 38(2): 136-45.
[18] Kumar A, Pragati S, Shrivastava JN. Production of peptide antifungal antibiotic and biocontrol activity of *Bacillus subtilis*. ***Indian J Exp Biol*** 2009; 47(1): 57-62.
[19] Zhao Z, Wang Q, Wang K, Brian K, Liu C, Gu Y. Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis ZZ185* in vitro and identification of its antifungal components. ***Bioresour Technol*** 2010; 101(1): 292-7.
[20] Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; approved standard-third edition. CLSI document M27-A3.Wayne, PA. 2008; 28(14).
[21] Muhammad SA, Ahmad S, Hameed A. Report: antibiotic production by thermophilic Bacillus specie SAT-4. ***Pak J Pharm Sci*** 2009; 22(3): 339-45.
[22] Oyedele AO, Ogunbanwo TS. Antifungal activities of *Bacillus subtilis* isolated from some condiments and soil. ***Afr J Microbiol Res*** 2014; 8(18): 1841-9.
[23] Afsharmanesh H, Ahmadzadeh M, Javan-Nikkhah M, Behboudi K. Improvement in biocontrol activity *of Bacillus subtilis UTB1* against *Aspergillus flavus* using gamma-irradiation. ***Crop Protection*** 2014; 60(1): 83-92.
[24] Deleu M, Paquot M, Nylander T. Effect of fengycin, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, on model biomembranes. ***Biophys J*** 2008; 94(7): 2667-79.
[25] Moyne AL, Shelby R, Cleveland TE, Tuzun S. Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. ***J Appl Microbiol*** 2001; 90(4): 622-9.
[26] Torsvik V, Goksøyr J, Daae FL. High diversity in DNA of soil bacteria. ***Appl Environ Microbiol*** 1990; 56(3): 782-7.
[27] Arrebola E, Sivakumar D, Bacigalupo R, Korsten L. Combined application of antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* and essential oils for the control of peach postharvest diseases. ***Crop Protetion*** 2010; 29(4): 369-77.
[28] Yánez-Mendizábal V, Zeriouh H, Viñas I, Torres R, Usall J, de Vicente A, et al. Biological control of peach brown rot (Monilinia spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides. ***Eur J Plant Pathol*** 2012; 132(4): 609-19.
[29] Sadfi N, Cherif M, Hajlaoui MR, Boudabbous A, Belanger R. Isolation and partial purification of antifungal metabolites produced by Bacillus cereus. ***Ann Microbiol*** 2002; 52(3): 323-37.
[30] Chunmei J, Junling SH, Yanlin L, Chengyong ZH. Inhibition of *Aspergillus carbonarius* and fungal contamination in table grapes using *Bacillus subtilis*. ***Food Control*** 2014; 35(1): 41-8.
[31] Senthil R, Prabakar K, Rajendran L, Karthikeyan G. Efficacy of different biological control agents against major postharvest pathogens of grapes under room temperature storage conditions. ***Phytopathol Mediterr*** 2011; 50(1): 55-65.
[32] Abeer H, Abd-Allah EF, Al-Obeed RS, Mridha MAU, Al-Huqail AA. Non-chemical strategies to control postharvest losses and extend the shelf life of table grape fruits. ***Biol Agri Horticulture*** 2013; 29(2): 82-90.
[33] Gong Q, Zhang Ch, Lu F, Zhao H, Bie X, Lu Zh. Identification of bacillomycin D from *Bacillus subtilis fmbJ* and its inhibition effects against *Aspergillus flavus*. ***Food Control*** 2014; 36(1): 8-14.
[34] Hu LB, Shi ZQ, Zhang T, Yang ZM. Fengycin antibiotics isolated from B-FS01 culture inhibit the growth of *fusariummoniliforme* Sheldon ATCC 38932. ***FEMS Microbiological Lett*** 2007; 272(1): 91-8.
[35] Lee H, Churey JJ, Worobo RW. Purification and structural characterization of bacillomycin F produced by a bacterial honey isolate active against *Byssochlamys fulva H25*. ***J Appl Microbiol*** 2008; 105(3): 663-73.
[36] Dunlap CA, Bowman MJ, Schisler DA. Genomic analysis and secondary metabolite

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-28]

production in*Bacillus amyloliquefaciens*AS 43.3: A biocontrol antagonist of Fusarium head blight. ***Biological Control*** 2013; 64(2): 166-75.
[37] Huang X, Zhang N, Yong X, Yang XY, Shen QR. Biocontrol of Rhizoctoniasolani damping-off disease in cucumber with *Bacillus pumilus* SQR-N43. ***Microbiol Res*** 2012; 167(3): 135-43.
[38] Li J, Jensen SE. Nonribosomal biosynthesis of fusaricidins by Paenibacillus polymyxa PKB1 involves direct activation of a D-amino acid. ***Chem Biol*** 2008; 15(2): 118-27.
[39] Gong M, Wang JD, Zhang J, Yang H, LU XF, Pei Y, et al. Study of the antifungal ability of *Bacillus subtilis* Strain PY-1 in Vitro and identification of its antifungal substance (Iturin A). ***Acta Biochimit Biophys Sin*** 2006; 38(4): 233-40.
[40] Kalpana S, Bagudo AI, Aliero AA. Effect of inhibitory spectrum and physical conditions on the production of antibiotic substance from *Bacillus laterosporus* ST-1. ***Niger J Microbiol*** 2010; 24(1): 2134-9.
[41] Moshafi MH, Forootanfar H, Ameri A, Shakibaie M, Dehghan-Noudeh GH, Razavi M. Antimicrobial activity of *Bacillus sp*. Strain FAS isolated from soil. ***Pak J Pharm Sci*** 2011; 24(3): 269-75.
[42] Al-Ajlani MM, Sheikh MA, Ahmad Z, Hasnain S. Production of surfactin from *Bacillus subtilis* MZ-7 grown on pharmamedia commercial medium. ***Microb Cell Fact*** 2007; 6(1): 17-25.
[43] Joshi S, Yadav S, Desai AJ. Application of response-surface methodology to evaluate the optimum medium components for the enhanced production of lichenysin by *Bacillus licheniformis* R2. ***Biochem Eng J*** 2008; 41(2): 122-7.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-28]