فعالیت ضدقارچی باکتری‌های بومی جداشده از خاک کشاورزی خرم‌آباد

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

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، ایران.
۲. گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران.
۳. پژوهشکدهٔ بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج، ایران.
۴. گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

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

چکیده

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

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

یافته‌ها درکل چهار جدایه، دارای اثرات ضدقارچی بسیاری بر برخی قارچ‌ها شامل **Aspergillus niger**، **Aspergillus flavus**، **Aspergillus fumigatus** و **Candida albicans** بودند. این جدایه‌ها با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی و تعیین توالی ژن **۱۶S rRNA** شناسایی شدند. پس از جست‌وجوی توالی آن‌ها از طریق **BLAST** در بانک اطلاعاتی **NCBI** جنس باکتری‌ها متعلق به دو جنس **Pseudomonas** و **Acinetobacter** بودند.

نتیجه‌گیری این اولین گزارش از بررسی فعالیت ضدقارچی باکتری‌های جداشده از خاک کشاورزی خرم‌آباد است. این باکتری‌ها می‌توانند کاندید مناسبی برای کنترل زیستی قارچ‌های بیماری‌زا باشند. استخراج، شناسایی و به‌کارگیری متابولیت‌های مهاری آن‌ها می‌تواند در طراحی و تولید داروهای ضدقارچی استفاده شود.

کلیدواژه‌ها:
جداسازی باکتری، ضدقارچ، روش انتشار دیسک، S ۱۶rRNA.

۱. مقدمه

قارچ‌ها مواد غذایی مختلف را آلوده می‌کنند و کیفیت آن‌ها را کاهش می‌دهند. همچنین با تولید متابولیت‌های ثانویه‌ای به‌نام مایکوتوکسین‌ها نظیر آفلاتوکسین، زیرالنون و دی اکسی‌نیوالنول می‌توانند اثرات سرطان‌زایی، تراتوژنیک، جهش‌زایی و همچنین سرکوب سیستم ایمنی را از خود بروز دهند [۱].

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

* **نویسندهٔ مسئول: فرانک هادی**
نشانی: گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

تلفن: ۰۶۶۳۳۱۲۰۱۰۶ **دورنگار:**
رایانه: hadi.f@lu.ac.ir
شناسه ORCID: 0000-0003-4990-664X
شناسه ORCID نویسندهٔ اول: 0000-0003-0417-5804

مجلهٔ علمی ـ پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دورهٔ ۲۶، شمارهٔ ۳، مرداد و شهریور ۱۳۹۸، ص ۳۸۲-۳۹۱
آدرس سایت: http://jsums.medsab.ac.ir رایانامه: journal@medsab.ac.ir
شاپای چاپی: ۷۴۸۷-۱۶۰۶

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

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

۲. مواد و روش‌ها

۲,۱. نمونه‌برداری

نمونه‌برداری در آبان ماه ۱۳۹۳ از خاک کشاورزی مناطق مختلف شهرستان خرم‌آباد انجام شد؛ به‌طوری که در هر منطقه از عمق ۱۰ تا ۲۰سانتی‌متری، به میزان ۰/۵ کیلوگرم خاک برداشته شد. سپس نمونه‌های هر منطقه به‌طور جداگانه مخلوط و در دمای اتاق به‌مدت ۷ـ۱۰ روز در معرض هوا خشک شد. این نمونه‌ها پس از عبور از الک با مش ۰/۸ میلی‌متری، تا زمان آزمایش در کیسه‌های پلی‌اتیلنی و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

۲,۲. جداسازی و کشت باکتری‌ها

به‌منظور جداسازی باکتری‌ها، ۱۰ گرم از نمونهٔ خاک مورد نظر با ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل مخلوط و روی شیکر (۳۰ دقیقه و ۱۳۰g) قرار داده شد. پس از آنکه به‌مدت ۱۰ دقیقه به حالت ساکن رها شد، از مایع رویی مقدار ۱ میلی‌لیتر برداشته و به لوله‌آزمایش محتوی ۹ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه شد. بدین ترتیب، غلظت 10^{-2} به‌دست آمد. سپس از رقت‌های متوالی سوسپانسیون خاک، غلظت‌های 10^{-3}، 10^{-4}، 10^{-5} و 10^{-6} تهیه شد. به‌دنبال آن، ۱ میلی‌لیتر از رقت‌های متوالی 10^{-3}، 10^{-4}، 10^{-5} و 10^{-6} به‌دست‌آمده در هریک از پتری دیش‌های استریل ریخته (هر رقت در سه تکرار) و به‌مدت یک هفته در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. بعد از چندین بار واکشت، تعدادی پلیت جامد محتوی کشت مخلوطی از باکتری‌ها به دست می‌آید. درنهایت کلنی‌های رشدیافته در محیط جامد به‌طور جداگانه با چند بار واکشت دادن در محیط نوترینت آگار خالص شد.

۲,۳. آزمون زیستی جهت تعیین فعالیت ضدقارچی

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

۲,۴. تعیین مشخصات باکتری‌ها

کلنی‌های حاصل از نمونه‌باکتری‌های جداشده از خاک با روش گرم، رنگ‌آمیزی شد و ریخت‌شناسی سلولی آن‌ها با میکروسکوپ نوری (بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰X) مورد بررسی قرار گرفت. شناسایی باکتری‌ها براساس واکنش‌های بیوشیمیایی و با استفاده از آزمون‌های افتراقی، کاتالاز، اکسیداز، MR، VP، TSI، ایندول، تحرک و H2S انجام شد.

۲,۵. شناسایی مولکولی باکتری‌ها

به‌منظور شناسایی مولکولی باکتری‌ها، ابتدا با استفاده از کیت Bacterial Genomic DNA Extraction، DNA ژنومیک باکتری‌ها استخراج گردید. پس از حصول اطمینان از خلوص و میزان DNA استخراج‌شده، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) به‌منظور تکثیر قطعه‌ای از توالی ژن S ۱۶rRNA باکتری‌ها با استفاده از آنزیم Pfu و آغازگرهای عمومی 5′-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3′: و 27F: 5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′ انجام گرفت [۶]. واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه

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

۲,۶. آنالیز داده‌های مولکولی

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

۲,۷. بررسی پتانسیل ضدقارچی عصاره‌های باکتریایی

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

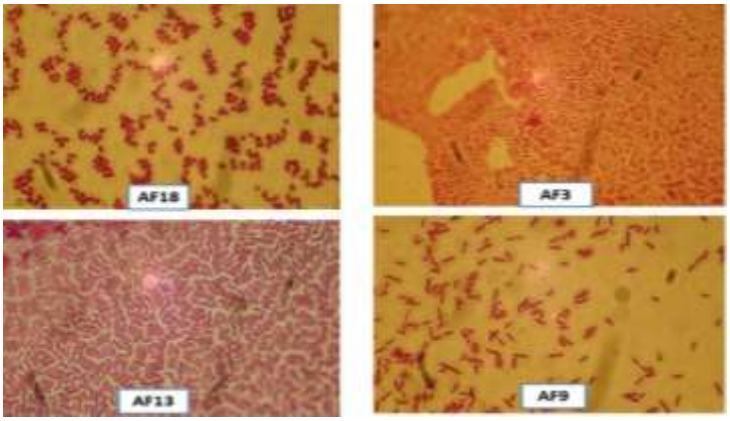
۳. یافته‌ها

۳,۱. نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی جدایه‌های باکتریایی

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

جدول ۱. نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی جدایه‌های باکتریایی

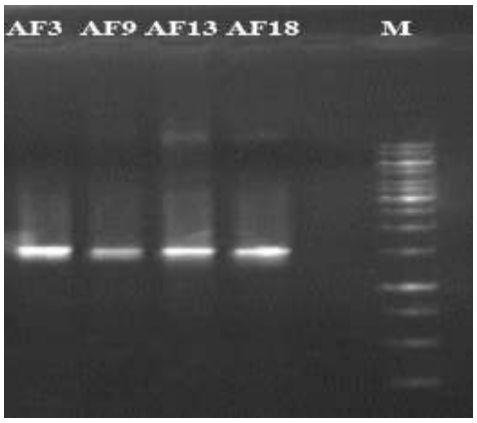
آزمون‌ها	AF3	AF9	AF13	AF18
Morphology	کوکوس	کوکوباسیل	کوکوباسیل	کوکوس
Catalase	+	+	+	+
Oxidase	+	_	_	+
Growth on MacConkey agar	+	+	+	+
MR	-	-	-	-
VP	+	-	-	+
TSI	-	-	_	-
Indol	-	-	-	-
H_2S	-	_	_	-
Motility	+	_	_	+
Gram	-	-	-	-



شکل ۱. نتایج آزمون گرم باکتری‌های جداشده بعد از عکس‌برداری با میکروسکوپ نوری (بزرگ‌نمایی ۱۰۰)

۳،۲. نتایج شناسایی مولکولی باکتری‌های جداشده

نتایج الکتروفورز ژل آگارز مربوط به محصولات PCR ژن S ۱۶rRNA در شکل ۲ نمایش داده شده است. ستون M مربوط به مارکر ۱ kb است. در مقایسه با مارکر، وزن قطعات تکثیرشده درحدود ۱۵۰۰ جفت باز است که در محدودهٔ مورد انتظار است.



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

۳،۳. نتایج توالی‌یابی محصولات PCR

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

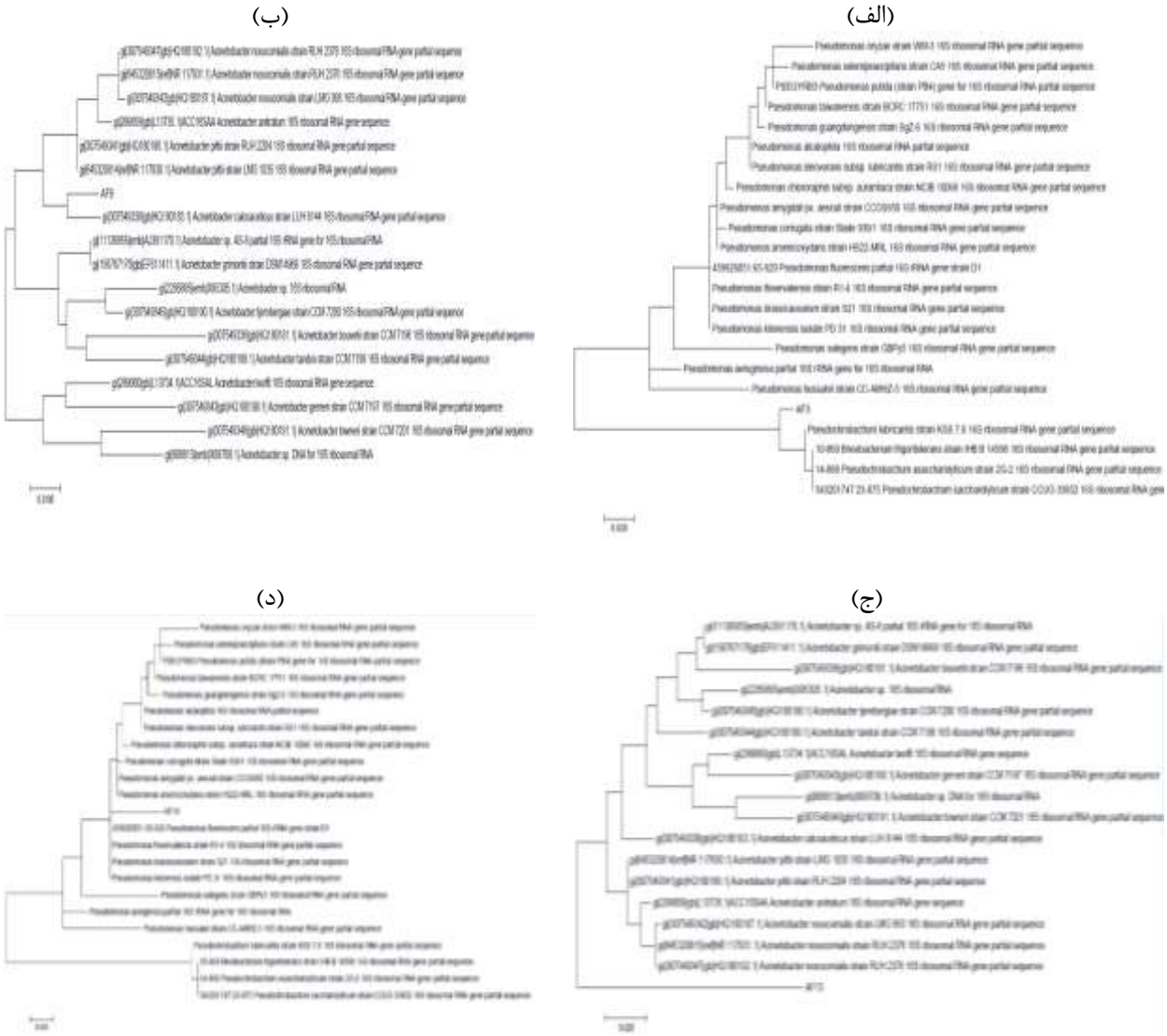
۳،۴. نتایج رسم درختچهٔ فیلوژنی باکتری‌های جداشده و مقایسه با گونه‌های مشابه

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

۳،۵. نتایج بررسی فعالیت ضدقارچی باکتری‌های جداشده

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

ضدقارچی را نشان داد. هرکدام از چهار ایزوله حداقل بر یکی از قارچ‌ها مؤثر بودند. ایزولهٔ AF3 و AF18 بیشترین اثر مهاری را بر قارچ آسپرژیلوس نیجر داشتند. چهار ایزوله اثرات مشابهی را بر قارچ آسپرژیلوس فلاووس نشان دادند؛ ولی ایزولهٔ AF3 هالهٔ شفاف‌تری با قطر ۱۶ میلی‌متر ایجاد کرد. ایزوله‌های AF3 و AF13 بیشترین اثر مهاری را بر قارچ آسپرژیلوس فومیگاتوس نشان دادند. همچنین AF3 بیشترین اثر مهاری را بر قارچ کاندیدا آلبیکنس نشان داد. نتایج در جدول ۲ آمده است.



شکل ۳. رسم درختچهٔ فیلوژنی جدایه‌های به‌روش پیوند هم‌جواری (NJ) براساس توالی ژن 16S rRNA آن‌ها، الف ــ د به‌ترتیب AF3، AF9، AF13 و AF18

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

پاتوژن‌ها / عصاره‌ها	*A.flavus*	*A.niger*	*A. fumigatus*	*C.albicans*
AF3	mm۱۶	۲۴mm	mm۱۳	mm۱۵
AF9	۱۷ mm	-	-	mm۱۳/۵
AF13	۱۸ mm	-	mm۱۲	mm۸
AF18	۱۶ mm	۲۶ mm	-	mm۸

٤. بحث و نتیجه‌گیری

خاک منبعی مهم برای جداسازی میکروارگانیسم‌ها به‌ویژه باکتری‌هاست که منشأ محصولات فعال زیستی با فعالیت‌های فارماکولوژیک متنوع است. این ترکیبات به‌طور وسیع به‌عنوان مواد دارویی و شیمیایی در پزشکی، دامپزشکی و کشاورزی استفاده می‌شوند [۸]. به‌دلیل عدم توانایی در مطالعهٔ ریزسازواره‌های خاک، دانسته‌های ما از تنوع میکروبی خاک محدود است. مطالعات نشان دادند یک گرم خاک دربرگیرندهٔ ۴هزار واحد ژنومیک مختلف باکتریایی است. همچنین تعداد گونه‌های شناخته‌شده را درحدود ۵هزار مورد برآورد کرده‌اند؛ یعنی تقریباً ۱٪ جمعیت باکتریایی خاک توسط روش‌های آزمایشگاهی قابل کشت است و البته معلوم نیست که این ۱٪ نشان‌دهندهٔ جمعیت باکتریایی باشد. فعالیت‌های مربوط به زندگی انسان مانند گسترش شهرها، کشاورزی، استفاده از علف‌کش‌ها و آلودگی‌ها می‌تواند بر تنوع جمعیت میکروبی تأثیرگذار باشد [۹]. میزان مرگ‌ومیر بیماری‌های عفونی در کشورهای درحال توسعه و توسعه‌یافته رو به افزایش است. تحقیقات نشان داده که ۳۳۵ مورد بیماری عفونی بین سال‌های ۱۹۴۰ـ۲۰۰۴ وارد جمعیت انسانی در دنیا شده است. بررسی‌های اخیر حاکی از آن است که سامانه‌های ژنتیکی در میکروارگانیسم‌ها قادر به برنامه‌ریزی برای مقابله با عوامل تهدیدکنندهٔ حیات آن‌هاست [۱۰]. همچنین بیماری‌های قارچی گیاه یکی از مهم‌ترین مباحث در کشاورزی و تولید غذا در کل دنیا محسوب می‌شود. تخمین زده می‌شود که آفت و زیان محصولات کشاورزی ناشی از بیماری‌های گیاهی در کشورهای غربی ۲۵٪ و در کشورهای درحال توسعه حدود ۵۰٪ است و یک‌سوم این صدمات مربوط به بیماری‌های قارچی است [۹]. محدودیت روش‌های سنتی فیزیکی و شیمیایی ازقبیل کاهش کیفیت و خواص تغذیه‌ای محصول، مسائل ایمنی و گرانی تجهیزات مورد نیاز، توجه محققان را به روش‌های زیستی سوق داده است [۳].

در سال‌های اخیر، مطالعات در زمینهٔ جداسازی و شناسایی باکتری‌ها از مناطق مختلف ایران گزارش شده است. بررسی این منابع و داده‌ها نشان می‌دهد تاکنون مطالعهٔ جامعی در این باره به‌خصوص جداسازی و خاصیت ضدقارچی باکتری‌های گرم منفی انجام نشده است؛ لذا با توجه به اهمیت این باکتری‌ها در زمینهٔ تولید ترکیبات ضدقارچی، این باکتری‌ها می‌توانند کاندیدهای مناسبی در کنترل زیستی قارچ‌های بیماری‌زا باشند و مورد توجه قرار گیرند. بیشتر مطالعات نشان داده است که باکتری‌های گرم مثبت مانند باسیلوس و اکتینومایست‌ها [۱۱] دارای خاصیت ضدقارچی هستند. برای مثال **B. subtilis** یکی از معمول‌ترین و شناخته‌ترین باکتری‌هاست که به‌طور متوسط ۴ـ۵٪ ژنوم آن برای سنتز آنتی‌بیوتیک اختصاص یافته و توانایی تولید ترکیبات ضدمیکروبی متعدد با ساختارهای متفاوت را دارد [۱۲]. کیمورا و همکار [۱۳] نشان دادند باکتری **Bacillus subtilis (NK-330)** از رشد قارچ و تولید آفلاتوکسین در شرایط آزمایشگاه ممانعت می‌کند. پچکنکایف و همکاران [۱۴] در تحقیق دیگری نشان دادند باکتری **B. licheniformis** رشد قارچ‌های **A. flavus** و **A.westerdijkiae** را مهار می‌کند. درکل اغلب اعضای جنس باسیلوس به‌عنوان کارخانه‌های میکروبی جهت تولید طیف وسیعی از مولکول‌های فعال زیستی با خاصیت بازدارندگی از رشد عوامل بیماری‌زا مطرح هستند. برای نمونه لی و همکاران [۱۵] اخیراً ترکیبات ضدقارچی مختلفی، مانند باسیلومایسن ال، فنجیسین و سورفاکتین، را از باکتری **Bacillus amyloliquefaciens SYBC H47 f** جدا و فعالیت ضدقارچی آن را علیه چندین قارچ بیماری‌زا گزارش کرده‌اند. علاوه‌بر این، توانایی تولید اسپور در این جنس، قابلیت باسیلوس را به‌عنوان بهترین کاندید برای ساخت آفت‌کش‌های زیستی افزایش داده است [۱۶]. باکتری‌هایی دیگری متعلق به جنس‌های مختلف باکتریایی با توانایی فعالیت ضدقارچی گزارش شده‌اند؛ برای مثال گانه‌سینگا همکاران [۱۷] نشان دادند سویه‌های **Flavobacterium sp.** و **Pantoea agglomerans** توانایی غیرفعال‌سازی آفلاتوکسین را دارند. همچنین مان و همکار [۱۸] تجزیهٔ آفلاتوکسین توسط باکتری **Corynebacteriumrubrum ATCC 14898** و کوالیرآسکا و همکار [۱۹] تجزیهٔ آفلاتوکسین توسط باکتری **Streptococcus lactis** را گزارش کرده‌اند. علاوه‌بر این، تجزیهٔ آفلاتوکسین توسط سویه‌هایی از **Lactobacillus** مشاهده شده است [۲۰]. برای مثال مهار رشد قارچ **A. nomius** توسط باکتری **L. rhamnosus** بیان شده است [۲۱]. گونایمی و همکاران [۲۲] مهار رشد قارچ **A. flavus** و **A. parasiticus** توسط **L. acidophilus** را نشان دادند. در مطالعه دیگری قزوینی و همکاران [۲۳] اظهار کردند **Bifidobacterium bifidum** و **L. fermentum** قادرند رشد قارچ **A. Parasiticus** را کاهش دهند. همچنین فعالیت ضدقارچی باکتری‌های **L. brevis** و **L. delbrueckii subsp. Lactis** مطالعه و اثبات شده است [۲۴]. مطالعات دیگری نشان داده است که باکتری **L. plantarum (PTCC 1058)** از جوانه‌زنی اسپور قارچ **A. flavus** جلوگیری می‌کند [۲۵]. باکتری‌های **Nocardia corynebacterioides**، **Rhodococcus erythropolis** و **Mycobacterium fluoranthenivorans** قادرند آفلاتوکسین را تجزیه کنند [۲۶]. مورایس و همکاران [۲۷] نشان دادند

باکتری‌های **Stenotrophomonas maltophilia** و **Bacillus sp.** در تجزیهٔ کومارین و آفلاتوکسین **B1** نقش دارند. بنابراین بیشترین مطالعات ضدقارچی دربارهٔ باکتری‌های گرم مثبت انجام شده است. اما در تحقیق حاضر هدف اصلی، جداسازی باکتری‌های گرم منفی و بررسی خاصیت ضدقارچی آن‌ها بود. چهار ایزوله باکتریایی در مقایسه با سایر باکتری‌های گرم منفی جداشده از خاک‌های کشاورزی خرم‌آباد قادر بودند از رشد قارچ‌ها در محیط کشت جلوگیری کنند. نتایج شناسایی این باکتری‌ها با استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناسی، بیوشیمیایی و مولکولی نشان داد مربوط به جنس‌های اسینتوباکتر و سودوموناس هستند که با مطالعات سایر دانشمندان مبنی بر مهار رشد قارچ‌ها توسط این دو جنس مذکور مطابقت داشت. برای مثال در پژوهشی سویهٔ **Pseudomonas putida** شدت بیماری‌زایی **A. flavus** و میزان آغشتگی به آفلاتوکسین روی بادام‌زمینی را کاهش داد [۲۸]. لئون و همکاران [۲۹] نشان دادند که **Pseudomonas fluorescens BNM296** و **Bacillus amyloliquefacien BNM340** از گیاه درمقابل قارچ **Pythiumultimum** محافظت می‌کنند و مکانیسم‌های مختلفی برای کنترل زیستی علیه قارچ‌ها دارند. همچنین در مطالعه‌ای، باکتری **P. aeruginosa N17-1** توانست آفلاتوکسین **B1** را تجزیه کند [۳۰]. اخیراً طی مطالعات مختلفی که مانا و همکاران [۳۱ـ۳۳] انجام داده‌اند، باکتری‌های مختلفی شامل **Bacillus megaterium**، **Microbacterium testaceum** و **P. protegens** از دانه‌های برنج انبارشده جداسازی و سپس فعالیت ضدقارچی آن‌ها علیه قارچ‌های مختلف مانند **Aspergillus candidus**، **Aspergillus fumigatus**، **Penicillium fellutanum**، **Penicillium islandicum** و همین‌طور **A. flavus** تأیید شد و در مطالعات بعدی ترکیبات ضدقارچی آن‌ها شناسایی گردید. لیو و همکاران [۳۵] تأثیر جنس اسینتوباکتر بر مهار رشد تعدادی از قارچ‌های بیماری‌زا مانند **Phytophthora capsici**، **Fusarium graminearum** و **Rhizoctonia solani** را تأیید کردند. تروتل ـ عزیز و همکاران [۳۴] سویه‌های مختلف باکتریایی شامل **Pseudomonas fluorescens**، **Bacillus subtilis**، **Pantoea agglomerans** و **Acinetobacter lwoffii** را از باغات انگور جدا کردند و فعالیت ضدقارچی آن‌ها علیه **Botrytis cinerea** را بررسی و تأیید نمودند. از سودوموناس آنتی‌بیوتیک‌های زیادی مانند ۲ و ۴ دی استیل فلوروگلوسینول (**2,4-DAPG: 2,4-diacetylphloroglucinol**)، پایولوتئورین (**Pyrrolnitrin**) و پیرولینیتـرین (**Pyrrolnitrin**)، اگروسین (**Agrocin84**)، هربیکولین (**Herbicolin**)، اومایسین (**Oomycin**)، فنازین (**Phenazine**) و سیانید هیدروژن استخراج شده است که باعث مهار رشد قارچ‌ها و کنترل بیماری‌ها می‌شود [۳۶ـ۳۸].

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

تشکر و قدردانی

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

References

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

[11]. Janaki T, Nayak BK, Ganesan T. Antifungal activity of soil actinomycetes from the mangrove Avicennia marina. J Med Plants Stud. 2016; 4 (2): 05-08.
[12]. Stein T. Bacillus subtilisantibiotics: structures, syntheses and specific functions. Mol Microbiol 2005; 56(4): 845-57.
[13]. Kimura N, Hirano S. Inhibitory Strains of Bacillus subtilis for Growth and Aflatoxin. production of Aflatoxigenic Fungi Agric Biol Chem. 1988; 52 (5): 1173-79.
[14]. Petchkongkaew A, Taillandier P, Gasaluck P, Lebrihi A. Isolation of Bacillus spp. from Thai fermented soybean (Thua-nao): screening for aflatoxin B1 and ochratoxin A detoxification. J Appl Microbiol. 2008; 104: 1495-1502.
[15]. Li X, Zhang Y, Wei Z, Guan Z, Cai Y, Liao X. Antifungal Activity of Isolated Bacillus amyloliquefaciens SYBC H47 for the Biocontrol of Peach Gummosis. PLoS ONE 2016; 11 (9): e0162125.
[16]. Emmert EA, Handelsman J. Biocontrol of Plant Disease: a (Gram-) Positive Perspective. FEMS Microbiol Lett 1999; 171 (1): 1-9.
[17]. Gunasinghe RN, Ikiriwatte CJ, Karunaratne AM. The use of Pantoea agglomerans and Flavobacterium sp. to control banana pathogens. J Hortic Sci Biotech 2004; 79 (4): 1002-1006.
[18]. Mann R, Rehm HJ. products from aflatoxin B_1 by Corynebacterium rubrum, Aspergillus niger, Trichoderma viride and Mucor ambiguus. Eur J Appl Microbiol Biotechnol 1976; 2 (4): 297-306.
[19]. Coallier-Ascah J, Idziak ES. Interaction between Streptococcus lactis and Aspergillus flavus on production of Aflatoxin. Appl Environ Microbiol 1985; 49 (1): 163-67.
[20]. Gajbhiye MH, KapadnisBP.Antifungal-activity-producing lactic acid bacteria as biocontrol agents in plants. Biocontrol Sci Techn 2016; 26 (11): 1451-70.
[21]. Munoz R, Arena ME, Silva J, González SN. Inhibition of mycotoxin-producing Aspergillus nomius vsc 23 by lactic acid bacteria and Saccharomyces cerevisiae. Braz J Microbiol 2010; 41 (4): 1019-26.
[22]. Ghonaimy GA, Yonis AA, Abol-Ela MF. Inhibition of Aspergillus flavus and A. parasiticus fungal growth and its aflatoxins (B1, B2, G1 and G2) production by Lactobacillus acidophilus. J Egypt Soc Toxicol 2007; 37: 53-60.
[23]. Ghazvini RD, Kouhsari E, Zibafar E, Hashemi SJ, Amini A, Niknejad F. Antifungal Activity and Aflatoxin Degradation of Bifidobacterium bifidum and Lactobacillus Fermentum Against Toxigenic Aspergillus Parasiticus. Open Microbiol J 2016; 10:197-201.
[24]. Bavankaram PP, Sellamuthu PS.Antifungal and anti-aflatoxigenic effect of probiotics against Aspergillusflavusand Aspergillusparasiticus. Toxin Rev 2016; 35 (1-2): 10-15.
[25]. Khanafari A, Soudi H, Miraboulfathi M, KarameiOsboo R, An In vitro investigation of Aflatoxin B1 Biological Control by Lactobacillus plantarum. Pak J Biol Sci 2007; 4 (3): 163-168.
[26]. Teniola OD, Addo PA, Brost IM, Farber P, Jany KD, Alberts JF, et al. Degradation of aflatoxin B(1) by cell-free extracts of Rhodococcus erythropolis and Mycobacterium fluoranthenivorans sp. nov.DSM 44556(T). Int J Food Microbiol 2005; 105 (2): 111-17.
[27]. Moraes APR, Videira SS, Bittencourt VREP, Bittencourt AJ. Antifungal activity of Stenotrophomonas maltophili in Stomoxy scalcitran larvae. Rev Bras Parasitol Vet. 2014; 23: 194-199.
[28]. Mickler CJ, Bowen KL, Kloepper JW. Evaluation of selected geocarposhpere bacteria for biological control of Aspergillus flavus in peanut. Plant Soil 1995; 175: 291-299.
[29]. Leon M, Yaryura PM, Montecchia MS, HernandezAI, CorreaOS,PucheuNL, et al. Antifungal Activity of Selected Indigenous Pseudomonas and Bacillus from the Soybean Rhizosphere. Int J Microbiol 2009; 2009: 572049.
[30]. Sangare L, Zhao Y, Folly YM, Chang J, Li J, Selvaraj JN, Xing F, Zhou L, Wang Y, Liu Y. Aflatoxin B1 degradation by a Pseudomonas strain. Toxins (Basel). 2014; 6 (10): 3028-40.
[31]. Mannaa M, Oh JY, Kim KD. Microbe-mediated control of Aspergillus flavus in stored rice grains with a focus on aflatoxin inhibition and biodegradation. Ann Appl Biol 2017; 171 (3): 376-92.
[32]. Mannaa M, Oh JY, Kim KD. Biocontrol activity of volatile-producing Bacillus megateriumand and Pseudomonas protegens against Aspergillusflavus and aflatoxin production on stored rice grains. Mycobiology 2017; 45 (3): 213-19.
[33]. Mannaa M, Kim KD. Biocontrol Activity of Volatile-Producing Bacillus megateriumand and Pseudomonas protegensAgainst Aspergillus and Penicilliumspp. Predominant in Stored Rice Grains: Study II. Mycobiology. 2018; 46 (1): 52-63.
[34]. Trotel-Aziz P, Couderchet M, Biagianti S, Aziz A. Characterization of new bacterial biocontrol agents Acinetobacter, Bacillus, Pantoea and Pseudomonas spp. mediating grapevine resistance against Botrytis cinerea. Environ Exper Bot 2008; 64 (1): 21-32.
[35]. Liu CH, Chen X, Liu TT, Lian B, Gu Y, Caer V, et al. Study of the antifungal activity of Acinetobacte rbaumannii LCH001 in vitro and identification of its antifungal components. Appl Microbiol Biotechnol 2007; 76 (2): 459-66.
[36]. Raaijmakers JM, Vlami M, de Souza JT. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. Antonie Leeuwenhoek. 2002; 81 (1-4): 537-47.
[37]. Ramette A, Frapolli M, Defago G, Moenne-Loccoz Y. Phylogeny of HCN synthase-encoding hcnBC genes in biocontrol Fluorescent pseudomonads and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability. Mol Plant Microbe Interact 2003; 16 (6): 525-35.
[38]. yan LL, Li YQ, Wang Y, Zhang XH, Xu YQ. Optimization of critical medium components using response surface methodology for Phenazine-1-carboxylic acid production by Pseudomonas sp. M-18Q. J Biosci Bioeng. 2008; 105(3): 232-37.

Antifungal Activity of Native Bacteria Isolated from Khorramabad Agricultural Soil

Amir Hadi Chegeni[1], Faranak Hadi[2*], Mojgn Kowsari[3], Maryam Zare[4], Abdolnaser Gholami Mohammadi[2]

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

Abstract

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

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

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

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

Received: 2018/08/02
Accepted: 2019/07/20

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