

بررسی اثر عوامل محیطی بر میزان فعالیت آنتاگونیستی عصاره کشت ایزوله *Bacillus pumilus*

المیرا پورباقی^{۱*}، خسرو عیسی زاده^۲، معصومه انوری^۲، لیلا مدیری^۴، راشد نظری^۵

^۱ کارشناس ارشد، عضو باشگاه پژوهشگران جوان، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، گیلان، ایران

^۲ استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، گیلان، ایران

^۳ استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، گیلان، ایران

^۴ گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، گیلان، ایران

^۵ کارشناس ارشد، عضو باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: باکتری های گونه باسیلوس پومیلوس ترکیبات بیولوژیکی زیادی تولید می کنند که علیه باکتری ها و قارچ ها فعالند. مطالعه حاضر با هدف غربالگری و بهینه سازی غلظت گلوکز، pH و زمان انکوباسیون بر میزان فعالیت آنتاگونیستی ایزوله *Bacillus pumilus* علیه ۴ پاتوژن انسانی انجام شد.

مواد و روش ها: در بررسی اولیه فعالیت ضد میکروبی از روش انتشار دیسک و محیط TSB و جهت تولید ماده ضد میکروبی از محیط سنتتیک و روش انتشار در چاهک استفاده شد. حداکثر میزان تولید ماده ضد میکروبی با تغییر pH (۶-۹)، زمان انکوباسیون (۰-۷۲ ساعت) و غلظت گلوکز (۱-۵٪) مورد سنجش قرار گرفت. داده ها با نرم افزار SPSS و ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. **یافته ها:** بیشترین میزان تولید ترکیبات ضد میکروبی توسط این ایزوله در pH ۷، ۳٪ گلوکز و بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون در ۳۷°C علیه ۴ سویه میکروبی بدست آمد.

نتیجه گیری: گونه *B. pumilus* می تواند کاندیدی توانا جهت تولید متابولیت های ضد باکتریایی در آینده باشد.

کلمات کلیدی: *Bacillus pumilus*، مقاومت آنتی بیوتیکی

مقدمه

در حالی که سرعت کشف آنتی بیوتیک های جدید کند شده است. به همین خاطر دانشمندان به برنامه های غربالگری میکروارگانسیم ها به دلیل تولید ترکیبات آنتی بیوتیکی توجه زیادی کرده اند (۳، ۴). همواره، نیاز به آنتی بیوتیک ها و ترکیبات ضد میکروبی به عنوان مشکلی مهم ادامه خواهد داشت زیرا هنگامی که تعداد باکتری های مقاوم و توزیع جغرافیایی این ارگانسیم ها هر دو در حال افزایش است مقاومت ضد میکروبی یک نگرانی در حال رشد محسوب می گردد. به همین دلیل، بنیادهای سلامت در جهان به دنبال برنامه ای جهت شناسایی ترکیبات طبیعی با فعالیت ضد میکروبی هستند (۵، ۶). میکرو ارگانسیم های جدا شده از خاک، به عنوان منبع مفیدی از ترکیبات طبیعی پیشنهاد شده اند. امروزه، باکتری های جنس باسیلوس جهت تولید ترکیبات طبیعی که قادر به فعالیت آنتاگونیستی علیه

به دلیل افزایش روز افزون پاتوژن های انسانی به آنتی بیوتیک های متداول، تلاش برای یافتن داروها و آنتی بیوتیک های جدید امری بسیار ضروری است (۱). به گفته سازمان بهداشت جهانی، تجویز زیاد و استفاده نادرست از آنتی بیوتیک ها منجر به مقاومت بسیاری از سویه های پاتوژن شده است. باکتری های بالینی مهمی نظیر *Staphylococcus aureus* در حال مقاوم شدن به آنتی بیوتیک های رایج مورد استفاده هستند (۲). امروزه، به سرعت سویه های مقاومی در حال ظاهر شدن هستند

آدرس نویسنده مسئول: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه

آزاد اسلامی واحد لاهیجان، گیلان، ایران

Email: Elmira.pourbaghi@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۳/۱۸

تاریخ پذیرش: ۹۱/۶/۱۵

قند، تست هیدرولیز نشاسته، تست احیای نیترات، تست وگس پروسکوئر (VP) و تست مصرف سیترات جهت شناسایی گونه باسیلوس پومیلوس بررسی شدند (۱۶). در این مطالعه تجربی ارگانیسیم های پاتوژن انسانی *Staphylococcus aureus* PTCC:1113، *Bacillus cereus* PTCC:1565، *Salmonella typhimorium* PTCC:1609 و *Klebsiella pneumoniae* PTCC:1402 از مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتری های سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران خریداری شدند و مواد شیمیایی استفاده شده در این مطالعه از شرکت مرک (Merck) تهیه گردید.

بررسی اولیه فعالیت ضد میکروبی ایزوله باسیلوس پومیلوس

در این بررسی از روش انتشار آگار در دیسک و محیط Trypticase Soy Broth (TSB) استفاده شد. ابتدا از میکروارگانیسیم های استاندارد و ایزوله خالص *B. pumilus* سوسپانسیون نیم مک فارلند تهیه شد. سپس توسط سوآب استریل از میکروارگانیسیم های استاندارد کشت (به اصطلاح سفره ای روی محیط Trypticase Soy Agar (TSA) انجام گرفت. در ادامه دیسک های بلانک به میزان ۲۰ میکرولیتر با سوسپانسیون نیم مک فارلند ایزوله *B. pumilus* آغشته گشتند. سپس پلیت ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند و وجود یا عدم وجود هاله عدم رشد میکرو ارگانیسیم های مورد آزمایش بر حسب میلی متر اندازه گیری گردید. هر آزمایش سه بار تکرار شد و میانگین قطر هاله مهارتی محاسبه گردید.

تولید ماده ضد میکروبی توسط ایزوله باسیلوس پومیلوس

در این مرحله از محیط کشت سنتتیک و روش انتشار در چاهک استفاده شد. ابتدا ایزوله مورد نظر در محیط کشت TSB در ۳۰ درجه سانتی گراد در انکوباتور شیکردار به مدت ۴۸ ساعت با دور ۱۲۰ rpm انکوبه شد. همچنین حدود ۱۰۰ میلی لیتر از محیط کشت سنتتیک درون ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری استریل شد و ۱۰ درصد از محیط پیش کشت به ارلن مایر اضافه گردید و در ۳۰ درجه سانتی گراد توسط شیکر به مدت ۲۴ ساعت با

بسیاری از باکتری ها و قارچ های پاتوژن می باشند، شناخته شده اند (۷). در صنعت داروسازی چند آنتی بیوتیک پپتیدی مهم توسط گونه های باسیلوس مانند باسیتراسین، پلی میگزین، گرامیسیدین، تیروسیدین، سوبتیلین، باسی لایزین و غیره تولید می شوند (۸، ۹). اکثر آنتی بیوتیک های گونه های باسیلوس پپتیدهایی با وزن مولکولی پایین هستند که توسط مسیرهای بیوسنتتیک غیر ریبوزومی تولید می شوند (۱۰، ۱۱). این پپتیدها میزان مختلفی از فعالیت های بیولوژیکی قابل توجهی را کنترل می کنند که از آن جمله می توان به فعالیت های ضد میکروبی، ضد ویروسی و ضد توموری اشاره کرد (۱۲، ۱۳). باکتری های گونه *Bacillus pumilus* به عنوان کاندیدی توانا جهت تولید متابولیت های ثانویه ضد باکتریایی و ضد قارچی و حشره کشی شناخته شده اند. فعالیت های ضد میکروبی گونه *B. pumilus* اساسا برای تولید مشتقات آنتی بیوتیکی پپتیدی، لیپوپپتیدی و باکتریوسین که دارای خواص با کاربردهای بیوتکنولوژی هستند، نسبت داده شده اند. این مواد میکروبی در برابر همولوگ های سنتتیک اغلب بصورت زیستی تجزیه پذیرند و طی فرآیند تخمیر تولید می شوند (۱۴، ۱۵). مطالعه حاضر با هدف غربالگری و بررسی تولید مواد ضد میکروبی ایزوله ای از گونه *Bacillus pumilus* علیه ۴ پاتوژن انسانی *Bacillus cereus*، *Staphylococcus aureus* PTCC:1113، *Salmonella typhimorium* PTCC:1609، PTCC:1565 و *Klebsiella pneumoniae* PTCC:1402 (و بهینه سازی تولید ترکیبات ضد میکروبی آن انجام شد.

مواد و روش ها

نمونه های خاک از مناطق جنگلی شهرستان لاهیجان در شرایط استریل جمع آوری گردید و به آزمایشگاه واحد دانشگاهی جهت جداسازی ایزوله و شناسایی گونه مورد نظر انتقال داده شد. ابتدا با استفاده از روش تعیین رقت در آگار از هر نمونه خاک تا 10^{-7} رقت تهیه شد و در روی محیط مغذی (Nutrient Agar) N.A حاوی ۷ درصد NaCl در ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شد. سپس کلنی های مشکوک به باسیلوس از نظر رنگ و مورفولوژی کلنی توسط تست های بیوشیمیایی مرسوم آزمایشگاهی شامل تست تخمیر

دور rpm ۱۲۰ انکوبه شد. سپس برای بدست آوردن سوپرناتانت فاقد سلولی از سانتریفوژ و فیلترهای ۰/۲ میکرومتری استریل استفاده گردید. مقادیر مواد در محیط سنتتیک بر حسب g/L است : FeSO₄.7H₂O، NaCl 0.01، L-glutamic acid 5.0 ، K₂HPO₄ 0.5، CuSO₄.7H₂O 0.01، KH₂PO₄ 0.5،0.01 MnSO₄.H₂O، MgSO₄.7H₂O 0.2،CaCl₂.2H₂O 0.015 Glucose 10، 0.01 و pH 7. در ادامه از کشت های ۲۴ ساعته میکروارگانیسم های استاندارد مورد آزمایش، سوسپانسیون نیم مک فارلند تهیه شد و با استفاده از سوآب استریل در سطح محیط کشت TSA کشت داده شد. در ادامه چاهک هایی با قطر ۴×۶ mm در محیط کشت ایجاد شد و حدود ۸۰ میکرولیتر از سوپرناتانت تهیه شده، بداخل چاهک ها اضافه شد. سپس پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند و خواص ضد میکروبی با اندازه گیری قطر هاله مهارى بر حسب میلی متر تعیین شد. هر آزمایش سه بار تکرار شد و میانگین قطر هاله مهارى محاسبه گردید.

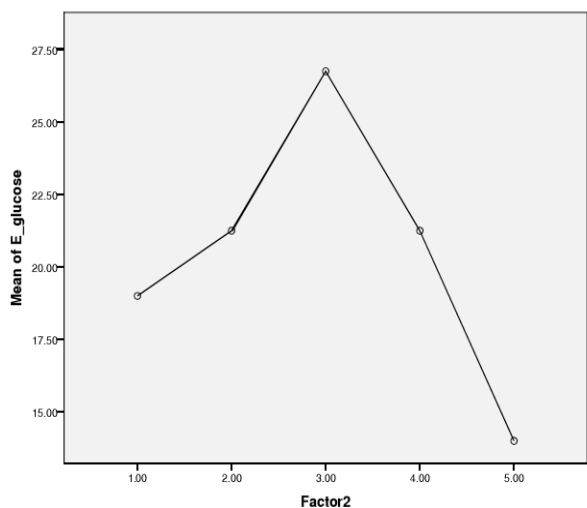
تولید حداکثر ماده ضد میکروبی

پارامترهایی مانند دوره انکوباسیون (۷۲-۰ ساعت)، pH اولیه محیط (۹-۶) و غلظت گلوکز محیط کشت تولیدی (۵-۱) جهت تولید حداکثر مواد ضد میکروبی توسط ایزوله مورد نظر مورد سنجش قرار گرفت. برای تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار SPSS و جدول آنالیز واریانس (ANOVA) استفاده شد. سطح معنی داری آزمون ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

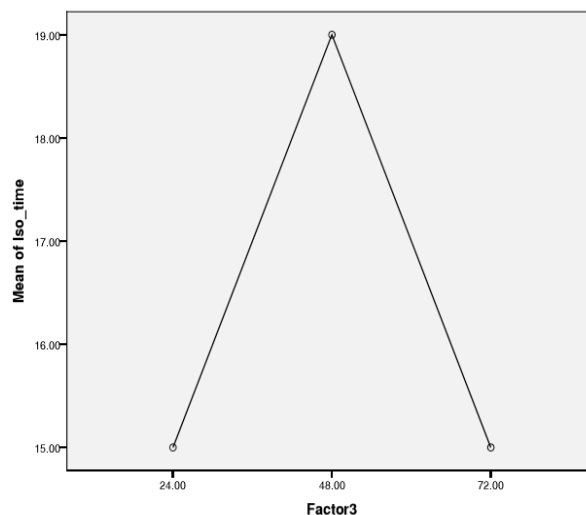
یافته ها

از بین ۴۰ نمونه باسیل گرم مثبت اسپور دار جدا شده از خاک، گونه باسیلوس پومیلوس بر اساس تست های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی شناسایی شد. نتایج حاصل از بررسی اولیه فعالیت ضد میکروبی با روش انتشار دیسک و محیط TSB نشان داد که ایزوله *B. pumilus* دارای فعالیت ضد باکتریایی علیه ۴ باکتری پاتوژن مورد آزمایش است. همچنین استفاده از محیط سنتتیک جهت تولید ترکیبات ضد میکروبی منجر به افزایش قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط این ایزوله علیه ۴ باکتری مورد آزمایش شد. از سوی دیگر ایزوله مورد نظر فعالیت ضد میکروبی

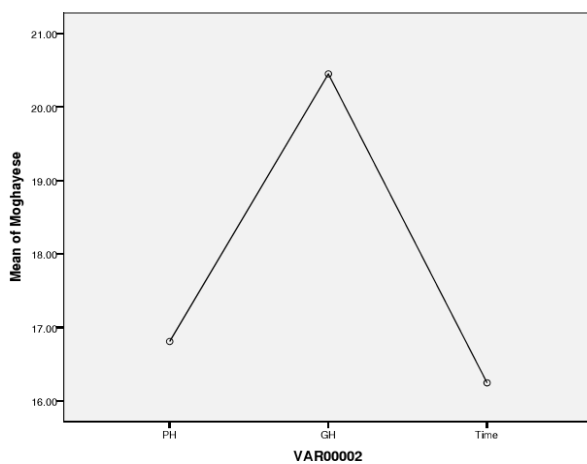
بهتری نسبت به دو باکتری گرم مثبت (۲۵ mm) *S. aureus* و (۲۲ mm) *B. cereus* در مقایسه با دو باکتری گرم منفی (۱۹ mm) *S. tyPHi* و (۲۰ mm) *K. pneumoniae* از خود نشان داد. نتایج حاصل از تغییر فاکتور های خارجی در میزان تولید ماده ضد میکروبی نشان داد که حداکثر تولید ترکیبات ضد میکروبی توسط این ایزوله در pH ۷، ۳ درصد گلوکز و بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد علیه هر ۴ سویه میکروبی مورد آزمایش مشاهده شد. نتایج حاصل از آنالیز واریانس تفاوت معنی داری بین متغیر های مورد بررسی نشان داد. بر اساس آزمون دانت بین غلظت های ۳ درصد و ۵ درصد گلوکز و همچنین بین غلظت های ۴ درصد و ۵ درصد گلوکز در میزان تولید ماده ضد میکروبی ایزوله باسیلوس پومیلوس اختلاف معناداری مشاهده شد. همچنین نتایج نشان داد که میزان تولید ماده ضد میکروبی در ۳ درصد غلظت گلوکز بیشتر از سایر غلظت ها بود. نتایج آزمون دانکن نشان داد که به ترتیب در pH برابر با ۶ و ۹ کمترین تولید و در pH برابر با ۷ و ۸ بیشترین تولید ماده ضد میکروبی در این ایزوله مشاهده شد. بر اساس آزمون توکی بین زمان های ۲۴ و ۴۸ ساعت و ۴۸ و ۷۲ ساعت تفاوت معنی دار مشاهده شد اما بین زمان های ۲۴ و ۷۲ ساعت تفاوت معنی داری مشاهده نشد. همچنین در ۴۸ ساعت انکوباسیون بیشترین میزان تولید ماده ضد میکروبی در ایزوله مورد نظر دیده شد. نتایج آماری تاثیر سه فاکتور pH، گلوکز و زمان انکوباسیون در میزان تولید ماده ضد میکروبی تفاوت معنی داری را بین pH و گلوکز و همچنین زمان انکوباسیون و گلوکز ($P < 0/05$) نشان داد اما بین pH و زمان انکوباسیون تفاوت معناداری مشاهده نشد ($P > 0/05$). همچنین بر اساس نتایج آماری بدست آمده گلوکز در میزان تولید ماده ضد میکروبی ایزوله مورد نظر موثرتر بود.



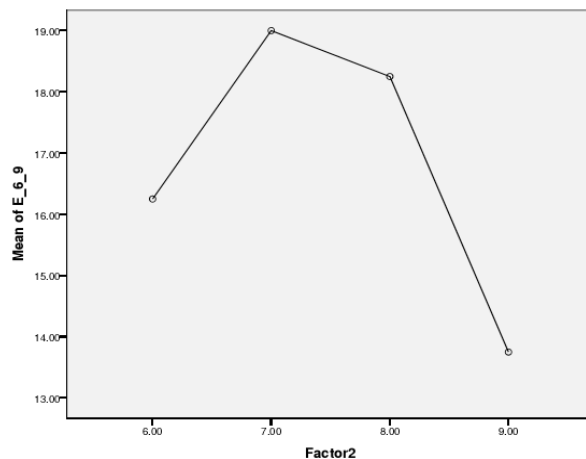
نمودار ۲- تاثیر غلظت های مختلف گلوکز در میزان تولید ماده ضد میکروبی ایزوله باسیلوس پومیلوس



نمودار ۱- تاثیر زمان انکوباسیون در میزان تولید ماده ضد میکروبی ایزوله باسیلوس پومیلوس



نمودار ۴- تاثیر غلظت گلوکز، pH و زمان انکوباسیون در میزان تولید ماده ضد میکروبی



نمودار ۳- تاثیر pH در میزان تولید ماده ضد میکروبی ایزوله باسیلوس پومیلوس

بحث

که حداکثر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط سوپرناتانت فاقد سلولی ایزوله مورد نظر بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون بدست آمد. مطالعه هاویک و همکاران نشان می دهد که تولید ماده ضد میکروبی *ElmiraElmiraB. licheniformis* فقط در طول فاز رشد سریع صورت می گیرد (۱۷). مطالعه حاضر نیز نتیجه مشابهی را نشان داد به گونه ای که تولید حداکثر مواد ضد میکروبی در طول ۷۲-۴۸ ساعت انکوباسیون به عنوان فاز رشد سریع برای گونه باسیلوس مشاهده شد. در مطالعه بوشرا و همکاران تولید آنتی بیوتیک در محدوده

ایزوله باسیلوس پومیلوس با استفاده از محیط سنتتیک به عنوان محیط تولیدی آنتی بیوتیک نسبت به محیط TSB، فعالیت ضد میکروبی بهتری از خود نشان داد. از آنجا که تفاوت این دو محیط در ترکیبات و عناصر موجود در آن ها می باشد بنابراین این عوامل می تواند در مقدار تولید متابولیت های مختلف توسط ایزوله *B. pumilus* و در نتیجه میزان فعالیت ضد میکروبی آن نقش داشته باشد. در تحقیق حاضر تولید ماده ضد میکروبی در دوره های زمانی مختلفی مانند ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون بررسی شد

جهت بدست آوردن ترکیبات ضد میکروبی در میان گونه های باسیلوس از نواحی شمالی ایران مشخص می نماید. تحقیق برای کشف متابولیت های بیولوژیکی جدید و ترکیبات دارویی، به تعداد زیادی از ایزوله ها احتیاج دارد و اگر باسیلوس های متنوع نمونه گیری و غربالگری شوند این تحقیقات در آینده امید بخش خواهد بود (۲۳). در پایان این مطالعه نشان داد که گونه باسیلوس پومیلوس می تواند کاندیدی مناسب و بالقوه جهت تولید متابولیت های ثانویه ضد باکتریایی علیه پاتوژن های انسانی مورد آزمایش باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه جهت اخذ مدرک کارشناسی ارشد میکروبیولوژی خانم المیرا پورباقی بود. بدین وسیله از گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد لاهیجان و سرکار خانم اندیش کارشناس محترم آزمایشگاه کارشناسی ارشد میکروبیولوژی واحد لاهیجان که در انجام این تحقیق با ما همکاری صمیمانه ای داشتند، تشکر می نمایم.

pH ۷-۸ محیط کشت توسط ایزوله ای از *B. subtilis* گزارش شد (۱۸). در مطالعه حاضر نیز حداکثر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط ایزوله باسیلوس پومیلوس علیه هر ۴ باکتری مورد آزمایش در pH ۷ مشاهده شد و به تدریج کاهش فعالیت با افزایش pH و حداقل فعالیت در pH ۹ مشاهده گردید. تغییر pH می تواند به علت مصرف گلوکز زیاد در فاز اولیه رشد باکتری باشد که خود منجر به تولید و تجمع اسیدهای آلی و کاهش pH محیط کشت می شود. همچنین افزایش pH می تواند در ارتباط با تولید آمونیاک باشد (۱۹). در این مطالعه حداکثر تولید ماده ضد میکروبی در ۳ درصد گلوکز و بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون مشاهده شد. در مطالعه ای حداکثر تولید ماده ضد میکروبی توسط ایزوله ای از باسیلوس علیه میکروکوکوس لوتئوس در ۲ درصد گلوکز و بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون گزارش شد (۲۰). به نظر می رسد که گلوکز و سایر کربوهیدرات ها در سنتز آنتی بیوتیک ها مداخله می کنند و این اثر منبع کربن وابسته به مصرف سریع منبع کربن در دسترس و مقدم می باشد (۲۱). مطالعه هاویک و همکاران با مطالعه حاضر همخوانی دارد، نتایج این مطالعه نشان داد که تولید ماده ضد میکروبی وابسته به pH است و اثر مهارتی گلوکز در تولید ماده ضد میکروبی، به علت تجمع اسیدهای آلی و به دنبال آن اسیدی شدن محیط می باشد (۱۷، ۲۲). در مطالعه حاضر ایزوله مورد نظر فعالیت ضد میکروبی بهتری نسبت به باکتری های گرم مثبت نشان دادند. در مطالعه برو و همکاران ایزوله ای از *B. pumilus* نسبت به باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس فعالیت ضد میکروبی بهتری در مقایسه با باکتری گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا نشان داد (۲۳). این تفاوت در حساسیت باکتری های گرم مثبت و گرم منفی نسبت به متابولیت های مختلف، می تواند به تفاوت های مورفولوژیکی بین این میکروارگانیسم ها مرتبط باشد. باکتری های گرم منفی دارای غشای خارجی پلی ساکارییدی هستند که دارای ترکیباتی با ساختار لیپوپلی ساکارید می باشد و یک دیواره سلولی نفوذ ناپذیر بوجود می آورند اما باکتری های گرم مثبت بیشتر حساسند چون فقط یک لایه پپتیدوگلیکان خارجی دارند که نمی تواند یک مانع موثر جهت نفوذ پذیری متابولیت ها باشد (۲۳، ۲۴). یافته های این مطالعه، اهمیت موضوع را برای تحقیقات آینده

- (1) Aunpad R, Na-Bangchang K. Pumilicin 4, A Novel Bacteriocin with Anti-MRSA and Anti-VRE Activity Produced by Newly Isolated Bacteria *Bacillus pumilus* Strain WAPB4. *Curr Microbiol*, 2007; 55(4):308-313.
- (2) Aunmuhammad S, Ahmad S, Hameed A. Antibiotic Production by Thermophilic *Bacillus SAT-4*. *Pak J Pharm Sci*, 2009; 22(3):339-345.
- (3) Awais M, Pervez A, Qayyum S, Saleem M. Effects of Glucose, Incubation Period and pH on the Production of Peptide Antibiotics by *Bacillus pumilus*. *Afri J Microbiol Res*, 2008; 2(4):114-119.
- (4) Azevedo EC, Rios EM, Fukushima K, Takaki CGM. Bacitracin Production by A New Strain of *Bacillus subtilis*, Extraction, Purification and Characterization. *Appl Biochem Biotechnol*, 1993; 42(7):1-7.
- (5) Bechard J, Eastwell KC, Sholberg PL, Mazza G, Shkura B. Isolation and Partial Chemical Characterization of an Antimicrobial Peptide Produced by a Strain of *Bacillus subtilis*. *J Agric Food chem.*, 1998; 46(3):5355-5361.
- (6) Bergey DH, Holt JG. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th. Williams & Wilkins Publishers, Baltimore. 1994; pp:58-101.
- (7) Berrue F, Ibrahim A, Boland P, Kerr RG. Newly Isolated Marine *Bacillus pumilus* (SP21): A Source of Novel Lipoamides and Other Antimicrobial Agents. *Pure Appl Chem*, 2009; 81(6):1027-1031.
- (8) Bottone EJ, Peluso RW. Production by *Bacillus pumilus* (MSH) of an Antifungal Compound that is Active Against *Mucoraceae* and *Aspergillus* Species: Preliminary Report. *J Med Microbiol*, 2003; 52(11):69-74.
- (9) Bushra J, Hasan F, Hameed A, Ahmed S. Isolation of *Bacillus subtilis* MH-4 from Soil and its Potential of Polypeptidic Antibiotic Production. *Pak J Pharm Sci*, 2007; 20(1):26-31.
- (10) Demain AL, Aharonowitz Y, Martin JF. Metabolite Control of Secondary Biosynthetic Pathways. Vining LC (Ed.), *Biochemistry and Genetic Regulation of Commercially Important Antibiotics*. Addison-Wesley, London, 2000; pp:49-67.
- (11) Esikova TZ, Temirov YV, Sokolov SL, Alakhov YB. Secondary Antimicrobial Metabolites Produced by Thermophilic *Bacillus* spp. Strains VK2 and VK21. *Appl Biochem Microbiol*, 2002; 38(8):226-231.
- (12) Gesheva V, Ivanova V, Gesheva R. Effects of Nutrients on the Production of AK-111-81 Macrolide Antibiotic by *Streptomyces hygroscopicus*. *Microbiol Reds*, 2005; 160(5):243-248.
- (13) Haavik HI. Studies on the Formation of Bacitracin by *Bacillus licheniformis*: Role of Catabolite Repression and Organic Acids. *J Gen Microbiol*, 1974; 84(6):321-326.
- (14) Hasan F, Khan S, Alishah A, Hameed A. Production of Antibacterial Compounds by Free and Immobilized *Bacillus pumilus* SAF1. *Pak J Bot*, 2009; 41(3):1499-1510.
- (15) Itoh J, Shomura T, Omoto Sh, Miyado Sh, et al. Isolation, Physicochemical Properties and Biological Activities of Amicoumacins Produced by *Bacillus pumilus*. *Agric Biol Chem*, 1982; 46(11):1255- 1259.
- (16) Katz E, Demain AL. The Peptide Antibiotics of *Bacillus*: Chemistry, Biogenesis, and Possible Functions. *Bacteriol Rev*, 1977; 41(10):449-474.
- (17) Marahiel MA, Nakano MM, Zabar P. Regulation of Peptide Antibiotic Production in *Bacillus*. *Mol Microbiol*, 1993; 7(4):631-636.
- (18) Mendo S, Faustino NA, Sarmiento AC, Amado F, Moir AJ. Purification and Characterization of a New Peptide Antibiotic Produced by Thermotolerant *Bacillus licheniformis* Strain. *Biotechnol Lett*, 2004; 26(11):115-119.
- (19) Nithya Ch, Aravindraja, Ch, Pandian, ShK. *Bacillus pumilus* of Palk Bay Origin Inhibits Quorum-Sensing-Mediated Virulence Factors in Gram-Negative Bacteria. *Res Microbiol*, 2010; 161(10):296-303.
- (20) Ouoba LII, Diawara B, Jespersen L, Jakobsen M. Antimicrobial Activity of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* During the Fermentation of African Locust Bean (*Parkia Biglobosa*) for Soumbala Production. *J Appl Microbiol*, 2006; 102(10):963-970.
- (21) Schallmeyer M, Singh A, Ward OP. Developments in the Use of *Bacillus* Species for Industrial Production. *Can J Microbiol*, 2004; 50(6):1-17.
- (22) Solé M, Francia A, Rius N, Lorén JG. The Role of pH in the "Glucose Effect" on Prodigiosin Production by Non-Proliferating Cells of *Serratia marcescens*. *Lett Appl Microbiol*, 1997; 25(9):81-84.
- (23) Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Antimicrobial Drugs, Microbiology an Introduction*, 20th Chapter. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 1995; pp:491-514.
- (24) Zinsser H. Antimicrobial agents, 9th chapter. Zinsser H, Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Wilfert C (ed.), *Zinsser Microbiology*, Prentice Hall International, UK, 1988; pp:128-160.