ارزیابی فعالیت ضد قارچی باکتری باسیلوس سوبتیلیس در مقابل قارچ‌های بیماری‌زا

حمیده بابایی[1]، معصومه شمس قهفرخی[2]، مریم سرلک[3]، محبوبه مدنی[4]، مهدی رزاقی ابیانه[5]

۱. کارشناس‌ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، دانشکده علوم پایه، اصفهان، ایران

۲. دانشیار، گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، تهران، ایران

۳.کارشناس‌ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، اصفهان، ایران

۴. استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، دانشکده علوم پایه، اصفهان، ایران

۵. دانشیار،گروه قارچ شناسی پزشکی،انیستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

مندیش/ دوره چهارم/ شماره ۶ و ۷/ زمستان ۱۳۹۲

چکیده

زمینه و هدف: در سال‌های اخیر، عوامل کنترل‌کننده بیولوژیک، به منظور کاهش بیماری‌های قارچی در انسان مورد استفاده قرار می‌گیرند که در این میان می‌توان به باکتری‌های غیر پاتوژن از جمله باسیلوس سوبتیلیس به علت توانایی بالقوه در تولید ترکیبات مهارکننده قارچ‌ها اشاره کرد. هدف از این مطالعه ارزیابی فعالیت ضد قارچی از فیلترای باسیلوس سوبتیلیس در برابر قارچ‌های بیماری‌زاست.

مواد و روش‌ها: تعداد پنجاه نمونه خاک زراعی از مناطق مختلف استان تهران جمع‌آوری شد و برای جداسازی باسیلوس سوبتیلیس به روی محیط کشت GYA کشت داده شد. باکتری‌های جدا شده به منظور توانایی مهار رشد قارچ‌ها در محیط کشت GYA و با استفاده از آزمون کشت متقابل و به صورت چشمی ارزیابی شدند سپس از فیلترای کشت باکتری که بیشترین فعالیت آنتاگونیستی را در مقابل قارچ‌ها نشان داده بود رقت‌های سریالی تهیه شد و فعالیت آنتاگونیستی آن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل با استفاده از نرم‌افزار SPSS آنالیز گردید.

یافته‌ها: در مجموع از ۵۰ نمونه خاک جمع‌آوری شده ۳۸ نمونه حاوی باسیلوس سوبتیلیس بود که فیلترای کشت آن قادر به مهار رشد بیش از ۵۰ درصدی قارچ‌های مورد نظر بود. نتایج نشان داد که اختلاف معنادار آماری میان مقدار مهار رشد حاصل از قارچ در مقایسه با گروه کنترل وجود دارد ($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان می‌دهد باکتری باسیلوس سوبتیلیس با تولید ترکیبات ضد قارچی، می‌تواند ابزار مناسبی برای کنترل زیستی قارچ‌ها در طبیعت باشد.

واژه‌های کلیدی: باکتری باسیلوس سوبتیلیس، قارچ‌های بیماری‌زا، فعالیت آنتاگونیستی، فیلترای کشت باکتری

آدرس مکاتبه: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین (پیشوا)

پست الکترونیکی: hamidehbabaei @yahoo.com

Downloaded from ndhj.lums.ac.ir at 22:20 +0330 on Friday September 22nd 2017

Downloaded from ndhj.lums.ac.ir at 22:20 +0330 on Friday September 22nd 2017

مقدمه

افزایش شیوع عفونت های قارچی در سال‌های اخیر با توجه به محدودیت در استفاده وسیع از داروهای ضد قارچی به دلیل اثرات جانبی شدید آن‌ها در انسان، همچنین پیدایش مقاومت میکروبی نسبت به آن‌ها، توجه محققین را به بررسی نقش انواع باکتری‌های غیر بیماری‌زا در کنترل و درمان عفونت‌های قارچی معطوف کرده است (۱و۲). روش‌های مختلفی به منظور کنترل و درمان بیماری‌های قارچی و همچنین کنترل حضور عوامل قارچی در اغذیه انسانی و حیوانی به کار گرفته شده است که متأسفانه به دلیل عوارض جانبی ناشی از برخی از آن‌ها در انسان و حیوانات، استفاده از این روش‌ها بسیار محدود شده است (۲،۳و۴). در همین راستا، به‌ویژه در سال‌های اخیر اساس اکثر مطالعات انجام گرفته در این زمینه بر یافتن ترکیبات مهارکننده رشد عوامل قارچی استوار بوده است و توجه محققین به بررسی تأثیر میکرو ارگانیسم‌های مختلف به‌ویژه باکتری‌های غیر بیماری‌زا بر رشد قارچ‌ها و متابولیت‌های تولید شده توسط آن‌ها معطوف شده است و برخی از متابولیت‌های مؤثر در این رابطه از منابع زنده استخراج و مورد شناسایی قرار گرفته‌اند (۴،۵ و۶). این باکتری‌ها می‌توانند به عنوان کاندیدهای مناسبی در کنترل قارچ‌های بیماری‌زا مورد توجه قرار گیرند. هدف از این تحقیق بررسی خاصیت آنتاگونیستی باکتری غیر بیماری‌زای باسیلوس سوبتیلیس بر علیه قارچ‌های بیماری‌زای انسانی نظیر Aspergillus niger، Aspergillus flavus، Trichophyton mentagrophytes و Microsporum canis است.

باسیلوس‌ها، باکتری‌های گرم مثبت، میله‌ای شکل و اغلب متحرک هستند. این باسیل‌ها می‌توانند از نوع هوازی مطلق یا بی‌هوازی مطلق و یا هر دو باشند. این باکتری‌ها در اثر تخمیر گلوکز می‌توانند محصولاتی مانند اتانول، گاز هیدروژن، استن، اسیدهای استیک، فورمی، لاکتیک و سوکسینیک را تولید کنند. برخی از گونه‌های باسیلوس قادر به تولید آنتی‌بیوتیک می‌باشند. تا کنون ترکیبات متنوعی با خاصیت مهار قارچ‌ها از انواع باسیلوس‌ها گزارش شده است. یک گونه از این جنس متعلق به باسیلوس سوبتیلیس است که قادر به تولید ترکیبات قدرتمندی علیه قارچ‌ها می‌باشند. از جمله این ترکیبات می‌توان به ایتورین A اشاره نمود (۷و۸). این ترکیب یک لیپوپپتید حلقوی می‌باشد که بر رشد قارچ‌ها اثر مهاری دارد و در عین حال اثرات سمی کمی بر روی انسان دارد و به همین علت در درمان عفونت‌های قارچی انسان و حیوان کاربرد دارد. فعالیت زیستی ایتورین‌ها وابسته به طول زنجیره لیپیدی آن است. هرچه این زنجیره بلندتر باشد ترکیب مورد نظر فعالیت ضد قارچی بیشتری از خود نشان می‌دهد (۹). ترکیبی تحت عنوان باسیلوپپتین که از این باکتری به دست می‌آید از خانواده ضد قارچ‌های ایتورین است که ساختار آن نیز لیپوپپتید حلقوی می‌باشد (۱۰). از ترکیب دیگری که از این نوع باسیلوس به دست می‌آید می‌توان به فنجایسین اشاره نمود که بر علیه قارچ‌ها قدرت مهاری دارد و فعالیت آنتاگونیستی آن به علت فسفولیپیدها و استرول‌ها و همچنین اولئیک اسید موجود در آن می‌باشد که دو اسید چرب غیر اشباع موجود در آن خاصیت ضد قارچی باسیلوس را افزایش می‌دهد (۱۱و۱۲). این نوع از باسیلوس‌ها به عنوان یک کنترل‌کننده بیولوژیک بر علیه قارچ‌های پاتوژن کاربرد دارند (۱۳). بررسی بر روی متابولیت‌های ضد قارچی گونه‌های باسیلوس نشان می‌دهد که این متابولیت‌ها در برابر دما و تغییرات PH مقاوم بوده و اثر ضد قارچی خود را از دست نمی‌دهند (۱۴و۱۵). در تحقیق حاضر میزان فعالیت ضد قارچی فیلترای کشت باکتری باسیلوس سوبتیلیس بر علیه قارچ‌های پاتوژن Aspergillus niger، Aspergillus flavus، Trichophyton mentagrophytes و Microsporum canis مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

باکتری باسیلوس سوبتیلیس مورد استفاده در تحقیق حاضر از نمونه خاک‌های زراعی جداسازی شد. تعداد ۵۰ نمونه خاک زراعی از مناطق مختلف استان‌های تهران جمع‌آوری گردید. سپس جهت تهیه سوسپانسیون از نمونه‌های خاک ابتدا مقدار ۰/۰۵ درصد، توئین ۸۰ در آب مقطر به هر نمونه خاک افزوده شده و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شد و در دور ۲۰۰۰ برای ۲ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس سوسپانسیون حاصل را در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری استریل درب‌دار ریخته و

Downloaded from ndhj.lums.ac.ir at 22:20 +0330 on Friday September 22nd 2017

مجدد بر اساس شماره‌های نمونه خاک مورد نظر شماره‌گذاری شدند و به منظور جداسازی باکتری باسیلوس سوبتیلیس سوسپانسیون خاک در محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس از هر باکتری کلونی خالص تهیه نموده و پس از انجام رنگ‌آمیزی، باکتری‌های گرم مثبت جداسازی شدند و با تست‌های بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفتند.

در این تحقیق، قارچ‌های بیماری‌زای انسانی جداشده از بیماران، در انیستیتو پاستور ایران بخش قارچ‌شناسی مورد مطالعه قرار گرفتند که شامل چهارگونه قارچ‌های A. niger، A. flavus، T.mentagrophytes و M. canis بودند. به منظور تهیه حجم تلقیح در ابتدا قارچ‌های مورد بررسی در لوله‌های حاوی محیط سابورو دکستروز آگار کشت داده شد. کشت قارچ‌ها به مدت ۱۰-۷ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت تهیه سوسپانسیون اسپور، پس از مشاهده رشد مناسب عوامل قارچی، ابتدا میزان ۵ میلی‌لیتر آب مقطر حاوی ۰/۱ درصد توئین ۸۰ استریل به لوله اضافه گردید و با استفاده از لوله‌ی شیشه‌ای توپر استریل اسپورهای سطح کلونی قارچ‌ها جمع‌آوری گردید و در لوله‌های ۱۵ میلی‌لیتری استریل منتقل شد و میزان حجم تلقیح اسپور قارچ به صورت میکروسکوپیک و توسط هماسیتومتری تعیین گردید.

جهت بررسی اثرات ضد قارچی باکتری‌های انتخاب شده، از روش بررسی چشمی (Visual agar plate assay) بر روی محیط جامد گلوکز عصاره مخمر آگار (GY) استفاده شد. در طول این آزمون همواره خواص یک آنتاگونیست خوب را در نظر گرفته، بدین جهت آزمون کشت متقابل انجام پذیرفت. در این آزمون سوسپانسیون هر نمونه قارچی در وسط یک پتری دیش ۹ سانتی‌متری حاوی محیط GY به صورت خطی کشت داده شد به طوری که ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون‌های قارچی به طور جداگانه در مرکز پلیت به صورت یک خط تلقیح شدند و یک لوپ کلونی از باکتری‌های آنتاگونیست انتخاب شده به طور جداگانه و به فاصله ۳ سانتی‌متری از طرفین خط تلقیح در مرکز پلیت و به صورت موازی کشت داده شدند و به منظور اطمینان از خاصیت آنتاگونیستی باکتری‌ها پلیت‌های کشت یافته به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

بعد از مدت زمان نگهداری باکتری‌های دارای فعالیت ضد قارچی با توجه به میزان رشد نمونه شاهد بررسی شدند و از میان آن‌ها باکتری باسیلوس سوبتیلیس که با بررسی چشمی بیشترین مهار را نشان داده بود جهت مرحله بعدی مورد آزمایش قرار گرفت. به منظور بررسی میزان فعالیت آنتاگونیستی، فیلترای کشت باکتری باسیلوس سوبتیلیس، ابتدا یک لوپ از باکتری برداشت شده و به پلیت حاوی محیط جامد گلوکز عصاره مخمر (GY) منتقل شد سپس کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. سپس یک لوپ از کلونی باکتری به ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط GY براث منتقل شد و ارلن به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در شرایط متحرک ۱۵۰ rpm قرار گرفت. پس از مدت زمان انکوباسیون، محیط حاوی باکتری در ۱۰۰۰۰×g به مدت ۴۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید تا محیط کشت از باکتری جدا شود. مایع رویی (فیلترای کشت) به وسیله فیلترهای سرنگی با سایز ۰/۲ میکرومتر استریل گردید. سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر از فیلترای کشت باکتری مهارکننده رشد قارچ‌ها در داخل یک ارلن استریل خالی، منتقل شد و به میزان ۲ گرم گلوکز و ۰/۵ گرم عصاره مخمر جهت غنی‌سازی فیلترای باکتری به آن افزوده شد و توسط فیلتر سرنگی در داخل ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری فیلتر گردید. سپس از فیلترای کشت باکتری رقت‌های ۱/۵، ۱/۱۰، ۱/۲۰، ۱/۴۰، ۱/۸۰ و ۱/۱۶۰ و یک نمونه از فیلترای خالص (رقیق نشده است) تهیه شد و از نظر میزان فعالیت ضد قارچی، مورد بررسی قرار گرفت. میزان ۳ میلی‌لیتر از مایع فیلترای کشت نمونه باکتری به طور سه تایی در گوده‌های پلیت‌های ۱۲ خانه‌ای کشت سلولی حاوی محیط کشت GY براث منتقل شد. جهت بررسی میزان رشد قارچ‌ها به عنوان کنترل، از محیط کشت GY براث به میزان ۲ میلی‌لیتر به صورت سه‌تایی استفاده شد. سپس به هر گروه از پلیت‌های مورد نظر میزان معینی از اسپور قارچی که برای قارچ‌های A.niger و A.flavus ۵۰ میکرولیتر و برای قارچ‌های

Downloaded from ndhj.lums.ac.ir at 22:20 +0330 on Friday September 22nd 2017

M.canis و T.menta ۷۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد، تلقیح گردید و پلیت‌ها به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و پس از اتمام دوره انکوباسیون، توده قارچی از محیط کشت جداسازی و برای محاسبه میزان مهار رشد قارچ، به مدت ۳ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا در این دما به تدریج و بدون آنکه نمونه‌های قارچی بسوزد خشک شوند و در نهایت وزن خشک آن‌ها محاسبه گردید (۱۶).

یافته‌ها

در مجموع از ۵۰ نمونه خاک مورد بررسی در محیط جامد گلوکز عصاره مخمر، ۳۸ نمونه. باسیلوس سوبتیلیس جدا شد. ۳۸ ایزوله باکتری باسیلوس سوبتیلیس که قادر به مهار رشد بالای قارچ‌ها بودند توسط روش‌های فیزیولوژیک مورد شناسایی قرار گرفتند. نامگذاری باکتری‌ها بر اساس کتاب Bergey تحت عنوان سیستماتیک و تشخیص و طبقه‌بندی باکتری‌ها انجام شد. فیلترای کشت باسیلوس سوبتیلیس مطابق با نمودار ۱ و با توجه به کاهش وزن خشک قارچ‌ها که در نتیجه رشد کم‌تر قارچ‌های مورد بررسی در مقابل فیلترای کشت باکتری آنتاگونیست بود نشان‌دهنده مهار رشد بیش از ۵۰ درصدی قارچ‌های تحت بررسی بوده است. این مهار برای قارچ‌های مورد نظر در مقایسه با کنترل از نظر آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS در سطح کم‌تر از ۰/۰۵ معنی‌دار گزارش گردید. با مقایسه درصد مهار رشد قارچ‌ها توسط فیلترای کشت باکتری، بیشترین میزان مهار مربوط به فیلترای کشت باکتری (فیلترای کشت رقیق نشده) به میزان ۱۰۰ درصد و کم‌ترین آن مربوط به رقت ۱/۱۶۰ با حدود ۰۵/ ۲۶ درصد بر علیه A.niger گزارش گردید. بالاترین درصد مهار رشد قارچ A.niger متعلق به فیلترای کشت خالص باکتری باسیلوس سوبتیلیس به میزان ۱۰۰ درصد و کمترین میزان درصد مهار رشد متعلق به رقت ۱/۱۶۰ به میزان ۲۶/۰۵ است. همچنین بالاترین درصد مهار رشد قارچ A.flavus متعلق به فیلترای کشت خالص باکتری باسیلوس سوبتیلیس به میزان ۱۰۰ درصد و کمترین درصد مهار رشد متعلق به رقت ۱/۱۶۰ و به میزان ۴۱/۸۷ می‌باشد.

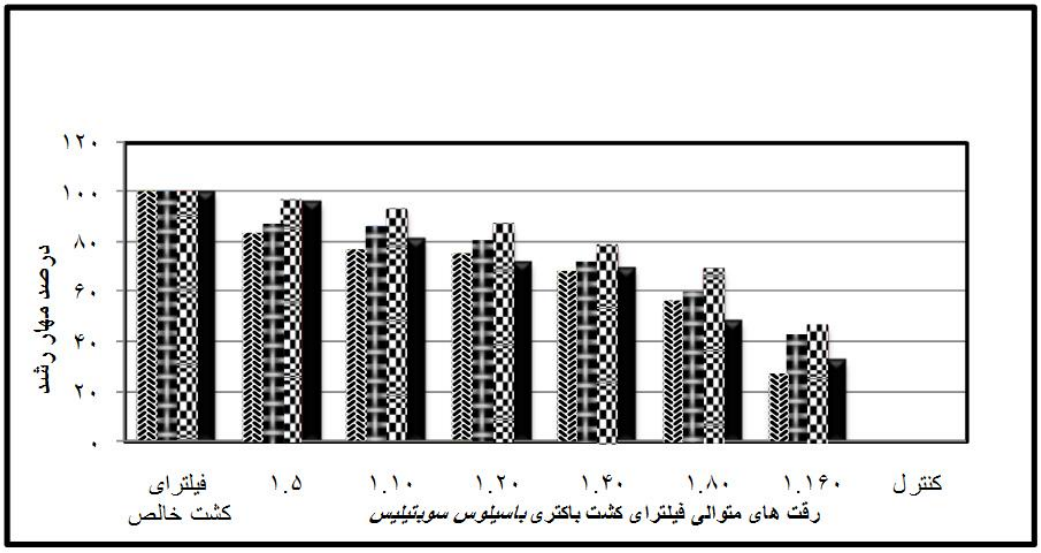
بالاترین درصد مهار رشد قارچ T.menta متعلق به فیلترای کشت خالص باکتری باسیلوس سوبتیلیس به میزان ۱۰۰ درصد و کمترین میزان درصد مهار رشد متعلق به رقت ۱/۱۶۰ به میزان ۴۵/۸۳ می‌باشد.

بالاترین درصد مهار رشد قارچ M.canis متعلق به فیلترای کشت خالص باکتری باسیلوس سوبتیلیس به میزان ۱۰۰ درصد و کمترین درصد مهار رشد متعلق به رقت ۱/۱۶۰ به میزان ۳۲/۷۶ می باشد.

با مقایسه کلی فعالیت آنتاگونیستی فیلترای کشت باکتری بر قارچ‌های مورد بررسی به طور کلی می‌توان نتیجه‌گیری کرد که بیشترین میزان مهار مربوط به فیلترای کشت خالص باکتری باسیلوس سوبتیلیس به میزان ۱۰۰ درصد بر علیه تمامی قارچ‌ها و کمترین آن مربوط به رقت‌های ۱/۱۶۰ با حدود درصدهای ۲۶/۰۵، ۳۲/۷۶، ۴۱/۸۷ و ۴۵/۸۳ به ترتیب بر علیه قارچ‌های A.niger، M. canis، A.flavus وT.menta گزارش گردید (نمودار شماره ۱). میزان درصد مهار رشد قارچ‌ها در رقت ۱/۵ فیلترای کشت باکتری در قارچ‌های A.niger، A.flavus، M.canis و T.menta به ترتیب عبارتند از ۸۲/۷۴، ۸۶/۸۴، ۹۲/۲۳ و ۹۶/۵۴ و میزان درصد مهار رشد در رقت ۱/۱۰ به ترتیب شامل ۷۶/۴، ۸۵/۹۸، ۹۲/۶ و ۸۱/۱۴ می‌باشد. میزان درصد مهار رشد در رقت ۱/۲۰ به ترتیب شامل ۷۵/۳۵، ۷۹/۹۶، ۸۶/۹۵ و ۷۲/۰۳ می‌باشد و در رقت ۱/۴۰ درصد مهار رشد به ترتیب عبارتند از ۶۸/۳، ۷۱/۱، ۷۸/۵۲ و ۶۹/۳۶ . در رقت ۱/۸۰ میزان مهارکنندگی به ترتیب ۵۵/۶۳، ۵۹/۳۲، ۶۹/۱ و ۴۸/۴۷ می‌باشد که با مشاهده کلی به نمودار شماره (۱) که تاثیر مهاری فیلترای کشت باکتری باسیلوس سوبتلبس بر رشد قارچ های پانوژن در کشت GY براث را نشان می دهد و با توجه به توضیحات مندرج در قسمت فوق، متوجه خواهید شد که با افزایش رقت از ۱/۵ به ۱/۱۶۰، میزان درصد مهارکنندگی نیز کاهش می‌یابد که این امر به دلیل کاهش خلوص ترکیباتی است که خاصیت ضد قارچی دارند.

Downloaded from ndhj.lums.ac.ir at 22:20 +0330 on Friday September 22nd 2017

نمودار شماره ۱ - تأثیر مهاری فیلترای کشت باکتری باسیلوس سوبتیلیس بر رشد قارچهای پاتوژن در کشت GY براث



بحث و نتیجه‌گیری

در سال‌های اخیر مطالعات در زمینه جداسازی و شناسایی باکتری‌ها از مناطق مختلف ایران گزارش شده است. بررسی این منابع و داده‌ها نشان می‌دهد تا کنون مطالعه جامعی در این زمینه انجام نگرفته است، لذا با توجه به اهمیت این باکتری در زمینه تولید انواع آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله ترکیبات ضد قارچی، مطالعه حاضر با هدف جداسازی باکتری باسیلوس سوبتیلیس از خاک‌های زراعی و بررسی میزان فعالیت ضد قارچی فیلترای کشت آن بر علیه قارچهای بیماری‌زا صورت گرفت. بر اساس مطالعات صورت گرفته باکتری‌های باسیلوس سوبتیلیس، گسترده‌ترین گروه باکتری‌های تولیدکننده متابولیت‌های ثانویه به‌ویژه مواد ضد باکتریایی و ضد قارچی هستند (۱۷) که به منظور استحصال این مواد صدها مرکز و گروه تحقیقاتی، در گوشه و کنار دنیا به روی این ارگانیسم‌ها، مطالعه و تحقیق می‌کنند (۱۸ و۱۹). این مسأله زمانی اهمیت می‌یابد که بدانیم قارچهای بیماری‌زا با گذشت زمان نسبت به داروهای ضد قارچی در دسترس، از خود مقاومت نشان می‌دهند (۲۰) و عملاً این مواد از حیطه درمان خارج می‌شوند. جهت فائق آمدن به این مقاومت نیاز به داروهای ضد قارچ جدید است که می‌توان گفت یکی از ابزارها و منابع موجود برای تولید آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر، میکروارگانیسم‌ها از جمله باسیلوس‌ها هستند. در همین راستا مطالعه حاضر جهت بررسی فعالیت ضدقارچی باکتری باسیلوس سوبتیلیس انجام شد. در تحقیق حاضر فیلترای کشت باکتری باسیلوس سوبتیلیس باعث مهار رشد تمام قارچهای مورد بررسی گردید. این باکتری قادر به مهار رشد معنی‌دار قارچهای A.niger، A.flavus، T.mentagrophytes و M.cani در مقایسه با کنترل بودند. نتایج همچنین نشان داد فیلترای کشت باسیلوس سوبتیلیس قادر به مهار بیش از ۵۰ درصدی قارچهای تحت بررسی، بوده است. این مهار برای قارچهای نامبرده در مقایسه با کنترل از نظر آماری در سطح کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار گزارش گردید و بیشترین میزان مهار مربوط به فیلترای کشت باکتری به میزان ۱۰۰ درصد بر علیه تمامی قارچها و کمترین آن مربوط به رقت‌های ۱/۱۶۰ با درصدهایی در حدود ۲۶/۰۵، ۳۲/۷۶، ۴۱/۸۷ و ۴۵/۸۳ به ترتیب بر علیه قارچهای A.niger، M.canis، A.flavus و T.menta گزارش گردید. در این مورد El-Hamshary و همکاران در سال ۲۰۱۲ با بررسی خاصیت آنتاگونیستی باکتری‌های خاک بر روی رشد قارچهای بیماری‌زای ترایکوفایتون، میکروسپوروم و آسپرژیلوس نشان دادند گونه‌های مختلف باکتری‌های باسیلوس با تولید ترکیبات

ضد قارچی نظیر آزوکسی باسیلین و آمینواسید، به عنوان قوی‌ترین باکتری آنتاگونیست مطرح می‌باشند که رشد آسپرژیلوس نایجر را تا ۵۶ درصد متوقف نمود و بعد از آن ترایکوفایتون و میکروسپوروم در رتبه‌های بعدی قرار داشتند (۲۱). Moyn و همکاران در سال ۲۰۰۱ نشان دادند که باسیلوس سوبتیلیس قادر به تولید ترکیبات پپتیدی ضدقارچی قوی تحت عنوان باسیلومایسین دی می‌باشد که خاصیت مهارکنندگی بالا علیه A.flavus را داراست. Kaneda و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان داد که باکتری باسیلوس سوبتیلیس با تولید متابولیت ضد قارچی باسیلوپپتین باعث مهار رشد قارچ‌ها می‌گردد (۱۰). Raaijmakers و همکاران در سال ۲۰۰۲ با جمع‌آوری خاک از مناطق مختلف مصر، باسیلوس سوبتیلیس سویه mtcc8114 را شناسایی کردند که اثر ضدقارچی علیه درماتوفیت‌ها را نشان داد (۲۰). بنابراین فعالیت ضد قارچی قابل توجه، باکتری باسیلوس سوبتیلیس بر علیه قارچ‌های مورد بررسی در این تحقیق با نتایج ارائه شده توسط محققان دیگر همخوانی دارد. در نتیجه این باکتری، ابزار مناسبی برای استفاده در کنترل زیستی قارچ‌ها در طبیعت به حساب می‌آید.

تشکر و قدردانی

در پایان مراتب سپاس و قدردانی خود را از همکاری صمیمانه ریاست محترم بخش قارچ‌شناسی انیستیتو پاستور ایران و زحمات بی‌شائبه پرسنل محترم بخش مذکور را اعلام می‌دارم.

Downloaded from ndhj.lums.ac.ir at 22:20 +0330 on Friday September 22nd 2017

Downloaded from ndhj.lums.ac.ir at 22:20 +0330 on Friday September 22nd 2017

References

1. Nordoy I, Gaustad P. Drug resistance in the treatment of invasive fungal infections. Tidsskr Nor Laegeforen. 2008; 128(22): 2607-11.
2. Kown-chung KJ, Bennett JE. Medical mycology. Philadelphia: lea & Febiger; 1992. P.707-729.
3. Bayati FA, Mola HF. Antibacterial and antifungal activities of different parts of Tribulus terrestris L.growing in Iraq. J Zhejiang Univ Sci B. 2008; 9(2):154-9.
4. Yousefzadi M, Sonboli A, Karimie F, Ebrahimi SN, Asghari B, Zeinalia A. Antimicrobial activity of some salvia species essential oil from Iran. Z. Natur forsch C. 2007; 62(7-8):514-8.
5. Palumbo JD, Okeeffe TL, Abbas HK. Isolation of maize soil and rhizosphere bacteria with antagonistic activity against Aspergillus flavus and Fusarium verticillioides. J Food Prot. 2007; 70(7): 1615-21.
6. Palumbo JD, O'Keeffe TL, Abbas HK. Isolation of maize soil and rhizosphere bacteria with antagonistic activity against Aspergillus flavus and Fusarium verticillioides. J Food Prot. 2007; 70(7): 1615-21.
7. Chia Hsieh F, Chun Lin T, Meng M, Sheng Kao S. Comparing methods for identifying Bacillus strains capable of producing the antifungal lipopeptide Iturin A. Curr Microbiol. 2008; 56(1): 1-5.
8. Czaczyk K, Trojanowska K, Stachowiak B. Inhibition of ergosterol biosynthesis in fungal plant pathogens by Bacillus sp. Polish J Environ St. 2002; 11(5): 593-7.
9. Lee H. Purification and structural characterization of bacillomycin F produced by a bacterial honey isolate active against Byssochlamys fulva H25. Appl Environ Microbiol. 2008; 105(3): 663-73.
10. Kaneda M, Kajimura Y. New antifungal antibiotics, bacillopeptins and fusaricidins.Yakugaku Zasshi. 2002; 122(9): 651-71.
11. Hu LB, Shi ZQ, Zhang T, Yang ZM. Fengycin antibiotics isolated from B-FS01 culture inhibit the growth of Fusarium moniliforme Sheldon ATCC 38932. FEMS Microbiol Lett. 2007; 272(1): 918.
12. 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.
13. Yu GY, Sinclair JB, Hartman GL, Bertagnolli BL. Production of iturin A by Bacillus amyloliquefaciens suppressing Rhizoctonia solani. Soil Biol Biochem. 2002; 34(7): 955-63.
14. Maldonado MC, Corona J, Gordillo MA, Navarro AR. Isolation and partial characterization of antifungal metabolites produced by Bacillus sp. IBA 33. Curr Microbiol. 2009; 599(6): 646-50.
15. Pryor SW, Gibson DM, Hey AG, Gossett JM, Walker LP. Optimization of spore and antifungal lipopeptide production during the solid-state fermentation of Bacillus subtilis. Appl Biochem Biotechnol. 2007; 143: 63-79.
16. Ranjbarian AR, Shams-Ghahfarokhi M, Kalantari S, Razzaghi Abyaneh M. Molecular identification of antagonistic bacteria from Tehran soil and evalution of their inhibitory activities toward pathogenic fungi. Iran Journal Microbiol. 2011; 3(3): 140-146.
17. Bredhold H, Fjaervik E, Zotchev B. Actinomycetes from sediments the Trondheim Fjord،Norway: Diversity and Biological Activity. Mar Dru. 2008; 6(1): 12-24.
18. Salami F. Isolation and determination of Streptomyces that produce antibiotic from soil. Pajohesh-ve-Sazandegi. 2004; 64: 41-74. [In persian]
19. Shantikumar L, Bora TC. Actinomycetes ofLoktak habitat: isolation and screening for antimicrobial activities. Biotech. 2006; 5(2): 217- 221.
20. Raaijmakers JM, Vlami M, de Souza JE. Antibiotic 16. production by bacterial biocontrol agents. Anton van Leeuwen. 2002; 81: 537-547.
21. Hamshary EL, Huda M, Khattab AA. Molecular characterization of bacteria isolated from the kingdom of Saudi Arabia and their uses against pathogenic fungi causing dermatological disease. African Biotech. 2012; 11(89),pp. 15510-15515.

Evalution of antifungal activity the Bacillus subtilis against pathogenic fungi

Babaei H[1], Shams Ghahfarokhi M[2], Sarlak M[3], Madani[4], Razzaghi Abyaneh M[5]

1. MSc. Microbiology, School of Basic Sciences, Islamic Azad University, Flavarjan Branch, Isfahan , Iran
2. Associate Professor, Department of Medical Fungui, Tarbiat Modarres University ,Tehran, Iran
3. MSc. Microbiology, Islamic Azad University, Flavarjan Branch, School of Basic Sciences, Isfahan , Iran
4. Assistant Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Flavarjan Branch, School of Basic Sciences, Isfahan, Iran
5. Associate Professor, Department of Medical Fungui , Pastor Institiute of Iran, Tehran, Iran

Downloaded from ndhj.lums.ac.ir at 22:20 +0330 on Friday September 22nd 2017

Abstract

Background & Aim: Among the biological control agents used in recent years for reducing fungal human diseases, non pathogenic bacteria such as *B.subtilis* have received major consideration because of their unique ability to produce a wide variety of fungal inhibitory compounds. The purpose of this study was to evaluate the antifungal activity of *B.subtilis* culture filtration against pathogenic fungi.

Material & Methods: Fifty soil samples were collected from so different part of Tehran and cultured on glucose yeast extract agar for isolate of *B.subtilis*. All isolated *B.subtilis* were screened for their ability to inhibit all fungi growth using the dual culture on medium GYA on base visual agar plate assay, then of *B.subtilis* culture filtration showed most remarkable antagonistic activites against fungi was prepared serial dilution and antagonistic activity amount was evaluated. The results were analyzed using the SPSS software program.

Results: Totally 38B.subtiliswere obtained from soil samples that showed antagonistic activites against fungi. Bacteria cultured filtrated was able to inhibition more than 50% related to the evaluated fungi. This inhibition amount reported related to the current fungi in comparision to control group using the SPSS software, statistically, less than 0/05 in significant level.

The results showed that there was statistically significant difference between the inhibition amount related to the current fungi compared to the control group ($p<0.05$)

Conclusions: The results show that the *B.subtilis* with produce antifungal metabolites can be an appropriate tool for biological control fungi in nature.

Key words: *Bacillus subtilis*, Fungal diseases, Antagonistic activity, Filtration medium