تحقیقی

دارای رتبه علمی – پژوهشی
از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

تعیین اثر ضد قارچی باسیلوس های تجزیه کننده کیتین خاک

عبدالجلیل ایری
کارشناس ارشد میکروب شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران

آیت نصرالهی عمران
دانشیار گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران

حمیدرضا پردلی
استادیار گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی ، گرگان، ایران

نویسنده مسئول: آیت نصرالهی عمران

پست الکترونیک: Ayat51@yahoo.co.in

تلفن: ۰۹۱۱۳۷۵۳۴۲۹

آدرس: تنکابن، صندوق پستی-۵۵۹-۴۶۸۱۵

دریافت:۹۱/۲/۲۳
ویرایش پایانی:۹۱/٤/۲
پذیرش:۹۱/٤/٤

چکیده

زمینه و هدف: *کیتین یک پلیمر خطی از واحد های N-استیل گلوکز آمین است که پس از سلولز فراوان ترین بیوپلیمر در طبیعت به حساب می آید. در دهه های اخیر کیتیناز ها به دلیل کاربردهای وسیع، به ویژه به عنوان کنترل زیستی برعلیه قارچ ها مورد توجه زیادی قرار گرفته اند.*

روش بررسی: *جداسازی باسیلوس های مولد کیتیناز با جمع آوری ۴۰ نمونه خاک از چهار منطقه جغرافیایی گرگان انجام گرفت و ویژگی تجزیه کنندگی کیتین آنها با بررسی هاله شفاف در پلیت های حاوی کیتین کلوئیدی مشخص و مورد ارزیابی قرار گرفت. شناسایی سویه های منتخب بر اساس تاکسونومی پلی فازی انجام گرفت. استخراج DNA برای شناسایی دقیق تر و تعیین توالی انجام شد. اثر ضدقارچی با روش چاهک برعلیه قارچ های Candida albicans، Aspergillus niger، Aspergillus flavus (IR 6)، Alternaria alternate و Fusarium oxyporum مورد ارزیابی قرار گرفت.*

یافته ها: *تعداد ۹ کلونی باسیلوس کیتیناز مثبت از پلیت های کلوئیدال کیتین آگار جدا شد که ۵ مورد از آنها اثر ضدقارچی از خود نشان دادند ودر این بین سویه R6 بیشترین اثر، R2 و R3 کم ترین اثر را روی قارچ ها نشان دادند. مقایسه توالی 16S rRNA این جدایه ها با باکتری های شناخته شده، تشابه ژنتیکی حدود ۹۵-۹۷ درصد را نشان دادند.*

نتیجه گیری: *برخی باکتری خاک می توانند با عوامل بیماری زایی انسانی و گیاهی خاک اثرات متضاد داشته باشند.*

واژه های کلیدی: *باسیلوس، کیتیناز، خاک، ضد قارچ*

آدرس مقاله:
ایری ع، نصرالهی عمران ع، پردلی ح " تعیین اثر ضد قارچی باسیلوس های تجزیه کننده کیتین خاک" مجله علوم آزمایشگاهی، ویژه نامه باکتری شناسی ۱۳۹۲ ، دوره هفتم(شماره۵): ۳۷-۴۴

مقدمه

کیتین یک هموپلیمر از N-استیل گلوکز آمین (GLcNAc) با اتصالات B-1,4 است پلیمری بسیار فراوان و تجدید پذیرطبیعی بعد از سلولز است که درطبیعت به طور گسترده در ترکیب اصلی ساختمان دیواره سلولی قارچ ها، اسکلت حشرات و بدنه سخت پوستان و پروتوزوآ وجود دارد. کیتین از نظر فراوانی دومین پلی ساکارید در طبیعت است به حلال های آلی بسیار مقاوم بوده و برای حلالیت احتیاج به اسیدهای معدنی قوی دارد. محصول هیدرولیزشده کیتین می تواند به عنوان منبع کربن یا نیتروژن در تولید پروتئین های تک یاخته استفاده شود. کیتین همانند سلولز می تواند به عنوان منبع بزرگ کربن و نیتروژن قابل ذخیره برای میکروارگانیسم ها باشد. کتینازها گلیکوزیل هیدرولازهایی هستند که در یک طیف گسترده ای از ارگانیسم ها از قبیل باکتری ها، قارچ ها، حشرات، گیاهان و حیوانات وجود دارند (۱،۲). در سال های اخیر آنزیم های کیتیناز به دلیل کاربردهای فراوان آن از قبیل تهیه کیتوالیگوساکاریدهای مهم از لحاظ پزشکی، مبارزه زیستی علیه قارچ های بیماری زای گیاهی، تهیه پروتوپلاست از قارچ، حذف زباله های حاوی کیتین و غیره توجه زیادی را به خود جلب کرده است.

غربالگری و جداسازی ارگانیسم های مستعد تولید کیتیناز به طور معمول روی محیط کشت های حاوی کیتین انجام می شود. باکتری ها کیتینازها را برای تجزیه کیتین و به کارگیری آن به عنوان منبع انرژی تولید می کنند. برخی از کیتینازهای باکتری های تجزیه کننده کیتین عوامل توانمند برای کنترل بیولوژیکی بیماری های گیاهی حاصله از قارچ های بیماری زا هستند. آنزیم های اخیر از رشد قارچ ها با هیدرولیز کیتین موجود در دیواره سلولی آنها ممانعت می کنند. باکتری های خاک به ویژه جنس باسیلوس طیف گسترده ای از مواد ضد میکروبی و فعال را تولید می کند که برخی از آنها خاصیت ضد قارچی دارند (۴-۶). از طرفی باسیلوس ها در میان میکروارگانیسم های تجزیه کننده کـیتین در طـبیعت با توجه به احتیاجات غذایی کم و تحمل .شرایط سخت دارای جایگاه منحصر به فردی هستند و در حقیقت یکی از تجزیه کنندگان اصلی کیتین می باشند. کیتینازهای باکتریایی به خانواده ۱۸ و۱۹ گلیکوزیل هیدرولازها تعلق دارند. البته اکثرمطالعات در این زمینه بر روی اکتینومایست ها به ویژه استرپتومایسس ها بوده و تجزیه کیتین یکی از ویژگی های این میکروارگانیسم ها می باشد. همچنین تولید کیتیناز به وسیله برخی از باکتری هایی مانند *باسیلوس تورینژینسیس* موجب افزایش قدرت بیماری زایی آنها می شود. این ویژگی به حدی در میان استرپتومایسس ها رایج است که یکی از مهمترین محیط کشت هایی را که برای جداسازی انتخابی چنین میکروارگانیسم هایی مورد استفاده قرار می دهیم، محیط کلوئیدال کیتین آگار (Colloidal chitin agar) بوده که تنها منبع کربن و نیتروژن آن کیتین کلوئیدی می باشد (۷-۹). با توجه به ویژگی های باسیلوس ها و جایگاهشان در میان میکروارگانیسم های کیتینولیتیک و همچنین فراوان بودن منابع کیتین در کشورمان و لزوم استفاده از منابع تجدید پذیر، این تحقیق با هدف غربالگری باسیلوس های کیتینولیتیک مختلف از نمونه های خاک از چندین منطقه شهر گرگان با شرایط اقلیمی و جغرافیایی متفاوت انجام گرفت .

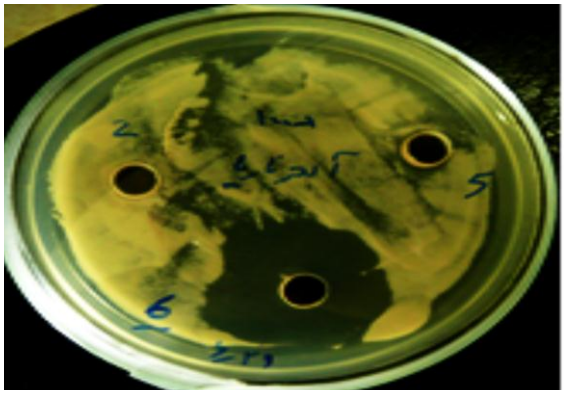
روش بررسی

در این مطالعه تحلیلی که در سال ۱۳۹۰ صورت گرفت نمونه های خاک از چهار منطقه جغرافیایی گرگان تهیه وسپس نمونه ها در دمای ۴درجه سانتیگراد نگهداری شدند. تهیه سوسپانسیون میکروبی از طریق افزودن ۵ گرم خاک به ۵۰ سی سی سرم فیزیولوژی سترون انجام گرفت. سپس سوسپانسیون به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم(۷۵ درجه سانتیگراد) تحت تاثیر شوک حرارتی قرار داده شد. شوک حرارتی برای از بین بردن سلول های رویشی و باقیمانده سلول های اسپودارانجام گرفت. سپس ۱۰ رقت متوالی آنها بر روی محیط حاوی کلوئیدال کیتین آگار که (شکل۱) حاوی حداقل نمک و کلوئیدال کیتین به عنوان

منبع کربن و انرژی است، کشت داده در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد (۱۰). کلونی هایی که هاله عدم رشد در اطراف آنها مشاهده می شد، از لحاظ باسیلوس بودن مورد ارزیابی ماکروسکوپی و میکروسکوپی قرار می گرفتند. برای شناسایی باکتری ها مشکوک به باسیلوس از آزمایش های بیوشیمیایی استفاده گردید (جدول ۱)و برای شناسایی دقیق تر سویه های باکتری ها DNA آنها بوسیله کیت شرکت سیناژن استخراج و برای تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره ارسال گردید(جدول۲). برای ارزیابی فعالیت ضد قارچی باسیلوس های کیتیناز مثبت، نمونه های قارچی Aspergillus niger(ATCC 10231)Aspergillus flavus(ATCC 2029)Candida albicans(PTCC 5004) Alternaria alternate(PTCC 5115) Fusarium oxyporum(PTCC 5224)از سازمان پژوهش های علمی صنعتی ایران تهیه گردید. برای تهیه سوسپانسیون باکتریایی از باکتری های رشد یافته (کشت خالص) در محیط اختصاصی آگار دار استفاده شد. یک تا دو کلنی از باکتری مورد نظر به محیط براث که رشد میکروارگانیسم را حمایت کند تلقیح نموده و محیط های براث حاوی میکروارگانیسم تلقیح شده روی انکوباتور شیکردار با دما، زمان و دور متناسب تنظیم شد. پس از رشد باکتری سوسپانسیونی با محیط نوترینت براث معادل لوله نیم مک فارلند تهیه شد. جهت جلوگیری از تبخیر در آن را محکم می نمودیم. برای تهیه سوسپانسیون قارچی، مقداری از کلنی قارچی کشت خالص ۲۴ ساعته از هر یک از ۵ سویه قارچی استاندارد را به کمک لوپ به محیط نوترینت براث منتقل نموده و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد تا کدورت آن معادل لوله ۰/۵ مک فارلند شود. برای بررسی فعالیت ضد قارچی باسیلوس های جدا شده، روش ممانعت از رشد توسط باکتری کیتیناز مثبت بر روی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار به روش چاهک انجام شد (شکل۲).

برای انجام این کار، ۱۰۰میکرولیتر از سوسپانسیون قارچ مورد نظر در داخل چاهک های به قطر۵ میلیمتر به همراه ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی قرار داده شد. سپس پلیت ها را در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری گردید و پس از گذشت ۲۴ ساعت، کشتها مورد بررسی و سپس هاله های عدم رشد اندازه گیری شدند (۱۱).

شکل۱- نمونه ای از باکتری های کیتیناز مثبت روی محیط (CCA)



شکل۲- فعالیت ضد قارچی نمونه R6

جدول۱- ویژگی های بیوشیمیایی و فیزیوژیکی باکتری های کیتینولیتیک جدا شده

Test	R1	R2	R3	R5	R6	R7	NR1	NR3	NR5
LV	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Citrate utilization	-	+	-	+	-	-	-	-	-
V-P	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Nitrat reduction	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Indole	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Grow in salt 7%	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Starch hydrolisis	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Casein hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatin hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urease	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Monnitol	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H_2S production	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase test	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hemolysis (blood agar)	+	-	+	+	+	+	+	+	+

جدول۲- نتایج شناسایی مولکولی باسیلوس های تولید کننده کیتیناز در سطح جنس وگونه از طریق روش ملکولی

نمونه ارسالی	باکتری مرجع درNCBI	درصد همولوژی	شماره دسترسی در بانک ژنی
R1	Bacillus sp. CNJ732 PL04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	DQ448749.1
R2	Bacillus sp. LT3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96%	FJ946999.1
R3	Bacillus cereus strain KU4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96%	JF895480.1
R5	Bacillus thuringiensis partial 16S rRNA gene, strain ucsc27	96%	FN667913.1
R6	Bacillus sp. S2-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	FJ217159.1
R7	Bacillus thuringiensis strain Z8B-52 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	HQ238661.1
NR1	Bacillus cereus strain HT21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	JN013206.1
NR3	Bacillus cereus strain MSU AS16S ribosomal RNA gene, partial sequencec	97%	JF907013.1
NR5	Bacillus cereus strain AcdSP4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	JN625722.1

جدول۳- اثر ضدقارچی سویه های *باسیلوس* علیه قارچ های مورد مطالعه

	سویه های *باسیلوس*									
سویه های قارچی	R 1	R 2	R 3	R 5	R 6	R 7	NR 1	N R3	N R5
کاندیدا آلبیکنس ATCC 10231	+	+	+	+	–	–	–	–	–
آسپرژیلوس نایجر ATCC 2029	+	–	–	-	–	–	+	+	+
آسپرژیلوس فلاووس PTCC 5004	+	+	+	+	–	–	–	+	-
آلترناریا آلترناتا PTCC 5224	+	+	+	-	+	+	+	+	-
فوزاریوم اکسی پوروم PTCC 5115	–	–	+	+	–	–	–	–	–

یافته ها

در این بررسی نمونه برداری از چهار منطقه جغرافیایی شهر گرگان صورت گرفت و از ۴۰ نمونه خاک در مجموع ۹ کلنی باسیلوس کیتیناز مثبت بر روی پلیت های کیتین آگار جداسازی و خالص سازی شدند. در نمونه هایی که تیمارحرارتی نشده بود، اکتینومایست های کیتیناز مثبت بر روی محیط جداسازی، بیشترین گروه میکروارگانیسم هایی را به خود اختصاص می دادند که بر روی این محیط هاله شفاف در پیرامون خود تولید کرده بودند. این نمونه ها شامل R7, R6 , R5 , R3 , R2 , R1,NR5, NR3, NR1 بودند. نتایج نشان داد بیشترین فراوانی *باسیلوس ها* مربوط به

غرب گرگان جاده یساقی می باشد نمونه های R1، R3، R5، R7، 2، 1.2، 5.2 از نواحی ریزوسفریک و۱۰/۲ از نواحی غیر ریزوسفریک جاده یساقی، R2 از نواحی ریزوسفریک، NR1، NR3 و NR5 از نواحی غیر ریزوسفریک شمال گرگان (جاده آق قلا) جدا شدند. از مجموع ۱۳ جدایه باسیلوس، ۵ جدایه دارای فعالیت ضد قارچی متفاوت علیه قارچ های مختلف مورد آزمایش در این مطالعه بودند. هر یک از سویه ها بر علیه یک یا چند قارچ مورد آزمایش اثر ضد قارچی نشان داد. اثرات ضد قارچی باسیلوس های خاکزی جداشده از منطقه گرگان در سویه های قارچی مختلف متفاوت بود. ۵ سویه از باسیلوس های مورد آزمایش اثرات ضد قارچی قابل قبولی نشان دادند. DNA این سویه ها برای شناسائی و تعیین گونه تعیین توالی شدند. این ۹ گونه به عنوان بهترین سویه های با اثرضد قارچی معرفی شدند. از مجموع ۹ باسیلوس مولد آنزیم کیتیناز جدا شده از خاک های این منطقه ۵ مورد از آنها فعالیت ضد قارچی داشتند.

بحث

در بسیاری از مطالعات غربالگری برای تایید تولید آنزیم توسط میکروارگانیسم های مولد کیتیاز مقایسه قطر هاله به قطر کلونی در میان سویه ها صورت می گیرد. در این تحقیق نیز این روش به کار گرفته شد. روشی که در این پژوهش برای غربالگری اولیه سویه ها صورت گرفت بر مبنای تولید آنزیم در محیط جامد بود و سویه هایی که توانایی بیشتری در شفاف سازی محیط کلوئیدال کیتین در مقایسه با نمونه های منفی و با یکدیگر داشتند به عنوان بهترین سویه ها انتخاب شدند و برای ادامه کار و بررسی اثر ضدقارچی ار آنها استفاده شد. در سال2003 Jung و همکاران در کره جنوبی یک باکتری با خاصیت کیتینازی قوی را از خاک ساحلی به روش کشت در محیط حاوی کلوئیدال کیتین جداسازی کردند و بر اساس توالی یابی نوکلئوتیدی 16S rRNAبه عنوان *Paenibacillus illinoisenis* شناسایی کردند. اثر ضد قارچی این باکتری بر قارچ رایزوکتونیا سولانی *Rhizoctonia solani* با کشت همزمان بررسی شد و در نتیجه علائم ایجاد شده توسط این قارچ در دوره آزمایش گلخانه ای توسط این باکتری مهار شد(۱۳). Gohel و همکاران در سال ۲۰۰۶ نقش باکتری های مولد کیتیناز، از جمله باسیلوس های خاکزی در کنترل و مهار رشد عوامل قارچی بیماری زا را مورد بررسی قرار دادند. آنها به روش های مختلفی برای سنجش میزان کیتیناز تولیدی از جمله کشت آنها بر روی محیط کلوئیدال کیتین آگار و بررسی هاله شفاف در اطراف آن اشاره داشتند(۱۴). در سال ۲۰۰۶ Bansode و همکاران در هندوستان ۵۰۰ جدایه میکروبی را از خاک قلیایی دریاچه Lonar جدا نموده و از آنها کیتیناز استخراج کردند. روش جدا سازی آنها کشت بروی محیط کلوئیدال کیتین آگار و مشاهده هاله شفاف اطراف کلونی ها بود(۱۵).Kamil و همکاران باسیلوس های کیتینولیتیک را از خاک جدا و اثر ضد قارچی آنها را بررسی کردند و اثرات مثبت مهاری باکتری های کیتیناز مثبت بر روی قارچی را نشان دادند(۱۰). در سال ۲۰۰۸ Shanmugaiah و همکاران در هندوستان ۳۹ باکتری تجزیه کننده کیتین را از خاک ریزوسفریک مزرعه برنج جدا کردند که از بین آنها نمونه ای که بیشترین فعالیت کیتینازی را در غربالگری های اولیه و ثانویه بر روی محیط کلوئیدال کیتین آگار تولید می کرد، *B.laterosporous* گزارش کردند که فعالیت کیتینازی این باکتری در حدود ۳ برابر بقیه باکتری ها بود(۱۶). در سال ۲۰۰۹ Beatriz و همکاران در مکزیک فعالیت ضد قارچی ۱۳ سویه بومی گونه باسیلوس جدا شده از خاک منطقه ای در این کشور بر علیه قارچ *Macrophomina phaseolina* به روش کشت دوتایی بر روی محیط نوترینت آگار مورد ارزیابی قرار دادند. عصاره خام یکی از سویه های تجزیه کننده کیتین *Basillus.lum B04* مهار رشد را نزدیک به ۳۰ درصد نشان داد. تولید آنزیم کیتیناز با قرار دادن سویه ها در محیط مایع حاوی ۶ درصد کلوئیدال کیتین بدست آمده بود(۱۷). در این مطالعه نظیر سایر مطالعات شناسایی ژنتیکی سویه ها بر اساس توالی ژن 16S rRNA انجام گرفت. در این بررسی توالی ژن 16S rRNA و مقایسه آن با باکتری های ثبت

شده، شباهت ۹۵-۹۷ درصد در سویه ها نشان داد. البته بررسی های فیزیولوژیک و مورفولوژیک نیز تفاوت هایی را نشان داد. با توجه به تفاوت های ژنتیکی، مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی مشاهده شده بین نزدیکترین سویه های ثبت شده و سویه های جدا شده در این پژوهش احتمال جدید و ناشناخته بودن این سویه ها را مطرح می سازد. در صورت داشتن تفاوت های قابل قبول در هیبریداسیون DNA/DNA به عنوان گونه های جدید از جنس باسیلوس مطرح شوند. به لحاظ ویژگی های ساختاری آنزیم کیتیناز وبهینه سازی شرایط سنجش فعالیت این آنزیم و تولید در محیط کشت مطالعات بیشتری لازم است. بنابراین احتمال یافتن عوامل ضد قارچی موثر با مکانیسم های جدید از باکتری های مولد این آنزیم که احتمال بروز مقاومت نسبت به آنها کم است در غربالگری هایی که روی انواع میکروارگانیسم های جدید جدا شده از منابع طبیعی صورت گرفته، بیشتر می باشد(۱۸). در بررسی Gomaa اثرات ضد قارچی باسیلوس های کیتیناز مثبت بر قارچ های پاتوژن های گیاهی به اثبات رسید(۱۹). میزان قطر هاله در روش چاهک بیشتر از روش دیسک گذاری بود. برای توجیح این تفاوت می توان گفت زمانی که باکتری به صورت نقطه ای یا چاهک در محیط تلقیح می شود در انتهای فاز رشد لگاریتمی شروع به تولید آنزیم یا ترکیبات ضد قارچی می نماید. ماده تولید شده از طریق انتشار در آگار در اطراف منطقه تلقیح وارد شده و به قارچ موجود در محیط اجازه رشد نمی دهد و در نتیجه هاله عدم رشد ایجاد می شود. اما زمانی که برای بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی از دیسک های آغشته به سوسپانسیون باکتریایی استفاده می شود به دلیل اینکه این سوسپانسیون علاوه بر ماده آنتی بیوتیکی حامل مقداری از محیط مایع نیز می باشد قطر هاله ایجاد شده کمتر گزارش می شود. از بین باسیلوس های مولد کیتیناز جدا شده در این تحقیق ۹ گونه R1, NR3, NR5 ,NR1,R7 ,R6 ,R5 ,R3 ,R2 به عنوان گونه های برتر در تولید مواد ضد قارچی موثر علیه سویه های پاتوژن قارچی (۵ سویه) شناسایی گردیدند پس از تعیین جنس و گونه جهت مطالعات بعدی نگهداری و ذخیره شدند. در کل R1 و R3 روی ۴ قارچ، R2، R5، NR3 روی ۳ قارچ و R6، R7، NR5 روی یک قارچ اثر مهاری داشتند. به این ترتیب بیشترین اثر مهاری مربوط به سویه R2, و R3 وکمترین اثر مربوط به سویه های R6 و R7 بود.

نتیجه گیری

مطالعه باکتری های تجزیه کننده کیتین از منابع طبیعی از قبیل خاک، به ویژه ریزوسفریک در جدا سازی باکتری هایی که ترکیبات ضد قارچی یا دیگر ترکیبات جدید تولید می کنند، مفید و کاربردی است.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته میکروب‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن بوده که با همکاری دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان انجام گرفت. نویسندگان مراتب احترام و قدردانی خود را نسبت به کلیه همکاران و کارکنان آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان به دلیل همکاری‌های انجام یافته در رابطه با اجرای این تحقیق را اعلام می‌دارند.

References

1. Howard MB, Ekborg NA, Weiner RM, Hutcheson SW. *Dtection and characterization of chitinases and other chitin modifying enzymes*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2003; 30(11): 627-635.

2. Reyes-Ramirez A, Escudero-Arbarca BI, Aguilar-Uscanga G, Hayward-Jones PM, Eleazar Barboza Corona J. *Antifungal Activity of Bacillus thuringiensis Chitinase and Its Potential for the Biocontrol of PhytopathogenicFungi in SoybeanSeeds*. Journal of Food Science. 2004; 69(5): 131-134.

3. Dahiya N, Tewari R, Hoondal GS. *Biotechnological aspect of chitinolytic enzyme :a review* . Applied Microbial Biotechnology. 2006; 71(6): 773-782.

4. El-Mehalawy AA, Gebreel HM, Rifaat HM, El-Kholy IM, Humid AA. *Effect of antifungal compounds produced by certain bacteria on physiological activities of human- and plant- pathogenic fungi*. Journal of Applied Sciences Research. 2008; 4(4): 425-432.

5. Nielsen K, Heitman J. *Sex and Virulence of Human Pathogenic Fungi, Advances in Genetics*. 2007; 57: 143-173.

6. Gebreel HM, El-Mehalawy AA, El-Kholy IM, Rifaat HM, Humid AA. *Anti microbial activities of certain bacteria isolated from egyptian soil against pathogenic fungi*. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences. 2008; 4(4): 331-339.

7. Dworkin H, Falkow S, Rosenberg H, Schleifer K, Stackebrandt E. *The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria* .3rd ed. Bacteria: Firmicutes,Cyanobacteria. 2006; 441-456.

8. Bhattacharya D, Nagpure A, Gupta RK. *Bacterial chitinase: properties and potential.* Critical Review in Biotechnology. 2007; 27(1): 21-28.

9. Flese P, Panda T. *Production of microbial chitinase – a revisit*. Bioprocess Engineering. 2000; 23: 127-134.

10. Kamil Z, Rizk M, Saleh M, Moustaf S. *Isolation and Identification of Rhizosphere Soil Chitinolytic Bacteria and their Potential in Antifungal Biocontrol*. Global Journal of Molecular Sciences. 2007; 2(2): 57-66.

11. Yan E, Hou J, Ding D, Guan W, Wang C, Wu Z, et al. *In vitro antifungal activity and mechanism of actionof chitinase against four plant pathogenic fungi*. Journal of Basic Microbiology. 2008; 48(4): 293–301.

12. Hoster F, Schmitz JE, Daniel R. *Enrichmeant of chitinolytic microorganism: isolation and characterization of a chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel Sreptomyces strain*. Applied Microbiology and Biotechnology. 2005; 66(4): 434-442.

13. Jung WJ, An KN, Jin YL, Park RD, Lim KT, Kim KY, et al. *Biological control of damping-off caused by Rhizoctonia solani using chitinase-producing Paenibacillus illinoisensis KJA-424*, Soil Biology & Biochemistry. 2003; 35(6): 1261–1264..

14. Gohel V, Singh A, Vimal M, Ashwini P, Chhatpar HS. *Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms.* African Journal of Biotechnology. 2006; 5(2): 54-72.

15. Bansode VB, Bajekal S. *Characterization of chitinases from microorganisms isolated from Lonar lakeIndian*. Journal of Biotechnology. 2006; 5(l): 357-363.

16. Shanmugaiah V, Mathivanan N, Balasubramanian N, Manoharan PT. *Optimization of cultural conditions for production ofchitinase by Bacillus laterosporous MML2270 isolatedfrom rice rhizosphere soil*. African Journal of Biotechnology. 2008; 7(15): 2562-2568.

17. Beatriz A, Rodas-Junco, Hector F, Magana-Sevilla, Jose M, Tun-Suarez, Arturo Reyes-Ramirez. *Anti fungal Activity in vitro of Native Bacillus sp.Strains Against Macrophomina phaseolina(Tassi)Goid*. Research Journal of Biological Sciences. 2009; 4(9): 985-989.

18. Wiwat C, Lertcanawanichakul M, Siwayapram P, Pantuwatana S, Bhumiratana A. *Expression of chitinase-encoding genes from Aeromonas hydrophila and seudomonas maltophila in Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*. Gene. 1996; 179(1): 119- 126.

19. Gomaa EZ. *Chitinase production by Bacillus thuringiensis and Bacillus licheniformis: their potential in antifungal biocontrol*. J microbial. 2012; 50(1): 103-11.

Original Article

Antifungal Activity of Soil Chitinolytic Bacilli

Eiri, AJ. (MSc)
MSc of Microbiology, Dept. of Biology Sciences, Faculty of Biology Sciences, Islamic azad University, Tonekabon Branch, Tonkabon, Iran

Nasrollahi Omran, A. (PhD) Associate Professor of Microbiology, Dept. of Microbiology, Faculty of Medicine, Islamic Azad University, Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran

Pordeli, H. (PhD)
Assistant Professor of Microbiology, Dept. of Microbiology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University, Gorgan Branch, Gorgan, Iran

Corresponding Author: Nasrollahi Omran, A.

Email: Ayat51@yahoo.co.in

Received: 12 May 2012
Revised: 22 Jun 2012
Accepted: 24 Jun 2012

Abstract

Background and Objective: Chitin, which is a linear polymer of N-acetyl glucosamine residues, has been the most abundant polymer in nature after cellulose. In recent decades, Chitinases have received increased attention because of their wide range of applications, especially in biological control against fungi.

Material and Methods: the isolation of bacilli producing chitinolytic enzymes was performed by collecting 40 soil samples from various regions of Gorgan, northern of Iran. The chitinolytic potential of the isolates was indicated by observation of clear zone in colloidal chitin agar medium. Identification of selected strains was performed by polyphasic taxonomy, and subtler identification and sequensing were carried out by extraction DNA. Antifungal effect was evaluated by well method against *Candida albicans* (ATCC 10231) *Aspergillus niger* (ATCC 2029)،*Aspergillu sflavus* (IR6) *Fusarium oxyporum* (PTCC 5115) and *Alternaria alternata* (PTCC 5224).

Results: Nine colonies of chitinase positive bacillus were isolated on choloidal Chitin Agar (CCA) and five of them had antifungal effect. R6 strain had the highest, and R2 and R3 had the lowest effect on fungi. The 16S rRNA sequence of these isolations in comparison with the known bacteria has 95-97% similarity.

Conclusion: Some of the soil bacteria can have antagonestic effects on human and phytopathogenic agents existed in soil.

Keywords: *Bacillus*; Chitinase; Soil; Antifungal

This paper should be cited as: Eiri AJ, Nasrollahi Omran A, Pordeli H. [Antifungal Activity of Soil Chitinolytic Bacilli]. MLJ. 2014; 7(Suppl.5):37-44 [Article in Persian]