

## معرفی باکتری

*Bacillus amyloliquefaciens* UTB96 به‌عنوان یک عامل کنترل بیولوژیک مؤثر و تجزیه‌کننده

آفلاتوکسین قارچی در شرایط آزمایشگاه

نگار باقری<sup>۱</sup>، مسعود احمدزاده<sup>۱</sup>، سلیمان قاسمی<sup>۲</sup>، ملیحه وحیدی نسب<sup>۱</sup>، شوکت السادات قرشی<sup>۱</sup>

۱- گروه گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

۲- مسئول واحد تحقیق و توسعه شرکت فناوری زیستی طبیعت‌گرا (بایوران)، کرج، ایران

مسئول مکاتبات: مسعود احمدزاده، پست الکترونیک: ahmadz@ut.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۴/۰۹

۶(۱) ۱-۱۷

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۰۹

## چکیده

قارچ *Aspergillus flavus* می‌تواند روی طیف گسترده‌ای از محصولات کشاورزی و مواد غذایی رشد نموده و با تولید آفلاتوکسین موجب آلودگی آن‌ها شود. یکی از روش‌های مناسب برای کنترل آفلاتوکسین، استفاده از عوامل مه‌ار زیستی است که با کاربرد باکتری‌های آنتاگونیست مؤثر امکان‌پذیر است. هدف از این پژوهش، جداسازی و شناسایی جدایه برتر آنتاگونیست علیه این قارچ روی پسته و سپس طراحی یک محیط کشت صنعتی و بهینه‌سازی برخی شرایط رشد آن برای به‌دست آوردن حداکثر زیست توده باکتری *Bacillus amyloliquefaciens* UTB96 بود. این سویه توانست به‌میزان ۹۸/۳۸ درصد غلظت آفلاتوکسین را در پسته کاهش دهد. هم‌چنین توانایی بالایی در جلوگیری از رشد قارچ و هم‌چنین کاهش میزان آفلاتوکسین تولید شده به‌میزان ۹۵/۹۹ درصد نشان داد. علاوه بر این، ترکیبات فرار سویه UTB96 توانست به‌میزان ۱۴/۴۴ درصد رشد قارچ را کاهش دهد. مؤثرترین فاکتورهای محیطی با استفاده از طرح آزمایشی پلاکت برمن، از نظر میزان اثر آن‌ها بر تولید زیست توده باکتری آنتاگونیست، غربال شده و در نهایت بهینه‌سازی تولید زیست توده باکتری در محیط کشت طراحی شده با استفاده از فاکتورهای غربال شده انجام شد. نتایج نشان داد که ملاس نیشکر و شربت خیس‌انده ذرت به‌ترتیب در غلظت‌های ۱۰ و ۲ گرم بر لیتر می‌توانند به‌عنوان منابع کربن و ازت صنعتی در تولید مورد استفاده قرار گیرند و شرایط بهینه فرآیند برای تولید حداکثر زیست توده در این محیط کشت شامل pH معادل ۷، دمای ۳۰ درجه سلسیوس و نسبت کربن به ازت ۱:۲۳ بود. در نهایت با اعمال این نقاط بهینه در محیط رشد باکتری در شرایط فرمانتور نیمه صنعتی میزان زیست توده به‌اندازه ۰/۱۷ گرم بر لیتر و میزان قدرت آنتاگونیستی افزایش پیدا کرد. گونه *Bacillus* این تحقیق شباهت‌هایی با گونه *B. velezensis* نشان می‌دهد که بررسی ملکولی آن در حال انجام است.

واژه‌های کلیدی: آفلاتوکسین، پلاکت برمن، ترکیبات فرار، *Bacillus amyloliquefaciens*، *Aspergillus flavus*

## مقدمه

(FAO, 2016). آفلاتوکسین‌ها گروه بزرگی از مایکوتوکسین‌ها هستند و به‌عنوان یکی از سمی‌ترین متابولیت‌های قارچی به‌حساب می‌آیند. آفلاتوکسین عامل بیماری آفلاتوکسیکوز در انسان و حیوانات شناخته شده و باعث برخی تأثیرات نامطلوب در حیوانات می‌شوند که از آن جمله می‌توان به استفرآخ، کم وزنی و بافت مردگی حاد تا انواع مختلف سرطان و در برخی از موارد، مرگ اشاره کرد (Kumar et al., 2016; Eaton & Groopman, 1994; Pestka & Bondy, 1990).

قارچ *Aspergillus flavus* روی گستره وسیعی از محصولات کشاورزی و مواد غذایی رشد نموده و با تولید سم آفلاتوکسین موجب آلودگی آن‌ها می‌شود. آفلاتوکسین‌ها سمی و سرطان‌زا بوده، مقدار آن‌ها در محصولات کشاورزی به‌دقت بررسی شده و در اغلب کشورها حد مجاز آن‌ها بین ۵ تا ۱۵ نانوگرم در گرم مشخص شده است. ایران با تولید ۳۱۵ هزار تن پسته در سال ۲۰۱۶، پس از آمریکا مقام دوم تولید جهانی را دارد

گروه‌های مختلف لیوپپتیدها باعث برتری سویه‌های باسیلوس تولید کننده آن‌ها در جایگاه‌های اکولوژیکی می‌شوند. برای تولید عوامل کنترل بیولوژیک در مقیاس بالا و صنعتی، یکی از تمهیدات مهم و لازم، پیدا کردن مواد خام اولیه مناسب و طراحی محیط کشت تجاری به‌صرفه با استفاده از آن‌ها است. از مهم‌ترین ویژگی‌های این مواد می‌توان به داشتن صرفه اقتصادی و در دسترس بودن اشاره کرد. در تولیدات با مقیاس بالا محیط کشت بایستی حداکثر تولید بایومس یا زیست توده و کیفیت محصول را با حداقل هزینه فراهم نماید (Lewis, 1991). استفاده از ترکیبات تجاری یا جانبی صنایع غذایی و کشاورزی به عنوان منابع کربن و ازت به خاطر ارزان بودن می‌تواند تا حدودی گره از مشکلات پیش روی تولید تجاری عوامل بیولوژیک باز نماید (Zabriskie et al. 1980). بهینه نمودن شرایط اثرگذار بر فرایندها چه از نوع فرایندهای شیمیایی و چه فرایندهای زیستی امری ضروری و مهم است. در یک فرایند زیستی مانند تولید ارگانسیم‌های زنده در محیط‌های کشت ایزوله مانند فرمانتورها، لازم است برخی فاکتورهای مؤثر مانند دما، pH، منابع غذایی مختلف، عناصر ریزمغذی، در راستای رسیدن به هدف مورد نظر از فرایند، بهینه شوند. یکی از روش‌های نوین و دقیقی که برای بهینه‌سازی فرایندها استفاده می‌شود، روش سطح پاسخ است. روش سطح پاسخ برای تعیین محیط غذایی، اینوکولوم و شرایط محیطی بهینه، برای تولید سورفکتین توسط باکتری *B. subtilis* با موفقیت مورد استفاده قرار گرفته است (Sen, 1997; Sen & Swaminathan, 2004). روش سطح پاسخ هم‌چنین برای افزایش تولید سورفکتین توسط باکتری *Pseudomonas aeruginosa* AT10 (Abalos, 2002)، سویه باکتریایی پروبیوتیک *Streptococcus thermophilus*، *Lactococcus lactis* (Rodrigues, 2006) و باکتری *Bacillus licheniformis* برای تولید هم‌زمان بیوسورفاکتانت‌ها و پروتئاز RG1 با استفاده از باقیمانده‌های محصولات کشاورزی مانند نشاسته ذرت و آرد سویا به ترتیب به عنوان منابع کربن و ازت مورد استفاده قرار گرفته است (Ramnani, 2005). این روش بهینه‌سازی به صنعت کمک می‌کند تا بهترین محیط کشت را

آنتاگونیست‌ها از طریق ترشح متابولیت‌های ضد میکروبی، آنزیم‌های تجزیه‌کننده و هم‌چنین از طریق رقابت برای مکان و غذا عمل می‌کنند. این عوامل میکروبی عمدتاً مکان‌های غذایی و فضایی طبیعی عوامل بیمارگر توکسین‌زا را اشغال کرده و با آن‌ها رقابت می‌کنند. ترکیبات ضدقارچی این توانایی را دارند تا با تأثیر مستقیم روی فاکتورهای بیماری‌زایی قارچ از جمله توکسین‌ها و آنزیم‌های خارج سلولی و نیز به‌طور غیرمستقیم باعث تخریب فاکتورهای بیماری‌زایی و آفلاتوکسین شده و یا از تشکیل و انتشار آن‌ها جلوگیری کنند (Ciegler et al., 1966; Shifa et al., 2016). بعضی از میکروارگانسیم‌های مفید برای کنترل بیماری‌های گیاهی توسط شرکت‌های مختلفی در دنیا تولید و به‌صورت تجاری به دنیا عرضه شده‌اند. اما متأسفانه اطلاعات و داده‌های مربوط به نحوه تولید این فرآورده‌ها و شرایط بهینه کمی و کیفی مربوط به فرایند تولید آن‌ها کم است و بسیاری از شرکت‌های تجاری این اطلاعات را به‌صورت محرمانه برای خود حفظ کرده و در دسترس سایرین قرار نمی‌دهند. پس بحث بومی‌سازی تولید تجاری این گونه محصولات اهمیت بالایی پیدا می‌کند.

یکی از میکروارگانسیم‌های مورد استفاده در مهارزیستی که اثرات کنترلی آن روی رشد قارچ اسپرژیلوس و میزان آفلاتوکسین آن مورد بررسی قرار گرفته است، باکتری *Bacillus amyloliquefaciens* UTB96 می‌باشد که در مطالعات قبلی با نام *B. subtilis* UTB96 مورد بررسی قرار گرفته است (Afsharmanesh & Ahmadzadeh, 2016). لذا بایستی به شرایط تولید تجاری این گونه عوامل میکروبی و بهینه‌سازی تولید آن‌ها در حجم بالا و فرمولاسیون مناسب آن‌ها توجه ویژه شود. ضرورت انجام این تحقیق، بالا بردن کیفیت محصولات کنترل بیولوژیک تولید شده در فرایند تولید تجاری از طریق بهینه‌سازی شرایط محیط کشت آن‌ها است. از میان ترکیبات ضد میکروبی، پتانسیل لیوپپتیدهای حلقوی خانواده‌های سورفکتین، ایتورین و فنجایسین برای کاربردهای بیوتکنولوژی و داروسازی به‌خاطر خاصیت سورفکتانتی آن‌ها به‌خوبی شناخته شده است. تولید

به دست آمده در پایگاه‌های NCBI، EzTaxon و 16SrDNA با توالی‌های موجود مقایسه و براساس بالاترین میزان شباهت شناسایی شدند. طبقه بندی توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Clustal W انجام شد و درخت فیلوژنتیکی براساس روش Neighbor joining و با آزمون اعتبارسنجی (Bootstrap) ۱۰۰۰ تکرار، با استفاده از نرم‌افزار MEGA5 - رسم شد.

کشت متقابل باکتری با سویه *A. flavus* R5 - براساس روش هاجدورن و همکاران (۱۹۸۹) باکتری در دو نقطه با فاصله یکسان از مرکز تشتک‌های پتری حاوی PDA-NA کشت داده شدند. سپس یک قطره از سوسپانسیون اسپور قارچ در مرکز هر پتری قرار داده شد. تأثیر باکتری در کاهش میزان آفلاتوکسین روی مغز پسته - ابتدا با استفاده از اسکالپل، روی مغز پسته‌ها در طول درز پوسته استخوانی زخمی ایجاد شد. سپس سوسپانسیون باکتری با غلظت  $10^7$  در میلی‌لیتر تهیه و پسته‌های زخمی به مدت ۲۰ دقیقه در این سوسپانسیون غوطه‌ور شدند. در هر پتری ده گرم پسته زخمی (۵ عدد) قرار داده شد و ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور قارچ با غلظت  $10^4$  به محل زخم هر پسته تزریق شد، ظروف پتری به مدت ۶ روز در انکوباتور نگهداری شدند پس از آن آفلاتوکسین B1 تولید شده طبق روش تینولا و همکاران (۲۰۰۵) استخراج و میزان آن اندازه‌گیری شد.

تأثیر باکتری در جلوگیری از رشد و کاهش آفلاتوکسین - ابتدا باکتری در محیط LB کشت داده شد و سپس یک میلی‌لیتر از کشت ۱۸ ساعته این باکتری به فلاسک‌های ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع PDB+LB اضافه شده و هم‌زمان یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون  $10^4$  اسپور قارچ در میلی‌لیتر، تهیه و به هر فلاسک ارلن اضافه شد. پس از ۷ روز روی شیکر انکوباتور در دمای ۳۰ درجه سلسیوس توده‌های میسیلیومی به کمک کاغذ صافی از محیط کشت جدا شده و در آن در دمای ۶۰ درجه سلسیوس خشک شدند. وزن خشک میسیلیوم محاسبه و آفلاتوکسین B1 تولید شده تعیین شد (تینولا و همکاران، ۲۰۰۵).

با بستر ارزان تر طراحی نمایند تا مطلوب‌ترین شرایط محیطی را برای بهبود تولید بیوسورفاکتانت استفاده نمایند. هدف از تحقیق حاضر، بررسی خواص باکتری پروبیوتیک *B. amyloliquefaciens* و هم‌چنین خواص کنترلی این جدایه بر روی قارچ *A. flavus* و سپس ایجاد شرایط بهینه سازی تولید باکتری می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

جداسازی و نگهداری باکتری آنتاگونیست - نمونه برداری از میوه پسته به صورت تصادفی، از مناطق مختلف پسته کاری استان کرمان صورت گرفته و جداسازی باکتری انجام شد. سپس به منظور نگهداری کوتاه مدت در دمای ۴ درجه سلسیوس یخچال، باکتری به ویال‌های حاوی  $MgSO_4$  یک دهم مولار منتقل و برای نگهداری طولانی مدت به روش شاد و همکاران، از گلیسرول استفاده شد. آزمون‌های فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و مرفولوژیک برای شناسایی باکتری آزمون کاتالاز، آزمون لیستیناز، تولید اندول، هیدرولیز کازئین، ژلاتین، نشاسته، تحمل نمک طعام (۷-۲ درصد)، تولید اسید از کربوهیدرات‌ها، استفاده از سترات، رشد غیرهوازی در محیط مایع گلوکز، آزمون حداقل و حداکثر دمای رشد در محیط غذایی مایع و هم‌چنین رنگ آمیزی اسپور به روش شاد و همکاران انجام شد (Schaad et al, 2001).

شناسایی مولکولی باکتری - DNA ژنومی باکتری با روش CTAB (مندوزا و همکاران، ۲۰۰۸؛ گرین و سام بروک، ۲۰۱۲) استخراج شد و به منظور ارزیابی DNA استخراج شده از روش الکتروفورز ژل آگارز یک درصد استفاده شد. سپس واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای تکثیر ناحیه ژنی 16SrDNA با استفاده از آغازگرهای (5'-PAF (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') و (3'-PAR AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') به کمک دستگاه ترموسایکلر در ۳۸ چرخه با اندکی تغییرات انجام شد (ذکریا و همکاران ۲۰۱۰). قطعات حاصل از توالی 16S rDNA به منظور تعیین توالی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال شد. پس از دریافت نتیجه توالی نوکلئوتیدی نمونه‌ها توسط نرم‌افزار BioEdit اصلاح شد و سپس توالی

تأثیر باکتری در کاهش میزان آفلاتوکسین محیط کشت - ۲۰۰ میکرولیتر از کشت ۱۸ ساعته باکتری در محیط مایع به ۵ میلی لیتر محیط مایع PDB حاوی ۲ ppm، آفلاتوکسین B1 اضافه شد. پس از ۵ روز روی شیکر انکوباتور و دمای ۳۰ درجه سلسیوس، میزان آفلاتوکسین به روش تینولا و همکاران (۲۰۰۵) اندازه گیری شد.

### استخراج ترکیبات ضدقارچی مؤثر در جلوگیری از رشد قارچ

استخراج لیوپیتیدهای برون سلولی باکتری - عصاره برون سلولی باکتری، پس از کشت ۷۲ ساعته باکتری تهیه و به روش ژنگ و همکاران (۲۰۰۷) انجام شد. در مرحله بعد حلال متانول به کمک دستگاه روتاری حذف و رسوب حاصل در ۲ میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار حل شد.

استخراج آفلاتوکسین از محیط کشت مایع - استخراج آفلاتوکسین موجود در محیط کشت مایع با استفاده از حلال کلروفرم و براساس روش تینولا و همکاران (۲۰۰۵) انجام شد. سپس آفلاتوکسین خشک شده در یک میلی لیتر کلروفرم حل شد و پس برای اندازه گیری میزان آفلاتوکسین تولید شده از روش HPTLC استفاده شد.

### بررسی تولید برخی آنزیم‌ها توسط باکتری

آزمون هیدرولیز چربی، هیدرولیز نشاسته و تجزیه پروتئین شیر براساس روش شاد و همکاران (۲۰۰۱) و هیدرولیز پروتئین مطابق روش مارهوفر و همکاران (۱۹۹۵) با اندکی تغییر استفاده شد.

### بررسی اثر محصولات جانبی برخی صنایع به تنهایی بر میزان تولید باکتری

در این مرحله پتانسیل ترکیبات تجاری یا پسماند برخی صنایع مانند ملاس چغندر قند، ملاس نیشکر، نشاسته سیب زمینی و سرم شیر در حمایت از رشد باکتری به عنوان یک بستر رشد آماده بررسی شد. این ترکیبات به طور جداگانه بدون اضافه کردن هیچ ترکیبی برای رشد باکتری مورد استفاده قرار گرفتند. ترکیبات خام استفاده شده در این مرحله در سه غلظت متفاوت برای رشد باکتری فراهم شدند (جدول ۱). سپس عصاره مخمر به عنوان منبع ازت با غلظت ۳ گرم بر لیتر به تمامی محیط‌ها اضافه و ترکیبات خام در سه

تأثیر ترکیبات فرار باکتری در جلوگیری از رشد میسیلیومی قارچ - این آزمون مطابق روش فیدامن و روزال (۱۹۹۳) با کمی تغییرات انجام گرفت.

تأثیر عصاره برون سلولی باکتری در جلوگیری از رشد میسیلیومی قارچ در محیط جامد - سوسپانسیون اسپور قارچ به میزان ۱۰<sup>۵</sup> در میلی لیتر به محیط کشت PDA پس از اتوکلاو اضافه شده و به ظروف پتری منتقل شد. سه چاهک درون هر ظرف پتری ایجاد و بلافاصله حدود ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره برون سلولی باکتری به هر چاهک اضافه شد. به منظور تهیه عصاره برون سلولی باکتری، این سویه در محیط کشت مایع به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در شیکرانکوباتور رشد کرده و سپس به مدت پانزده دقیقه در ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ شد و در مرحله آخر عصاره بدون سلول‌های باکتری از فیلتر ۰/۲ عبور داده شد. میزان هاله پس از ۷۲ ساعت نگهداری در ۳۰ درجه سلسیوس اندازه گیری شد.

تأثیر متابولیت‌های خارج سلولی در جلوگیری از رشد قارچ - در محیط مایع غلظت‌های ۱۰، ۲۵ و ۵۰ درصد از عصاره خارج سلولی در محیط کشت PDB تهیه و سوسپانسیون ۱۰<sup>۴</sup> اسپور قارچ به آن اضافه شد. پس از نگهداری به مدت ۷ روز در دمای ۳۰، میزان رشد قارچ با اندازه گیری وزن خشک توده میسیلیومی تولید شده تعیین شد. در روش اختلاط با محیط عصاره برون سلولی با غلظت‌های ۱۰، ۲۵ و ۵۰ به محیط PDA اضافه و درون ظروف پتری ریخته شد. سپس سوسپانسیون اسپور در وسط هر تشتک قرار گرفت و میزان بازدارندگی از طریق اندازه گیری قطر رشد محاسبه شد.

تأثیر عصاره برون سلولی در جلوگیری از جوانه زنی اسپور - به روش چیتارا و همکاران (۲۰۰۳) انجام شد. غلظت‌های ۱۰، ۲۵ و ۵۰ از عصاره در یک میلی لیتر محیط PDB تهیه و سوسپانسیون ۱۰<sup>۴</sup> اضافه شد. پس از ده ساعت نگهداری در شرایط تاریک و دمای ۳۰ درجه سلسیوس، تعداد اسپورهای جوانه زده و جوانه نزده توسط میکروسکوپ نوری شمارش شد. در هر تکرار ۱۰۰ اسپور شمارش شده و درصد اسپورهای جوانه زده محاسبه شد.

به عنوان منابع اصلی کربن و ازت در این پژوهش انتخاب شدند با استفاده از دستگاه لیوفیلیز به صورت پودر خشک در آورده شدند. این پودر برای محاسبه میزان ماده خشک ترکیبات مایع در طول طراحی محیط کشت، مورد استفاده قرار گرفت.

تعیین درصد عناصر کربن، نیتروژن و هیدروژن موجود در منابع کربن و ازت - برای آنالیز عناصر کربن، ازت و نیز هیدروژن این ترکیبات، از دستگاه CHN Analyzer آزمایشگاه شیمی دانشگاه تربیت معلم کرج استفاده شد. برای آنالیز این ترکیبات میزان یک گرم از پودر خشک شده ملاس نیشکر و شربت خیسانه ذرت برای آنالیز مورد استفاده قرار گرفت.

سنجش زیست توده باکتری - میزان تولید زیست توده باکتری به روش وایت و همکاران با تغییراتی مورد سنجش گرفت (White, 1954). در این روش غلظت‌های مختلفی از سوسپانسیون باکتری با میزان جذب نوری ۰/۱، ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷، ۱ و ۱/۵ تهیه شد و توده سلولی باقی مانده 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. از سوی دیگر منحنی استاندارد مربوط به رابطه بین زیست توده و میزان جذب نوری باکتری در طول موج ۶۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر به دست آمد. در مراحل مختلف آزمایش از این منحنی برای تبدیل جذب نوری باکتری به زیست توده تولیدی آن استفاده شد.

غربال (Screening) فاکتورهای محیطی مؤثر در رشد باکتری - برای انتخاب فاکتورهای اصلی و مؤثر از طرح آزمایشی ویژه غربال گری، یعنی طرح فاکتوریل خرد شده با ۱۲ تیمار آزمایشی و با چهار نقطه مرکزی استفاده شد. برای متمایز نمودن فاکتورهای مؤثر و معنی دار از نمودار پارتو در سطح احتمال ۹۹ درصد استفاده شد. در این مرحله پنج فاکتور مورد بررسی و غربال قرار گرفتند، تا این که مؤثرترین آن‌ها در تولید زیست توده باکتریایی مشخص شود و برخی فاکتورها برای یافتن نقاط بهینه آن‌ها انتخاب شوند. این پنج فاکتور شامل دمای محیط کشت، pH، نسبت کربن به ازت، میزان تکان خوردن محیط و غلظت نمک

غلظت متفاوت برای رشد باکتری به کار رفتند. برای هر کدام از ترکیبات ۳ تکرار انجام گرفت و نتایج آن برای آنالیز آماری به دست آمد.

جدول ۱- ترکیبات تجاری خام مورد استفاده برای رشد باکتری و غلظت‌های مختلف آن‌ها.

Table 1. The different concentrations of raw commercial compounds to bacterial growth.

Carbon source	Different concentration levels		
	1	2	3
Sugarbeet molasses (g/l)	10	20	40
Sugarcane molasses (g/l)	10	20	40
Potato starch (v/v)	25	50	75
Milk serum (%)	100	200	300

### بررسی اثر منابع مختلف ازت آلی و معدنی به همراه منبع کربن بر میزان تولید باکتری

پس از انتخاب منبع کربن مناسب در مرحله قبل، این منبع در تلفیق با چندین منبع ازت برای رشد باکتری مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۲). برای هر کدام از ترکیبات ۳ تکرار در نظر گرفته شد و داده‌های آن برای آنالیز آماری به دست آمد.

جدول ۲- منابع مختلف ازت مورد استفاده به همراه یک منبع کربن ثابت برای رشد باکتری و غلظت‌های مختلف آن‌ها.

Table 2. The concentration levels of different nitrogen sources and one carbon source to bacterial growth.

Carbon source	Different concentration levels (g/l)		
	1	2	3
Corn steep	2	4	8
Pure urea	0.5	1.5	3
Urea fertilizer	1.3	2.6	5.2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0	2	0
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0	2	0
Pepton	0	2	0
Yeast extract	0	3	0

### تعیین درصد عناصر منابع کربن و ازت انتخابی

خشک کردن و تعیین وزن خشک نمونه‌ها - ملاس نیشکر و شربت خیسانه ذرت که به صورت مایع تهیه شده بود برای تعیین وزن خشک آن‌ها بایستی به صورت پودر خشک در آورده می شدند. این دو ترکیب که به ترتیب



برای جلوگیری از ایجاد کف در سطح محیط کشت و خطرات بعدی آن، از روغن کرچک به عنوان ضد کف استفاده شد. پس از تنظیم pH متر فرمانتور و با رعایت نکات ایمنی لازم در تنظیم تهویه محفظه های دستگاه، فرمانتور با دقت داخل اتوکلاو قرار گرفت. پس از نصب فرمانتور بر روی هیتر و برقراری اتصالات مختلف و تنظیم دمای محیط کشت، پیش کشت ۲۴ ساعته باکتری به نسبت پنج درصد در آن تلقیح شد. در مرحله غیربهینه، دما روی ۲۹ درجه سلسیوس، pH روی ۷/۳ و همزن روی ۱۶۰ دور در دقیقه تنظیم شد.

آزمون میزان تولید در فرمانتور آزمایشگاهی پس از بهینه سازی- در این مرحله نقاط بهینه به دست آمده برای سه فاکتور دما، pH و نسبت کربن به ازت بر محیط فرمانتور اعمال شد. دمای بهینه اعمال شده در این مرحله ۳۰ درجه سلسیوس، نسبت کربن به ازت ۱:۲۳ و pH بهینه حدود ۷ بود. سایر شرایط مانند ترکیبات معدنی شبیه محیط کشت قبل از بهینه سازی بود و روغن کرچک به عنوان یک ترکیب ضد کف در این مرحله نیز به میزان ۰/۴ گرم بر لیتر به محیط کشت اضافه شد.

#### آزمون میزان تولید در فرمانتور نیمه صنعتی

مایه زنی محیط کشت فرمانتور نیمه صنعتی با باکتری UTB96 - پیش کشت باکتری به میزان ۱ درصد در شرایط استریل زیر هود داخل فلاسک تلقیح که از قبل سترون شده بود ریخته شد و سپس بر روی فرمانتور نیمه صنعتی نصب شد. در این مرحله محیط پیش کشت پس از سترون شدن مسیر ورود به داخل فرمانتور، اجازه داده شد که در آن تلقیح گردد. دمای محیط کشت داخل فرمانتور روی ۲۹ درجه سلسیوس تنظیم شد. pH محیط روی ۷/۳ تنظیم و هوادهی در این فرمانتورها به طریق air lift انجام شد. میزان تولید زیست توده پس از ۸ ساعت مورد سنجش قرار گرفت.

آزمون میزان تولید در فرمانتور نیمه صنعتی قبل از بهینه سازی- محیط کشت طراحی شده در فرمانتور نیمه صنعتی قبل از بهینه سازی، از فرمانتور air lift شرکت فناوری زیستی طبیعت گرا استفاده شد. برای این منظور ابتدا محیط کشت اصلی در حجم ۲ لیتر به صورت غلیظ تهیه شد

بود. این فاکتورها در سه سطح و با استفاده از روش پلاکت برمن مورد ارزیابی قرار گرفتند. نوع و میزان سطوح این فاکتورها در جدول ۳ آورده شده است. جدول ۳- فاکتورهای محیطی مورد استفاده در مرحله غربالگری با روش پلاکت برمن در سه سطح مختلف.

Table 3. Environmental factors used in Bremenplacket screening at three different levels.

Independent variables	Domain use		
	-1	0	+1
Temperature ( C )	25	30	35
pH	6	7	8
RPM	100	150	200
C/N	10	20	30
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0/5	1	1/5

جدول داده های مربوط به پلاکت برمن با استفاده از نرم افزار آماری مینی تب طراحی شد. براساس این طرح پنج فاکتور مذکور در ۱۶ ارلن اصلی و ۱۶ ارلن شاهد از نظر میزان تأثیرشان مورد مقایسه قرار گرفتند.

بهینه سازی تولید زیست توده باکتری - یک طرح مرکب مرکزی با ۵ سطح کدبندی شده برای بهینه نمودن فاکتورهای منتخب استفاده شد. نتایج این طرح با معادله چند جمله ای درجه دوم یا روش رگرسیون چندگانه مطابق بود. مدل مکعبی انتخابی برای پیش بینی نقطه اپتیمم بیان شد. نرم افزار مینی تب برای آنالیزهای رگرسیون و رسم نمودارهای بهینه سازی مورد استفاده قرار گرفتند.

در این مرحله سطوح مختلف سه فاکتور دما، نسبت کربن به ازت و pH که براساس روش پلاکت برمن مؤثر بودن آنها مشخص شده بود، براساس طرح مرکب مرکزی در پنج ۵ سطح مورد بررسی قرار گرفتند. با به دست آوردن ضرایب معادله رگرسیون زیر و جایگذاری آنها می توان میزان مناسب هر کدام از سه فاکتور مذکور را برای به دست آوردن حداکثر زیست توده به دست آورد.

#### آزمون میزان تولید در فرمانتور آزمایشگاهی

آزمون میزان تولید در فرمانتور آزمایشگاهی قبل از بهینه سازی - محیط کشت به دست آمده در مرحله انتخاب منابع کربن و ازت که بهینه نشده بود، در حجم ۱/۵ لیتر درون فرمانتور آزمایشگاهی ریخته شد. در این آزمایش

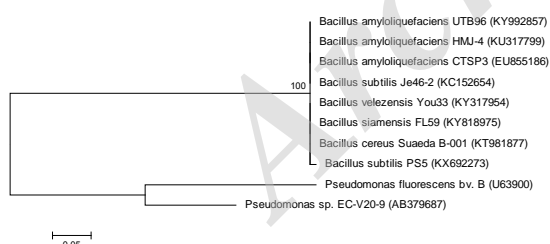
## نتایج

خصوصیات مرفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی- این جدایه از نظر تولید اسپور، هیدرولیز کازئین، ژلاتین و نشاسته، مصرف سترات، واکنش کاتالاز و تولید اسید از قندهای آل آرابینوز، دی زایلوز و دی مانیتول مثبت بود. در نمک طعام ۲ و ۵ و ۷ درصد و اسیدیته ۶/۸ و ۵/۷ و دمای ۴۱ رشد کرد. تولید لووان و اندول نمی کند. تولید اسید از لاکتوز می کند اما از اینولین اسید تولید نمی کند. این جدایه قادر است آنزیم لیپاز را به میزان قابل قبولی تولید و پروتئین شیر را تجزیه نماید. هم چنین قادر به تولید آنزیم آمیلاز و آنزیم مهم پروتئاز می باشد.

مطالعات فیلوژنتیکی و ترسیم درخت فیلوژنتیکی- مطالعات فیلوژنتیکی و آزمون های بیوشیمیایی انجام شده نشان داد که این استرین باکتری با احتمال ۹۹ درصد متعلق به گونه *B. amyloliquifaciens* است. سپس توالی این سویه در بانک ژن NCBI و با شماره دسترسی KY992857 ثبت شد و با مقایسه توالی این سویه با توالی های مشابه در بانک ژن درخت فیلوژنتیکی با نرم افزار MEGA رسم شد.

شکل ۱- درخت فیلوژنتیکی مربوط به جدایه *B. amyloliquifaciens* UTB96

Fig.1. Phylogenetic tree of *B. amyloliquifaciens* UTB96.



تأثیر باکتری و ترکیبات فرار در کاهش میزان آفلاتوکسین بر روی مغز پسته و جلوگیری از رشد و کاهش آفلاتوکسین جدایه *A. flavus* R5 - در محیط کشت مایع این جدایه با ۹۸/۳۸ درصد کاهش آفلاتوکسین در پسته را داشت و در سطح یک درصد معنی دار بود. تمامی آزمایشات در سه تکرار انجام شد. هم چنین توانایی بالایی در جلوگیری از رشد قارچ و هم چنین کاهش میزان آفلاتوکسین تولید شده به میزان ۹۵/۹۹ درصد دارد. این s,di

و پس از تنظیم pH، محیط کشت درون فلاسک تلقیح ریخته شد. فلاسک تلقیح اتوکلاو و سپس روی فرماتور نیمه صنعتی نصب شد. مسیر ورود محیط کشت از فلاسک تلقیح به درون فرماتور نیمه صنعتی قبل از این کار بوسیله بخار آب موجود در خط سترون شد. محیط کشت غلیظ سترون پس از ورود در فرماتور نیمه صنعتی با ۴۰ لیتر آب سترون مخلوط شد و پس از تنظیم دما، محیط کشت آماده تلقیح با باکتری شد. لازم به ذکر است که برای جلوگیری از کف کردن محیط کشت درون فرماتور از روغن مایع به عنوان یک ترکیب ضد کف استفاده شد.

آزمون میزان تولید در فرماتور نیمه صنعتی پس از بهینه سازی- نقاط بهینه به دست آمده برای سه فاکتور دما، pH و نسبت کربن به ازت در محیط فرماتور اعمال شد. دمای بهینه اعمال شده در این مرحله ۳۰ درجه سلسیوس، نسبت کربن به ازت ۱:۲۳ و pH بهینه حدود ۷ بود. سایر شرایط مانند ترکیبات معدنی مانند محیط کشت قبل از بهینه سازی بود و روغن مایع به عنوان یک ترکیب ضد کف در این مرحله نیز به محیط کشت اضافه شد.

بررسی اثر محیط کشت و نوع فرماتور بر خاصیت آنتاگونیستی باکتری- برای بررسی قدرت آنتاگونیستی باکتری در شرایط آزمایشگاه از روش هاجدرون و همکاران (۱۹۸۹) استفاده شد. در این آزمایش سویه باکتری به دست آمده در مراحل مختلف آزمایش شامل قبل و پس از بهینه سازی محیط کشت و در دو فرماتور نیمه صنعتی و آزمایشگاهی، به صورت لکه ای به فواصل مساوی از مرکز تشتک های پتری و به فاصله یک سانتی متری از حاشیه آنها از چهار طرف تشتک های پتری حاوی محیط کشت PDA مایه زنی شدند. سپس دیسکی به قطر ۵ میلی متر از حاشیه کشت چند روزه *P. drechsleri* در مرکز تشتک کشت داده شد. در مورد قارچ *A. flavus* به جای دیسک حاوی ریشه از سوسپانسیون اسپور این قارچ برای تلقیح استفاده شد. در تشتک پتری شاهد از آب مقطر استریل استفاده شد. این تشتک ها در دمای ۲۷ درجه سلسیوس نگهداری و سپس میزان رشد پرگنه اندازه گیری شد.

Carbon source	Different concentration levels		
	1	2	3
Sugarbeet molasses (g/l)	0.025 hi	0.022i	0.065f
Sugarcane molasses (g/l)	0.178b	0.091d	0.076e
Potato starch (v/v)	0.03h	0.012j	0.004jk
Milk serum (%)	0.136c	0.0k	0.053g

اثر منابع کربن مختلف به همراه عصاره مخمر بر میزان تولید زیست توده باکتری - نتایج به دست آمده در این مرحله نشان داد که ملاس نیشکر در ترکیب با ۳ گرم بر لیتر عصاره مخمر به عنوان منبع ازت نسبت به سایر محیط‌های کشت تجاری دارای بیشترین تولید زیست توده باکتریایی بود. داده‌های به دست آمده (جدول ۵) در این مرحله نشان داد که این محیط به دلیل تأمین کامل منبع ازت مورد نیاز باکتری می‌تواند میزان رشد آن را به ۰/۵۶ گرم بر لیتر برساند. لذا ملاس نیشکر به عنوان یک ترکیب کربن مناسب برای مرحله بعد انتخاب شد.

جدول ۵- مقایسه میزان تولید زیست توده باکتری (گرم بر لیتر) در پسماندهای صنعتی در غلظت‌های مختلف به همراه ۳ گرم بر لیتر عصاره مخمر در سطح یک درصد.

Table 5. The comparison of bacterial biomass production (g/l) in industrial wastes at different concentrations plus 3 grams of yeast extract ( $P < 0.01$ ).

Carbon source	Different concentration levels		
	1	2	3
Sugarbeet molasses (g/l)	0.467d	0.378f	0.119h
Sugarcane molasses (g/l)	0.56b	0.487c	0.422e
Potato starch (v/v)	0.486cd	0.221g	0.069i
Milk serum (%)	0.012k	0.113h	0.054j

اثر منابع مختلف ازت به همراه یک منبع کربن بر میزان تولید زیست توده باکتری - در این مرحله غلظت‌های مختلف چند منبع ازت آلی و معدنی در ترکیب با غلظت ۱۰ گرم بر لیتر ملاس نیشکر بر میزان رشد باکتری UTB96 مورد مقایسه قرار گرفتند. نتایج نشان داد (جدول ۶) که غلظت ۲ گرم بر لیتر شربت خیسانه ذرت با تولید ۰/۳۸ گرم بر لیتر بیشترین اثر را بر تولید زیست توده باکتری در بین سایر ترکیبات ازت دارد. البته در این آزمایش عصاره مخمر که یک منبع ازت معروف آزمایشگاهی به حساب

به میزان ۸۷/۲۶ درصد کاهش میزان آفلاتوکسین نسبت به شاهد دارای بیشترین توانایی حذف آفلاتوکسین در محیط است. ترکیبات فرار این جدایه ۱۴/۴۴ درصد بازدارندگی از رشد قارچ داشته و در سطح یک درصد معنی دار است.

خاصیت ضد قارچی عصاره برون سلولی - این آزمون با بررسی هاله عدم رشد روی محیط کشت، مورد مطالعه قرار گرفت. این جدایه به میزان ۸ میلی متر هاله عدم رشد را باعث شد. در اختلاط با محیط کشت با افزایش غلظت عصاره، تأثیر آن در جلوگیری از رشد قارچ افزایش یافته و نتایج دارای تفاوت معنی دار در سطح یک درصد هستند. عصاره برون سلولی این باکتری در غلظت ۵۰، ۸۰/۹۱ درصد قدرت بازدارندگی از رشد میسیلیوم قارچ را داشته و باعث بازدارندگی از جوانه زنی اسپور به میزان ۷۲ درصد شد. و در غلظت ۱۰ درصد به میزان ۵۴ درصد بازدارندگی از جوانه زنی اسپور را داشت.

خاصیت ضد قارچی لیپوپپتیدهای برون سلولی به روش ایجاد چاهک - در بررسی هاله عدم رشد روی محیط کشت، این جدایه ایجاد هاله ۱۲ میلی متری کرد.

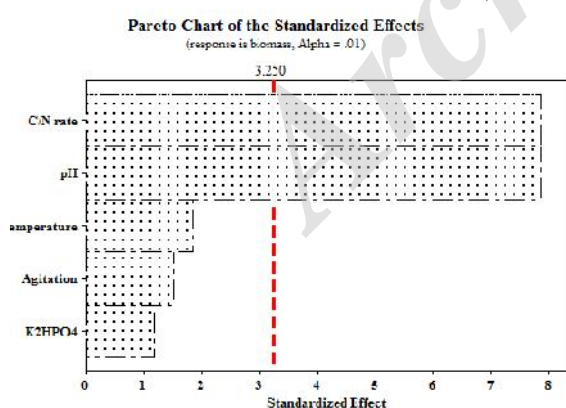
اثر محصولات جانبی برخی صنایع به تنهایی بر میزان تولید زیست توده باکتری - در این مرحله میزان رشد باکتری در محیط‌های کشت صنعتی به صورت خالص و در چند غلظت در سطح آماری ۱ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. طبق نتایج به دست آمده (جدول ۴) مشخص شد که حداکثر رشد در غلظت ۱۰ گرم بر لیتر ملاس نیشکر صورت پذیرفت. میزان رشد باکتری در این محیط کشت ۰/۱۸ گرم بر لیتر شد. این در حالی است که محیط کشت آزمایشگاهی M1 دارای رشد باکتری به میزان ۰/۶۵ گرم بر لیتر بود.

جدول ۴- مقایسه میزان تولید زیست توده باکتری (گرم بر لیتر) در منابع کربن تجاری در غلظت‌های مختلف آن‌ها در سطح احتمال یک درصد.

Table 4. The comparison of bacterial biomass production (g/l) in commercial carbon sources at different concentrations ( $P < 0.01$ ).



غربالگری و بررسی اثر فاکتورها بر تولید زیست توده- اولین هدف از آزمایشات غربالگری، انتخاب فاکتورهای مهم و مؤثر از میان فاکتورهای مختلف می باشد. در این مطالعه یک طرح فاکتوریل خرد شده برای تشخیص میزان اثر پنج فاکتور مؤثر بر میزان تولید زیست توده باکتری در فلاسک های ارلن ۵۰۰ میلی لیتری مورد استفاده قرار گرفت. در بررسی اثر فاکتورها، داده های به دست آمده با یک مدل درجه اول قابل ارزیابی بود. برای انجام آنالیز از سطح احتمال ۹۹ درصد استفاده شد. پس از تجزیه واریانس (ANOVA) مشخص شد که مدل درجه اول برای تولید زیست توده مناسب می باشد. جدول پارتو که به عنوان یک ابزار مفید در تشخیص مهم ترین اثرات می باشد، برای تعیین فاکتورهای معنی دار به کار برده شد. در این جدول طول هر ستون در نمودار پارتو استاندارد نشانگر ضریب رگرسیون فاکتور مورد نظر می باشد و نشان می دهد که نسبت کربن به ازت، pH، دما و میزان هم خوردن محیط کشت به ترتیب دارای اثرات مهم تری در تولید زیست توده هستند. بنابراین از بین این پنج فاکتور سه فاکتور دما، pH و نسبت کربن به ازت برای آزمایش های بهینه سازی انتخاب شدند. نسبت کربن به ازت و pH محیط کشت، بیشترین اثر را بر میزان تولید زیست توده باکتریایی دارد. پس از این دو دما در جایگاه سوم قرار گرفته است (شکل ۲).



شکل ۲- نمودار پارتو مربوط به غربالگری فاکتورهای مؤثر در تولید زیست توده باکتری.

Fig. 2. The pareto chart for screening factors affecting the production of bacterial biomass.

می آید به عنوان شاهد برای مقایسه استفاده شده بود که باکتری توانست در آن به میزان ۰/۵۱ گرم بر لیتر رشد نماید. انتخاب منبع کربن و ازت تجاری و تعیین اجزای محیط کشت - پس از انتخاب منابع کربن و ازت مناسب برای رشد باکتری و تعیین غلظت مناسب آن ها، محیط کشت مناسب و پایه برای رشد این باکتری طراحی شد. در این محیط کشت ملاس نیشکر با غلظت ۱۰ گرم بر لیتر به عنوان منبع کربن و شربت خیسانده ذرت به عنوان منبع ازت با غلظت ۲ گرم بر لیتر تعیین شد. برای اطمینان از تأمین مواد غذایی ضروری برخی از عناصر غذایی مؤثر در رشد نیز به محیط بر حسب گرم بر لیتر اضافه شدند از جمله سولفات منیزیم ۰/۴، دی پتاسیم هیدروژن فسفات ۰/۹۸، کلرید کلسیم ۰/۱، کربنات پتاسیم ۰/۲، منگنز سولفات ۰/۰۱ و روغن مایع ۰/۴.

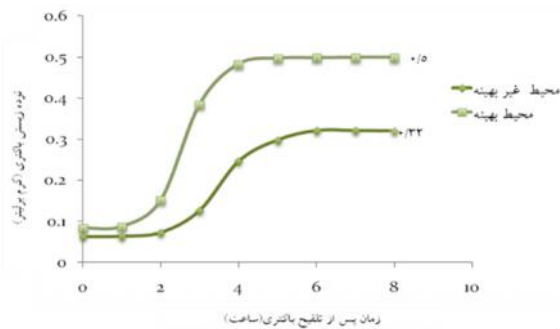
جدول ۶- مقایسه میزان تولید زیست توده باکتری (گرم بر لیتر) در غلظت های مختلف منابع ازت به همراه ملاس نیشکر (۱۰ گرم بر لیتر) در سطح یک درصد.

Table 6. The comparison of bacterial biomass production (g/l) at different concentrations of nitrogen sources plus sugarcane molasses (10g/l) (P < 0.01).

Nitrogen source	Different concentration levels (g/l)		
	1	2	3
Corn steep	0.38b	0.27def	0.11h
Pure urea	0.26c	0.26ef	0.25g
Urea fertilizer	0.31f	0.26f	0.16f
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		0.31cd	
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		0.3cde	
Pepton		0.36b	
Yeast extract		0.51a	

نتایج آنالیز منابع کربن و ازت با دستگاه CHN ANALYZER- به منظور تعیین نسبت های مختلف کربن به ازت (C/N) منابع کربن و ازت انتخاب شده برای بررسی اثر آن ها بر میزان رشد باکتری نیاز بود تا درصد این عناصر در ترکیبات سنجیده شود. در این آنالیز مشخص شد که ملاس نیشکر دارای ۳۷/۳ درصد کربن و ۰/۲۸ درصد ازت می باشد. هم چنین کربن و ازت به ترتیب ۳۳/۳۹ و ۶/۷۵ درصد از محتوای شربت خیسانده ذرت را تشکیل می داد.

حداکثر زیست توده به دست آمده برای باکتری در فرماتور آزمایشگاهی در محیط کشت بهینه و غیربهینه - در این آزمایش ابتدا پتانسیل رشد باکتری در محیط کشت بهینه نشده مورد آزمایش قرار گرفت. حداکثر میزان تولید زیست توده پس از ۱۲ ساعت رشد به حدود ۰/۳۱ گرم بر لیتر رسید. پس از به دست آوردن نقاط بهینه فاکتورهایی مانند دما، pH و نسبت کربن به ازت، این نقاط برای رسیدن به حداکثر تولید زیست توده باکتری در فرماتور آزمایشگاهی مورد آزمون قرار گرفت. با اعمال این نقاط میزان رشدی در حدود ۰/۴۴ گرم بر لیتر به دست آمد که با توجه به نتایج حاصل مشخص شد که میزان رشد باکتری در حالت بهینه شده نسبت به حالت غیربهینه بهبود یافته است.



شکل ۳- منحنی رشد باکتری در فرماتور نیمه صنعتی، پیش و پس از بهینه سازی.

Fig. 3. Bacterial growth curve in semi-industrial fermenter before and after optimization.

روند افزایش تولید در طول طراحی و بهینه سازی محیط کشت - در طول طراحی محیط کشت یکی از اهداف، حداکثر نمودن تولید بود. این هدف مهم ترین فاکتور در مرحله بهینه سازی شرایط رشد بود. نتایج در سطح یک درصد معنی دار بوده و نشان داد که میزان تولید زیست توده باکتری از مرحله انتخاب منابع کربن و ازت مناسب روند روبه رشد را طی نموده و در نهایت در محیط کشت بهینه شده به حداکثر مقدار رسیده است. حداکثر مقدار تولید زیست توده در فرماتور نیمه صنعتی به دست آمد که مقدار آن بسیار نزدیک به مقدار پیش بینی شده توسط روش سطح پاسخ بود. میزان تولید در ملاس نیشکر بدون هیچ افزودنی

اثرات متقابل بین فاکتورها - اثر متقابل نسبت کربن به ازت و pH - اگر دما در حد بهینه که ۳۰ درجه سلسیوس می باشد، ثابت نگه داشته شود، حداکثر زیست توده، یعنی ۰/۵۵ گرم بر لیتر هنگامی به دست می آید که نسبت کربن به ازت از ۱۵ و ۳۰ به سمت ۲۳ میل کند و به موازات آن pH از ۷/۸ و ۶/۲ به سمت ۷ تغییر نماید.

اثر متقابل نسبت کربن به ازت و دما - اگر pH در حد بهینه ۷ نگه داشته شود، در دمای ۲۹ درجه سلسیوس و نسبت کربن به ازت ۱:۲۳ بیشترین زیست توده باکتری به میزان ۰/۵۲ گرم بر لیتر تولید می شود. با خروج از محدوده دمایی ۲۳ درجه سلسیوس و نسبت کربن به ازت ۱۸ تا ۲۸ میزان تولید زیست توده سلولی به تدریج کم شده و به کمترین میزان خود می رسد.

اثر متقابل دما و pH - هنگامی که نسبت کربن به ازت در نسبت بهینه ۱:۲۳ ثابت نگه داشته شود در دمای ۲۷ درجه سلسیوس و pH حدود ۶/۹، میزان تولید زیست توده باکتری در حداکثر مقدار خود یعنی ۰/۵۵ گرم بر لیتر خواهد بود. با خروج pH از محدوده ۶/۷ تا ۷/۱ و دما از ۲۲ تا ۳۳ درجه سلسیوس تولید زیست توده به تدریج کاهش می یابد و کمترین زیست توده باکتری در دمای بالاتر از ۳۸ و pH معادل ۷/۵ به دست می آید.

### فرماتور نیمه صنعتی

حداکثر زیست توده به دست آمده برای باکتری در فرماتور نیمه صنعتی در محیط کشت بهینه و غیربهینه در این آزمایش پتانسیل رشد باکتری در محیط کشت بهینه نشده مورد آزمایش قرار گرفت. حداکثر میزان تولید زیست توده پس از ۸ ساعت رشد به حدود ۰/۳۲ گرم بر لیتر رسید. اما پس از به دست آوردن نقاط بهینه فاکتورهایی مانند دما، pH و نسبت کربن به ازت در فلاسک های ۵۰۰ میلی لیتری، این نقاط برای رسیدن به حداکثر زیست توده باکتری در فرماتور نیمه صنعتی مورد آزمون قرار گرفت. با اعمال این نقاط میزان رشدی در حدود ۰/۴۹۹ گرم بر لیتر به دست آمد که با توجه به نتایج حاصل مشخص شد که میزان رشد باکتری در حالت بهینه شده نسبت به حالت قبلی بهبود یافته است (شکل ۳).

حالی‌که در جلوگیری از رشد قارچ *A. flavus* باکتری‌های رشد یافته در هر دو محیط کشت بهینه و غیر بهینه تفاوت معنی‌داری نشان نداد.

### بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که این سویه مقدار آفلاتوکسین ردیابی شده را هم در محیط مایع و هم روی پسته به شکل معنی‌داری کاهش می‌دهد به نحوی که به میزان ۹۸/۳۸ درصد مقدار آفلاتوکسین را در پسته‌های آلوده به قارچ و نسبت به شاهد کاهش داد. هم‌چنین قادر است به میزان قابل توجهی آفلاتوکسین موجود در محیط را تجزیه کند، زیرا توانست به میزان ۸۷/۲۶ درصد آفلاتوکسین B1 اضافه شده به محیط را کاهش دهد. توانایی سویه‌های *B. subtilis* در جلوگیری از رشد *A. flavus* و کاهش آفلاتوکسین قبلاً نیز گزارش شده است (Cuero et al., 1991; Reddy et al., 2009). تأثیر متابولیت‌های فرار باکتری *B. subtilis* در کاهش رشد سیانوباکتری‌ها توسط رایت و تامسون (۱۹۸۵) گزارش شده است. طبق تحقیقات ردی و همکاران (۲۰۰۹) عصاره خارج سلولی باکتری *B. subtilis* به طور مؤثری از رشد قارچ *A. flavus* به میزان ۶۸ درصد و از تولید آفلاتوکسین B1 به میزان ۵۸ درصد ممانعت کرد. بیشتر اعضای جنس باسیلوس قادرند طیف وسیعی از مولکول‌های فعال بیولوژیکی با خاصیت بازدارندگی از رشد بیمارگرها را تولید کنند (Emmert and Handelsman, 1999). هم‌چنین توانایی تولید اسپور که مقاومت بالایی به شرایط خشکی دارد، قابلیت این باکتری را به عنوان بهترین کاندیدا برای ساخت آفت‌کش‌های بیولوژیک افزایش داده است. به طور متوسط ۴-۵ درصد ژنوم *B. subtilis* برای سنتز آنتی‌بیوتیک اختصاص داشته و توانایی تولید ترکیبات ضد میکروبی متعدد با ساختارهای متفاوت را دارد (Stein, 2005). کیمورا و هیرانو (۱۹۸۸) نشان دادند جدایه *Bacillus subtilis* NK-330 از رشد قارچ و تولید آفلاتوکسین در شرایط آزمایشگاه ممانعت می‌کند. کاربرد *B. subtilis* روی ذرت ۴۸ ساعت قبل از آلودگی به *A. flavus* در شرایط مزرعه از آلوده شدن ذرت

دیگر حدود ۰/۱۸ گرم بر لیتر شد. این مقدار پس از تعیین منبع ازت مناسب یعنی شربت خیسانده ذرت و اضافه کردن به آن افزایش یافت و به ۰/۳۸ گرم بر لیتر رسید. اما بهینه‌سازی محیط کشت طراحی شده با استفاده از روش سطح پاسخ و اعمال نقاط بهینه در فرماتور نیمه صنعتی باعث شد تا مقدار تولید این باکتری به حدود ۰/۴۹۹ گرم بر لیتر برسد و این مقدار نزدیک‌ترین مقدار به مقدار پیش‌بینی شده توسط سطح پاسخ که حدود ۰/۵۵ گرم بر لیتر بود، می‌باشد. اما میزان تولید در شرایط بهینه در فرماتور آزمایشگاهی اگرچه بیشتر از حالت غیر بهینه بود، اما نسبت به فرماتور نیمه‌صنعتی کمتر بود.

بررسی خاصیت آنتاگونیستی باکتری در فرماتور آزمایشگاهی - نتایج به دست آمده نشان داد که باکتری UTB96 رشد یافته در محیط کشت غیربهینه، قادر است رشد بیمارگرهای *A. flavus* و *P. drechsleri* را به ترتیب به میزان ۷۸ و ۵۴ درصد کنترل نماید. این در حالی است که باکتری حاصل از محیط کشت بهینه توانست از رشد این دو قارچ به ترتیب به میزان ۴۹ و ۷۹ درصد جلوگیری نماید. البته قدرت آنتاگونیستی باکتری رشد یافته در محیط کشت بهینه نسبت به محیط غیربهینه تنها در مورد *P. drechsleri* به طور معنی‌داری (در سطح ۱ درصد) افزایش داشته است. در حالی‌که در جلوگیری از رشد قارچ *A. flavus* باکتری‌های رشد یافته در محیط کشت بهینه نسبت به حالت غیربهینه نه تنها افزایش نداشت، بلکه کاهش معنی‌داری (در سطح ۱ درصد) نیز یافته است.

بررسی خاصیت آنتاگونیستی باکتری در فرماتور نیمه‌صنعتی - نتایج به دست آمده نشان داد که باکتری UTB96 رشد یافته در محیط کشت غیربهینه، قادر است رشد بیمارگرهای *A. flavus* و *P. drechsleri* را به ترتیب به میزان ۵۰ و ۷۰ درصد کنترل نماید. این در حالی است که باکتری حاصل از محیط کشت بهینه توانست از رشد این دو، به ترتیب به میزان ۵۴ و ۷۸ درصد جلوگیری نماید. البته قدرت آنتاگونیستی باکتری رشد یافته در محیط کشت بهینه نسبت به محیط غیر بهینه تنها در مورد قارچ *P. drechsleri* به طور معنی‌داری (در سطح ۱٪) افزایش داشته است. در

محیط کشت اقتصادی استفاده شوند. با توجه به این که یک منبع کربن مناسب زمانی می تواند حمایت بالقوه خود را از رشد باکتری بالفعل نماید که منبع ازت مناسبی در کنار آن قرار گیرد. زمانی که یک غلظت ثابت ملاس نیشکر به تنهایی برای رشد باکتری استفاده می شود، عملکردی به مراتب کمتر از زمانی دارد که در تلفیق با یک منبع ازت تجاری مانند شربت خیسانده ذرت استفاده می شود. از طرف دیگر میزان تولید در یک منبع قندی تجاری مانند ملاس و یک منبع ازت تجاری مانند شربت خیسانده ذرت به مراتب کمتر از یک محیط با منبع کربن ملاس و منبع ازت قوی آزمایشگاهی مانند عصاره مخمر است. و این به دلیل ایده آل بودن منبع ازت موجود در محیط کشت است. البته در مقیاس تجاری استفاده از عصاره مخمر مقرون به صرفه نخواهد بود و هدف ما باید افزایش تولید در منابع غذایی ارزان قیمت و با صرفه اقتصادی باشد. در همین راستا ملاس نیشکر در غلظت ۱۰ گرم بر لیتر و شربت خیسانده ذرت در غلظت ۲ گرم بر لیتر به ترتیب به عنوان منابع کربن و ازت محیط کشت با میزان تولید زیست توده ۰/۳۸ گرم بر لیتر انتخاب شدند. با استفاده از یک استراتژی بهینه سازی ترتیبی، شرایط بهینه برای بیشترین تولید زیست توده باکتری شامل دمای ۳۰ درجه سلسیوس، pH برابر ۷ و نسبت کربن به ازت ۱:۲۳ بودند. حداکثر تولید قابل پیش بینی زیست توده در شرایط بهینه ۰/۵۵ گرم بر لیتر به دست آمد. در بررسی اهمیت فاکتورهای مختلف در تولید زیست توده مشاهده شد که pH و نسبت کربن به ازت محیط کشت بیشترین اثر را بر میزان تولید زیست توده باکتریایی دارند. و پس از آن دما و میزان تکان محیط، در جایگاه های بعدی قرار گرفتند. در مقایسه میزان اثر فاکتورهای محیطی بر میزان تولید زیست توده با استفاده از روش پلاکت بر من pH جزء مؤثرترین فاکتورها بود. این در حالیست که اسریکومار و همکاران (۲۰۱۰) نیز در بررسی خود pH را به عنوان مؤثرترین فاکتور در تولید زیست توده باکتری *Bacillus subtilis* SK09 معرفی کردند. در بررسی برهمکنش های بین فاکتورهای مؤثر در تولید زیست توده، اگر دما در حد بهینه که ۳۰ درجه سلسیوس می باشد، ثابت نگه داشته شود، حداکثر

به افلاتوکسین جلوگیری کرد (Cuero et al., 1991). طبق تحقیقات گوآن و همکاران (۲۰۰۸) باکتری های *Bacillus sp.* و *Stenotrophomonas maltophilia* به ترتیب با ۸۲ درصد و ۸۰ درصد کاهش کومارین در تجزیه کومارین و افلاتوکسین B1 نقش دارند. طبق تحقیقات صداقت تلگرد (۱۳۸۸)، سویه های BSP1، BSP4، BSP5 و BSP38 باکتری *B. subtilis* جداسازی شده از میوه پسته، تأثیر چشم گیری در کاهش میزان افلاتوکسین روی میوه پسته نشان دادند. خانافری و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که باکتری *Lactobacillus plantarum* از جوانه زنی اسپور قارچ *A. flavus* ممانعت کرده و باعث کاهش ۷۷ درصدی افلاتوکسین B1 موجود در ذرت شدند. پتانسیل خوب این باکتری در مهار زیستی قارچ و کاهش مقدار افلاتوکسین، امکان کاربرد تجاری آن را در جهت کاهش میزان آلودگی محصولات کشاورزی به افلاتوکسین و تامین امنیت غذایی فراهم می کند. برای قضاوت در خصوص قدرت آنتاگونیستی و پتانسیل مهارگری زیستی یک باکتری بایستی فاکتورهای زیادی را مورد ارزیابی قرار داد، مانند تولید آنتی بیوتیک های مختلف، آنزیم های مؤثر، قدرت کلنیزاسیون سطوح هدف، رقابت مؤثر، پایداری به شرایط و سایر فاکتورها، اما آنچه که در این پژوهش به عنوان یکی از فاکتورهای مؤثر در فرایند تولید و به ویژه تولید تجاری مد نظر قرار گرفت و ملاک ارزیابی ما در این پژوهش بود، میزان تولید زیست توده بود. یکی از فاکتورهای مهم در کارایی یک عامل مهارزیستی در محیط طبیعی اطراف ریشه یا فراریشه توانایی آن ها در مصرف منابع مختلف غذایی محیط پیرامونی آن هاست. در محیط های کشت تجاری نیز میکروارگانیسمی قابلیت تولید به صرفه را خواهد داشت که هیچ غذایی وسیع تری داشته باشد و آنزیم های لازم را برای هضم ترکیبات غذایی بیشتر را تولید نماید. باکتری *B. amyloliquefaciens* مورد استفاده در این پژوهش از این دیدگاه در جایگاه نسبتاً مطلوبی قرار داشت. این سویه دارای توانایی هضم آنزیمی ترکیبات غذایی تجاری حاوی پروتئین، لپید و نشاسته را داشت. لذا ترکیبات جانبی برخی صنایع مانند آب نشاسته، آب پنیر نیز می توانند در طراحی

فرمانتور آزمایشگاهی ۱۲ ساعت می‌باشد که حاکی از سرعت رشد بالاتر باکتری در فرمانتور نیمه‌صنعتی می‌باشد. این موضوع می‌تواند به دلیل سیستم هوادهی بسیار مناسب فرمانتور نیمه‌صنعتی نسبت به فرمانتور آزمایشگاهی باشد چراکه سیستم هوادهی در فرمانتور نیمه‌صنعتی به صورت ایرلیفت بوده و کارایی آن در تامین اکسیژن مورد نیاز باکتری بسیار بالاست.

نتایج این پژوهش نشان داد که غربالگری فاکتورهای مؤثر در رشد باکتری و بهینه‌سازی آن‌ها با استفاده از روش سطح پاسخ می‌تواند موجب ارتقاء عملکرد باکتری در فرمانتور شود. این ارتقاء هم در فرمانتور آزمایشگاهی و هم در فرمانتور نیمه‌صنعتی قابل مشاهده است. بهینه‌سازی فرایند تولید باکتری باعث شد تا میزان تولید زیست توده باکتری در فرمانتور آزمایشگاهی از ۰/۳۱ گرم بر لیتر در حالت غیربهینه به ۰/۴۴ گرم بر لیتر در حالت بهینه برسد. هم‌چنین میزان تولید زیست توده باکتری در فرمانتور نیمه‌صنعتی از ۰/۳۲ گرم بر لیتر در شرایط غیربهینه به ۰/۴۹۹ گرم بر لیتر در حالت بهینه برسد. این پژوهش هم‌چنین نشان دهنده این موضوع بود که توانایی سازگاری باکتری با محیط کشت طراحی شده در محیط کشت بهینه شده نسبت به حالت غیربهینه در فرمانتور نیمه‌صنعتی بهبود یافت. بدین ترتیب که فاز تاخیر باکتری در حالت غیربهینه ۲ ساعت اما در حالت بهینه یک ساعت به طول انجامید. در مورد فرمانتور آزمایشگاهی بهینه‌سازی در مدت زمان فاز تاخیر باکتری اثری نداشت، اما باعث افزایش سرعت رشد باکتری در فاز لگاریتمی باکتری شد. کاهش زمان فاز تاخیر و افزایش سرعت رشد باکتری در طول فرآیند تولید تجاری یک باکتری بیوکنترل یکی از راه‌های کاهش زمان تولید و هزینه‌های مرتبط با تولید مانند حامل‌های انرژی می‌باشد. کوستا و همکاران تلاش کردند تا با پیدا کردن منابع کربن و ازت از میان محصولات تجاری خام، ضمن حداقل نمودن هزینه‌ها، میزان زیست توده تولیدی توسط مخمر *P. agglomerans* را با حفظ اثر بیوکنترلی آن به حداکثر برسانند. در این پژوهش از محیط کشتی مرکب از منابع نیتروژنی مانند عصاره مخمر (۵ گرم بر لیتر) و مخمر آبجو

زیست توده، یعنی ۰/۵۵ گرم بر لیتر هنگامی به دست می‌آید که نسبت کربن به ازت از ۱۵ و ۳۰ به سمت ۲۳ میل کند و به موازات آن pH از ۷/۸ و ۶/۲ به سمت ۷ تغییر نماید. اما اگر pH در حد بهینه یعنی ۷ نگه داشته شود، در دمای ۲۹ درجه سلسیوس و نسبت کربن به ازت ۲۴ بیشترین زیست توده باکتری به میزان ۰/۵۲ گرم بر لیتر تولید می‌شود. با خروج از محدوده دمایی ۲۳ درجه و نسبت کربن به ازت ۱۸ تا ۲۸ میزان تولید زیست توده به تدریج کم شده و به کمترین میزان خود می‌رسد. از سوی دیگر هنگامی که نسبت کربن به ازت در نسبت بهینه یعنی ۲۳/۱ ثابت نگه داشته شود در دمای ۲۷ درجه سلسیوس و pH در حدود ۶/۹ میزان تولید زیست توده باکتری در حداکثر مقدار خود یعنی ۰/۵۵ گرم بر لیتر خواهد بود. با خروج pH از محدوده ۶/۷ تا ۷/۱ و دما از ۲۲ تا ۳۳، تولید زیست توده به تدریج کاهش می‌یابد و کمترین زیست توده باکتری در دمای بالاتر از ۳۸ و pH ۷/۵ به دست می‌آید. سوزا و همکاران (۲۰۱۴) بیان کردند که در محیط NYD تولید زیست توده پس از ۲۴ ساعت ۰/۷۴ گرم بر لیتر بوده و در صورت وجود منابع کربنی متفاوت مانند سوکروز، ملاس سویا و ملاس نیشکر به ترتیب ۳۹/۲ درصد، ۹۵/۹ درصد و ۳۱/۸ درصد افزایش پیدا می‌کند (Sousa et al., 2014). تولید بایومس یا زیست توده در محیط پایه در تحقیقات توان و هنگ (۲۰۱۴)، حدود ۲/۷ گرم بر لیتر در مدت ۲۰ ساعت و دمای ۳۷ درجه سلسیوس بود؛ در صورتیکه در محیط بهینه این میزان به ۳ گرم بر لیتر می‌رسد، در واقع حضور یون‌های کلسیم و منیزیم در محیط طراحی شده برای زنده‌مانی سلول‌های باکتریایی بسیار مهم هستند (Tuan and Houg, 2014). آزمایش‌ها برای بهینه‌سازی شرایط کشت و افزایش تولید زیست توده *B. subtilis* SK09 با استفاده از طرح پلاکت بر من موفقیت آمیز بود و pH، آمونیم سترات و پیتون بصورت معنی‌دار باعث افزایش محصول بیومس پروبیوتیک می‌شود (Sreekumar and Krishnan, 2010). نتایج نشان می‌دهد که میزان تولید زیست توده در هر دو محیط بهینه و غیربهینه در فرمانتور نیمه‌صنعتی بیشتر از فرمانتور آزمایشگاهی است. زمان رسیدن به حداکثر رشد در فرمانتور نیمه‌صنعتی ۸ و در



آنتاگونیستی باکتری رشد یافته در محیط کشت بهینه نسبت به محیط غیربهینه تنها در مورد *P. drechsleri* به طور معنی داری (در سطح ۱ درصد) افزایش داشته است. در حالی که در جلوگیری از رشد قارچ *A. flavus*، باکتری رشد یافته در دو محیط کشت بهینه و غیربهینه تفاوت معنی داری نشان ندادند. هم چنین بهینه سازی شرایط رشد در فرمانتور آزمایشگاهی، اثر بازدارندگی باکتری از رشد *P. drechsleri* را به میزان ۲۵ درصد افزایش داد. در حالی که در مورد *A. flavus* نه تنها باعث افزایش کارایی باکتری نشد بلکه آن را به میزان ۲۹ درصد کاهش داد. در پی مشاهده این نتایج دو نکته مهم مورد تاکید قرار می گیرد: اول این که افزایش تولید زیست توده یک باکتری در طول فرایند تولید لزوماً با افزایش قدرت آنتاگونیستی باکتری همراه نبوده و چه بسا ممکن است باعث کاهش کارایی باکتری نیز بشود. دلیل احتمالی این پدیده را می توان با تجمع موتانت های سریع الرشد باکتری در محیط کشت دانست. در نتیجه مطالعات و تحقیقات تکمیلی به منظور بهینه سازی این جدایه در شرایط مختلف پیشنهاد می شود.

گونه *Bacillus* این تحقیق شباهت هایی با گونه *B. velezensis* نشان می دهد که بررسی ملکولی آن در حال انجام است.

#### سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه تهران و شرکت فناوری زیستی طبیعت گرا (بایوران) انجام گرفته است.

خشک شده (۱۰ گرم بر لیتر) و کربوهیدرات های ارزان قیمت مانند سوکروز (۱۰ گرم بر لیتر) و ملاس (۲۰ گرم بر لیتر)، برای رشد مخمر با حفظ کارایی باکتری روی قارچ های *Penicillium digitatum* و *P. italicum* روی پرتقال استفاده شد (Costa et al., 2001). باکتری *Pseudomonas fluorescens* 2-79 یک عامل بیوکنترل علیه عامل بیماری پاخوره گندم (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) می باشد. اسلیننجر و همکاران (۱۹۹۵) با تنظیم pH، دما و منبع کربن محیط کشت مایع، میزان تولید آنتی بیوتیک فنازین را بهینه کردند. پراوین و همکاران (Praveen, 2008) با استفاده از این روش توانستند با تنظیم شرایط تغذیه ای، تولید آنتی بیوتیک actinomycin-D توسط *Streptomyces sindenensis* را بهینه نمایند. آگری و همکاران تجزیه فنول در سیستم بیچ توسط باکتری *Pseudomonas fluorescens* را با تنظیم متغیرهای فرایند با استفاده از این روش بهینه نمودند. فلاویا و همکاران محیط کشت را برای تولید آگزوپلی ساکارید توسط *Rhizobium* sp. با روش سطح پاسخ بهینه سازی نمودند.

باکتری UTB96 رشد یافته در فرمانتور نیمه صنعتی، قبل از بهینه سازی قادر است رشد بیمارگرهای *A. flavus* و *P. drechsleri* را به ترتیب به میزان ۵۰ درصد و ۷۰ درصد کنترل نماید. این در حالی است که باکتری حاصل از محیط کشت بهینه توانست از رشد این دو قارچ به ترتیب به میزان ۵۴ درصد و ۷۸ درصد جلوگیری کند. البته قدرت

#### References

- Abalos, A. 2002. Utilization of response surface methodology to optimize the culture media for the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. *Journal of Chemistry and Technical Biotechnology*, 77: 777-784.
- Afsharmanesh, H. & Ahmadzadeh, M. 2016. The Iturin lipopeptides as key compounds in antagonism of *Bacillus subtilis* UTB96 toward *Aspergillus flavus*. *Biological Control of Pest and Plant Diseases*, 5 (1): 79-95.
- Costa, E., Teixido, N., Usall, J., Atares, E. & Vinas, I. 2001. Production of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 using commercial products and by-products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56: 367-371.

- Cuero, R.G., Duffus, E., Osuji, G. & Pettit, R. 1991. Aflatoxin control in preharvest maize: effects of chitosan and two microbial agents. *Journal of Agriculture Science*, 117: 165-169.
- Chitarra, G.S., Breeuwer, P., Nout, M.J.R., van Aelst, A.C., Rombouts, F.M. & Abee, T. 2003. An antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* YM 10-20 inhibits germination of *Penicillium roqueforti* conidiospores. *Applied Microbiology*, 94: 159-166.
- Eaton, D.L. & Groopman, J.D. 1994. The toxicology of aflatoxins. Academic Press, New York, 383-424.
- Emmert, E.A.B. & Handelsman, J. 1999. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbial Letter*, 171 (1): 1-9.
- Fiddaman, P.J. & Rossal, S. 1993. The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. *Journal Applied Bacteriology*, 74: 119-126.
- Fravel, D.R. 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, 43: 337-359.
- Green, M.R. & Sambrook, J. 2012. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Guan, S., Ji, C., Zhou, T., Li, J., Ma, Q. & Niu, T. 2008. Aflatoxin B1 degradation by *Stenotrophomonas maltophilia* and other microbes selected using coumarin medium. *International Journal of Molecular Science*, 9: 1489-1503.
- Hagedorn, C., Could, W.D. & Bradinelli, R.T. 1989. Rhizobacteria of cotton and their repression of seedling disease pathogens. *Applied Environment Microbiology*, 55: 2793-2797.
- Khanafari, A., Soudi, H., Miraboufathi, M. & Karamei Osboo, R. 2007. An In vitro Investigation of Aflatoxin B1 Biological Control by *Lactobacillus plantarum*. *Plant Journal of Biological Science*, 4 (3): 163-68.
- Kimura, N. & Hirano, S. 1988. Inhibitory strains of *Bacillus subtilis* for growth and Aflatoxin- production of aflatoxigenic fungi. *Agriculture Biology and Chemistry*, 52 (5): 1173-1179.
- Kumar, P., Mahato, D.K., Kamle, M., Mohanta, T.K. & Kang, S.G. 2016. Aflatoxins: A Global Concern for Food Safety, Human Health and Their Management. *Frontiers in Microbiology*, 7: 2170.
- Lewis, J.A. 1991. Formulation and delivery systems of biocontrol agents with emphasis on fungi. In: Keister, D.L., Cregan, P.B. (eds): *The rhizosphere and plant growth*. Kluwer, Rotterdam, 279-287.
- Maurhofer, M., Keel, C., Haas, D. & Défago, G. 1995. Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO with enhanced antibiotic production. *Plant Pathology*, 44: 40-50.
- Ongena, M. & Jacques, P. 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16 (3): 115-125.
- Pestka, J.J. & Bondy, G.S. 1990. Alteration of immune function following dietary mycotoxin exposure. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 68 (7): 1009-1016.
- Praveen, V. 2008. Nutritional regulation of actinomycin-D production by a new isolate of *Streptomyces sindenensis* using statistical methods. *Index Journal of Expression Biology*, 46: 138-144.
- Reddy, K.R.N., Saritha, P., Reddy, C.S. & Muralidharan, K. 2009. Aflatoxin B1 producing potential of *Aspergillus flavus* strains isolated from stored rice grains. *African Journal of Biotechnology*, 8 (14): 3303-3308.

- Ramnani, P. 2005. Concomitant production and downstream processing of alkaline protease and biosurfactant from *Bacillus licheniformis* RG1: bioformulation as detergent additive. *Process Biochemistry*, 40: 3352-3359.
- Rodgers, P.B. 1989. Potential of biological control organisms as a source of antifungal compounds for agrochemical and pharmaceutical product development. *Pesticide Science*, 27: 155-164.
- Rodrigues, L. 2006. Response surface optimization of the medium components for production of biosurfactants by probiotic bacteria. *Process Biochemistry*, 41: 1-10.
- Schaad, N.W., Jonse, J.B., & Chun, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd edition, APS Press, St. Paul, Minn. Sen, R. & Swaminathan, T. 1997. Application of response-surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the enhanced production of surfactin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47: 358-363.
- Sedaghat Telgerd, N. 2009. Biological control assay of *Aspergillus flavus* in pistachio by strains of *A. flavus* without toxin and *Bacillus subtilis*. Master thesis. The college of agriculture and natural resource of Tehran University, 76.
- Shifa, H., Tasneem, Sh., Gopalakrishnan, C. & Velazhahan, R. 2016. Biological control of pre-harvest aflatoxin contamination in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) with *Bacillus subtilis* G1, *Arch. of Phytopathology and Plant Protection*, 49 (5-6): 137-148.
- Sousa, C., Klainer, B., Lima, K. & Pinto, G. 2014. Biomass production from *Bacillus* sp. RAB9 using several carbon sources. *BMC Proceedings*, 8(4): 172.
- Sreekumar, G. & Krishnan, S. 2010. Enhanced biomass production study on probiotic *Bacillus subtilis* SK09 by medium optimization using response surface methodology. *African Journal of Biotechnology*, 9 (45): 8078-8084.
- Stein, T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56: 845-857.
- Teniola, O.D., Addo, P.A., Brost, I.M., Farber, P., Jany, K.D., Alberts, J.F., Van Zyl, W.H., Steyn, P.S. & Holzapfel, W.H. 2005. Degradation of aflatoxin B1 by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoranthenorans* sp.nov. DSM 44556 (T). *International Journal of Food Microbiology*, 105: 111-117.
- Tuan, N.A. & Houg, N.T. 2014. Optimization of the fermentation medium to receive the highest biomass yield by *Bacillus subtilis* Natto and the initial test of Nattokinase yield. *IOSR Journal of Engineering invention*, 4 (12): 35-40.
- Wright, S.J. & Thompson, R.J. 1985. *Bacillus* volatiles antagonize cyanobacteria. *FEMS Microbial Letter*, 30: 263-267.
- Zhang, J. & Greasham, R. 1999. Chemically defined media for commercial fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51: 407-421.
- Zabriskie, D.W., Armiger, W.B., Phillips, D.H. & Albano, P.A. 1980. Traders' guide to fermentation medium formulation. Traders Protein, Memphis.

---

***Bacillus amyloliquefaciens* UTB96, an effective biocontrol and aflatoxin- degrading bacterium**Negar Bagheri<sup>1</sup>, Masoud Ahmadzadeh<sup>1</sup>, Soleiman Ghasemi<sup>2</sup>, Malihe Vahidinasab<sup>1</sup>, Shoukat Sadat Ghoreishi<sup>1</sup>

1. Department of Plant Protection, University of Tehran, Karaj, Iran

2. Head of R&amp;D Department, Nature Biotechnology Company (Biorun), Karaj, Iran

Corresponding author: Masoud Ahmadzadeh, ahmadz@ut.ac.ir

Received: Dec., 30, 2017

6(1) 1-17

Accepted: Jun., 30, 2018

---

**Abstract**

*Aspergillus flavus* grows on a wide range of agricultural and food products and causes contamination with aflatoxin. One of the suitable methods for controlling aflatoxin is the use of biological agents, which is possible by the application of effective bacterial antagonists. The objectives of the present study were to isolate and characterize a superior biocontrol agent against the above-mentioned fungus on pistachio, to develop an industrial culture medium and to optimize its growth conditions for enhancing maximum biomass production for *Bacillus amyloliquefaciens* UTB96. According to the results, this strain was capable of significant growth inhibition of *A. flavus* and reducing aflatoxin concentration in the pistachio up to 98.38%. Moreover, its VOCs showed growth inhibition as well. The most effective environmental factors were screened using the Bremenplacket design, in terms of their effects on the biomass production of the antagonistic bacterium and optimizing the production of bacterial biomass in culture medium designed using the screened factors. The results showed that sugarcane molasses and corn steep could be used as the industrial sources of carbon (C) and nitrogen (N) in production at 10 and 2 g/l respectively. Optimum conditions for maximum production of biomass in this culture medium included pH=7, 30°C and C/N ratio 1:23. Using the optimized culture medium and conditions in a semi-industrial method, the amount of biomass was reached up to 0.17 g/l, and the antagonistic effects increased by 8%. *Bacillus* species used in this work shows some similarities with *B. velezensis* that needs to be validated by further molecular analysis.

**Keywords:** aflatoxin, *Aspergillus flavus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, Bremenplacket, VOCs

---