Applied Entomology and Phytopathology آفات و بیماری‌های گیاهی

Vol. 93, No. 1, Sep., 2025 جلد۹۳، شماره ۱، شهریور ۱٤۰٤

Scientific article

Optimization of antifungal metabolite surfactin production by *Bacillus velezensis* UTB96

MAEDEH AHMADZADEH [1], MALIHEH VAHIDI NASAB[2], MASOUD AHMADZADEH[3]✉

1. Undergraduate student, Department of Plant Protection, College of Agriculture, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Tehran, Iran ; 2. Ph.D candidate, Institute of Food Science and Biotechnology. University of Hohenheim, Germany; 3. Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Tehran, Iran

(Received: July, 2025; Accepted: Sep. 2025)

Abstract

Surfactin is one of the most effective bacterial cyclic lipopetides mainly produced by different species of *Bacillus* that has antifungal activity. This compound are considered for using in various industries, medical and pharmaceutical and agricultural as an effective antibiotic for pest and disease management. Mostly the production of secondary metabolites in microorganisms is strongly influenced by physical and chemical conditions. In the current study, effect of some factors on surfatin production of B. *velezensis* UTB96 were evaluated. This strain was able to reduce the surface tension of the water from 72 mN/m to 30 mN/m. In this research we evaluated the production of surfactin by *B. velezensis* UTB96 as a potent producer. The strain was cultured in two different media. The effect of different incubation time including 24, 48 and 72 hours, different temperature including 25 and 37˚ C, and also, different sources of nitrogen and finally different concentration of microelements surfactin production has been evaluated using HPLC analysis. HPLC analysis indicated that surfactin considerably produced at the optimum temperature of 37˚C for a 48h-incubation period. Regarding media components, it was found that the optimum nitrogen source was NH_4NO_3 (50 mM) and also, the optimum mineral slats were $MnSO_4$ (0.01 mM), $FeSO_4$ (4 uM). These results tend to suggest that *B. velezensis* UTB96 might be an appropriate strain to produce surfactin in bioreactor fermentation for large-scale production in order to apply for controlling *Aspergillus flavus* and to reduce its mycotoxin, aflatoxin as well. It was also revealed that the extracted cyclic lipopeptides could inhibit the growth of the fungus *A. flavus* at the concentration of 1mg/ml.

Keywords: Antimicrobials, *Aspergillus*, biosurfactant, cyclic lipopeptid, surfactin

DOI: http://doi.org/ 10.22092/jaep.2025.366438.1522
✉ **ahmadz@ut.ac.ir**
©2025, The Author(s). Published by Iranian Research Institute of Plant Protection (IRIPP). This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0)

Applied Entomology and Phytopathology
Vol. 93, No. 1, Sep., 2025

آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد۹۳، شماره ۱، شهریور ۱٤۰٤

مقاله پژوهشی

بهینه‌سازی تولیدترکیب ضد قارچی سورفکتین در *Bacillus velezensis* UTB96

مائده احمدزاده[۱]، ملیحه وحیدی نسب[۲]، مسعود احمدزاده[۳]✉

۱- دانشجوی کارشناسی، گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، ایران؛
۲- دانشجوی دکترای، انستیتو علوم غذایی و بیوتکنولوژی، دانشگاه هوهنهایم، آلمان؛
۳- استاد، گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: تیر ۱٤۰٤؛ تاریخ پذیرش: شهریور ۱٤۰٤)

چکیده

سورفکتین قدرتمندترین و یکی از مهم‌ترین لیپوپپتیدهای حلقوی است که توسط *Bacillus velezensis* و برخی گونه‌های *Bacillus* دیگر تولید می‌شود و کاربرد وسیعی در صنعت، پزشکی، داروسازی و کنترل زیستی آفات و بیماری‌های گیاهی در کشاورزی دارد. به‌منظور افزایش تولید لیپوپپتیدهای حلقوی، انتخاب محیط کشت مناسب و اقتصادی و مهیاکردن بهترین شرایط محیطی تولید، اهمیت زیادی دارد. سویه *B. velezensis* UTB96 با تولید لیپوپپتیدهای حلقوی موجب کاهش کشش سطحی آب از ۷۲ mN/m به ۳۰ mN/m شد. در این پژوهش، دو محیط کشت متفاوت تهیه شد و میزان تولید سورفکتین با استفاده از HPLC در زمان‌های ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی، در دو دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سلسیوس و دو محیط متفاوت از نظر منابع نیتروژن و برخی فلزات مؤثر محاسبه شد. نتایج نشان‌داد که بیشترین میزان تولید سورفکتین مربوط به دمای ۳۷ درجه سلسیوس، طول دوره رشد ٤۸ساعته و با منبع نیتروژن نیترات آمونیوم و غلظت ۰/۰۱ میلی‌مول سولفات منگنز و چهار میکرومول سولفات آهن بود. به‌طور کلی، نتایج این پژوهش نشان داد که سویهٔ *B. velezensis* UTB96 توان بالقوه‌ای در تولید لیپوپپتید حلقوی سورفکتین دارد و بهینه‌سازی محیط کشت و عوامل محیطی تاثیر معنی‌داری بر افزایش میزان تولید سورفکتین دارد؛ لذا این سویه را می‌توان برای کاربردهای صنعتی و تولید تجاری سورفکتین پیشنهاد کرد. همچنین، لیپوپپتیدهای حلقوی خالص‌سازی شده از این سویه در غلظت یک میلی‌گرم بر میلی‌مول توانستند از رشد قارچ *Aspergillus flavus* جلوگیری کنند.

کلمات کلیدی: آسپرژیلوس، بیوسورفکتانت، خواص ضد میکروبی، سورفکتین، لیپوپپتید حلقوی

DOI: http://doi.org/ 10.22092/jaep.2025.366438.1522
✉ **ahmadz@ut.ac.ir**
©2025, The Author(s). Published by Iranian Research Institute of Plant Protection (IRIPP). This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0)

مقدمه

لیپوپپتیدهای حلقوی متابولیت‌هایی هستند که طی واکنش‌های مرحله به مرحله و پیچیده از فعالیت پپتید سنتتازهای غیرریبوزومی حاصل می‌شوند. به‌علت سمّیت کمتر برای جانوران، زیست‌تخریب‌پذیری و پتانسیل کاهش قابل‌توجه کشش سطحی، جایگزین مناسبی برای سورفکتانت‌های صنعتی محسوب می‌شوند (Ahmadzadeh and Sharifi Tehrani, 2021). سویه‌هایی از دو گونهٔ *Bacillus subtilis* و *Bacillus amyloliquifaciens* بزرگترین خانواده‌های لیپوپپتیدهای حلقوی یعنی سورفکتین، ایتورین، فنجایسین و همچنین خانوادهٔ تازه شناسایی‌شده‌ای با نام لوسیلومایسین را تولید می‌کنند (Luo *et al.*, 2015; Raaijmakers *et al.*, 2010). لیپوپپتیدهای خانواده سورفکتین از یک حلقه هپتاپپتیدی تشکیل شده‌اند که به یک زنجیرهٔ اسیدچرب بتاهیدروکسی (β-hydroxy fatty acids) ۱٤–۱۷ کربنه متصل است. در واقع بخش انتهای زنجیرهٔ اسید چرب در تشکیل حلقهٔ هپتاپپتیدی مشارکت می‌کند و یک حلقه ماکرولاکتونی (Macrolactone ring) را می‌سازد (Ongena and Jacques, 2008). اعضای مهم خانوادهٔ سورفکتین شامل سورفکتین، لیچنایسین، پومیلاسیدین و اسپرین هستند. تفاوت آنها در توالی اسیدهای آمینه و طول زنجیرهٔ کربنی آنهاست. سورفکتین‌ها به دلیل طبیعت آمفی‌فیلیک خود می‌توانند به‌آسانی و محکم به لایهٔ لیپیدی غشاهای سلولی متصل شوند. این لیپوپپتیدهای حلقوی قدرتمندترین و یکی از مهم‌ترین لیپوپپتیدحلقوی تولیدشده به‌وسیله باکتری *B. subtilis* هستند و کاربرد وسیعی در صنعت، پزشکی و داروسازی و کنترل زیستی آفات و بیماریها در کشاورزی دارند. تولید لیپوپپتیدهای حلقوی نقش مهمی در خاصیت بازدارندگی رشد بیمارگرهای گیاهی در گونهٔ *B. subtilis* به عنوان یک عامل کنترل زیستی را دارد (Ahmadzadeh and Sharifi Tehrani, 2021). لیپوپپتیدهای حلقوی دارای خاصیت ضد ویروس، باکتری، قارچ، مخمر، مایکوپلاسمای قوی هستند و در حوزهٔ کشاورزی و کنترل–بیولوژیک از آنها استفادهٔ زیادی می‌شود. فعالیت ضد قارچی لیپوپپتیدهای حلقوی مختلف، علیه قارچ‌های متعددی و برخی مخمرهای بیماریزای انسانی و گیاهی از جمله *Aspergillus* spp. بررسی شده است. طول زنجیرهٔ اسیدچرب و توالی اسیدآمینه ای سیکلوپپتید لیپوپپتیدها در نحوهٔ عمل و نقش آنها مؤثر است (Raaijmarker *et al.*, 2010). علاوه بر مشارکت در آنتاگونیسم، لیپوپپتیدهای تولیدشده توسط جنس *Bacillus* و به‌خصوص سورفکتین در القای مقاومت سیستمیک گیاهان (Jourdan *et al.*, 2009; Ongena *et al.*, 2005)، در افزایش تحرک باکتری و توانایی ارتباط و استقرار موفق روی ریشه گیاه، به عبارت بهتر، کلنیزاسیون (Bais *et al.*, 2004; Kearns *et al.*, 2004) و همچنین، در تشکیل بیوفیلم (Hofemeister *et al.*, 2004)، نقش دارند.

در تولید تجاری یک محصول بیوکنترل، انتخاب یک بسترکشت مناسب و به‌صرفه اهمیت زیادی دارد. به منظور جایگزین کردن بیوسورفکتانت‌ها به‌جای سورفکتانت‌های سنتتیک، باید از منابع ارزان قیمت استفاده کرد (Ghribi *et al.*, 2011). به‌طوری که باکتری بتواند بیشترین مقدار این متابولیت‌های ثانویه را تولید کند. بدین منظور، محققان سعی کرده‌اند تا از ضایعات کشاورزی و بسترهای کشت ارزان استفاده نمایند. تولید لیپوپپتیدهای حلقوی در هر دو محیط کشت مایع (Submerged State Fermentation) و جامد (Solid State Fermentation) امکان‌پذیر است (Zhu *et al.*, 2013). منبع کربن برای کلیه فعالیت‌های بیوسنتزی که منجر به تولید مثل، تولید متابولیت‌ها و بقای سلول می‌شود، مورد نیاز است. مناسب‌ترین منبع کربن برای تولید سورفکتین، قند گلوکز به میزان ۳٤ گرم در لیتر می‌باشد (Joshi *et al.*,2008). درحالیکه عده‌ای از محققین نشان دادند که علاوه بر قند گلوکز، ملاس چغندرقند به میزان ۱٦۰ میلی لیتر بر لیتر، منبع کربن مناسبی برای بهینه‌سازی سورفکتین می‌باشد. منبع کربن اصلی موجود در این ترکیب، قند سوکروز است. سوکروز پس از قند کلوگز، یک منبع کربن مناسب جهت بهینه‌سازی تولید لیپوپپتیدهای حلقوی معرفی شده است (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2008). تصفیه ملاس و رقیق‌سازی آن قبل از استفاده نیز، بر کیفیت

محصول بیوکنترل تولیدشده تاثیر دارد (Banat *et al.,* 2014). هدف از این پژوهش، بهینه‌سازی شرایط رشد باکتری و فراهم‌کردن مناسب‌ترین شرایط محیطی به منظور دستیابی به افزایش تولید لیپوپپتیدهای حلقوی به ویژه سورفکتین و افزایش کارایی بیوکنترل است. در تحقیق حاضر، با درنظرگرفتن جنبهٔ اقتصادی، یک محیط کشت مناسب به منظور بهینه‌سازی لیپوپپتیدهای حلقوی انتخاب شد.

مواد و روش

تهیه و نگهداری سویه *Bacillus velezensis* UTB96

سویهٔ *Bacillus velezensis* UTB96 از کلکسیون آزمایشگاه کنترل بیولوژیک دانشگاه تهران تهیه شد. البته به غیر از آزمون‌های بیوشیمیایی و بررسی ناحیهٔ 16s rRNA که قبلاً انجام گرفته بود (Bagher *et al*. 2018) ، آزمون‌های ملکولی تکمیلی برای شناسایی دقیق گونه، انجام گرفته است. این سویه که ژنوم آن نیز تعیین ترادف شده است (Accession number: CP036527.1)، در حال حاضر، یک سویهٔ پروبیوتیک برتر محسوب می‌شود و به عنوان تولیدکننده سورفکتین مطرح است (Keshavarzi *et al.,* 2018; Vahidinasb *et al.,* 2019). به‌منظور نگهداری کوتاه‌مدت باکتری از محلول یک‌دهم مولار $MgSO_4$ و برای نگهداری بلندمدت نیز از محیط لوریا برتانی[1] (LB) به نسبت حجمی مساوی با گلیسیرین (۸۷ درصد) سترون، درون ویال‌های اپندورف سترون مخلوط و در فریزر ۸۰- درجه سلسیوس استفاده شد.

محیط کشت اولیه رشد باکتری *B. velezensis* UTB96

تولید انواع لیپوپپتیدها در سویهٔ *B. velezensis* UTB96 از بین ده‌ها جدایهٔ باکتری، به عنوان یک باکتری برتر پروبیوتیک گیاهی به اثبات رسیده است (Afsharmanesh *et al.,* 2014). در همهٔ آزمایش‌ها، باکتری ابتدا روی محیط کشت آگار مغذی (NA) کشت شد. پس از ٢٤ ساعت یک لوپ از باکتری رشد یافته در این محیط کشت به ۲۰۰ میلی لیتر درون ارلن‌های پانصد میلی لیتری حاوی در محیط کشت LB رشد داده‌شد. پس از ۱۸-١٤ ساعت رشد باکتری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و ۱۸۰ دور در دقیقه از آن به‌عنوان زادمایهٔ اولیه استفاده شد. در این پژوهش، از ملاس چغندرقند به‌عنوان منبع کربن باکتری استفاده شد. شربت خیساندهٔ ذرت به عنوان منبع نیتروژن آلی و نیترات آمونیوم (NH_4NO_3) به عنوان منبع نیتروژن معدنی انتخاب شدند. از آنجایی که اضافه‌کردن غلظت مناسبی از برخی فلزات، تغییرات معنی‌داری در تولید لیپوپپتیدهای حلقوی ایجاد می‌کند، در این پژوهش نیز با توجه به نتایج کارهای پیشین توسط دیگر محققان ، سه فلز منگنز، منیزیوم و آهن به شکل نمک‌های سولفات استفاده شدند (Mizumoto and Shoda, 2007; Gancel *et al.,* 2009). همچنین، از نمک‌های منوپتاسیم فسفات ($KHPO_4$)، دی‌پتاسیم فسفات (K_2HPO_4)، کلرید کلسیم ($CaCl_2$) و کلرید پتاسیم (KCl) جهت ثابت ماندن pH و ایجاد محیط بافری استفاده شد (جدول۱).

جدول ۱- محیط کشت پایه و اصلاح‌شده

Table 1. Original and modified culture media

Modified medium	Original medium	
Molasses 10g/l	Molasses 10g/l	Carbon source
NH_4NO_3 50mM	Corn steep liquor 5g/l	Nitrogen source
$MgSO_4$ 0.5g/l	$MgSO_4$ 0.5g/l	
$KHPO_4$ 0.5g/l	$KHPO_4$ 0.5g/l	
K_2HPO_4 1g/l	K_2HPO_4 1g/l	Buffers
0.5g/l $CaCl_2$	0.5g/l $CaCl_2$	
KCl 0.5g/l	KCl 0.5g/l	
$FeSO_4$ 0.008g/l	$FeSO_4$ 0.008g/l	Cations
$MnSO_4$ 0.01mM	$MnSO_4$ 0.1g/l	

Luria-Bertani (LB)

نمودار رشد باکتری طی ۱۷ ساعت در سه محیط کشت LB، پایه و اصلاح‌شده

برای مقایسهٔ منحنی رشد، سویه *B. velezensis* UTB96 در محیط‌های کشت LB، پایه و اصلاح‌شده، در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و تکان ۱۸۰ دور در دقیقه رشد داده شدند. میزان رشد این دو باکتری، در محیط‌های مختلف، با اندازه‌گیری جذب نوری آنها در ٦۰۰ نانومتر، هر یک ساعت یک‌بار در طی ۱۷ ساعت اندازه‌گیری‌شد.

بررسی اثر دما و طول دورهٔ کشت بر میزان تولید لیپوپپتیدهای حلقوی دو محیط کشت پایه و اصلاح‌شده

ابتدا محیط‌های کشت پایه و اصلاح‌شده تهیه شد. سپس این محیط‌ها به میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر درون ارلن‌های ۲۵۰میلی‌لیتری ریخته شدند. پس از تنظیم pH آنها بر روی ٦/۸ و سترون نمودن، زادمایهٔ باکتری با نسبت هفت درصد از کشت تازهٔ ۱۸–۱٤ ساعتهٔ آن‌ها در محیط مایعLB، به آنها مایه زنی شد. محیط‌های مایه‌زنی‌شده در دور ثابت ۱۸۰ دور در دقیقه در دو دمای مختلف ۲۵ و ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند. ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت پس از رشد، باکتری‌ها برداشت شدند. برای هر کدام از تیمارها، سه تکرار در نظر گرفته شد. مایع رویی (سوپرناتانت) باکتری با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ (هشت هزار دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه) برای انجام آزمایش‌های بعدی به‌دست آمد.

استخراج لیپوپپتیدهای حلقوی

سلول‌های باکتری به‌وسیلهٔ سانتریفیوژ (هشت هزار دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه) از مایع رویی جداشدند. بلافاصله پس از آن، اسیدیته سوپرناتانت به‌وسیلهٔ اسید کلریدریک شش نرمال به دو واحد رسانده شد و به‌مدت ۸–٦ ساعت در دمای چهار درجه سلسیوس قرار داده شدند (Hsieh *et al.*, 2004). سپس با سانتریفیوژ در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس، رسوب حاصل، جمع‌آوری و بخش پپتیدی آن با استفاده از ترکیب متانول استخراج شد. در مرحلهٔ بعدی حلال متانول به کمک فشار در روش خشک‌انجمادی در دمای ٦۰- درجه سلسیوس حذف شده، رسوب حاصل در فریزر با دمای منفی چهار درجه سلسیوس نگهداری شد.

ردیابی تولید سورفکتین با استفاده از HPLC

برای تعیین غلظت سورفکتین از دستگاه HPLC ساخت شرکت KNAUER کشور آلمان مدل PLATIN blue و رابط نرم‌افزاری EZChrom Eilte استفاده شد. قبل از تزریق نمونه‌ها، استاندارد سورفکتین خریداری‌شده از سیگما، از فیلتر استات سلولزی ۰/۲ میلی‌متری عبور داده شد و به مقدار ده میکرولیتر از آن به دستگاه HPLC تزریق گردید. محلول حاوی لیپوپپتیدها، روی ستون سلولزی ODS-2 C18 با طول ۲۵۰ میلی‌متر و قطر داخلی چهار میلی‌متر با کمک بافر شوینده (فاز متحرک Mobile phase) شامل استونیتریل همراه با تری فلورواستیک اسید۳/۸ میلی مولار به نسبت ۸۰:۲۰ درصد به صورت ایزوگرادیانت به تعادل درآمد. سرعت جریان (Flow) یک میلی‌لیتر در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و حجم تزریق ۱۰ میکرولیتر بود. در نهایت جذب آن بوسیلهٔ آشکارگر فتو دیود ایی (PDA) (Photo Diode Array) در طول موج ۲۱۰ نانومتر ثبت شد.

بررسی میزان تودهٔ زیستی باکتری در دو محیط کشت پایه و اصلاح‌شده در دمای ۳۷ درجه سلسیوس

میزان تولید توده زیستی (بیومس) باکتری با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ و توزین تودهٔ سلولی مورد سنجش قرارگرفت (Zhu *et al.*, 2013). سلول‌های باکتری به‌وسیلهٔ سانتریفیوژ (ده هزار دور در دقیقه، به مدت ۲۰ دقیقه و دمای چهار درجه سلسیوس) از مایع رویی جداشدند. تودهٔ باکتری دو بار با آب مقطر سترون شستشو و سپس در داخل ظروف آلومنیومی ریخته شدند. توده سلولی باقی‌مانده در روی این ظروف پس از خشک شدن در دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس به مدت یک شب، با در دست داشتن وزن اولیه آنها، توزین شدند.

آزمون‌های بیوشیمیایی برای ارزیابی میزان تولید لیپوپپتیدهای حلقوی

مقدار کلی تولید مواد بیوسورفکتانت در دو محیط پایه و اصلاح‌شده در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به وسیله آزمون‌های بیوشیمیایی لیپاز، جابه‌جایی با نفت و میزان کاهش کشش سطحی به شرح زیر اندازه‌گیری شد.

آزمون تولید لیپاز

طبق روشی متداول (Samad *et al.*, 1998) درچاهک ایجاد شده در مرکز محیط‌کشت تولید لیپاز (دو درصد توئین۸۰، ۰/۱درصد متیل رد و ۲/۵ درصد آگار)، دویست میکرولیتر سوپرناتانت باکتری، اضافه‌شد. پس از ۲٤ ساعت قرارگرفتن

در دمای ۲۸ درجه سلسیوس، هالهٔ ایجادشده در اطراف چاهک‌ها که نشان‌دهنده میزان تولید لیپاز است، بررسی شد.

آزمون جابه‌جایی با نفت خام

طبق روشی استاندارد چهل میلی‌لیتر آب مقطر به تشتک پتری پانزده سانتی‌متری، ریخته‌شد و سپس، بیست میکرولیتر نفت خام به مرکزآب اضافه شد و در نهایت، ده میکرولیتر از مایع رویی باکتری، به مرکز نفت خام پخش‌شده در سطح آب اضافه شد (Morikawa *et al.*, 1993). بعد از سی ثانیه، قطر هالهٔ ایجادشده اطراف باکتری که نشان‌دهندهٔ تولید بیوسورفکتانت است، اندازه‌گیری شد. این آزمایش با پنج تکرار انجام شد.

آزمون بررسی میزان کاهش کشش سطحی

میزان کاهش کشش سطحی سوپرناتانت‌ها، با استفاده از دستگاه تنسیومتر موجود در دانشکده شیمی دانشگاه تهران مدل Kruss K6, Germany اندازه‌گیری شد و با آب مقطر به عنوان شاهد، مقایسه شد (Gudina *et al.*, 2002).

بررسی خاصیت ضد قارچی لیپوپپتیدهای حلقوی استخراج شده

سوسپانسیون اسپور قارچ با غلظت 10^5 اسپور در میلی‌لیتر تهیه و به محیط کشت PDA(potato dextrose agar) سترون شده اضافه شد. پس از سردشدن محیط، چاهکی به قطر هشت میلی‌متر در وسط تشتک پتری ایجاد شد. لیپوپپتیدهای حلقوی از محیط پایه و اصلاح‌شده، پس از ٤٨ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، خالص شدند و با غلظت یک میلی گرم در میلی لیتر در حلال آلی متانول مخلوط شده، در نهایت، به چاهک ایجادشده در وسط تشتک پتری ریخته شدند. پس از پنج روز، میزان هاله بازدارندگی اطراف چاهک اندازه‌گیری شد.

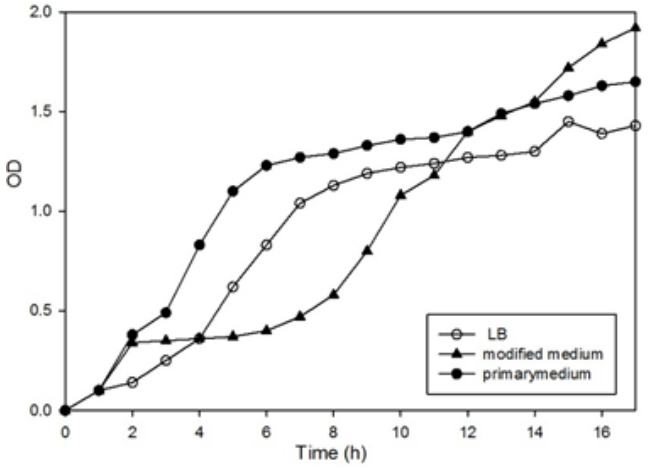
آنالیز آماری و تجزیه و تحلیل

به منظور تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه 27.0.1 استفاده شد و میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک یا پنج درصد مقایسه شدند. به منظور رسم نمودار نیز، از نرم‌افزار SigmaPlot استفاده شد.

نتایج

نمودار رشد باکتری طی ۱۷ ساعت در سه محیط کشت LB، پایه و اصلاح شده

مقایسه نمودار رشد باکتری *B. velezensis* UTB96 در سه محیط پایه، اصلاح‌شده و LB نشان داد که الگوی رشد این جدایه مشابه با سایر باکتری‌ها دارای یک فاز تاخیر، فاز لگاریتمی و سکون است، اما این الگوی رشد، در محیط‌های مختلف، متفاوت است. رشد باکتری در محیط پایه و LB، بیشتر به هم شبیه بوده، با این تفاوت که زمان رسیدن باکتری به فاز لگاریتمی در محیط پایه سریعتر از محیط LB است. در محیط پایه سرعت رشد باکتری در شش ساعت اول رشد، بیشتر از محیط اصلاح‌شده است و پس از آن کم شده تا این‌که به فاز سکون می‌رسد و ثابت می‌شود، اما در محیط اصلاح‌شده برعکس است و در ساعات اولیه، سرعت رشد پایین است و به تدریج زیاد می‌شود. در نهایت، حداکثر میزان رشد باکتری در محیط اصلاح‌شده مشاهده شد (شکل ۱).

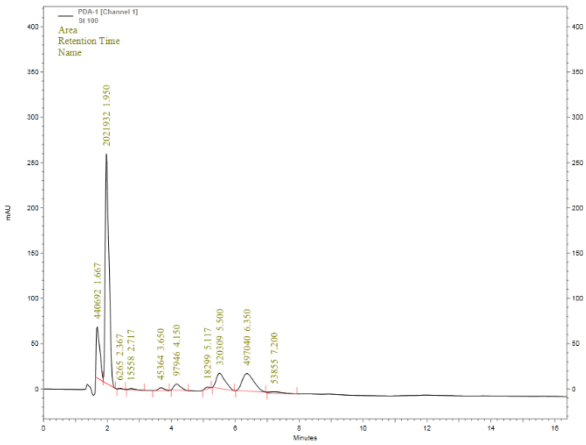


شکل ۱- منحنی رشد باکتری طی ۱۷ ساعت در سه محیط کشت LB، پایه و اصلاح‌شده (اجزای هر دو محیط در جدول ۱ توضیح داده شده‌اند)

Fig 1. Bacterial growth kinetic during 17 hours in three media: original medium, LB and modified (The components of both media was described in Table 1)

اندازه‌گیری میزان تولید سورفکتین

سورفکتین دارای نه ایزومر مختلف است که در کروماتوگرام حاصل از نمونه سورفکتین استاندارد، این نه پیک مشاهده شدند (شکل ۲).



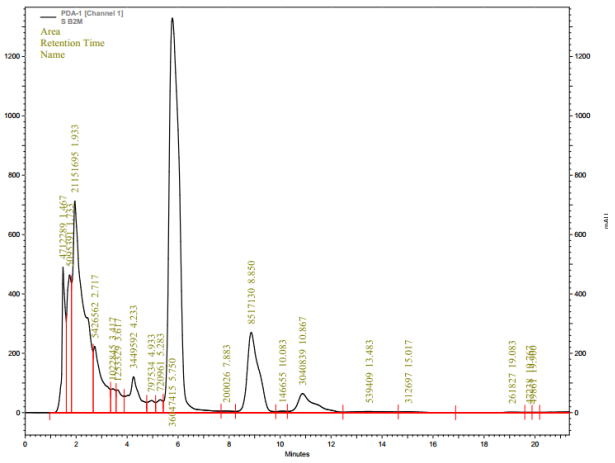
شکل ۲- کروماتوگرام نمونه استاندارد سورفکتین شامل نه ایزومر مختلف

Fig 2. Chromatogram of standard sample of surfactin showing nine isomers

شکل ۳ کروماتوگرام مربوط به تولید سورفکتین در محیط اصلاح‌شده پس از ٤۸ ساعت در دو دمای ۳۷ و ۲۵ درجه سلسیوس را نشان می‌دهند. بر طبق این نتایج، میزان تولید سورفکتین در دمای ۳۷ درجه سلسیوس بیشتر بود و اختلاف معنی‌داری با مقدار سورفکتین در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نشان داد. بیشترین میزان تولید سورفکتین تولیدشده مربوط به دمای ۳۷ درجه سلسیوس و ٤۸ ساعت پس از کشت باکتری است (جدول۲)؛ بنابراین، برای انجام سایر آزمایش‌ها از این دمای و طول دورهٔ کشت ٤۸ ساعته به منظور رشد باکتری استفاده شد.

میزان تودهٔ زیستی باکتری در دو محیط کشت پایه و اصلاح‌شده در دمای ۳۷ درجه سلسیوس

در ابتدا تفاوت چندانی بین میزان تودهٔ زیستی باکتری مشاهده نشد و پس از ٤۸ ساعت روند رشد باکتری در محیط اصلاح‌شده افزایش یافت. در نهایت، بیشترین میزان تودهٔ زیستی باکتری مربوط به محیط پایه و پس از ۷۲ ساعت اندازه‌گیری شد (شکل ٤).



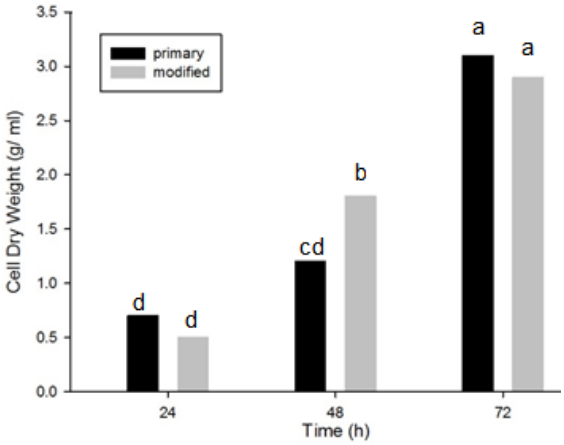
شکل ۳- کروماتوگرام تولید سورفکتین (شامل ایزومرهای مختلف) در محیط اصلاح‌شده، پس از ٤۸ ساعت و دمای ۳۷ درجه سلسیوس

Fig 3. Chromatogram of standard sample of surfactin showing several isomers following incubation in modified medium for 48 h at 37ºC

جدول۲- میزان تولید سورفکتین در تیمارهای مختلف در آزمون HPLC

Table 2. Measurement of surfactin analyzed by HPLC assay

Surfactin production mg/ml	Treatment	Surfactin production mg/ml	Treatment
2.083c	24-h growth in original medium, 25˚C	3.575 bc	48-h growth in modified medium, 25˚C
2.219 c	24-h growth in original medium, 37˚C	6.529 a	48-h growth in modified medium, 37˚C
1.326 d	24-h growth in modified medium, 25˚C	2.221 c	72-h growth in modified medium, 25˚C
4.61 bc	24-h growth in modified medium, 37˚C	4.084 bc	72-h growth in modified medium, 37˚C



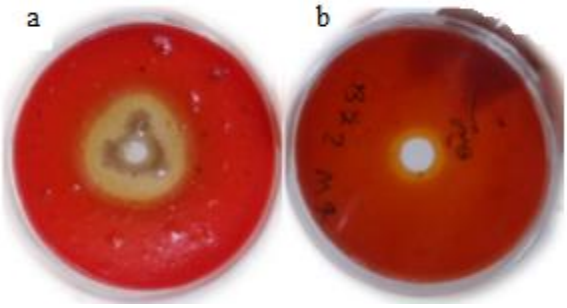
شکل ٤- مقایسهٔ میزان توده زیستی باکتری در دو محیط پایه و اصلاح شده در دمای ۳۷ درجه سلسیوس

Fig 4- Comparison of bacterial biomass cultured on two medium at 37°C

آزمون‌های بیوشیمیایی برای ارزیابی میزان تولید لیپوپپتیدهای حلقوی

آزمون لیپاز

در آزمون لیپاز، هالهٔ روشن ایجادشده در اطراف چاهک حاوی مایع رویی باکتری (سوپرناتانت)، نشان‌دهندهٔ میزان تولید آنزیم لیپاز است. نتایج این آزمون نشان داد که میزان هالهٔ ایجادشده از سوپرناتانت باکتری رشدیافته در محیط LB کمتر از محیط پایه و اصلاح‌شده بود. در واقع میزان تولید لیپوپپتیدهای حلقوی در دو محیط پایه و اصلاح‌شده بیشتر از محیط LB است (شکل ٥).



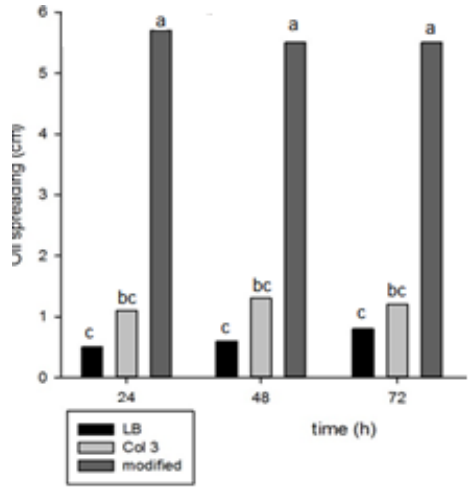
شکل ٥- آزمون تولید لیپاز. b: سوپرناتانت *Bacillus velezensis* UTB96رشدیافته در محیط LB به مدت ٤٨ ساعت؛ a: سوپرناتانت *Bacillus velezensis* UTB96 رشدیافته در محیط اصلاح‌شده به مدت ٤٨ ساعت

Fig. 5. Lipase production test. b) Supernantant of *Bacillus velezensis* UTB96 grown in LB for 48 hours and a)

grown in the modified medium for 48 hours.

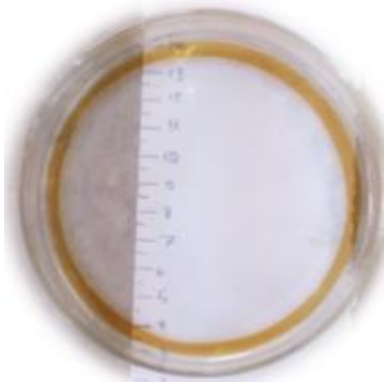
آزمون جابه‌جایی با نفت خام

بر طبق نتایج این آزمون، قسمت رویی سوسپانسیون باکتری حاصل از سانتریفیوژ محیط اصلاح‌شده، پخش‌شدگی بیشتری در نفت خام داشت و اختلاف آنها با محیط پایه در سطح یک درصد کاملا معنی‌داربود. قسمت رویی سوسپانسیون (سوپرناتانت) حاصل از سانتریفیوژ باکتری ٤٨ ساعت رشدیافته در محیط LB کمترین قطر پخش‌شدگی را نشان داد(شکل‌های ٦ و ٧).



شکل ٦- مقایسه قطر پخش‌شدگی در نفت خام مربوط به مایع رویی (سوپرناتانت) باکتری *Bacillus velezensis* UTB96 در سه محیط پایه، اصلاح‌شده و LB

Fig. 6. Oil displacement test (dispersing diameter) of *Bacillus velezensis* UTB96 in supernatant of three different media (control, LB and modified)

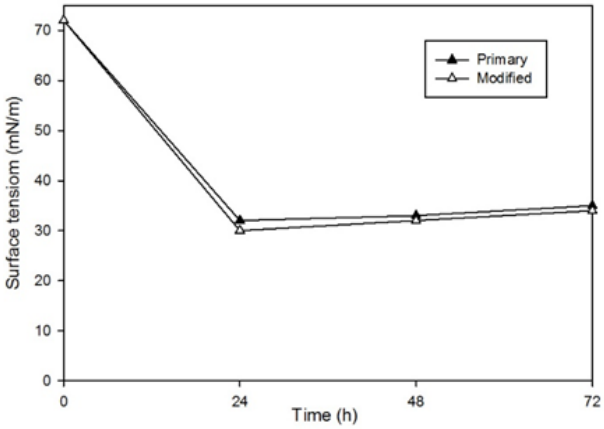


شکل ٧- آزمون پخش شدگی مایع رویی (سوپرناتانت) باکتری *Bacillus velezensis* UTB96 رشدیافته در محیط اصلاح‌شده در نفت خام

Fig. 7. Oil displacement test for *B. velezensis* UTB96 supernatant grown in modified medium

آزمون بررسی میزان کاهش کشش سطحی

سوپرناتانت باکتری حاصل از دو محیط پایه و اصلاح‌شده توانستند کشش سطحی را به‌خوبی کاهش دهند. در این آزمون کشش سطحی آب مقطر ۷۲ mN/m محاسبه شد و مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ باکتری در تیمارهای زمانی مختلف ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت توانستند به‌طور متوسط کشش سطحی آب را تا ۳۰mN/m کاهش دهند (شکل ۸).

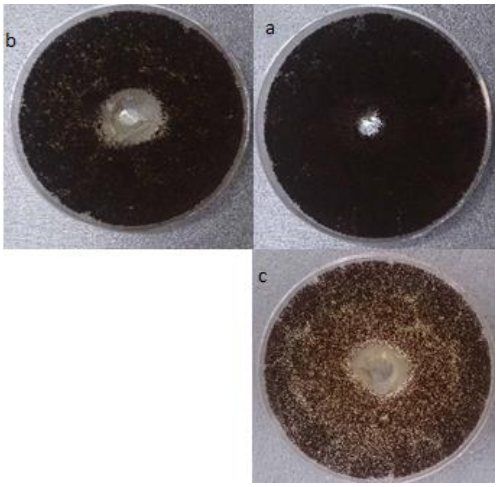


شکل ۸- میزان کاهش کشش سطحی باکتری *Bacillus velezensis* UTB96 در دو محیط پایه و اصلاح‌شده

Fig. 8. Reducing ability of tension surface of *Bacillus velezensis* UTB96 in both basic and modified culture media

بررسی خاصیت ضد قارچی لیپوپپتیدهای حلقوی استخراج شده

هالهٔ بازدارندگی از رشد قارچ در اطراف چاهک حاوی لیپوپپتیدهای خالص‌شده از محیط‌های پایه و اصلاح‌شده نشان داد که لیپوپپتیدهای خالص‌سازی شده می‌توانند از رشد *A. flavus* جلوگیری کند (شکل ۹). فعالیت ضد قارچی لیپوپپتیدهای حلقوی تولیدشده توسط باکتری‌های جنس *Bacillus* به ایتورین و فنجایسین نسبت داده می‌شود و سورفکتین با فعالیت تشدیدکنندگی (سینرژیستی) خود این خاصیت را افزایش می‌دهد. تولید این ترکیبات در آزمایش‌های قبلی در این سویه به اثبات رسیده بود (Afsharmanesh *et al.* 2014).



شکل ۹- آزمون بررسی خاصیت ضد قارچی لیپوپپتیدهای حلقوی استخراج شده a: شاهد، b: لیپوپپتیدهای استخراج‌شده از محیط پایه و c: لیپوپپتیدهای استخراج‌شده از محیط اصلاح‌شده
(اجزای هر دو محیط در جدول ۱ توضیح داده شده‌اند)

Fig. 9. Antifungal activity of lipopeptides in a) Control, b) basic medium and c) modified medium
(The components of both media was described in Table 1)

بحث

بیوسورفکتانت‌ها لیپوپپتیدهای حلقوی تولیدشده از سلول برخی باکتری‌ها هستند که دارای بخش آب‌دوست و آب‌گریز می‌باشند و کشش سطحی را کاهش می‌دهند و به دلیل تجزیه‌پذیربودن، جایگزین مناسبی برای سورفکتانت‌های مصنوعی شیمیایی در صنایع مختلف محسوب می‌شوند (Ines and Dhouha, 2015). خواص بیوکنترلی این ترکیبات موجب توان رقابت بیشتر باکتری‌های تولیدکننده آن برای بقا در شرایط نامساعد شده است. این ترکیب علاوه بر کاربرد در صنایع مختلف، در رشد و تکثیر باکتری موثر بوده، علاوه بر خواص ضدمیکروبی، نقش مهمی در کنترل حشرات دارد. ازاین‌رو، بهینه‌سازی تولید آن می‌تواند در فرایند صنعتی شدن، مورد استفاده شرکت‌های خصوصی قرار بگیرد. محققان نشان دادند که عوامل محیطی مختلف مثل دما، اسیدیته، میزان هوادهی، دور شیکر و طول دورهٔ کشت، بر میزان تولید بیوسورفکتانت‌ها موثر است (Joshi *et al.*, 2008).

اسیدیتهٔ مناسب برای تولید سورفکتین حدود ٦/٥ تا ٦/٨ می‌باشد (Abdel-Mawgoud *et al.,* 2008)، درحالی‌که اسیدیتهٔ مناسب برای تولید ایتورین متفاوت است و محققان، مقادیر مختلفی از اسیدیته را در تحقیق خود برای تولید ایتورین پیشنهاد داده‌اند. طبق گزارش Mizumoto and Shoda (2007) بیشترین میزان ایتورین توسط باکتری *B. subtilis* RB14-CS در اسیدیته ٥/٩ تا ٦/٣ تولید شده است. به منظور بهینه‌سازی تولید سورفکتین در این تحقیق اسیدیتهٔ تمام محیط‌های کشت، ٦/٨ در نظر گرفته شد. علاوه بر این فاکتورها، طول دورهٔ رشد باکتری بر تولید بیوسورفکتانت‌ها مؤثر است. بیشترین میزان رشد سویهٔ *B. subtilis* KO تقریباً ٠/٦٠٨ تا ٠/٧٨٠گرم در یکصد میلی‌لیتر محیط LB و ملاس ده درصد، دمای ٤٥ درجه سلسیوس و ٢٤ ساعت طول دوره رشد بوده است (Younis *et al.,* 2010). زمان عامل مهمی در مقدار تولید سورفکتین است. تولید این ترکیب تحت تنظیم سیستم حد نصاب احساس بوده، بیان آن در مراحل پایانی فاز سکون افزایش می‌یابد. این ترکیب در سنتز برخی متابولیت‌های باکتری موثر است، ازاین‌رو، مقدار آن در شرایط خاصی می‌تواند رو به کاهش بگذارد (Ines and Dhouha, 2015; Guez *et al.,* 2021).

لازم به ذکر است که میزان زیاد رشد باکتری لزوماً به معنای افزایش تولید لیپوپپتید نیست. در تحقیق حاضر نیز، بیشترین میزان زیست تودهٔ باکتری به مقدار ٢/٩٦ گرم بر لیتر اندازه‌گیری شد. دمای بهینه برای تولید بیوسورفکتانت‌ها با هم متفاوت است؛ به‌طوری که بهینه دما برای تولید سورفکتین ٣٧ درجه سلسیوس و برای ایتورین ٢٥ درجه سلسیوس می‌باشد (Ohno *et al.,* 1995). این مقدار مربوط به محیط پایه پس از ٧٢ ساعت و در دمای ٣٧ درجه سلسیوس بود. این درحالی است که نتایج HPLC نشان داد که بیشترین میزان تولید سورفکتین مربوط به دمای ٣٧ درجه سلسیوس و بعد از ٤٨ ساعت دورهٔ رشد است. علاوه بر فاکتورهای محیطی، مشخص شده است که غلظت مناسب از برخی فلزات، تغییرات معنی‌داری در تولید لیپوپپتیدهای حلقوی ایجادمی‌کند. اضافه‌کردن غلظت مناسب از سولفات آهن در مراحل مختلف رشد باکتری موجب افزایش معنی‌داری در تولید سورفکتین می‌شود؛ به‌طوری که مقدار سورفکتین از چهار میکرومول به بیش از ٣٥٠٠ میلی‌گرم بر لیتر می‌رسد (Wei and Chu, 1998). فلزات تاثیرگذار دیگر در تولید سورفکتین، منگنز و منیزیوم می‌باشند. غلظت مناسب از یون Mn^{2+} تاثیر بسیار مهمی در افزایش تولید سورفکتین توسط باکتری *B. subtilis* دارد. اضافه‌کردن ٠/٠١ میلی‌مول منگنز موجب افزایش تولید سورفکتین از ٠/٣٣ به ٢/٦ گرم بر لیتر می‌شود (Wei and Chu, 2002). طی تحقیقی در سال ٢٠١١ نیز از فلزات روی، آهن، منگنز و منیزیم جهت بهینه‌سازی تولید بیوسورفکتانت‌ها استفاده شده است. بر طبق نتایج وی، سولفات منگنز و سولفات منیزیم با غلظت‌های به‌ترتیب، ٠/١ و ٠/٥ گرم بر لیتر بیشترین تاثیر را در میزان تولید بیوسورفکتانت‌ها داشته‌اند(Li and Li, 2011). در تحقیق حاضر میزان تولید سورفکتین در دو محیط پایه و اصلاح‌شده در زمان‌های متفاوت کشت بررسی شد. این دو محیط از نظر منابع نیتروژن و غلظت عناصر مؤثر منگنز و آهن با هم تفاوت داشتند. از آنجایی که منابع نیتروژن معدنی نسبت به آلی در تولید سورفکتین مؤثرتر هستند، یکی از علل موفق‌تر بودن محیط اصلاح‌شده در تولید سورفکتین را می‌توان به جایگزین شدن آمونیوم نیترات با شربت خیسانده ذرت نسبت داد. علاوه بر این، فلزات آهن و منگنز نیز در تولید لیپوپپتیدهای حلقوی به خصوص سورفکتین بسیار مؤثر هستند که در ترکیب محیط اصلاح شده با توجه به نتایج سایر محققین از غلظت‌های کمتر نسبت به محیط پایه استفاده شد. به‌طور کلی کاهش یا افزایش تولید لیپوپپتیدهای حلقوی را نمی‌توان به اضافه کردن هر یک از این ترکیبات به تنهایی نسبت داد؛ چرا که تغییر غلظت هریک از این ترکیبات می‌تواند بر تأثیری که دیگری دارد، اثر بگذارد؛ بنابراین همواره باید برایند اثر ترکیبات موجود در محیط کشت باکتری در شرایط محیطی متفاوت مورد توجه قرار گیرد. نتایج آزمون‌های لیپاز و کاهش کشش سطحی آب از ٧٢ mN/m به ٣٠ mN/m نشان داد که این باکتری در تولید لیپوپپتیدها توانمندی قابل

توجهی دارد. آزمون جابه‌جایی با نفت خام و کنارزدن آن از سطح آب نشان داد که این جدایه از کارایی نسبتاً خوبی برخوردار است و اثر این بیوسورفکتانت می‌تواند در حذف باقی‌مانده‌های نفتی مورد بررسی قرارگیرد. در این تحقیق، خاصیت ضدقارچی لیپوپپتیدهای حلقوی خالص‌سازی شده از *B. velezensis* UTB96 بر *Aspergillu flavus* به اثبات رسید.

شاکری و همکاران در تحقیقات خود ۹ گونه قارچ را انارهای آلوده داخل باغ و انبار جداسازی کردند و بر اساس گزارش آنها گونهٔ *A. flavus* از توانایی بالایی در نفوذ و رشد و تکثیر برخوردار بود و در همهٔ نمونه‌های آلوده بدون استثنا وجود داشته است (نقل از Afsharmanesh *et al.*, 2014). در حال حاضر پوسیدگی میوهٔ انار در انبار یا در مراحل بازاررسانی، مهمترین مشکل انبارداری و مانع عمدهٔ صادرات میوه انار محسوب می‌شود؛ لذا با توجه به نتایج مؤثر این جدایه باکتری بر روی قارچ مذکور در شرایط آزمایشگاه، آزمایش‌ها و تحقیقات تکمیلی بیشتر می‌تواند در باغ جهت کاهش عوامل پوسیدگی انار انجام شود. اثبات شده است که تولید آنزیم لیپاز در باکتری‌ها همزمان با تولید بیوسورفکتانت می‌باشد (Colla *et al.*, 2010). بنابراین آزمون تولید لیپاز راهی برای ارزیابی تولید بیوسورفکتانت‌ها محسوب می‌شود.

به‌طور کلی بهینه‌سازی تولید نوع خاصی از لیپوپپتیدها مانند سورفکتین، به دلیل اشتراک در برخی مسیرهای بیوشیمیایی، کار آسانی نیست (Abdel-mawgoud et al. 2008). هر یک از اعضای این خانوادهٔ لیپوپپتیدهای حلقوی خواص ضدمیکروبی یا حشره‌کشی متفاوتی دارند؛ از این‌رو یافتن شرایط و منابع غذایی (کربن، ازت، نسبت آنها و مواد معدنی) مستلزم تحقیقات گسترده‌تری است که درحال انجام و تکمیل‌شدن می‌باشد. ایتورین اگرچه به دلیل خواص ضدقارچی مشهور است اما کارهای تحقیقاتی متعددی نشان داد که این ترکیب، خاصیت حشره‌کشی مناسبی دارد (Guinda *et al.*, 2012).

بنابر نتایج این پژوهش، سویهٔ *Bacillus velezensis* UTB96 توان بالقوه‌ای در تولید لیپوپپتیدهای حلقوی و به‌ویژه سورفکتین دارد و بهینه‌سازی محیط کشت و عوامل محیطی تاثیر قابل معنی‌داری بر افزایش میزان تولید سورفکتین دارد. لذا این جدایه را می‌توان برای کاربردهای صنعتی و تولید تجاری بیوسورفکتانت‌ها پیشنهاد کرد و در حوزه‌های مختلف کشاورزی و کنترل بیولوژیک، در پزشکی و داروسازی، صنایع غذایی و در بخش‌های مختلف صنعت نفت از آنها بهره برد. این سویه در حال حاضر به صورت تجاری توسط شرکت بایوران تولید و استفاده می شود.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه تهران و امکانات آزمایشگاهی شرکت فناوری زیستی طبیعت‌گرا (بایوران) انجام گرفته است. از آقای دکتر همایون مرادی مدیر عامل شرکت صمیمانه تشکر می‌شود. بررسی‌های مربوط به اندازه‌گیری سورفکتین و تفسیر نتایج مربوطه با همکاری انستیتو علوم غذایی و بیوتکنولوژی دانشگاه هوهنهایم آلمان انجام گرفته است.

References

ABDEL-MAWGOUD, A. M., ABOLWAFA, M. M., & HASSOUNA, N. A.-H. 2008. Optimization of surfactin production by *Bacillus subtilis* isolate BS5. Applied Biochemistry and Biotechnology, 150(3): 305- 325. DOI: https://doi.org/10.1007/s12010-008-8155-x

AFSHARMANESH, H., AHMADZADEH, M., JAVAN-NIKKHAH, M., & BEHBOUDI, K. 2014. Improvement in biocontrol activity of *Bacillus subtilis* UTB1 against *Aspergillus flavus* using gamma-irradiation. Crop. Protection, 60: 83-92. (In Farsi with English summary). DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2014.02.013

BAIS H. P., FALL R., & VIVANCO J. M. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of Arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. Plant Physiology, 134(1): 307-319. DOI: https://doi.org/10.1104/pp.103.028712

BANAT, I. M., SATPUTE, S. K., CAMEOTRA, S. S., PATIL, R., & NYAYANIT, N. V. 2014. Cost-effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. Frontiers in Microbiology, 5: 697-715. DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00697

COLLA, L. M.,RIZZARDI, J., PINTO, M. H., REINEHR, C. O., BERTOLIN, T. E., & COSTA, J. A. V. 2010. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. Bioresource Technology, 101(21): 8308-8314. DOI: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.086

GANCEL, F., MONTASTRUC, L., LIU, T., ZHAO, L. and NIKOV, I. 2009. Lipopeptide overproduction by cell immobilization on iron enriched light polymer particles. Process Biochemistry, 44: 975–978. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.04.023

GHRIBI, D., MNIF, I., BOUKEDI, H., KAMMOUN, R., & ELLOUZE-CHAABOUNI, S. 2011.Statistical optimization of low-cost medium for economical production of *Bacillus subtilis* biosurfactant, a biocontrol agent for the olive moth Prays oleae. African Journal of Microbiology Research, 5(27): DOI: 4927-4936. https://doi.org/10.5897/ajmr11.1125

GUDINA, E. J., PEREIRA, J. F., RODRIGUES, L. R., COUTINHO, J. A., & TEIXEIRA, J. A. 2012. Isolation and study of microorganisms from oil samples for application in microbial-enhanced oil recovery. International Biodeterioration & Biodegradation, 68: 56-64. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.01.001

GUEZ, JS, VASSAUX, A, LARROCHE, C, JACQUES, P, COUTTE, F. 2021. New continuous process for the production of lipopeptide biosurfactants in foam overflowing bioreactor. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 28;9:678469. DOI: https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.678469

HSIEH, F.C., Li, M.C., LIN, T.C. and KAO, S.S. 2004. Rapid detection and characterization of surfactin producing *Bacillus subtilis* and closely related species based on PCR. Current Microbiology, 49: 186–191. DOI: https://doi.org/10.1007/s00284-004-4314-7

HOFEMEISTER, J., CONRAD, B., ADLER, B., HOFEMEISTER, B., FEESCHE, J., KUCHERYAVA, N., ZWINTSCHER, A. 2004. Genetic analysis of the biosynthesis of non-ribosomal peptide-and polyketide-like antibiotics, iron uptake and biofilm formation by *Bacillus subtilis* A1/3. Molecular Genetics and Genomics, 272(4): 363-378. DOI: https://doi.org/10.1007/s00438-004-1056-y

INÈS M, DHOUHA G. 2015. Lipopeptide surfactants: Production, recovery and pore forming capacity. Peptides, 71:100-12. DOI: https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.07.006

JOSHI, S., YADAV, S., & DESAI, A. J. 2008. Application of response-surface methodology to evaluate the optimum medium components for the enhanced production of lichenysin by *Bacillus licheniformis* R2. Biochemical Engineering Journal, 41(2): 122-127. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.04.005

JOURDAN, E., HENRY, G., DUBY, F., DOMMES, J., BARTHELEMY, J.-P., THONART, P., & ONGENA, M. 2009. Insights into the defense-related events occurring in plant cells following perception of surfactin-type lipopeptide from *Bacillus subtilis*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 22(4): 456-468. DOI: https://doi.org/10.1094/mpmi-22-4-0456

KEARNS, D. B., CHU, F., RUDNER, R., & LOSICK, R. 2004. Genes governing swarming in *Bacillus subtilis* and evidence for a phase variation mechanism controlling surface motility. Molecular Microbiology, 52(2): 357-369. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.03996.x

KESHAVARZI, S., AHMAD ZADEH, M., MIRZAEI, S., BEHBOUDI, K., and BANDEH POUR, M. 2018. Enhancing surfactant production in *Bacillus subtilis* UTB96 by fermentation optimization. Biocontrol in

Plant Protection. 5(2), 13-26. https://doi.org/10.22092/bcpp.2018.117885

KLICH, M.A. 2002. Identification of Common Aspergillus species. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures. LUO, C., LIU, X., ZHOU, X., GUO, J., TRUONG, J., WANG, X., and CHEN, Z. 2015. Unusual biosynthesis and structure of locillomycins from *Bacillus subtilis* 916. Applied and Environmental Microbiology, 81(19): 6601-6609. https://doi.org/10.1128/AEM.01639-15

LI, Y.Y. and LI, B., 2011. Study on fungi-bacteria consortium bioremediation of petroleum contaminated mangrove sediments amended with mixed biosurfactants. Advanced materials research, 183, pp.1163-1167. DOI: https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.183-185.1163

MIZUMOTO, S., & SHODA, M. 2007. Medium optimization of antifungal lipopeptide, iturin A, production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation by response surface methodology. Applied Microbiology and Biotechnology, 76(1): 101-108. DOI: https://doi.org/10.1007/s00253-007-0994-9

MORIKAWA, M., DAIDO, H., TAKAO, T., MURATA, S., SHIMONISHI, Y., & IMANAKA, T., 1993. A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS38. Journal of Bacteriology, 175(20): 6459-6466. DOI: https://doi.org/10.1128/jb.175.20.6459-6466.1993

ONGENA, M., DUBY, F., JOURDAN, E., BEAUDRY, T., JADIN, V., DOMMES, J., & THONART, P. 2005. *Bacillus subtilis* M4 decreases plant susceptibility towards fungal pathogens by increasing host resistance associated with differential gene expression. Applied Microbiology and Biotechnology, 67(5): 692-698. DOI: https://doi.org/10.1007/s00253-004-1741-0

ONGENA, M., & JACQUES, P. 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends in Microbiology, 16(3): 115-125. DOI: https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009

RAAIJMAKERS, J. M., DE BRUIJN, I., NYBROE, O., & ONGENA, M. 2010. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. FEMS Microbiology Reviews, 34(6): 1037-1062. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00221.x

SAMAD, M. Y. A., RAZAK, C. N. A., SALLEH, B., YUNUS, W. Z. W., AMPON, K. & BASRI, M. 1989. A plate assay for primary screening of lipase activity. Journal of Microbiological Methods, 9(1): 51-56. DOI: https://doi.org/10.1016/0167-7012(89)90030-4

ZHU, Z., ZHANG, J., WU, Y. , RAN, W., & SHEN, Q. 2013. Comparative study on the properties of lipopeptide products and expression of biosynthetic genes from *Bacillus amyloliquefaciens* XZ 173 in liquid fermentation and solid-state fermentation. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 29(11): 2105-2114. DOI: https://doi.org/10.1007/s11274-013-1375-4