مجموعه مقالات
چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹٤، پژوهشکده کشاورزی هسته ای)
The 4th National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

بررسی برخی خصوصیات فنوتیپی و مولکولی موتانت های *باکتری* *Bacillus subtilis* UTB1 حاصل از پرتو گاما علیه قارچ *Aspergillus flavus*

حمیده افشارمنش[1]*، مسعود احمدزاده[2]، فرحناز معتمدی[1]، محمد جوان نیکخواه[2]
۱-پژوهشکده کشاورزی هسته ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، کرج، ایران، ۲-گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج ، ایران
*مسئول مکاتبات: hafsharmanesh@nrcam.org

چکیده: باکتری *Bacillus subtilis* UTB1 به عنوان یک عامل بیوکنترل قارچ توکسین زای *Aspergillus flavus* شناخته شده است. به منظور افزایش فعالیت آنتاگونیستی این استرین باکتریایی علیه پاتوژن *A. flavus* R5، موتاسیون تصادفی با اشعه گاما با ده دز (۳-۰/۱ کیلوگری) در استرین *B. subtilis* UTB1 انجام گرفت. فعالیت آنتاگونیستی ۵۰۰ کلونی انتخاب شده از ده دز پرتوتابی علیه *A. flavus* R5 در شرایط آزمایشگاه نشان داد که در۴۵ کلونی (۹درصد)، فعالیت آنتاگونیستی نسبت به استرین مادری UTB1 با آزمون کشت متقابل، افزایش معنی‌داری یافته است. بیشترین نرخ جهش مطلوب با فعالیت بازدارندگی بیشتر علیه قارچ در سه دز ۲، ۲/۵ و ۳ کیلوگری اتفاق افتاد. آزمون حرکت توده‌ای در این ۴۵ کلونی مشخص کرد که ۴۸/۸۸ درصد کلونی‌ها، بر خلاف استرین وحشی قادر به پخش از نقطه آلوده سازی روی محیط کشت بودند. بررسی تولید بیوسورفکتانت با دو روش فعالیت همولیتیک و پخش روی نفت خام نشان داد که از ۴۵ کلونی انتخاب شده، تنها در هشت کلونی افزایش معنی‌داری نسبت به با استرین وحشی نشان می‌دهند. انگشت نگاری DNA به روش rep-PCR در ۴۵کلونی انتخاب شده از کشت متقابل انجام شد که الگوی پلی‌مورفیسم مشخص نمود که استرین UTB1 با هشت کلونی M562 M523, M464 M458, M455, M425, M419 و M600 پلی مورفیسم و اختلاف ژنتیکی نشان می دهد و حاکی از ایجاد موتاسیون در این کلونیها می باشد.

واژگان کلیدی: موتاسیون، پرتو گاما، کنترل بیولوژیک ، *Bacillus subtilis*، *Aspergillus flavus*

Study of some phenotypic and molecular characterization of Bacillus subtilis UTB1 mutants induced by gamma irradiation against *Aspergillus flavus*

Hamideh Afsharmanesh[1]*, Masoud Ahmadzadeh [2], Farahnaz Motamedi [1], Mohammad Javan-Nikkhah [2]
1-Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute (NARS-NSTRI), Karaj, Iran
2- Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
*hafsharmanesh@nrcam.org

Abstract: *Bacillus subtilis* UTB1 is known as a biocontrol agent of toxigenic fungus *Aspergillus flavus*. In order to increase antagonistic activity of the bacterial strain against *A. flavus* R5, a random mutagenesis using gamma irradiation with 10 doses (0.1-3 KGy) was applied in strain *B. subtilis* UTB1. Antifungal activity of 500 colonies selected from 10 doses of irradiation against *A. flavus* R5 using dual culture assay showed that the fungal growth had been reduced significantly in 45 colonies (9%) compared with the parental strain UTB1. The highest mutation ratio with higher inhibition activity against *A. flavus* R5 was obtained at three doses 2, 2.5 and 3 KGy. Swarming motility exhibited 48.88%

colonies out of 45 unlike the wild strain were capable of spreading from the site of inoculation in medium. Biosurfactant activity by means of hemolytic activity and oil spreading technique increased significantly in eight colonies out of 45. DNA fingerprinting using rep-PCR was applied in the 45 selected colonies based on antifungal activity, which eight colonies (M419, M425, M455, M458, M464, M523, M562 and M600) revealed polymorphism and genetic diversity with the wild type UTB1 that inducing mutation is indicated in the colonies.

Keywords: Mutation, Gamma Irradiation, Biological control, *Bacillus subtilis* ،*Aspergillus flavus*.

مقدمه:

اصلاح ژنتیکی هر ارگانیزمی با در نظر گرفتن عدم اختلال در وظایف نرمال آنها می‌تواند منجر به توسعه خصوصیات مطلوبشان شود. اصلاح ژنتیکی می‌تواند به وسیله جهش شیمیایی و فیزیکی(مانند پرتو گاما یا UV) صورت گیرد (۴). باکتری آنتاگونیست باسیلوس به عنوان یک کنترل کننده موفق بیماری های گیاهی مختلف و در عین حال به عنوان یک تقویت کننده رشد در بین ارگانیسم های شناخته شده از جایگاه بی نظیری برخوردار است. اما مطالعات انجام شده در کشور تا کنون تنها به بررسی گونه های موجود درایران و پتانسیل آنها در کنترل بیماری های گیاهی معطوف بوده است و ارایه جدایه های جهش یافته ای که از توانایی های بالاتری نسبت به جدایه های موجود برخوردار باشند می تواند افقی تازه در زمینه کنترل بیولوژیک بسیاری از بیماری ها بگشاید. اعضاء جنس باسیلوس اغلب به عنوان کارخانه‌های میکروبی برای تولید طیف وسیعی از مولکول‌های فعال بیولوژیکی که دارای توانایی بالقوه در جلوگیری از رشد بیمارگرهای خاکزاد، هوازاد یا پس از برداشت می‌باشند مورد توجه قرار گرفته‌اند (۳). یکی از مهمترین گونه‌های جنس باسیلوس که به خوبی مطالعه شده است، ریزوباکتری *B. subtilis* می‌باشد که به طور بالقوه بیش از ۲۴ عدد ترکیبات ضد میکروبی با ساختار متنوع تولید می‌کند (۹). در بین آنتی‌بیوتیک‌های پپتیدی، لیپوپپتیدهای حلقوی (سورفکتین ها، ایتورین ها و فنجایسین ها) فراوان‌ترین آنتی‌بیوتیک‌های تولید شده به وسیله *B. subtilis* می‌باشند. به دلیل خصوصیات بیوسورفکتانت این ترکیبات، از آنها در کاربردهای بیوتکنولوژی و دارویی استفاده می‌شود. حرکت توده‌ای در باکتریها که منجر به افزایش کلنیزاسیون سطحی می‌شود (۲) نیز بسیار وابسته به تولید بیوسورفکتانت‌ها می‌باشد(۵) و به باکتری‌ها اجازه می‌دهد تا به عنوان یک بیوفیلم در سطوح ریشه پخش شوند. فزرانه در سال ۱۳۸۹ (۱)گزارش کرد استرین *B. subtilis* BSP1(UTB1) ، قادر است به مقدار قابل توجهی (بیشتر از ۸۰ درصد) آفلاتوکسین را تجزیه نماید اما توانایی این استرین در کاهش رشد قارچ *A.flavus* ضعیف است. در این تحقیق تلاش می‌شود ضمن بهره‌گیری از تکنیک جهش تصادفی با اشعه گاما به منظور بهبود توانایی بیوکنترل باکتری *B. subtilis* UTB1 در جلوگیری از رشد قارچ مذکور، برخی خصوصیات فنوتیپی جهش یافته ها از جمله حرکت باکتری، تولید بیوسورفکتانت ها و نیز تغییرات الگوی پلی مورفیسم DNA آنها بررسی گردد.

مواد و روش ها

جهش تصادفی با اشعه گاما: به منظور بهبود توانایی بیوکنترل باکتری *B. subtilis* UTB1 علیه قارچ *A. flavus* R5 جهش تصادفی با استفاده از اشعه گاما با ده دز مختلف (۱۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰، ۷۰۰، ۱۰۰۰، ۱۲۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰، ۲۵۰۰ و ۳۰۰۰ گری[1]) انجام گرفت. عملیات پرتوتابی با استفاده از دستگاه گاماسل با چشمه کبالت ۶۰ اکتیویته ۲۵۰۰ کوری مستقر در پژوهشکده کشاورزی هسته ای سازمان انرژی اتمی ایران انجام گرفت. بعد از هر دز پرتوتابی جمعیت باکتری‌ها به روش شمارش کلونی‌های باکتری در محیط کشت بررسی گردید(۶). سپس کلونی‌های انفرادی به طور تصادفی انتخاب شده، به منظور بررسی اثر آنها در جلوگیری از رشد قارچ کشت داده شدند.

فعالیت آنتاگونیستی جهش‌یافته‌ها: اثر بازدارندگی ۵۰۰ کلونی انتخاب شده از ده دز مختلف روی قارچ *A. flavus* R5 با استفاده از روش کشت متقابل روی پتری دیش‌ها مطابق با روش پالومبو و همکاران (۷) بررسی شد. شعاع رشد قارچ بعد از هفت روز اندازه‌گیری شد. جهش‌یافته‌هایی که باعث افزایش در جلوگیری از رشد قارچ نسبت به استرین وحشی در پتری شدند انتخاب شدند.

حرکت شناوری[2]و توده‌ای[3]: با توجه به اینکه در ۳۷ کلونی از کلونی‌های انتخاب شده بر اساس کشت متقابل، سلول باکتری به وسیله پخش سریع در محیط کشت از رشد قارچ ممانعت می‌کرد، بررسی حرکت شناوری و توده ای در ۴۵ کلونی انتخاب شده از کشت متقابل، مطابق با روش کنیل و همکاران (۲) انجام شد. بدین منظور از کشت تازه باکتری‌ها به صورت نقطه‌ای در مرکز پتری دیش‌های حاوی محیط ال بی با ۰/۳ درصد آگار(حرکت شناوری) و ۰/۷ درصد آگار (حرکت توده-ای) قرار گرفتند. پتری دیش‌ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای ^{o}C ۳۷ نگهداری شدند و سپس قطر رشد کلونی باکتری اندازه-گیری شد.

فعالیت بیوسورفکتانت‌ها: تولید بیوسورفکتانت ها با دو روش زیر مطابق با روش یوسف و همکاران (۱۱) بررسی شد.
الف) روش فعالیت همولیتیکی: از کشت ۱۸ ساعته باکتری‌ها نقطه گذاری روی محیط بلاد آگار[4] که حاوی پنج درصد خون گوسفند می‌باشد، انجام شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ^{o}C ۳۷ نگهداری شدند. قطر هاله روشن در اطراف کلونی‌های

[1]Gray (Gy)
[2]Swimming
[3] Swarming
[4]blood agar

باکتری که نشان دهنده تولید بیوسورفکتانت است، اندازه‌گیری شد. ب) روش پخش روی نفت خام[1]: در پتری دیش‌های نه سانتی‌متری آب مقطر ریخته شد و ۴۰ میکرولیتر نفت خام به آب اضافه شد و سپس ۲۰ میکرولیتر از مایع رویی باکتری رشد یافته در محیط مایع YPD به سطح نفت خام اضافه شد. بعد از ۳۰ ثانیه قطر هاله ایجاد شده روی نفت که نشان‌دهنده غلظت بیوسورفکتانت است، اندازه‌گیری شد.

انگشت نگاری DNA به روش rep-PCR

به منظور پی بردن به اختلافات ژنتیکی بین استرین وحشی UTB1 و ۴۵ کلونی که قدرت آنتاگونیستی بیشتری نسبت به استرین وحشی نشان داده بودند، از روش انگشت نگاری DNA به روش rep-PCR استفاده شد. استخراج DNAکل ژنوم باکتری با استفاده از کیت استخراج Biospin Bacteria Genomic DNA Extraction Kit (China) و طبق پروتوکل پیشنهادی شرکت سازنده انجام گرفت. برای تکثیر DNA از آغازگرهای ERIC1R (5´-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3´)، ERIC2 (5´-CCGCCGTTGCCGCCGTTGCCGCCG-3´) و BOX A1R (5´-TTCGTCAGTTCTATCTACAACC-3´) (ساخت شرکت بایونییر کره جنوبی) استفاده شد. مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در هر لوله شامل کیت مخلوط واکنش(2x PCR master kit) ۱۲/۵ میکرولیتر(ساخت شرکت سیناژن، ایران)، آغازگرهای ERIC 1R و ERIC 2 یا BOX A1R ۰/۴ پیکو مول، DNA ژنومی باکتریایی (۱۰ نانوگرم) می باشد. برنامه حرارتی PCR شامل یک انکوباسیون اولیه در ^{o}C ۹۵ به مدت دو دقیقه و سپس ۳۵ چرخه از ^{o}C ۹۴ به مدت ۳۰ ثانیه، ۴۵ (ERIC) یا ^{o}C ۵۰ (BOX) به مدت ۶۰ ثانیه و ^{o}C ۷۲ به مدت ۶۰ ثانیه انجام شدو با بسط نهایی در ^{o}C ۷۲ به مدت ۱۰ دقیقه پایان یافت. پس از تکثیر، الکتروفورز محصول PCR به همراه نشانگر DNA مخلوط ۱۰۰۰-۱۰۰ جفت بازی[2](ساخت فرمنتاس آلمان) بر روی ژل آگارز یک درصد انجام شد و باندهای حاصل بین استرین وحشی UTB1 و جهش‌یافته‌ها مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج و بحث

فعالیت آنتاگونیستی جهش‌یافته‌ها: از مجموع ده دز پرتوتابی، ۵۰۰ کلونی باکتری پس از سریال رقت به طور تصادفی انتخاب شدند و فعالیت آنتاگونیستی آنها در کشت متقابل با قارچ *A. flavus* R5 بررسی شد. سه نوع فنوتیپ در نتایج حاصل از کشت متقابل مشاهده شد: ۱- در ۳۰ کلونی (۶ درصد) شعاع رشد قارچ نسبت به استرین وحشی UTB1 افزایش معنی‌داری (در سطح یک درصد) نشان داد. در این مورد فعالیت بازدارندگی باکتری یا کاهش نشان داد و یا کاملاً از بین

[1]oil spreading technique

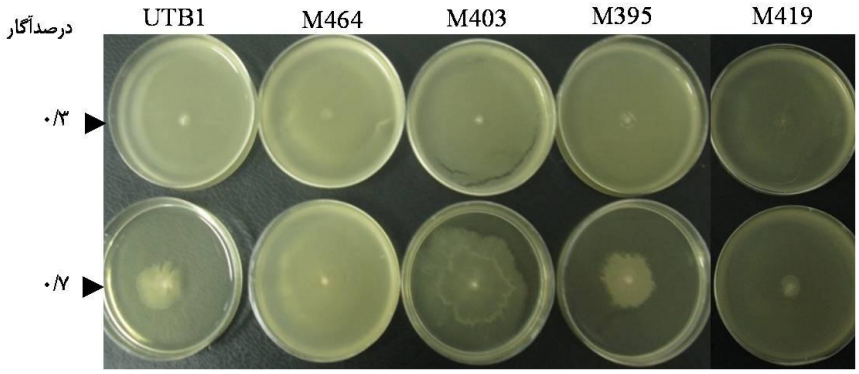
[2]*GeneRuler™ DNA Ladder* Mix, *100-10000bp*

رفت؛ ۲- در ۴۵ کلونی (۹ درصد) شعاع رشد قارچ نسبت به استرین وحشی UTB1 کاهش معنی‌داری در سطح یک درصد نشان داد. نتایج نشان داد که بیشترین طیف جهش مطلوب در دزهای ۲۰۰۰ و ۲۵۰۰ گری رخ داد که بیشترین تعداد را در بازدارندگی از رشد قارچ نسبت به استرین وحشی داشتند (۳۷ کلونی) و در آنها سلول‌های باکتریایی با پخش شدن سریع در محیط کشت، توانستند جلوی رشد قارچ را بگیرند. در ۸ کلونی باقی‌مانده که قطر هاله بازدارندگی درآنها کمی افزایش یافته بود (ولی در محیط پخش نشدند) از دز ۳۰۰۰ گری انتخاب شده بودند؛ ۳-در سایر کلونی‌ها (۸۵ درصد) اختلاف معنی‌داری از نظر شعاع رشد قارچ نسبت به استرین وحشی در سطح یک درصد دیده نشد. نتایج حاضر نشان داد که بیشترین نرخ جهش مطلوب با فعالیت بازدارندگی بیشتر علیه قارچ زمانی اتفاق افتاد که جمعیت زنده باکتری‌ها به مقدار ۳-۴ واحد لگاریتمی کاهش یافته بود. بدین معنی که جمعیت استرین وحشی پرتوتابی نشده 10^8 بود ولی در دزهای ۲۰۰۰، ۲۵۰۰ و ۳۰۰۰ گری که بیشترین تعداد جهش‌های مطلوب را شامل می‌شدند، جمعیت زنده سلول‌های باکتری به 10^5 و 10^4 کاهش یافته بود. این یافته با نتایج رازا و همکاران (۸) منطبق است که شرح دادند بهترین دز پرتو گاما برای ایجاد جهش در *Pseudomonas putida* دز ۳۰۰ گری است که جمعیت زنده باکتری به مقدار سه واحد لگاریتمی نسبت به استرین پرتوتابی‌نشده کاهش می-یابد.

حرکت شناوری و توده‌ای: نتایج حرکت شناوری و توده‌ای در ۴۵ کلونی انتخاب‌شده از کشت متقابل نشان داد که همه ۴۵ کلونی و نیز استرین وحشی UTB1 قادر به حرکت شناوری بودند. در پتری دیش‌های حاوی ۰/۷درصد آگار که نشان دهنده حرکت توده‌ای است، ۴۸/۸۸ درصد کلونی‌ها قادر به پخش از نقطه آلوده‌سازی محیط کشت بودند و اختلاف معنی-داری را با استرین UTB1 (در سطح یک درصد) با اندازه گیری قطر رشد کلونی باکتریایی نشان دادند. رشد استرین UTB1 محدود به اطراف محل آلوده‌سازی شد (شکل۴-۳). پخش شدن کلونی‌های حاصل از پرتوتابی استرین UTB1 روی محیط نیمه جامد (حرکت توده‌ای) به احتمال زیاد به واسطه تولید بیشتر لیپوپپتیدهای سورفکتین و ایتورین می‌باشد که همچنین کلنیزاسیون سطحی کلونی‌های پرتوتابی شده را در کشت متقابل با *A. flavus* در مقایسه با استرین وحشی UTB1 افزایش می‌دهد.

فعالیت بیوسورفکتانت‌ها: نتایج فعالیت همولیتیکی در این تحقیق نشان داد که تنها هشت کلونی M419, M425, M455, M458, M464, M523, M562 و M600 از بین ۴۵ کلونی انتخاب شده بر اساس کشت متقابل، قادر به لیز کردن بلاد آگار و تشکیل هاله روشن در اطراف کلونی باکتری بودند. هیچ هاله روشنی اطراف کلونی استرین UTB1 تشکیل نشد و بنابراین، این استرین فعالیت همولیتیکی نشان نداد. در روش پخش روی نفت خام، قطر هاله روشن روی سطح نفت نشان‌دهنده غلظت بیوسورفکتانت است (یوسف و همکاران، ۲۰۰۴). با توجه به تولید هاله روشن روی سطح نفت خام، می‌توان گفت همه ۴۵ کلونی قادر به تولید بیوسورفکتانت می‌باشند اما مقدار آن متفاوت می‌باشد. آنالیز آماری نشان داد که هشت کلونی M419, M425, M455, M464, M497, M525, M562 و M600 اختلاف معنی‌داری از نظر قطر هاله روشن و تولید بیوسورفکتانت با استرین وحشی UTB1 در سطح یک درصد نشان دادند. بنابراین، می‌توان بیان کرد

که در هشت کلونی فوق، مقدار تولید بیوسورفکتانت افزایش یافته است. افزایش تولید بیوسورفکتانت‌ها به وسیله جهش تصادفی در تحقیقات پیشین گزارش شده است جهش‌یافته‌ای از *Pseudomonas aeruginosa* MR01 حاصل از پرتو گاما، ۱/۵ برابر بیشتر از استرین وحشی بیوسورفکتانت دی رامنولیپید تولید کرد. نتایج حاصل از دو روش ذکر شده برای تولید بیوسورفکتانت نشان داد که ۸۲ درصد کلونی‌ها که قادر به لیز کردن بلاد آگار نبودند ولی در روش پخش روی نفت خام تولید بیوسورفکتانت در آنها مشخص گردید. یوسف و همکاران در سال ۲۰۰۴ (۱۱)، تعداد زیادی نتایج مثبت و منفی کاذب در روش لیزکردن بلاد آگار و همبستگی ضعیف آن با کشش سطحی را گزارش کردند و بیان کردند که این روش، روش قابل اعتمادی برای مشخص کردن تولید بیوسورفکتانت نیست. آنها پیشنهاد کردند که روش پخش روی نفت خام بهتر از روش‌های بلاد آگار و اضمحلال قطره[1]، تولید بیوسورفکتانت را نشان می‌دهد.



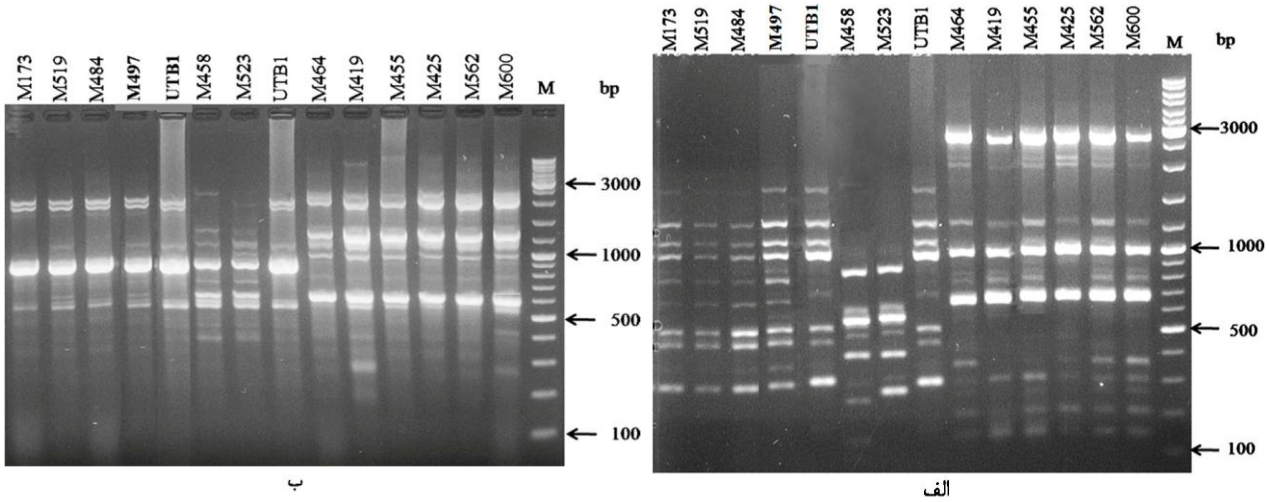
شکل ۴-۳- حرکت شناوری (محیط البی حاوی ۰/۳٪ آگار) و توده‌ای (محیط البی حاوی ۰/۷٪ آگار) در استرین *B. subtilis* UTB1 و چهار جهش یافته آن (M464، M403، M395 و M419) پس از ۱۸ ساعت نگهداری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس.

انگشت نگاری DNA به روش rep-PCR

نتایج پلی‌مورفیسم حاصل از rep-PCR با استفاده از دو آغازگر BOX و ERIC در استرین UTB1 و ۴۵ کلونی انتخاب شده بر اساس کشت متقابل ، نشان داد که استرین UTB1 با هشت کلونی M419, M425, M455, M458, M464, M523, M562 و M600 اختلاف ژنتیکی نشان می‌دهد (شکل ۴-۶). الگوی پلی‌مورفیسم نشان داد که می‌توان جهش‌یافته‌ها را به سه گروه مجزا تقسیم کرد: گروه اول شامل شش جهش‌یافته M419, M425, M455, M464, M562 و M600 بوده که الگوی پلی‌مورفیسم در آنها شبیه یکدیگر است. گروه دوم شامل دو جهش‌یافته M458 و M523 با الگوی پلی‌مورفیسم مشابه می‌باشد. سایر جهش‌یافته‌ها به همراه استرین وحشی UTB1 گروه سوم را تشکیل می‌دهند. طول قطعات تکثیر یافته حاصل از ERIC-PCR درشش جهش یافته گروه اول، طیف

[1] drop collapse

وسیعی را بین ۱۵۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز نشان داد در حالیکه در استرین UTB1 بین ۳۰۰ تا ۱۵۰۰ جفت باز بود. انگشت نگاری DNA به روش rep-PCR روشی سریع، قابل اعتماد و تکرار پذیر است که قادر است تنوع ژنتیکی بین ژنوم گونه‌ها و استرین‌های مختلف باکتریایی را مشخص نماید (ورسالوویک و همکاران، ۱۹۹۴). بنابراین، این نوع انگشت نگاری می‌تواند در توصیف ایزوله‌های باکتریایی در دوره‌های طولانی مفید بوده و تغییرات و اختلافات ژنتیکی را در ژنوم باکتری پس از پرتوتابی نشان دهد.



شکل ۴-۶- مقایسه الگوهای باندی بین استرین وحشی UTB1 و جهش‌یافته‌های حاصل از پرتودهی (M173، M159، M484، M497، M458، M523، M464، M419، M455، M425، M562 و M600) در ژل آگارز یک درصد، با استفاده از (الف) ERIC-PCR و (ب) BOX-PCR. نام جدایه‌ها بالای هر چاهک نوشته شده است. M، مارکر DNA مخلوط از ۱۰۰ تا ۱۰۰۰۰ جفت باز.

منابع:

۱- فرزانه، م. ۱۳۸۹. بررسی مکانیزم عمل باکتری *Bacillus subtilis* در جلوگیری از رشد قارچ *Aspergillus flavus* و کاهش آفلاتوکسین روی پسته. رساله دکتری. پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران. ۱۶۵ صفحه.

2-Connelly, M. B., Young, G. M. and Sloma1, A. 2004. Extracellular proteolytic activity plays a central role in swarming motility in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 186 (13): 4159–4167.

3-Emmert, E.A. B. and Handelsman, J. 1999. Biocontrol of Plant Disease: a Gram-Positive Perspective. FEMS Microbiol. Lett. 171(1): 1-9.

4-Haggag, W. M. and A. Mohamed H. A. 2007. Biotechnological aspects of microorganisms used in plant biological control. American Eurasian journal of agriculture. 1(1): 12-17.

5-Kearns, D.B., and Losick, R. 2003. Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. 49: 581–590

6-Lotfabad,T., Abassi, H., Ahmadkhaniha, R., Roostaazad, R., Masoomi, F., Zahiri, H., Ahmadian, G., Vali, H. and Noghabi, K. 2010. Structural characterization of a rhamnolipid-type biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* MR01: Enhancement of di-rhamnolipidproportion using gamma irradiation. Colloids Surf B. 81: 397-405.

7-Palumbo, J.D., Baker, J.L., Mahoney, N.E. 2006. Isolation of bacterial antagonists of *Aspergillus flavus* from almonds. Microb Ecol. 52: 45–52.

8-Raza, Z.A., Khan, M.S. and Khalid, Z.M. 2007. Evaluation of distant carbon sources in biosurfactant production by a gamma ray-induced *Pseudomonas putida* mutant. Process Biochem. 42: 686–692.

9-Stein, T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. Mol. Microbiol. 56: 845–857.

10-Versalovic, J., Schneider, M., DE-Bruijn, F.J. and Lupski, J.R. 1994. Genomic fingerprint of bacteria using repetitive sequence-based polimerase chain reaction. Method. Mol. Cell. Biol. 5: 25-40.

11-Youssef, N.H., Duncana, K.E., Naglea, D.P., Savagea, K.N., Knappb, R.M. and McInerney, M.J. 2004. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. J. Microbiol. Methods. 56: 339–347.