Journal of Microbial World
Volume 17, No. 1, June 2024

Original Article

Evaluation of the antifungal components and antifungal activity produced from native *Bacillus toyonensis* against plant pathogen fungal *Aspergillus tubingensis* and *Fusarium fujikuroi*

Kosar sadat shojaedin [1], Shokoofeh Ghazi [2], shadi selseleh zakeri [3]

[1] Master of Microbiology ,Department of Microbiology, Faculty of Advance Science and Technology, Islamic Azad University, Tehran, Iran. [2]Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Advanced science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran. [3] PhD in Microbiology, Department of Microbiology, Grain Research Center ,Iran Government trading Company, Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objectives: *Aspergillus tubingensis* and *Fusarium fujikuroi* cause raisin rot and ring rot of rice. Nowadays, using chemical compounds has decreased. Therefore, *Bacillus* species having antifungal activities can be used in biocontrol. The aim of this research is evaluating antifungal metabolites produced from the *Bacillus* strains against two mentioned fungi.

Material and Methods: 5 soil samples were collected from forest soils of Tehran for the *Bacillus* isolation genus and the antifungal activity of the isolated *Bacillus* species were evaluated using well-method. To increase the amount of antifungal production, superior strain was optimized. Produced antifungal metabolite was purified by the Methanol extraction method and its compounds were evaluated by GC chromatography analysis. Superior strain was assessed for genetic identity based on 16S rRNA sequencing.

Results: Production amount for antifungal metabolites of *Bacillus* species was evaluated and a strain showing the highest fungal growth-inhibition halo with a diameter of 26±0.265 and 25±0.265 mm ($p \leq 0.05$) introduced as the superior strain. Inoculation of this species into the production medium, in the presence of Glucose, Yeast extract as the nitrogen source, neutral pH, and with incubation time course of 48 hours showed the significant increase in the production rate of antifungal compounds with diameters of 31±0.265 and 30.265±0.0 mm ($p \leq 0.05$). The superior species was identified as the name of *Bacillus toyonensis.* Results of Gas chromatography confirmed the production of 68.38% antifungal metabolite from lipopeptides of the Iturin group.

Conclusion: *Bacillus toyonensis*, as a native strain isolated from the soil ecosystem of Iran, has a potent capacity in producing antifungal metabolites and this potential can be benefited in biological control of fungal pests.

Keywords: *Aspergillus tubingensis, Fusarium fujikuroi, Bacillus toyonensis*, soil, antifungal metabolites.

Received: 18 February 2024 Revised: 2 April 2024 Accepted: 28 May 2024

Correspondence to: Shokoofeh Ghazi

Tel: +98 9125224038

E-mail: Shokoofeh. ghazi@gmail.com

Journal of Microbial World 2024, 17 (1): 45 - 61

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال هفدهم شماره اول (پیاپی ۵۸) بهار ۱۴۰۳
صفحات ۶۱ –۴۵

Original Article

بررسی فعالیت و ترکیبات ضدقارچی تولید شده از باکتری *باسیلوس تویوننسیس* بومی علیه قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی *آسپرژیلوس توبینجنسیس* و *فوزاریوم فوجی کوروای*

کوثر سادات شجاع الدین [۱]، شکوفه غازی [۲*]، شادی سلسله ذاکری [۳]

[۱] کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، واحد علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. [۲] استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، واحد علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. [۳] دکتری میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، مرکز پژوهش های غلات، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: قارچ‌های *آسپرژیلوس توبینجنسیس* (*Aspergillus tubingensis*) و *فوزاریوم فوجی کوروای* (*Fusarium fujikuroi*) در ایجاد پوسیدگی کشمش و طوقه برنج نقش دارند. امروزه استفاده از ترکیبات شیمیایی کاهش یافته، لذا گونه‌های *باسیلوس* (*Bacillus*) با خواص ضدقارچی، می‌توانند درحیطه‌ی کنترل‌زیستی استفاده گردند. هدف این پژوهش، بررسی متابولیت‌های ضدقارچی تولید شده ازگونه‌های *باسیلوس* علیه دو قارچ نامبرده می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ۵ نمونه خاک پارک‌های جنگلی شهرتهران جهت جداسازی جنس *باسیلوس* جمع‌آوری و بررسی فعالیت ضدقارچی گونه‌های *باسیلوس* به روش چاهک‌گذاری انجام شد. گونه منتخب جهت افزایش مقدار تولید متابولیت ضدقارچی بهینه سازی گردید. متابولیت ضدقارچی تولید شده با روش عصاره متانولی تخلیص شد و ترکیبات آن با آنالیزکروماتوگرافی GC-MS ارزیابی شد. گونه منتخب جهت شناسایی هویت ژنتیکی برمبنای 16S rRNA بررسی گردید.

یافته‌ها: میزان تولید متابولیت‌های ضدقارچی گونه‌های *باسیلوس* ارزیابی شد و یک گونه با داشتن بالاترین هاله مهار رشد قارچی به قطر ۲۶۵ /۰±۲۶ و ۰/۲۶۵±۲۵ میلی‌متر به‌عنوان گونه منتخب معرفی گردید. تلقیح این گونه درمحیط پایه تولیدی در حضور منبع کربن گلوکز، منبع نیتروژن، عصاره مخمر، pH خنثی و با گرماگذاری در بازه زمانی ۴۸ ساعت افزایش زیادی در میزان تولید ترکیب ضدقارچی با قطرهاله ۲۶۵ /۰±۳۱ و ۰/۲۶۵±۳۰ میلی‌متر نشان داد. گونه برتر با نام *باسیلوس تویوننسیس* (*Bacillus toyonensis*) تعیین هویت شد. نتایج کروماتوگرافی تولید ۶۸/۳۸ لیپوپپتیدهای گروه ایتورین (Iturin) را تایید کرد.

نتیجه‌گیری: *باسیلوس تویوننسیس* به‌عنوان یک سویه بومی جداسازی شده ازاکوسیستم خاک کشور پتانسیل زیادی در تولید متابولیت‌های ضدقارچی داشته و می‌توان از این قابلیت جهت کنترل زیستی آفات قارچی بهره گرفت.

کلمات کلیدی: *آسپرژیلوس توبینجنسیس*، *فوزاریوم فوجی کوروای*، *باسیلوس تویوننسیس*، خاک، متابولیت‌های ضدقارچی.

دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۱۱/۲۹ ویرایش مقاله: ۱۴۰۳/۱/۱۴ پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۳/۸

مقدمه

گونه‌های مختلفی از موجودات زنده و میکروارگانیسم‌ها در خاک زندگی می‌کنند. قارچ‌ها یکی از انواع موجودات زنده خاک هستند که باعث ایجاد بیماری در گیاهان می‌شوند. قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی، در طول تاریخ خسارات اقتصادی فراوانی به محصولات کشاورزی وارد کردند که از آن جمله می‌توان به کاهش محصولات، ایجاد ضایعه روی‌گیاه و مرگ گیاه اشاره کرد (۱و۲). همچنین قارچ‌ها متابولیت هایی به نام

*) آدرس برای مکاتبه: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری نوین، واحد علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
تلفن: ۰۹۱۲۵۲۲۴۰۳۸ پست الکترونیک: Shokoofeh. ghazi@gmail.com

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

مایکوتوکسین (Mycotoxin) تولید می‌کنند که باعث جهش، سرطان و تضعیف سیستم ایمنی در انسان می‌شود. قارچ‌های *فوزاریوم فوجی کوروای* و *آسپرژیلوس توبینجنسیس* یکی‌از عوامل آلوده‌کننده گیاهان می‌باشند (۳). برنج به‌عنوان یک محصول غذایی اصلی، نقش بسیار مهمی در تغذیه جمعیت زیادی از مردم جهان دارد. بیماری باکانه (Bakanae) یا پوسیدگی طوقه و ریشه برنج بیماری است که از قارچ *فوزاریوم فوجی کوروای* ناشی می‌شود و در بیشتر مناطق برنج‌کاری دنیا یافت می‌شود (٤و٥). بیماری باکانه دارای علائم مشخصی مانند گیاه باریک و کشیده با برگ‌های سبز رنگ پریده تا زرد، کوتولگی بوته‌ها و تشکیل ریشه‌های نابجا و بذرهای تغییررنگ‌یافته و یا پوک در برنج است. کشمش از انواع خشکبار است که با عامل قارچی *آسپرژیلوس توبینجنسیس* آلوده می‌گردد. این قارچ می‌تواند سبب کاهش مقادیر کمی و کیفی محصول شود(٦و٧).

قارچ‌کش‌های شیمیایی، گروهی از آفت‌کش‌ها هستند که به میزان وسیعی‌استفاده می‌شوند و باعث نابودی قارچ‌های بیماریزای گیاهی شده و از رشد و گسترش آن‌ها جلوگیری می‌کنند. همچنین اثرات منفی زیادی نیز بر روی سلامت انسان و محیط زیست می‌گذارند. باقی مانده سموم ناشی از مصرف قارچ‌کش‌ها، باعث آلودگی محیط، ایجاد مقاومت درعوامل بیماری‌زا، و باقی ماندن طولانی مدت درمحیط زیست، کاهش بازدهی محصولات و بیماری‌هایی چون جهش، سرطان و مشکلات هورمونی در انسان‌ها می‌شوند. بسیاری از کشورها استفاده از قارچ‌کش‌ها و آفت کش‌های شیمیایی را محدود کرده‌اند و تحقیقات گسترده‌ای را جهت کنترل‌کردن قارچ‌های بیماریزای گیاهی، آغاز نموده‌اند (۸،۹و۱۰). امروزه، ازمیکروارگانیسم‌ها جهت کنترل و سرکوب عوامل بیماری‌زای قارچی استفاده می‌شود، که به آن کنترل‌زیستی می‌گویند. کنترل‌زیستی روش نوینی است که می‌تواند جایگزین خوبی برای قارچ‌کش‌های شیمیایی باشد. از میان باکتری‌های موثر در کنترل‌زیستی، جنس باسیلوس به علت تشکیل اسپور و مقاومت در شرایط سخت، از عوامل مهم کنترل‌زیستی به حساب می‌آید (۱۱). جنس *باسیلوس* شامل باکتری‌های گرم مثبت، میله‌ای شکل، هوازی و اکثرا ساپروفیت بوده که توانایی تولید لیپوپپتیدهای ضدقارچی از خانواده لیپوپپتیدی ایتورین (Iturin) را دارند (۱۲). لیپوپپتیدهای ضدقارچی و ترکیبات تولیدشده توسط *باسیلوس*ها، حلقوی بوده که در فاز سکون چرخه رشد، تولید و از طریق واکنش با غشای سیتوپلاسمی و ایجاد منفذ هدایت‌کننده یون‌ها در غشا و افزایش نفوذپذیری غشای سلول، مانع رشد قارچ‌ها شده و موجب مرگ سلول قارچ بیماری‌زا می‌شوند (۱۳).این لیپوپپتیدهای ضدقارچی، مزایای زیادی نسبت به سایر آفت‌کش‌ها دارند. از آن جمله می‌توان به کمتر سمی‌بودن، ماندگاری بیشتر در محیط، تجزیه‌زیستی بالا و خصوصیات سازگار با محیط‌زیست اشاره نمود که می‌تواند از رشد و تکثیر قارچ‌ها جلوگیری‌کند (١٤و١٥).

بسیاری ازگونه‌های *باسیلوس* مانند *باسیلوس سوبتیلیس* (*Bacillus subtilis*) قادر به مهار رشد قارچ‌های بیماری‌زای‌گیاهی‌مانند *ورتیسیلیوم داهلی* (*Verticillium dahiliae*) عامل پژمردگی سبزیجات (١٦)، *مگناپورته‌گریسا* (*Magnaporthegrisea*) بیماری بلاست در برنج (١٧)، *فوزاریوم اکسی سپوروم* (*Fusarium oxysporum*) عامل پوسیدگی گندم (١٨)، فوزاریوم گرامینارووم (*Fusariumgraminearum*) عامل آلودگی سیب زمینی (١٩) می‌باشد.

هدف این تحقیق، بررسی اثر متابولیت‌های ضدقارچی گونه‌های *باسیلوس* جداشده از خاک پارک‌های شهر تهران برقارچ‌های *آسپرژیلوس توبینجنسیس* (عامل پوسیدگی کشمش) و *فوزاریوم فوجی کوروای* (عامل پوسیدگی طوقه و ریشه برنج)، تعیین اثر ترکیبات محیط‌کشت برمیزان تولید لیپوپپتیدهای ضدقارچی توسط گونه‌های *باسیلوس* و در نهایت تعیین هویت گونه منتخب است.

مواد و روش‌ها

الف) جداسازی باسیلوس‌ها از خاک: به‌منظور جداسازی گونه‌های *باسیلوس*، ۵ نمونه خاک، از فاصله ۱ متری ریشه و از

عمق ۳۰ تا ۱۰ سانتی‌متری خاک پارک‌های جنگلی شهر تهران (جمشیدیه، یاس‌فاطمی، سرخه‌حصار، باغ‌پرندگان و چیتگر) به کمک وسایل سترون جمع‌آوری و نمونه‌ها جهت مطالعات بعدی تحت شرایط کاملا سترون و در کنار یخ خشک به آزمایشگاه منتقل و در دمای ٤ درجه سلسیوس در یخچال نگهداری شدند. جهت جداسازی انحصاری *باسیلوس*ها به روش استاندارد تهیه رقت های سریالی و پورپلیت و با کمک تکنیک غنی سازی حرارتی، به مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری ۸۰ درجه سلسیوس انجام‌گردید (١٤). براساس خصوصیات ریخت‌شناسی کلنی‌های سفیدرنگ، مایل به کرم با قوام کره‌ای و سطحی خشن و حاشیه دندانه‌دار انتخاب و طی کشت‌خطی در محیط کشت نوترینت‌آگار (ایران شرکت Ibrosco) خالص‌سازی شدند. به منظور تایید جنس *باسیلوس*، بررسی‌های میکروسکوپی شامل رنگ‌آمیزی گرم، اسپور و آزمون کاتالاز انجام‌گردید (١٦).

ب) سویه‌های قارچی مورد بررسی: سویه‌های قارچی استاندارد شامل: *Fusarium fujikuroi* PTCC 5144، که عامل پوسیدگی طوقه و ریشه برنج و *Aspergillus tubingensis* PTCC 5162، عامل پوسیدگی و آلودگی کشمش می‌باشد که به صورت لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم های صنعتی ایران تهیه گردید (١٦).

ج) احیای سویه‌های لیوفیلیزه و تهیه سوسپانسیون قارچی: ویال‌های لیوفیلیزه قارچی در شرایط سترون بازشدند و محتویات کامل آن در لوله‌ای حاوی محیط سابورودکستروزبراث (کشورایران شرکت Ibrosco) ریخته شد. سپس روی محیط پوتیتو دکستروزآگار (کشور ایران شرکت Ibrosco) کشت و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت گرماگذاری گردیدند تا سویه‌های قارچی رشد نمایند. سپس جهت تهیه سوسپانسیون قارچی، مقداری از کلنی رشدکرده، از کشت ۷۲ ساعته هر قارچ مطابق با استاندارد نیم‌مک‌فارلند (5/1 ×108 CFU/ml)، در۳ تا ۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی سترون حل‌گردید و کدورت آن تنظیم‌شد (١٦).

د) بررسی خواص ضد قارچی گونه های باسیلوس: جهت بررسی فعالیت ضدقارچی گونه‌های *باسیلوس* جداسازی شده از نمونه‌های خاک، از روش چاهک‌گذاری استفاده شد (١٤). از هر سوسپانسیون قارچی، به کمک سوآپ در محیط پوتیتو دکستروزآگار، کشت یکنواخت داده‌شد. درادامه چاهک‌هایی در پلیت حفر و انتهای آن‌ها با آگارمذاب بسته شد با کمک سمپلر در یک چاهک، میزان ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون گونه‌های *باسیلوس* در محیط نوترینت براث (کشور ایران شرکت Ibrosco) و (با شرایط گرماگذاری ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، دور چرخش 160 RPMو کدورت معادل با استاندارد نیم مک فارلند) و در چاهک دوم میزان ۵۰ میکرولیتر از سوپرناتانت (مایع رویی) باکتری ریخته شد.سوپرناتانت باکتری که با قراردادن لوله‌های اپندورف سترون حاوی سوسپانسیون ٢٤ ساعته باکتری، در سانتریفیوژ یخچال‌دار (لیپوپپتیدهای ضدقارچی ترکیبات حساس به حرارت بالا هستند به همین علت در این مرحله از سانتریفیوژ یخچال‌دار استفاده گردید) با دور RPM12000، به مدت ۱۵دقیقه و دمای ۵ درجه سلسیوس، به‌دست‌آمد (١٦).سپس پلیت‌ها در انکوباتور یخچال‌دار، در دمای ۲۵درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت گرماگذاری شدند. برای هر نمونه باکتری ۳ بار تکرار آزمایشات در نظر گرفته‌شد و به عنوان شاهد عدم‌رشد (کنترل منفی)، ۵۰ میکرولیتر محیط نوترینت براث سترون، در یک چاهک ریخته شد (١٦). در ادامه قطر هاله عدم رشد ایجادشده در اطراف چاهک‌ها، به کمک خط‌کش آنتی‌بیوگرام اندازه‌گیری شد و به کمک آزمون آنالیزی دامنه دانکن (LSD)، بهترین گونه، که دارای بیشترین قطر هاله عدم رشد (بیشترین فعالیت ضدقارچی) بود، به‌عنوان گونه منتخب انتخاب گردید. برای هر آزمایش۳ تکرار درنظرگرفته‌شد (١٦).

ه) بهینه‌سازی فعالیت ضدقارچی گونه باسیلوس منتخب: منبع کربن: به‌منظور بررسی تاثیر منبع کربن از سه قند گلوکز، لاکتوز و نشاسته به میزان ۰/۰۵ گرم در لیتر استفاده‌شد که به صورت جداگانه جایگزین عصاره گوشت (منبع کربن) در محیط نوترینت براث (عصاره‌گوشت ۰/۰۵ گرم درلیتر، پپتون۱گرم درلیتر، نمک ۱گرم در لیتر) شدند. پس از کشت گونه منتخب

در محیط‌های تهیه شده، نمونه‌های مورد نظر در انکوباتورشیکردار، در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و دور RPM 160 به مدت ۲٤، ٤٨ و ۷۲ ساعت گرماگذاری شدند (۱٦). هم‌چنین از کشت گونه منتخب در محیط نوترینت براث سترون به‌عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر سترون به‌عنوان کنترل منفی استفاده‌شد. میزان فعالیت ضد قارچی و قطر هاله عدم‌رشد هر کدام به کمک روش چاهک‌گذاری و آزمون آنالیزی دامنه دانکن علیه دو قارچ *آسپرژیلوس توبینجنسیس* و *فوزاریوم فوجی کوروای* مورد بررسی قرارگرفت و برای هر آزمایش۳ بار تکرار در نظر گرفته شد (۱٦).

منبع نیتروژن: در این مرحله تاثیر منابع نیتروژن مختلف شامل: ازت آلی (عصاره مخمر) و ازت معدنی (نیترات آمونیوم و نیترات پتاسیم) مورد بررسی قرارگرفت که به میزان ۱گرم در لیتر، به صورت جداگانه جایگزین پپتون (منبع نیتروژن) در محیط نوتریت براث شدند. بهترین منبع کربن (مشخص‌شده از مرحله قبل) نیز جایگزین عصاره‌گوشت در محیط نوترینت براث شد. پس از کشت گونه منتخب در محیط‌های تهیه شده در انکوباتورشیکردار، در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و دور RPM160 به مدت۲٤، ٤٨ و ۷۲ ساعت گرماگذاری شدند (۱٦). هم‌چنین از کشت گونه منتخب در محیط نوترینت براث سترون به‌عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر سترون به عنوان کنترل منفی استفاده شد. میزان فعالیت ضدقارچی و قطر هاله عدم‌رشد هر کدام به کمک روش چاهک‌گذاری و آزمون آنالیزی دامنه دانکن علیه دو قارچ *آسپرژیلوس توبینجنسیس* و و *فوزاریوم فوجی کوروای* مورد بررسی قرارگرفت و برای هر آزمایش۳ بار تکرار درنظرگرفته شد (۱٦).

اسیدیته: محیط کشت بهینه، حاوی بهترین منبع کربن و بهترین منبع نیتروژن (با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در مرحله ۱و۲) تهیه‌گردید. به کمک اسیدکلریدریک و هیدروکسیدسدیم ۱ نرمال و pH متر، هرکدام در محدوده pH اسیدی (۵)، pH خنثی (۷) و pH بازی (۹) تنظیم شدند و مطابق با روش ذکر شده در مرحله ۱و۲پس ازکشت و گرماگذاری، قطر هاله عدم رشد هر کدام به کمک روش چاهک‌گذاری و آزمون آنالیزی دامنه دانکن علیه دو قارچ *آسپرژیلوس توبینجنسیس* و *فوزاریوم فوجی کوروای* مورد بررسی قرارگرفت. هم‌چنین از کشت گونه منتخب در محیط نوترینت براث سترون به‌عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر سترون به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد و برای هر آزمایش۳ بار تکرار درنظرگرفته شد (۱٦).

و) تخلیص متابولیت‌های ضدقارچی ازگونه منتخب: جهت تخلیص متابولیت‌های ضدقارچی گروه ایتورین گونه منتخب در ۲۵۰ میلی‌لیتر محیط بهینه (مشخص شده از مرحله قبل) در ارلن‌مایر ۱ لیتری کشت و به مدت ٤۸ساعت در انکوباتور شیکردار با دور RPM 160 و دمای ۳۷ درجه سلسیوس، گرماگذاری شد. سپس محیط‌ها با دور RPM6621 و دمای ۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه در سانترفیوژ یخچال‌دار قرارگرفتند. پس از سانترفیوژ، یک رسوب زرد – صورتی و سوپرناتانت تشکیل‌شد. درادامه، سوپرناتانت حاصل به کمک اسیدکلریدریک ٦ نرمال به pH معادل۲رسید (۱٦). سوپرناتانت اسیدی مجدد با دور RPM 13000 و دمای ۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه در سانترفیوژ یخچال‌دار قرارگرفت. رسوب حاصل در متانول حل‌شد (متانول مناسب‌ترین حلال جهت انحلال لیپوپپتیدهای ضدقارچی است) و بار دیگر با دور RPM 13000 و دمای ۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه در سانترفیوژ یخچال‌دار قرارگرفت (۱٦). سوپرناتانت حاصل، همان متابولیت‌های ضدقارچی تولیدشده توسط گونه منتخب است که پس از۳ مرحله سانترفیوز به‌دست آمد.سپس عصاره متانولی داخل میکروتیوب ریخته‌شده و در دمای ٤ درجه سلسیوس نگهداری شد تا در مراحل بعد مورد استفاده قرار گیرد (۱٦).

ز) بررسی فعالیت ضدقارچی عصاره متانولی خالص‌سازی شده گونه منتخب با روش چاهک‌گذاری: در روش چاهک‌گذاری جهت اطمینان بیشتر از تولید متابولیت‌های ضدقارچی توسط گونه منتخب، از عصاره متانولی تخلیص‌شده (سوپرناتانت حاصل از سانترفیوژ کشت ٤۸ ساعته باسیلوس منتخب در محیط کشت بهینه) به‌عنوان کنترل مثبت و از آب مقطرسترون به‌عنوان کنترل منفی، استفاده شد. قطر هاله عدم رشد هر کدام

از قارچ‌ها با استفاده از خط‌کش آنتی‌بیوگرام اندازه‌گیری شد و با استفاده از آزمون آنالیزی دامنه دانکن، مورد بررسی قرارگرفت (۲۰).

ح) آنالیزمتابولیت‌های ضدقارچی گونه منتخب با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی (GC- MS): عصاره متانولی حاصل از گونه منتخب جهت آنالیزمتابولیت‌های ضدقارچی به کمک روش کروماتوگرافی‌گازی – طیف سنج جرمی به مرکز آنالیزهای شیمیایی کیمیازی (شهرتهران) فرستاده شد. آنالیز لیپوپپتیدهای ضدقارچی، با دستگاه (Agilent6890 شرکت Agilent technologies) و ستون HP با مشخصات 1MS و به ابعاد 08.8 m×218µm×8.21µm و با سرچ کتابخانه (NISTof version 2) انجام‌شد. نمونه به‌طور مستقیم به میزان یک میکرولیتر به دستگاه GC-MS با مد split تزریق شد و در ادامه از گاز هلیوم به‌عنوان گاز حامل استفاده گردید. پس از تزریق نمونه با شرایط یاد شده به دستگاه، نتیجه به صورت پیک‌هایی در منحنی کروماتوگرام حاصله مشخص‌شد و زمان ظهور (Retention time) و محدوده زیر هر پیک به صورت جداگانه ثبت گردید (۲۰).

ن) شناسایی مولکولی گونه منتخب: به‌منظور شناسایی دقیق جنس‌وگونه منتخب، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) انجام شد. DNA گونه منتخب طی روش جوشاندن جداسازی‌گردید. در مرحله بعد از آغازگر رفت 5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3' و آغازگر برگشت 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3 در جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز استفاده شد (۱۶). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به‌ترتیب زیرانجام شد: واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۹۰ ثانیه و طویل‌شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد (۱۶). در مرحله بعد محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از الکتروفورز در ژل آگاروز ۰/۱ درصد بررسی و محصول به‌دست‌آمده جهت تعیین توالی و رسم درخت فیلوژنتیکی (Phylogenetic Tree) به شرکت ژن ایران (ایران-تهران) ارسال شد و جهت تایید شناسایی باکتری‌ها، توالی‌های حاصله با استفاده از بلاست (BLAST) با توالی نوکلئوتیدی موجود در بانک اطلاعات ژنی تطبیق داده شد (۱۶).

ی) تجزیه و تحلیل آماری: جهت تجزیه و تحلیل داده‌های آماری و بررسی اختلاف معنی‌دار در میانگین قطر هاله عدم‌رشد گونه منتخب، از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA)، استفاده‌گردید. همچنین جهت تعیین بیشترین میانگین قطر هاله عدم‌رشد گونه منتخب، از آزمون چند دامنه دانکن استفاده‌شد. تمامی مراحل با نرم افزار SPSS نسخه ۱۶و سطح معنادار کمتر از ۰/۰۵ انجام گردید (۱۶).

یافته‌ها

الف) جداسازی و شناسایی اولیه گونه‌های باسیلوس: در این مرحله، براساس خصوصیات ریخت شناسی، ۶۰ کلنی سفید رنگ مایل به کرم، با قوام کره‌ای، سطحی خشن و حاشیه دندانه دار، جداسازی‌شده و از آن‌ها کشت ٤ مرحله‌ای تهیه‌گردید. در نهایت ٤۰ گونه *باسیلوس* (گرم مثبت هوازی، اسپوردار، کاتالاز مثبت) شناسایی‌شدند و این گونه‌ها به‌منظور بررسی‌های بعدی در دمای ٤ درجه سلسیوس، در یخچال قرارگرفتند. جهت ذخیره‌سازی گونه‌های غربال شده، با استفاده از گلیسرول ۲۰٪ سترون شده، استوک گلیسرولی تهیه و در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

د) بررسی خواص ضدقارچی گونه های باسیلوس: فعالیت ضدقارچی ٤۰ گونه *باسیلوس* شناسایی شده، به کمک روش چاهک‌گذاری مورد بررسی قرارگرفت. همانگونه که در جدول شماره۱ نشان داده شده است، از این تعداد، پنج گونه دارای فعالیت ضدقارچی بود که در تکرارهای بعدی (گونه *باسیلوس تویونننسیس* با کد شماره ۱۲)، طی گرماگذاری با دور RPM160 و دمای ۳۷ درجه سلسیوس، به مدت ٢٤ ساعت، بیشترین فعالیت ضدقارچی را به ترتیب با میانگین قطرهاله عدم رشد ۲٦±۰/۲٦۵ و ۲۵±۰/۲٦۵ میلی‌متر پس از ٤۸ ساعت

گرماگذاری علیه دو قارچ *آسپرژیلوس توبینجنسیس* و *فوزاریوم فوجی کوروای* از خود نشان داد ($p \leq 0/05$) و به‌عنوان گونه منتخب، برگزیده شد. گونه منتخب از خاک پارک جمشیدیه واقع در منطقه یک تهران، جداسازی شده است.

در روش چاهک‌گذاری با استفاده مستقیم از سوسپانسیون باکتریایی و با استفاده ازسوپرناتانت سانترفیوژ شده از باکتری‌های غربال شده با دور RPM 12000 و دمای ۵ درجه‌ی سلسیوس نتایج مشابهی را در مهار رشد قارچ‌ها نشان دادند که نتایج هردو، در جدول شماره۱ ذکر شده‌است.

جدول ۱: نتایج میانگین قطر هاله‌ی عدم‌رشد *آسپرژیلوس توبینجنسیس* و *فوزاریوم فوجی‌کوروای* در اثر فعالیت ضدقارچی ۵ گونه *باسیلوس*منتخب.

نام قارچ	کد گونه *باسیلوس*				
	۱۲	۱۷	۲۰	۲۴	۲۵
آسپرژیلوس توبینجنسیس	۲۶±۰/۲۶۵^{a}	۱۴±۰/۲۶۵^{ac}	۱۷±۰/۲۶۵^{ab}	۱۸±۰/۲۶۵^{b}	۱۶±۰/۲۶۵^{c}
فوزاریوم فوجی کوروای	۲۵±۰/۲۶۵^{a}	۱۶±۰/۲۶۵^{ac}	۱۵±۰/۲۶۵^{ab}	۲۰±۰/۲۶۵^{b}	۱۹±۰/۲۶۵^{c}

حروف نامتشابه در هرردیف، اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد ($p \leq ۰/۰۵$).

در ادامه بر طبق جدول شماره۱و انجام آزمون دامنه دانکن، تمامی جفت‌های ممکن (خواص ضدقارچی ۵گونه منتخب *باسیلوس*)، اختلاف معنی‌داری با هم داشتند. فعالیت ضدقارچی گونه *باسیلوس تویونسیس* با کد شماره ۱۲، در بالاترین گروه آماری (a) قرار گرفت درنتیجه دارای بالاترین میزان فعالیت ضدقارچی بود که به‌عنوان گونه منتخب برگزیده شد. با توجه به جدول ۵ بهترین زمان تولید متابولیت‌های ضدقارچی توسط گونه‌منتخب، در محیط‌کشت بهینه (حاوی گلوکز و عصاره مخمر به‌عنوان بهترین منابع کربن و نیتروژن)، pHخنثی، دمای ۳۷درجه سلسیوس و گرماگذاری با دور RPM160، از ۲۴ تا ۴۸ ساعت است.

ه) بهینه‌سازی فعالیت ضدقارچی گونه منتخب: بر اساس نتایج به‌دست‌آمده (جداول۲، ۳، ۴ و ۵) گلوکز به‌عنوان بهترین منبع کربن، عصاره مخمر به‌عنوان بهترین منبع نیتروژن، pH خنثی (محدوده ۷) به‌عنوان بهترین اسیدیته، می‌تواند منجر به افزایش تولید متابولیت‌های ضدقارچی تولید شده توسط گونه منتخب *باسیلوس تویونسیس* شود.

مقایسه فعالیت ضدقارچی گونه‌ی منتخب درحضور منابع مختلف کربن: نتایج حاصل از بررسی میزان فعالیت ضدقارچی و میانگین قطر هاله عدم‌رشد گونه منتخب *باسیلوس تویونسیس* علیه دو قارچ *آسپرژیلوس توبینجنسیس* و *فوزاریوم فوجی کوروای* در محیط‌کشت حاوی منابع مختلف کربن (گلوکز، لاکتوز و نشاسته) طبق جدول شماره۲ می‌باشد.

جدول ۲: نتایج میانگین قطر هاله عدم‌رشد *آسپرژیلوس توبینجنسیس* و *فوزاریوم فوجی کوروای* دراثر فعالیت ضد قارچی گونه منتخب *باسیلوس تویونسیس* در حضور منابع مختلف کربن بعد از ۲۴ ساعت گرماگذاری.

منابع کربن	*آسپرژیلوس توبینجنسیس*	*فوزاریوم فوجی کوروای*
گلوکز	۲۸±۰/۲۶۵^{a}	۲۷±۰/۲۶۵^{a}
لاکتوز	۲۳±۰/۲۶۵^{b}	۵۵±۰/۲۶۵^{b}
نشاسته	۱۶ ±۰/۲۶۵^{c}	۱۵±۰/۲۶۵^{c}

حروف نامتشابه در هرردیف، اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد ($p \leq ۰/۰۵$).

در ادامه با انجام آزمون دامنه‌دانکن، تمامی جفت‌های ممکن، درمحیط‌کشت‌هایی با منابع گلوکز، لاکتوز و نشاسته اختلاف معنی‌داری با هم داشتند. برطبق جدول شماره۲، خواص ضدقارچی گونه منتخب *باسیلوس تویونسیس* علیه دو قارچ *آسپرژیلوس توبینجنسیس* و *فوزاریوم فوجی کوروای* در محیط‌کشت حاوی گلوکز، با میانگین قطر هاله عدم‌رشد به ترتیب ۲۸±۰/۲۶۵ و ۲۷±۰/۲۶۵ میلی‌متر بود که در بالاترین گروه آماری (a) قرارگرفت ($p \leq ۰/۰۵$) درنتیجه گلوکز به‌عنوان بهترین منبع کربن انتخاب‌شد.

مقایسه فعالیت ضدقارچی گونه‌ی منتخب درحضور منابع مختلف نیتروژن: نتایج حاصل از بررسی میزان فعالیت

ضدقارچی و میانگین قطر هاله عدم رشد گونه منتخب *باسیلوس تویونسیس* علیه دو قارچ *آسپرژیلوس توبینجنسیس* و *فوزاریوم فوجی کوروای* در محیط کشت حاوی منابع مختلف نیتروژن(عصاره مخمر، نیترات‌آمونیوم و نیترات پتاسیم) طبق جدول شماره۳ می‌باشد.

جدول ۳: نتایج میانگین قطر هاله عدم‌رشد *آسپرژیلوس توبینجنسیس* و *فوزاریوم فوجی کوروای* دراثر فعالیت ضدقارچی گونه منتخب *باسیلوس تویونسیس* در حضور منابع مختلف نیتروژن بعد از ۲٤ ساعت گرماگذاری.

منابع نیتروژن	*آسپرژیلوس توبینجنسیس*	*فوزاریوم فوجی کوروای*
عصاره مخمر	۲۹±۰/۲٦٥[a]	۲۸±۰/۲٦٥[a]
نیترات آمونیوم	۱۳±۰/۲٦٥[c]	۱۲±۰/۲٦٥[c]
نیترات پتاسیم	۱٥±۰/۲٦٥[b]	۱٤±۰/۲٦٥[b]

حروف نامتشابه در هرردیف، اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد ($p \leq ۰/۰٥$).

در ادامه با انجام آزمون دامنه دانکن، تمامی جفت‌های ممکن، در محیط‌کشت‌هایی با منابع عصاره مخمر، نیترات آمونیوم و نیترات پتاسیم اختلاف معنی‌داری با هم داشتند. طبق جدول شماره ۳، خواص ضدقارچی گونه منتخب *باسیلوس تویونسیس* علیه دو قارچ *آسپرژیلوس توبینجنسیس* و *فوزاریوم فوجی کوروای* در محیط‌کشت حاوی عصاره مخمر، با میانگین قطر هاله عدم رشد به ترتیب ۲۹±۰/۲٦٥ و ۲۸±۰/۲٦٥ میلی‌متر بود ($p \leq ۰/۰٥$). که در بالاترین گروه آماری (a) قرارگرفت درنتیجه عصاره‌مخمر به‌عنوان بهترین منبع نیتروژن انتخاب شد.

مقایسه فعالیت ضدقارچی گونه‌ی منتخب در محیط‌کشت‌هایی با pH اسیدی، خنثی و قلیایی: نتایج حاصل از بررسی میزان فعالیت ضدقارچی و میانگین قطر هاله عدم رشد گونه منتخب *باسیلوس* علیه دو قارچ *آسپرژیلوس توبینجنسیس* و *فوزاریوم فوجی کوروای* در محیط‌کشت‌هایی با pH اسیدی، خنثی و قلیایی طبق جدول شماره٤ می‌باشد.

در ادامه با انجام آزمون دامنه دانکن، تمامی جفت‌های ممکن، درمحیط‌کشت‌هایی با pH اسیدی، خنثی و قلیایی اختلاف معنی‌داری با هم داشتند. طبق جدول شماره ٤، خواص ضد قارچی گونه منتخب *باسیلوس تویونسیس* علیه دو قارچ *آسپرژیلوس توبینجنسیس* و *فوزاریوم فوجی کوروای* درمحیط‌کشت با pH خنثی، با میانگین قطر هاله عدم‌رشد به ترتیب ۲۹±۰/۲٦٥ و ۲۸±۰/۲٦٥ میلی‌متر بود.($p \leq ۰/۰٥$)که در بالاترین گروه آماری (a) قرارگرفت درنتیجه pH خنثی به‌عنوان بهترین اسیدیته انتخاب شد.

مقایسه فعالیت ضدقارچی گونه‌ی منتخب در محیط کشت بهینه، در فواصل زمانی۲٤، ٤٨ و ۷۲ ساعت گرماگذاری: میانگین قطر هاله عدم رشد سوسپانسیون ۲٤ ساعته گونه منتخب *باسیلوس تویونسیس* در محیط کشت حاوی منبع کربن گلوکز، منبع نیتروژن عصاره مخمر، pH خنثی و دمای ۳۷ درجه سلسیوس علیه *آسپرژیلوس توبینجنسیس* و *فوزاریوم فوجی کوروای* به ترتیب ۲۹±۰/۲٦٥ و ۲۸±۰/۲٦٥ میلی‌متر بود. ($p \leq ۰/۰٥$) که افزایش معناداری نسبت به میانگین قطر هاله عدم رشد کنترل مثبت (سوسپانسیون ۲٤ ساعته گونه منتخب *باسیلوس تویونسیس* در محیط کشت نوترینت براث) به‌ترتیب با اندازه ۲٦±۰/۲٦٥و ۰/۲٦٥± ۲٥ میلی‌متر داشت ($p \leq ۰/۰٥$).

جدول ٤: نتایج میانگین قطر هاله عدم رشد *آسپرژیلوس توبینجنسیس* و *فوزاریوم فوجی کوروای* دراثر فعالیت ضدقارچی گونه منتخب *باسیلوس تویونسیس* در محیط کشت‌هایی با pH اسیدی، خنثی و قلیایی بعد از ۲٤ ساعت گرماگذاری.

pH	*آسپرژیلوس توبینجنسیس*	*فوزاریوم فوجی کوروای*
اسیدی	۱٥±۰/۲٦٥[b]	۱٤±۰/۲٦٥[b]
خنثی	۲۹±۰/۲٦٥[a]	۲۸±۰/۲٦٥[a]
قلیایی	۱۳±۰/۲٦٥[c]	۱۲±۰/۲٦٥[c]

حروف نامتشابه در هرردیف، اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد ($p \leq ۰/۰٥$).

در ادامه با انجام آزمون دامنه دانکن، تمامی جفت‌های ممکن، در۲٤ ساعت، ٤٨ ساعت و۷۲ ساعت اختلاف معنی‌داری با هم داشتند.بر طبق جدول شماره ٥ بیشترین خواص ضدقارچی گونه منتخب *باسیلوس تویونسیس* علیه *آسپرژیلوس توبینجنسیس* و *فوزاریوم فوجی کوروای* در محیط کشت بهینه

(گلوکز۰/۰۵ گرم در لیتر، عصاره مخمر۱ گرم در لیتر، نمک۱گرم در لیتر)، pH خنثی (محدوده ۷) و دمای ۳۷ درجه سلسیوس در مدت زمان ۴۸ ساعت گرماگذاری بود، (به‌ترتیب با میانگین قطر هاله عدم رشد ۳۱±۰/۲۶۵ و ۳۰±۰/۲۶۵ میلی‌متر) که در بالاترین گروه آماری (a) قرارگرفت ($p \leq 0/05$). همچنین میزان تولید متابولیت‌های ضد قارچی در ۷۲ ساعت، (به‌ترتیب با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۳±۰/۲۶۵ و ۱۲±۰/۲۶۵ میلی‌متر) نسبت به سوسپانسیون ۲۴ ساعته و ۴۸ ساعته روند کاهشی و کاهش معناداری داشت ($p \leq 0/05$).

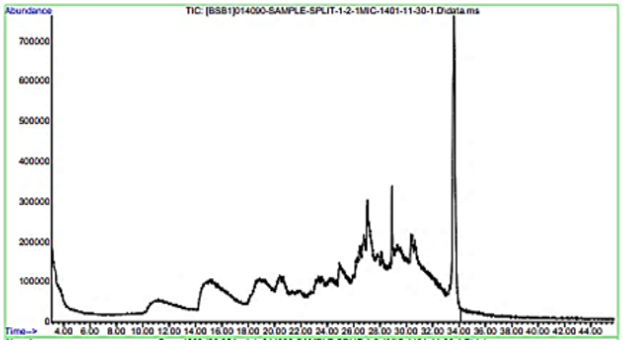
جدول ۵: نتایج میانگین قطر هاله عدم‌رشد *آسپرژیلوس توبینجنسیس* و *فوزاریوم فوجی‌کوروای* در اثر فعالیت ضدقارچی گونه منتخب *باسیلوس تویونسیس* در محیط کشت بهینه حاوی بهترین منبع کربن (گلوکز)، بهترین منبع نیتروژن (عصاره مخمر)، pH خنثی در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت گرماگذاری.

زمان	*آسپرژیلوس توبینجنسیس*	*فوزاریوم فوجی کوروای*
۲۴ ساعت	۲۹±۰/۲۶۵^{b}	۲۸±۰/۲۶۵^{b}
۴۸ ساعت	۳۱±۰/۲۶۵^{a}	۳۰±۰/۲۶۵^{a}
۷۲ ساعت	۱۳±۰/۲۶۵^{c}	۱۲±۰/۲۶۵^{c}

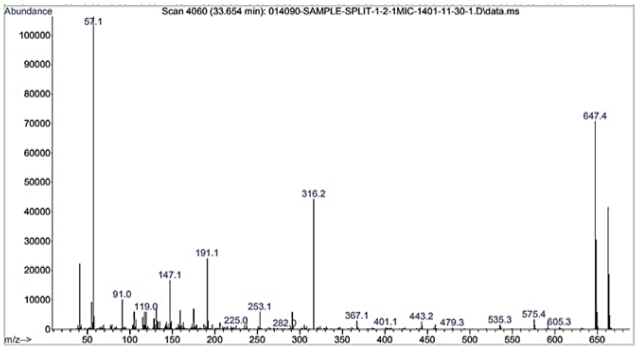
حروف نامتشابه در هرردیف، اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد ($p \leq 0/05$).

ح) آنالیزمتابولیت‌های ضدقارچی گونه منتخب با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی: نتایج حاصل ازآنالیز کروماتوگرافی گازی- طیف سنج جرمی عصاره متانولی استخراج‌شده از *باسیلوس تویسیس*، با مقایسه مشخصات و با مراجعه به منابع و مقالات شماره (۲۸،۲۹،۲۱،۲۲،۱۷،۲۰، ۳۰و۳۱) و با توجه به شکل شماره ۲،۱، ۳و۴ نشان‌داده شده‌است.

گونه منتخب *باسیلوس تویونسیس*، ترکیب شماره ۱ (شکل۳)، چهارمین پیک شاخص، با نام 3',8,8'-Trimethoxy-3-piperidyl-2,2'-binaphthalene-1,1',4,4'-tetrone و فرمول مولکولی $C_{28}H_{25}NO_7$ فاکتور تطابق (MF) ۶۸۳ و فاکتور تطابق معکوس (RMF)۷۴۵، (که

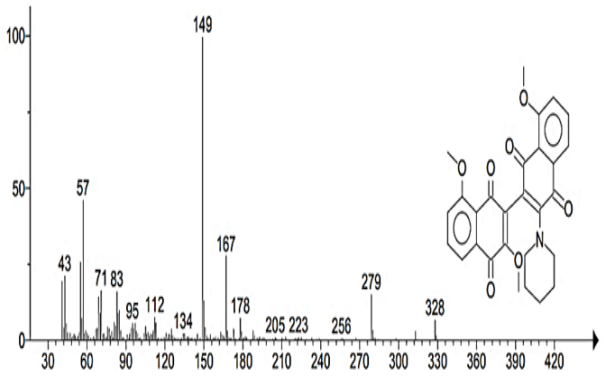


شکل ۱: منحنی کروماتوگرام عصاره متانولی متابولیت ضدقارچی استخراج‌شده از *باسیلوس تویونسیس*.

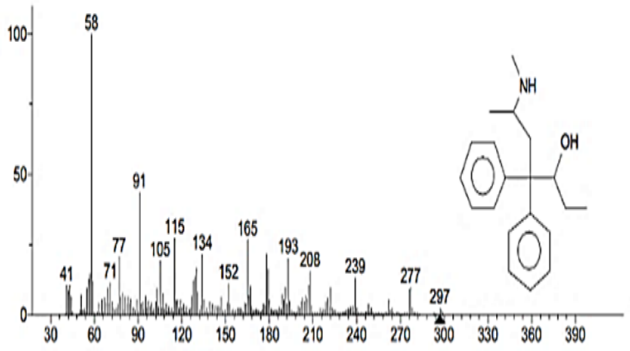


شکل ۲: کروماتوگرام طیف سنجی جرمی مربوط به عصاره متانولی استخراج شده از گونه منتخب *باسیلوس تویونسیس* دراین نمودار شدت نسبی یون‌ها در m/z = 57/1 به فراوان‌ترین حالت نرمال شده است که بلندترین پیک بوده و به پیک مادر معروف است. دومین پیک بلند در m/z =647/4 و سومین پیک بلند در m/z =316/2 نرمال شده است. همچنین یون مولکولی در m/z = 647/4 (بیشترین میزان m/z) مشاهده شده است.

میزان فاکتور تطابق و فاکتور تطابق معکوس این ترکیب درمحدوده ۶۰۰ تا ۸۰۰ قرار گرفته‌است که نشان دهنده تطابق خوب است). همچنین در زمان بازداری ۲۸/۹۱۱ دقیقه، یک لیپوپپتیدضدقارچی باسطح زیر منحنی۶۲/۶ درصد تولید کرده است، که یک لیپوپپتید حلقوی مشابه با لیپوپپتیدهای حلقوی ضدقارچی است که این ترکیب می‌تواند جزئی از مواد تشکیل‌دهنده ترکیبات ضدقارچی مانند فنجسین (Fangycin)، سورفاکتین (Surfactin) و یا ایتورین باشد. ترکیب شماره۱، درصد بیشتری از لیپوپپتیدهای حلقوی موجود در عصاره متانولی استخراج‌شده از گونه منتخب را به خود اختصاص داده است.



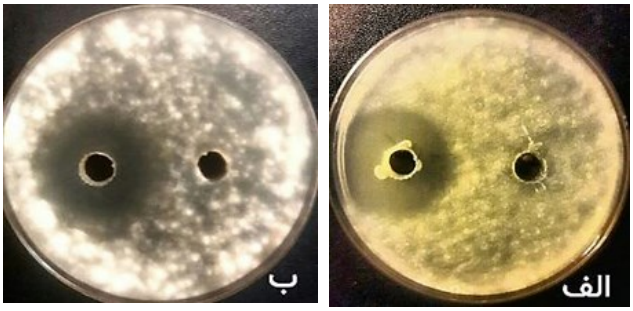
شکل ۳: کروماتوگرام طیف‌سنجی جرمی مربوط به ترکیب شماره ۱ (لیپوپپتید حلقوی) شناسایی‌شده از عصاره متانولی استخراج‌شده از گونه منتخب *باسیلوس تویننسیس* است که در این نمودار شدت نسبی یون‌ها در m/z =149 به فراوان‌ترین حالت نرمال شده است که بلند ترین پیک بوده و به پیک مادر معروف است و دومین پیک بلند در m/z =57 و سومین پیک بلند در m/z =167 نرمال شده‌است و یون مولکولی در m/z =328 مشاهده شده است.



شکل ٤: کرومانوگرام طیف سنجی جرمی مربوط به ترکیب شماره ۲(لیپوپپتید حلقوی) شناسایی‌شده از عصاره متانولی استخراج‌شده، از گونه منتخب *باسیلوس تویونننسیس* ارائه شده که دراین نمودار شدت نسبی یون‌ها در m/z =58 به فراوان‌ترین حالت نرمال شده است که بلندترین پیک بوده و به پیک مادر معروف است. دومین پیک بلند در m/z =91 و سومین پیک بلند در m/z =115 نرمال شده‌است و یون مولکولی در m/z =277 مشاهده شده است.

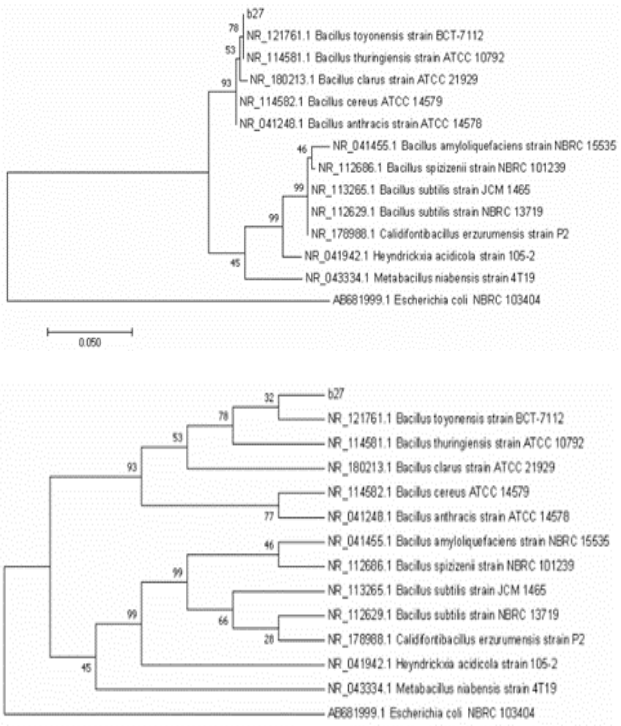
در ادامه با توجه به شکل شماره ٤، دومین پیک شاخص، ترکیب شماره ۲ با نام α-N-Normethadol با فرمول‌مولکولی $C_{20}H_{27}NO$ و فاکتورتطابق (MF) ٦٤٢ و فاکتور تطابق‌معکوس (RMF) ٦٤٥ (که میزان فاکتورتطابق و فاکتورتطابق‌معکوس این ترکیب در محدوده ٦۰۰ تا ۸۰۰ قرار گرفته است که نشان‌دهنده تطابق خوب است) همچنین در زمان بازداری ۲۳/۳۳۳ دقیقه یک لیپوپپتید حلقوی ضدقارچی با سطح زیر منحنی ۵/۷۳ درصد تولید کرده است، که این ترکیب می‌تواند جزئی از مواد تشکیل دهنده ترکیبات ضدقارچی مانند فنجسین، سورفاکتین و یا ایتورین باشد. که این ترکیب درصد کمی از لیپوپپتیدهای حلقوی موجود در عصاره متانولی استخراج شده از گونه منتخب را به خود اختصاص داده است. نتایج نشان می‌دهد که دو ترکیب لیپوپپتید حلقوی در عصاره متانولی استخراج‌شده از گونه منتخب *باسیلوس تویوننسیس* شناسایی شده است که مجموعا ٦۸/۳۳ درصد از عصاره را به خود اختصاص می‌دهد.

ز) بررسی فعالیت ضدقارچی عصاره متانولی خالص‌سازی شده از باسیلوس تویونسیس با روش چاهک‌گذاری: طبق نتایج به‌دست‌آمده (شکل۵)، میانگین قطرهاله عدم رشد حاصل از عصاره متانولی تخلیص‌شده از گونه منتخب *باسیلوس تویوننسیس*، در محیط کشت بهینه (گلوکز ۰/۰۵ گرم در لیتر، عصاره مخمر ۱ گرم در لیتر، نمک ۱گرم در لیتر)، pH خنثی و گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ٤۸ ساعت علیه دو قارچ *آسپرژیلوس توبینجنسیس* و *فوزاریوم فوجی کوروای* که به‌ترتیب ۳۳±۰/۲٦۵ و ۳۲±۰/ ۲٦۵ میلی‌مترگزارش شد ($p\leq$۰/۰۵). نسبت به میانگین قطر هاله عدم رشد سوسپانسیون ۲٤ ساعته در محیط نوترینت براث علیه دو قارچ *آسپرژیلوس توبینجنسیس* و *فوزاریوم فوجی کوروای* که به‌ترتیب ۲٦±۰/۲٦۵و ۲۵±۰/۲٦۵ میلی‌متر بود، افزایش معناداری داشت ($p\leq$۰/۰۵). هم‌چنین نسبت به میانگین قطر هاله عدم‌رشد سوسپانسیون ۲٤ ساعته و ٤۸ ساعته گونه منتخب *باسیلوس تویوننسیس* در محیط کشت بهینه (گلوکز و عصاره‌مخمر) و pH خنثی و گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، علیه *آسپرژیلوس توبینجنسیس* که به‌ترتیب ۰/۲٦۵ ± ۲۹و ۳۱±۰/۲٦۵ میلی‌متر بود ($p\leq$۰/۰۵) و علیه *فوزاریوم فوجی کوروای* که به‌ترتیب ۰/۲٦۵ ± ۲۸و ۳۰±۰/۲٦۵ میلی‌متر ($p\leq$۰/۰۵) بود، روند افزایشی و افزایش معناداری داشت.



شکل ۵: قطر هاله‌ی عدم رشد *آسپرژیلوس توبینجنسیس* (الف) و *فوزاریوم فوجی کوروای* (ب) در اثر فعالیت ضدقارچی عصاره متانولی‌تخلیص شده از گونه منتخب *باسیلوس تویونسیس* در محیط کشت بهینه (گلوکز و عصاره مخمر)، pH خنثی و دمای ۳۷ درجه سلسیوس، به مدت ۴۸ ساعت (کنترل مثبت) و رشد هر دو قارچ در اطراف چاهک حاوی آب مقطر سترون (کنترل منفی).

ن) شناسایی مولکولی گونه منتخب: واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز جهت تکثیر قطعه 16S rRNA گونه منتخب *باسیلوس تویونسیس* انجام گردید. پس از انجام بلاستینگ در درگاه NCBI شباهت ۹۹/۸۰ درصدی گونه منتخب به *باسیلوس تویونسیس* تایید شد.



شکل ٦: رسم درخت فیلوژنی گونه منتخب *باسیلوس تویونسیس* با استفاده از نرم افزار Mega6 و الگوریتم اتصال- همسایگی ۲ و ۱۰۰۰ Bootstap.

بحث

کنترل‌زیستی عوامل بیماری‌زای گیاهی، به کمک میکروارگانیسم‌ها، روش جایگزین مناسبی برای آفت‌کش‌های شیمیایی است. برخی از باکتری‌ها مانند *باسیلوس*‌ها، با تولید متابولیت‌های ضدقارچی، نقش مهمی‌در مبارزه با قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی دارند (۲۳).

در این پژوهش از ٦۰ گونه باکتری بومی جداشده از خاک پارک‌های جنگلی شهر تهران، تعداد ٤۰ گونه به عنوان *باسیلوس* (گرم مثبت، هوازی، اسپوردار، کاتالاز مثبت) شناسایی شدند. آزمون تکمیلی شامل بررسی فعالیت ضدقارچی گونه‌ها با استفاده از روش چاهک‌گذاری، نشان‌داد که از این تعداد، پنج گونه دارای فعالیت ضدقارچی بوده که در تکرارهای بعدی گونه *باسیلوس تویونسیس* طی گرماگذاری با دور ۱٦۰RPM و دمای ۳۷ درجه سلسیوس و به مدت ۲٤ ساعت، بیشترین فعالیت ضدقارچی را به ترتیب با میانگین قطر هاله‌ی عدم رشد ۲٦۵±۰/۲٦٦ و ۲٦±۰/۲٦٦ میلی‌متر($p\leq$۰/۰۵) علیه دو قارچ *آسپرژیلوس توبینجنسیس* (عامل پوسیدگی کشمش) و *فوزاریوم فوجی کوروای* (عامل پوسیدگی طوقه و ریشه برنج) نشان داد و به‌عنوان گونه منتخب، برگزیده شد. مقایسه توالی 16S rRNA، رسم درخت فیلوژنتیکی این گونه شباهت ۹۹/۸۰ درصدی به *باسیلوس تویونسیس* دارد (۱٦). این باکتری، میله‌ای شکل، کاتالاز مثبت و اسپوردار بوده که از زیرگونه‌های گروه *باسیلوس سرئوس* (*Bacillus cereus*) است که درخاک، محصولات کشاورزی و دریاهای عمیق یافت می‌شود و از آن به‌عنوان پروبیوتیک درخوراک دام، کنترل‌زیستی و کمک به رشد گیاه تحت شرایط سخت از جمله تنش شوری استفاده می‌شود. این باکتری هوازی، متحرک و قادر به رشد در دماهای پایین (٤ درجه سلسیوس) و غلظت بالای (۸٪) نمک است (۲٤). گونه منتخب *باسیلوس تویونسیس* بیشترین فعالیت ضدقارچی خود را در محیط نوترینت براث حاوی گلوکز به‌عنوان بهترین منبع کربن، عصاره مخمر به‌عنوان بهترین منبع نیتروژن، pH خنثی (۷) و گرماگذاری با دور ۱٦۰RPM در مدت زمان ٤۸ ساعت و دمای ۳۷ درجه سلسیوس از خود نشان داد.

تخلیص متابولیت‌های ضدقارچی تولیدشده توسط گونه منتخب *باسیلوس تویونسیس* به کمک حلال متانول انجام و شناسایی و تعیین ساختار نمونه مجهول به کمک روش کروماتوگرافی گازی- طیف سنج جرمی نشان دهنده آن بودکه ترکیب لیپوپپتید حلقوی شماره۱ با فرمول مولکولی $C_{28}H_{25}NO_7$، در زمان بازداری ۲۸/۹۱۱ دقیقه و سطح زیرمنحنی ۶۲/۶ درصد و ترکیب لیپوپپتید حلقوی شماره۲ با فرمول مولکولی $C_{20}H_{27}NO$، در زمان بازداری ۲۳/۳۳۳ دقیقه و سطح زیرمنحنی ۵/۷۳ درصد تولیدشد. مجموعا ۶۸/۳۳ درصد از عصاره متانولی حاصل از گونه منتخب *باسیلوس تویونسیس* شامل ترکیباتی با ساختار لیپوپپتیدهای حلقوی گروه ایتورین از جمله ایتورین، سورفاکتین و فنجسین می‌باشد (۲۰).

نتایج حاصل توانایی گونه‌های بومی *باسیلوس* شهر تهران و متابولیت‌های تولیده توسط آن‌ها را در مقابله با قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی نشان می‌دهد. از تحقیقات مشابه انجام شده در مورد خواص ضدقارچی *باسیلوس*ها می‌توان به موارد زیر اشاره‌کرد:

نورخان (Noorkhan) و همکاران در سال 2018 به مطالعه‌ای مشابه بر روی فعالیت ضدقارچی گونه‌های *باسیلوس* در برابر *فوزاریوم* و تجزیه و تحلیل مکانیسم‌های مورد استفاده آن در کنترل‌زیستی پرداختند. این بررسی روی چهار گونه از *باسیلوس*های *Basillus simplex30N-5*، *Basillussimplex237*،*simplex11* و *Basillussubtilis30VD-* انجام‌شد..نتایج‌نشان‌دادکه *B.subtillis30VD-1* با میانگین قطر هاله عدم رشد۱۵ میلی‌متر موثرترین اثر ضدقارچی را بر روی قارچ *فوزاریوم* دارد که در مقایسه با نتایج تحقیق حاضر و با استناد به میانگین قطر هاله عدم رشد *باسیلوس* منتخب تحقیق حاضر علیه قارچ *فوزاریوم فوجی کوروای* (۲۵میلی‌متر)، نسبت به میانگین قطرهاله عدم رشد *باسیلوس* منتخب تحقیق نورخان و همکاران (۱۵میلی‌متر)، فعالیت ضدقارچی بیشتری داشته است.این تفاوت می‌تواند به دلیل تولید بیشترمتابولیت‌های ضدقارچی توسط *باسیلوس* منتخب تحقیق حاضر باشد. همچنین pH خنثی (۷) را به‌عنوان بهینه pH و دمای بهینه ۳۷ درجه سلسیوس را گزارش کردند که منجر به افزایش تولید متابولیت‌های ضدقارچی توسط گونه *باسیلوس* می‌شود که این نتایج همسو با نتایج تحقیق حاضراست (۱۲).

اویدله (Oydele) و همکاران در سال 2014 مطالعه‌ای مشابه جهت ارزیابی فعالیت ضدقارچی *باسیلوس سوبتیلیس* (*Basillus subtilis*) جدا شده از خاک انجام‌دادند. نتایج نشان داد که جدایه‌های *باسیلوس سوبتیلیس* عملکرد ضدقارچی خوبی علیه قارچ *آسپرژیلوس* با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۹ میلی‌متر دارد. که در مقایسه با نتایج تحقیق حاضر و با استناد به میانگین قطر هاله عدم رشد *باسیلوس* منتخب تحقیق حاضر علیه قارچ *آسپرژیلوس توبینجنسیس* (۲۶ میلی‌متر) نسبت به میانگین قطر هاله عدم رشد *باسیلوس* منتخب تحقیق اویدله و همکاران (۱۹میلی‌متر) فعالیت ضدقارچی بیشتری داشته است. این تفاوت می‌تواند به دلیل تولید بیشترمتابولیت‌های ضدقارچی توسط *باسیلوس* منتخب تحقیق حاضر باشد. همچنین pH بهینه (۷)، دمای بهینه ۳۷ درجه سلسیوس، گلوکز را به‌عنوان بهترین منبع کربن و بهینه مدت زمان گرماگذاری ۲۴ تا ۴۸ ساعت گزارش کردند که منجر به افزایش متابولیت‌های ضدقارچی توسط جدایه *باسیلوس* می‌شود، که این نتایج همسو با نتایج تحقیق حاضراست (۲۳).

رونگ (Rong) و همکاران در سال 2020 مطالعه‌ای مشابه جهت ارزیابی فعالیت ضدقارچی *باسیلوس سافنسیس* (*Bacillus Safensis*) و کاربرد آن به‌عنوان آفت‌کش جهت کنترل بیماری بلاست برنج انجام‌دادند. نتایج نشان می‌دهد که این سویه و ترکیبات ضدقارچی آن پتانسیل تبدیل شدن به یک آفت کش‌زیستی جهت کنترل‌زیستی بیماری بلاست برنج را دارد (۲۵).

محمدی (Mohammadi) و همکاران در سال2016 مطالعه‌ای مشابه بر روی فعالیت ضدقارچی جدایه *باسیلوس سوبتیلیس* تولیدکننده ایتورین علیه قارچ‌های بیماری‌زا *فوزاریوم مونیلیفورم* و *ورتیسیلیوم داهلی* انجام‌دادند. جدایه‌ها به خوبی توانستند متابولیت‌های ضدقارچی تولیدکنند و کاندیدای مناسبی برای کنترل زیستی قارچ های بیماری‌زای گیاهی باشند همچنین

گلوکز را به‌عنوان منبع کربن بهینه و عصاره مخمر را به‌عنوان منبع نیتروژن بهینه گزارش‌کردند که منجر به افزایش تولید متابولیت‌های ضدقارچی توسط جدایه *باسیلوس* می‌شود.که این نتایج همسو با نتایج تحقیق حاضراست (۱۶).

زاهدی (Zahedi) و همکاران در سال 2013 مطالعه‌ای مشابه جهت جداسازی و شناسایی *باسیلوس تویونسیس* مولد لیپوپپتیدهای ضدقارچی از منابع محیطی انجام دادند در نتیجه این مطالعه، میزان تولید متابولیت‌های ضدقارچی توسط *باسیلوس تویونسیس* علیه قارچ *آسپرژیلوس نایجر* (*Aspergillus niger*) در دو روز بعد از گرماگذاری، روند افزایشی داشته (زیرا لیپوپپتیدهای ضد قارچی جزو دسته متابولیت‌های ثانویه هستند و در انتهای فاز لگاریتمی و در فاز سکون چرخه رشد باکتری تولید می‌شوند) و از روز سوم به بعد روند کاهشی را از خود نشان داده‌است (این امر می تواند به علت ورود باکتری به فاز مرگ و تولید متابولیت‌های سمی باشد) که این نتایج همسو با نتایج تحقیق حاضراست (۲۶).

سلسله ذاکری (Selseleh Zakeri) و همکاران در سال 2009 مطالعه‌ای مشابه جهت ارزیابی فعالیت ضدقارچی *باسیلوس سرئوس* علیه گونه‌های بیماری‌زای گیاهی *ورتیسلیوم داهلی* و *فیتوفتورا اینفستانس* (*Phytophthora infestans*) انجام دادند. نتایج نشان داد این باکتری و متابولیت‌های آن می‌توانند از رشد قارچ‌های مورد نظر جلوگیری کنند. همچنین پپتون را به‌عنوان مناسب‌ترین منبع نیتروژن گزارش کردند که منجر به افزایش تولید متابولیت‌های ضدقارچی توسط جدایه *باسیلوس* می‌شود. که این یافته با نتایج تحقیق حاضر تفاوت دارد. این تفاوت می‌تواند به علت رشد بهتر و تولید متابولیت‌های ضدقارچی بیشتر توسط گونه *باسیلوس* منتخب مورد بررسی دراین تحقیق در محیط‌کشت دارای عصاره مخمر به‌عنوان بهترین منبع نیتروژن باشد (۲۷).

زارعی (Zarei) و همکاران در سال 2017 مطالعه‌ای مشابه با استفاده از آنالیز کروماتوگرافی‌گازی- طیف‌سنج جرمی جهت شناسایی ترکیبات موجود در عصاره متانولی تخلیص‌شده از *باسیلوس*ها انجام دادند. ٦٧ درصد از ترکیبات، مربوط به ۱۱ ماده شیمیایی بود. که بیشترین ترکیبات موجود در این عصاره مربوط به Gamma-terpinene با میزان ۲۷ درصد و زمان بازداری ۱۲دقیقه و Phenol, 2,4-bis (1,1-dimethylethyl) با میزان ۷ درصد و زمان بازداری ۲۷/۳۵ دقیقه، است که می‌تواند تشکیل دهنده بخشی از ساختار لیپوپپتیدهای ضدقارچی گروه ایتورین (ایتورین، فنجسین و سورفاکتین) باشند. و در مقایسه با نتایج تحقیق حاضر (٦٨/٣٣٪)، درصد کمتری را گزارش کرده‌اند. این ترکیبات دارای خواص ضدقارچی بوده، که با ایجاد منفذ روی غشای قارچ و افزایش نفوذپذیری آن، موجب مرگ سلول قارچ می‌شوند (۲۰).

کویلی بایوا (Koilybayeva) و همکاران درسال 2023 مطالعه‌ای مشابه جهت ارزیابی و آنالیز متابولیت‌های تولیدشده توسط برخی از گونه‌های *باسیلوس* با استفاده از کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنج جرمی انجام دادند. تجزیه و تحلیل‌ها نشان داد که ترکیبات تولید شده توسط *باسیلوس*ها شامل ترکیبات مختلفی مانند: کتون‌ها، الکل‌ها، لیپوپپتیدها، اسیدهای چرب، اترها و استرها است. عملکرد این ترکیبات در گونه‌های مختلف *باسیلوس* متفاوت است که کاربردهای مختلفی در زمینه نگهداری مواد غذایی، فعالیت‌های ضد میکروبی، صنعتی، زیست پالایی و حتی به‌عنوان عوامل کنترل زیستی دارند. در ادامه هشت ترکیب شیمیایی با غلظت‌های مختلف از گونه *باسیلوس تویونسیس* شناسایی شد. که بیشترین ترکیبات مربوط به Acetoin با میزان ۳۸/۲۵ درصد و زمان بازداری ٦/٢٤٦ دقیقه، 2,3-butanedione با میزان ١٦/٩٧ درصد و زمان بازداری ٢/٢٦٥ دقیقه، 2,3-butanediol با میزان ۷/۸۰ درصد و زمان بازداری ٩/٤٨٦ دقیقه است.عملکرد هر کدام از این ترکیبات با هم‌دیگر متفاوت است (۲۸).

ناس (Nas) و همکاران در سال 2021 مطالعه‌ای مشابه جهت تجزیه و تحلیل متابولیت‌های فعال زیستی تولیدشده توسط گونه‌های *باسیلوس* به کمک روش کروماتوگرافی گازی- طیف سنج جرمی انجام دادند. در ادامه ٥٦ ترکیب شناسایی شدند که شامل ترکیبات استر، اسیدچرب، اتر و لیپوپپتید هستند. که چنین ترکیباتی کاربردهای بیولوژیکی و دارویی گسترده‌ای

دارند (۲۹).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه و همسو بودن این نتایج با سایر مطالعات ارائه شده می‌توان نتیجه‌گیری کرد که، خاک‌های بومی مناطق جنگلی شهر تهران، منابع با پتاسیل بالا جهت جداسازی باکتری‌هایی با توانایی تولید متابولیت‌های ضد قارچی می‌باشند. همچنین تاییدی بر توانایی گونه‌های بومی کشور به‌ویژه جنس *باسیلوس تویوننسیس*، در مبارزه با قارچ‌های بیماریزای گیاهی است، که می‌توان از آن در جهت کنترل زیستی و تهیه قارچ کش‌های زیستی استفاده نمود. این لیپوپپتیدهای ضدقارچی مزایای زیادی نسبت سایر آفت‌کش‌ها دارند، از جمله سمی بودن کمتر، تجزیه زیستی بالا و خصوصیات سازگار با محیط زیست که می‌تواند جایگزین مناسبی برای قارچ‌کش‌های شیمیایی، باشند. ضمن اینکه صرفه‌ی اقتصادی تولید اینگونه از محصولات و جلوگیری از خروج ارز از کشور در ازای خرید محصولات مشابه از منابع خارجی را می‌توان با استفاده از توانمندی و دانش پایه‌ای موجود در کشور اشاعه داد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان این مقاله پژوهشی کلیه نکات اخلاقی اعم از سرقت ادبی، عدم انتشار دوگانه و تحریف داده‌ها را رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از سرکار خانم دکتر عدیمی استاد توانمند گروه قارچ شناسی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی تهران، به دلیل همکاری صمیمانه شان در این پروژه، نهایت تشکر و قدردانی را دارند.

تعارض منافع

وجود ندارد.

References

1. Doehlemann G, Ökmen B, Zhu W, Sharon A. Plant pathogenic fungi. Microbiology spectrum 2017; 5(1):5-1
2. Jiang C, Zhang X, Liu H, Xu JR. Mitogen-activated protein kinase signaling in plant pathogenic fungi. PLoS pathogens 2018; 14(3): 10-18.
3. Kostić A, Milinčić D, Petrović TS, Krnjaja V, Stanojević S, Barać M. Mycotoxins and mycotoxin producing fungi in pollen. Toxins 2019 ;11(2):64.
4. Saito H, Sasaki M, Nonaka Y, Tanaka J, Tokunaga T, Kato A. Spray application of nonpathogenic fusaria onto rice flowers controls bakanae disease (caused by Fusarium fujikuroi) in the next plant generation 2021 ;2 (7):6-18.
5. Cen Y, Lin J, Wang Y, Wang J, Liu Z. The gibberellin producer *Fusarium fujikuroi*: Methods and technologies in the current toolkit Frontiers in Bioengineering and Biotechnology2020 ; 8 (2):29 -32.
6. Papadaki A, Kachrimanidou V, Lappa I, Eriotou E, Sidirokastritis N, Kampioti A. Mediterranean raisins/currants as traditional superfoods. processing, health benefits, food applications and future trends within the bio-economy era Applied Sciences2021;11(4):16
7. Hase I, Kagatani J, Suzuki S, Yoshida S, Sakamoto K, Maitani F. Successfully treated bronchopulmonary oxalosis caused by *Aspergillus tubingensis* in a non-neutropenic patient A case report and review of the literature.Journal of Infection and Chemotherapy 2022;28(2):299 -303.
8. Rani L, Thapa K, Kanojia N, Sharma N, Singh S, Grewal A. An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. Journal of Cleaner Production 2021; 20 (9):33-37.
9. Baibakova E, Nefedjeva E, Suska-Malawska M, Wilk M, Sevriukova G, Zheltobriukhov V. Modern fungicides: Mechanisms of action, fungal resistance and phytotoxic effects. Annual Research & Review in Biology 2019 ;5 (1):6
10. Aleaghaee S, Rezaee S, Ebadi M, Zamanizadeh H. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici and induction of defensive enzyme of phenylalanine ammonialyse in tomato by Trichoderma and Bacillus antagonist isolates. Journal of Microbial World. 2019;12(2): 125-38. (in Persian)
11. Fira D, Dimkić I, Berić T, Lozo J, Stanković S. Biological control of plant pathogens by Bacillus species. Journal of biotechnology 2018; 9(1):44-55.
12. Khan N, Martínez-Hidalgo P, Ice T, Maymon M, Humm E, Nejat N. Antifungal activity of Bacillus species against Fusarium and analysis of the potential mechanisms used in biocontrol. Frontiers in microbiology 2018;9(1):23-63.

13. Desmyttere H, Deweer C, Muchembled J, Sahmer K, Jacquin J, Coutte F. Antifungal activities of Bacillus subtilis lipopeptides to two Venturia inaequalis strains possessing different tebuconazole sensitivity. Frontiers in microbiology2019;10(1):23-27
14. Devi S, Kiesewalter H, Kovács R, Frisvad J, Weber T, Larsen T. Depiction of secondary metabolites and antifungal activity of *Bacillus velezensis* DTU001. Synthetic and systems biotechnology 2019;4(3):142-9.
15. Golmoradi M, Shahidi Bonjar G, Aghighi S, Soltani Nejad M. Application of Soil-borne Streptomycetes for Biological Control against Fusarium Wilt of Cumin (Cuminum cyminum L) caused by Fusarium oxysporum fsp cumini. Journal of Microbial World. 2021;14(2). (in Persian)
16. Mohammadi A.,Akhwan -Sepehi A.,Hosseini -Dost R. Biological control of Pythium and Fusarium solani fungi by Native strains of *Bacillus subtilis* Biology of Microorganisms 2016;4(19):1–14.(in Persian)
17. Wu S,.Liu G, Zhou S, Sha Z, Sun C.Characterization of antifungal lipopeptide biosurfactants produced by marine bacterium *Bacillus* sp. CS30 . Marine Drugs 2019;17 (4):199
18. Ayslu M , Fanisovona G, Lutfullin M, Khilyas I, Minnullina L, Gilyazeva A. *Bacillus subtilis* strains with antifungal activity against the phytopathogenic fungi. Agricultural Sciences 2016 ;8(1):1-20.
19. Rafiee F, Fazeli M, Akhavan Sepahi A, Noormohammadi Z. Antifungal activity of *Bacillus subtilis* isolated from soil in Tehran's parks against *Fusarium graminearum*. The scientific research quarterly of the world of microbes. 2021; (number 4 (consecutive 49)):17-28(in Persian)
20. Zarei M, Jahdi M. Determining the antifungal properties of Bacillus sp and *Staphylococcus haemolyticus* isolated Made from the native sponge of the Persian Gulf. animal Environment Quarterly 2017 ; 9(4): 559-566(in Persian)
21. Lovestead T and Urness K. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC− MS). 2019; 5(3): 12-56
22. Ma Y, Kong Q, Qin C, Chen Y, Chen Y, Lv R, Zhou G. Identification of lipopeptides in Bacillus megaterium by two-step ultrafiltration and LC–ESI–MS/MS. Amb Express. 2016;6: 1-5.
23. Oyedele A, Ogunbanwo T. Antifungal activities of Bacillus subtilis isolated from some condiments and soil. African Journal of Microbiology Research2014;8(18):1841-9
24. Rojas D, Vences M., Sohlenkamp C, Santoyo G . *Bacillus toyonensis* COPE52 modifies lipid and fatty acid composition, exhibits antifungal activity, and stimulates growth of tomato plants under saline conditions. Current Microbiology 2020;7(3):2735-44

25. Rong S, Xu H, Li L, Chen R, Gao X, Xu Z. Antifungal activity of endophytic *Bacillus safensis* B21 and its potential application as a biopesticide to control rice blast. Pesticide biochemistry and physiology 2020;16(2):69-77

26. Zahedi A, Motamedi H, Zarei Mahmoodabadi A . Isolation and identification of Bacillusproducing antifungal antibiotics from sources environmental Microbiology BiologyChamran University, Ahvaz, Iran 2013;4(8):54-101(in Persian)

27. Zakari Sh., Akhwan Sepehi A,. Rezapanah M . Evaluation of antifungal activity of *Bacillus Cereus* against Plant pathogenic fungi Verticillium Dahliae and Phytophthora Infestans Basic Sciences Azad University Islamic 2009 ;1(78): 41–52(in Persian)

28. Koilybayeva M., Shynykul Z, Ustenova G, Waleron K, Jońca J, Mustafina K.,.Gas Chromatography– Mass Spectrometry Profiling of Volatile Metabolites Produced by Some Bacillus spp. and Evaluation of Their Antibacterial and Antibiotic Activities . Molecules 2023; 2(8):56-75

29. Nas F, Aissaoui N, Mahjoubi M, Mosbah A, Arab M, Abdelwahed S. A comparative GC-MS analysis of bioactive secondary metabolites produced by halotolerant *Bacillus* spp isolated from the Great Sebkha \ of Oran. Int Microbiol. 2021;24(3):455-470

30. Richard G, Reilly C, Pusey P, Costello C, Arrendale R,Cox R. Isolation and identification of iturins as antifungal peptides in biological control of peach brown rot with *Bacillus subtilis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry1998;36(2):366-70

31. Pathak K, Keharia H. Identification of surfactins and iturins produced by potent fungal antagonist, *Bacillus subtilis* K1 isolated from aerial roots of banyan (Ficus benghalensis) tree using mass spectrometry. 3 Biotech. 2014;283-95.