

ارزیابی فعالیت ضد قارچی باکتری باسیلوس سوبتیلیس در مقابل قارچ‌های بیماری‌زا

حمیده بابایی^۱، معصومه شمس قهفرخی^۲، مریم سرلک^۳، محبوبه مدنی^۴، مهدی رزاقی ایبانه^۵

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

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

۳. کارشناس ارشد 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 قارچ‌شناسی 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 ($p < 0.05$).

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

مقدمه

افزایش شیوع عفونت های قارچی در سال های 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 باکتری های غیر بیماری زا در کنترل و درمان عفونت های قارچی معطوف کرده است (۱ و ۲). روش های مختلفی به منظور کنترل و درمان بیماری های قارچی و همچنین کنترل حضور عوامل قارچی در غذای 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 روش ها بسیار محدود شده است (۳ و ۴). در همین راستا، به ویژه در سال های 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 ارگانیسم های مختلف به ویژه باکتری های غیر بیماری زا بر رشد قارچ ها و متابولیت های تولید شده توسط آنها معطوف شده است و برخی از متابولیت های مؤثر در این رابطه از منابع زنده استخراج و مورد شناسایی قرار گرفته اند (۵ و ۶). این باکتری ها می توانند به عنوان کاندیدهای مناسبی در کنترل قارچ های بیماری زا مورد توجه قرار گیرند. هدف از این تحقیق بررسی خاصیت آنتاگونیستی باکتری غیر بیماری زای باسیلوس سوبتیلیس بر علیه قارچ های بیماری زای انسانی نظیر *Aspergillus niger*، *Aspergillus flavus*، *Trichophyton mentagrophytes* و *Microsporum canis* است.

باسیلوس ها، باکتری های گرم مثبت، میله ای شکل و اغلب متحرک هستند. این باسیل ها می توانند از نوع هوازی مطلق یا بی هوازی مطلق و یا هر دو باشند. این باکتری ها در اثر تخمیر گلوکز می توانند محصولاتی مانند اتانول، گاز هیدروژن، استن، اسیدهای استیک، فورمی، لاکتیک و سوکسینیک را تولید کنند. برخی از گونه های باسیلوس قادر به تولید آنتی بیوتیک می باشند. تا کنون ترکیبات متنوعی با خاصیت مهار قارچ ها از انواع باسیلوس ها گزارش شده است. یک گونه از این جنس متعلق به باسیلوس سوبتیلیس است که قادر به تولید ترکیبات قدرتمندی علیه قارچ ها می باشند. از جمله این ترکیبات

به ایتورین A اشاره نمود (۷ و ۸). این ترکیب یک لیپوپپتید حلقوی می باشد که بر رشد قارچ ها اثر مهاری دارد و در عین حال اثرات سمی کمی بر روی انسان دارد و به همین علت در درمان عفونت های قارچی انسان و حیوان کاربرد دارد. فعالیت زیستی ایتورین ها وابسته به طول زنجیره لیپیدی آن است. هرچه این زنجیره بلندتر باشد ترکیب مورد نظر فعالیت ضد قارچی بیشتری از خود نشان می دهد (۹). ترکیبی تحت عنوان باسیلوپپتین که از این باکتری به دست می آید از خانواده ضد قارچ های ایتورین است که ساختار آن نیز لیپوپپتید حلقوی می باشد (۱۰). از ترکیب دیگری که از این نوع باسیلوس به دست می آید می توان به فنجایسین اشاره نمود که بر علیه قارچ ها قدرت مهاری دارد و فعالیت آنتاگونیستی آن به علت فسفولیپیدها و استرول ها و همچنین اولئیک اسید موجود در آن می باشد که دو اسید چرب غیر اشباع موجود در آن خاصیت ضد قارچی باسیلوس را افزایش می دهد (۱۱ و ۱۲). این نوع از باسیلوس ها به عنوان یک کنترل کننده بیولوژیک بر علیه قارچ های پاتوژن کاربرد دارند (۱۳). بررسی بر روی متابولیت های ضد قارچی گونه های باسیلوس نشان می دهد که این متابولیت ها در برابر دما و تغییرات PH مقاوم بوده و اثر ضد قارچی خود را از دست نمی دهند (۱۴ و ۱۵). در تحقیق حاضر میزان فعالیت ضد قارچی فیلترای کشت باکتری باسیلوس سوبتیلیس بر علیه قارچ های پاتوژن *Aspergillus niger*، *Trichophyton mentagrophytes*، *Aspergillus flavus* و *Microsporum canis* مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

باکتری باسیلوس سوبتیلیس مورد استفاده در تحقیق حاضر از نمونه خاک های زراعی جداسازی شد. تعداد ۵۰ نمونه خاک زراعی از مناطق مختلف استان های تهران جمع آوری گردید. سپس جهت تهیه سوسپانسیون از نمونه های 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 سانتیفریوژ گردید. سپس سوسپانسیون حاصل را در میکروتیوب های ۱/۵ میلی لیتری استریل درب دار ریخته و

یافته به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

بعد از مدت زمان نگهداری باکتری های دارای فعالیت ضد قارچی با توجه به میزان رشد نمونه شاهد بررسی شدند و از میان آن ها 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 سانتی گراد نگهداری گردید. سپس یک لوپ از کلونی باکتری به ارلن ۵۰۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط GY براث منتقل شد و ارلن به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد در شرایط متحرک ۱۵۰ rpm قرار گرفت. پس از مدت زمان انکوباسیون، محیط حاوی باکتری در ۱۰۰۰×g به مدت ۴۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد 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 میلی لیتر از فیلترای کشت باکتری مهارکننده رشد قارچ ها در داخل یک ارلن استریل خالی، منتقل شد و به میزان ۲ گرم گلوکز و ۰/۵ گرم عصاره مخمر جهت غنی سازی فیلترای باکتری به آن افزوده شد و توسط فیلتر سرنگی در داخل ارلن ۲۵۰ میلی لیتری فیلتر گردید. سپس از فیلترای کشت باکتری رقت های 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 میلی لیتر از مایع فیلترای کشت نمونه باکتری به طور سه تایی در گوده های پلیت های ۱۲ خانه ای کشت سلولی حاوی محیط کشت GY براث منتقل شد. جهت بررسی میزان رشد قارچ ها به عنوان کنترل، از محیط کشت GY براث به میزان ۲ میلی لیتر به صورت سه تایی استفاده شد. سپس به هر گروه از پلیت های مورد نظر میزان معینی از اسپور قارچی که برای قارچ های *A.flavus* و *A.niger* ۵۰ میکرولیتر و برای قارچ های

مجدد بر اساس شماره های نمونه خاک مورد نظر شماره گذاری 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 سانتی گراد نگهداری شد. سپس از هر باکتری کلونی خالص تهیه نموده و پس از انجام رنگ آمیزی، باکتری های گرم مثبت جداسازی شدند و با تست های بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفتند.

در این تحقیق، قارچ های بیماری زای انسانی جدا شده از بیماران، در انیستیتو پاستور ایران بخش قارچ شناسی مورد مطالعه قرار گرفتند که شامل چهارگونه قارچ های *A. flavus*، *A. niger*، *M. canis* و *T. mentagrophytes* بودند. به منظور تهیه حجم تلقیح در ابتدا قارچ های مورد بررسی در لوله های حاوی محیط سابورو دکستروز آگار کشت داده شد. کشت قارچ ها به مدت ۷-۱۰ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد نگهداری شد. جهت تهیه سوسپانسیون اسپور، پس از مشاهده رشد مناسب عوامل قارچی، ابتدا میزان ۵ میلی لیتر آب مقطر حاوی ۰/۱ درصد توئین ۸۰ استریل به لوله اضافه گردید و با استفاده از لوله ی شیشه ای توپر استریل اسپورهای سطح کلونی قارچ ها جمع آوری گردید و در لوله های ۱۵ میلی لیتری استریل منتقل شد و میزان حجم تلقیح اسپور قارچ به صورت میکروسکوپی و توسط هماسیتومتری تعیین گردید.

جهت بررسی اثرات ضد قارچی باکتری های 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 سانتی متری حاوی محیط GY به صورت خطی کشت داده شد به طوری که ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون های قارچی به طور جداگانه در مرکز پلیت به صورت یک خط تلقیح شدند و یک لوپ کلونی از باکتری های آنتاگونیست انتخاب شده به طور جداگانه و به فاصله ۳ سانتی متری از طرفین خط تلقیح در مرکز پلیت و به صورت موازی کشت داده شدند و به منظور اطمینان از خاصیت آنتاگونیستی باکتری ها پلیت های کشت

باسیلوس سوبتیلیس به میزان ۱۰۰ درصد و کمترین درصد مهار رشد متعلق به رقت ۱/۱۶۰ و به میزان ۴۱/۸۷ می باشد. 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 می باشد.

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.

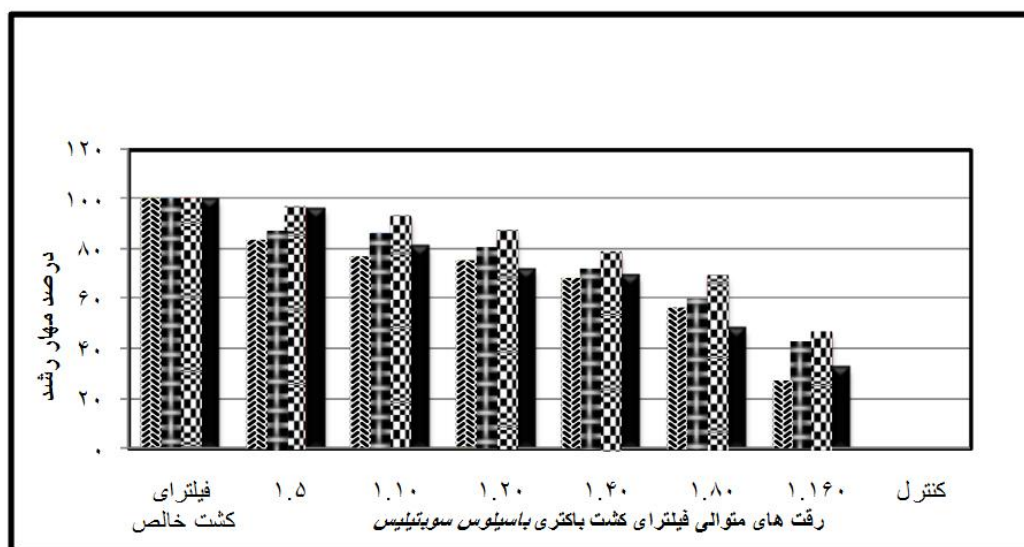
با مقایسه کلی فعالیت آنتاگونیستی فیلترای کشت باکتری بر قارچ های مورد بررسی به طور کلی می توان نتیجه گیری کرد که بیشترین میزان مهار مربوط به فیلترای کشت خالص باکتری باسیلوس سوبتیلیس به میزان ۱۰۰ درصد بر علیه تمامی قارچ ها و کمترین آن مربوط به رقت های ۱/۱۶۰ با حدود درصد های ۲۶/۰۵، ۳۲/۷۶، ۴۱/۸۷ و ۴۵/۸۳ به ترتیب بر علیه قارچ های *T.menta*، *A.flavus*، *M. canis*، *A.niger* گزارش گردید (نمودار شماره ۱). میزان درصد مهار رشد قارچ ها در رقت ۱/۵ فیلترای کشت باکتری در قارچ های *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 می باشد. میزان درصد مهار رشد در رقت ۱/۲۰ به ترتیب شامل ۷۵/۳۵، ۷۹/۹۶، ۸۶/۹۵ و ۷۲/۰۳ می باشد 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 می باشد که با مشاهده کلی به نمودار شماره (۱) که تاثیر مهاری فیلترای کشت باکتری باسیلوس سوبتیلیس بر رشد قارچ های پانوژن در کشت *GY* برات 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 می یابد که این امر به دلیل کاهش خلوص ترکیباتی است که خاصیت ضد قارچی دارند.

M.canis و *T.menta* ۷۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد، تلقیح گردید و پلیت ها به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد 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 سانتی گراد قرار گرفت تا در این دما به تدریج و بدون آنکه نمونه های قارچی بسوزد خشک شوند و در نهایت وزن خشک آن ها محاسبه گردید (۱۶).

یافته ها

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 قارچ ها بودند توسط روش های فیزیولوژیک مورد شناسایی قرار گرفتند. نامگذاری باکتری ها بر اساس کتاب *Bergey* تحت عنوان سیستماتیک و تشخیص و طبقه بندی باکتری ها انجام شد. فیلترای کشت باسیلوس سوبتیلیس مطابق با نمودار ۱ و با توجه به کاهش وزن خشک قارچ ها که در نتیجه رشد کم تر قارچ های مورد بررسی در مقابل فیلترای کشت باکتری آنتاگونیست بود نشان دهنده مهار رشد بیش از ۵۰ درصدی قارچ های تحت بررسی بوده است. این مهار برای قارچ های مورد نظر در مقایسه با کنترل از نظر آماری با استفاده از نرم افزار *SPSS* در سطح کم تر از ۰/۰۵ معنی دار گزارش گردید. با مقایسه درصد مهار رشد قارچ ها توسط فیلترای کشت باکتری، بیشترین میزان مهار مربوط به فیلترای کشت باکتری (فیلترای کشت رقیق نشده) به میزان ۱۰۰ درصد و کم ترین آن مربوط به رقت ۱/۱۶۰ با حدود ۲۶/۰۵ 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

نمودار شماره ۱ - تأثیر مهاری فیلترای کشت باکتری باسیلوس سوبتیلیس بر رشد قاچ‌های پاتوزن در کشت GY پراث



بحث و نتیجه گیری

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 و ۱۹). 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. canis* 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 تریکوفایتون، میکروسپوروم و آسپرژیلوس نشان دادند گونه‌های مختلف باکتری‌های باسیلوس با تولید ترکیبات

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.

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 پتیدی 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 باسیلوپتین باعث مهار رشد قارچ‌ها می‌گردد (۱۰). Raaijmakers و همکاران در سال ۲۰۰۲ با جمع‌آوری خاک از مناطق مختلف مصر،

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. Naturforsch 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 *Byssoschlamys 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; 59(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 evaluation 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 of Loktak 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.

Evaluation of antifungal activity the *Bacillus subtilis* against pathogenic fungi

Babaei H¹, Shams Ghahfarokhi M², Sarlak M³, Madani⁴, Razzaghi Abyaneh M⁵

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

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 38*B.subtilis*were 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