معرفی باکتری *Bacillus amyloliquefaciens* UTB96 به‌عنوان یک عامل کنترل بیولوژیک مؤثر و تجزیه‌کننده آفلاتوکسین قارچی در شرایط آزمایشگاه

نگار باقری[۱]، مسعود احمدزاده[۱]، سلیمان قاسمی[۲]، ملیحه وحیدی نسب[۱]، شوکت السادات قرشی[۱]

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 دریافت: ۹۶/۱۰/۰۹ ۱۷-۱ (۱)۶ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۴/۰۹

چکیده

قارچ *Aspergillus flavus* می‌تواند روی طیف گسترده‌ای از محصولات کشاورزی و موادغذایی 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 تودهٔ 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 فرّار 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 تودهٔ باکتری آنتاگونیست، غربال شده و در نهایت بهینه‌سازی تولید زیست تودهٔ 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 درجهٔ 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 به‌اندازهٔ ۰/۱۷ گرم بر لیتر و میزان قدرت آنتاگونیستی افزایش پیدا کرد. گونهٔ *Bacillus* این تحقیق شباهت‌هایی با گونه *B. velezensis* نشان می‌دهد که بررسی ملکولی آن در حال انجام است.

واژه‌های کلیدی: آفلاتوکسین، پلاکت‌برمن، ترکیبات فرّار، *Aspergillus flavus*، *Bacillus amyloliquefaciens*

مقدمه

قارچ *Aspergillus flavus* روی گسترهٔ 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 (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 به‌استفراغ، 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).

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 میکروارگانیسم‌های مفید برای کنترل بیماری‌های گیاهی توسط شرکت‌های مختلفی در دنیا تولید و به‌صورت تجاری به‌دنیا عرضه شده‌اند. اما متأسفانه اطلاعات و داده‌های مربوط به نحوهٔ تولید این فرآورده‌ها و شرایط بهینه کمی و کیفی مربوط به‌فرایند 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 میکروارگانیسم‌های مورد استفاده در مهارزیستی که اثرات کنترلی آن روی رشد قارچ آسپرژیلوس و میزان آفلاتوکسین آن مورد بررسی قرارگرفته است، باکتری *Bacillus amyloliquefaciens* UTB96 می‌باشد که در مطالعات قبلی با نام *B. subtilis* UTB96 مورد بررسی قرارگرفته است (Afsharmanesh & Ahmadzadeh, 2016). لذا بایستی به‌شرایط تولید تجاری این‌گونه 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 فرآیند تولید تجاری از طریق بهینه‌سازی شرایط محیط کشت آن‌ها است. از میان ترکیبات ضد میکروبی، پتانسیل لیپوپپتیدهای حلقوی خانواده‌های سورفکتین، ایتورین و فنجایسین برای کاربردهای بیوتکنولوژی و داروسازی به‌خاطر خاصیت سورفکتانتی آن‌ها به‌خوبی شناخته شده است. تولید گروه‌های مختلف لیپوپپتیدها باعث برتری سویه‌های باسیلوس تولید کنندهٔ 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 به‌داشتن صرفه اقتصادی و در دسترس بودن اشاره کرد. در تولیدات با مقیاس بالا محیط کشت بایستی حداکثر تولید بایومَس یا زیست توده و کیفیت محصول را با حداقل هزینه فراهم نماید (Lewis, 1991). استفاده از ترکیبات تجاری یا جانبی صنایع غذایی و کشاورزی به‌عنوان منابع کربن و ازت به‌خاطر 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 فرآیندها چه از نوع فرایندهای شیمیایی و چه فرایندهای زیستی امری ضروری و مهم است. در یک فرایند زیستی مانند تولید ارگانیسم‌های زنده در محیط‌های کشت ایزوله مانند فرمانتورها، لازم است برخی فاکتورهای مؤثر مانند دما، pH، منابع غذایی مختلف، عناصر ریزمغذی، در راستای رسیدن به‌هدف 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 *Lactococcus lactis*، *Streptococcus thermophilus* (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 به‌ترتیب به‌عنوان منابع کربن و ازت مورد استفاده قرارگرفته است (Ramnani, 2005). این روش بهینه‌سازی به‌صنعت کمک می‌کند تا بهترین محیط کشت را

با بستر ارزان‌تر 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- نمونه‌برداری از میوه پسته به‌صورت تصادفی، از مناطق مختلف پسته‌کاری استان کرمان صورت گرفته و جداسازی باکتری انجام شد. سپس به‌منظور نگهداری کوتاه مدت در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس یخچال، باکتری به‌ویال‌های حاوی MgSo4 یک دهم مولار منتقل و برای نگهداری طولانی مدت به‌روش 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 سیترات، رشد غیرهوازی در محیط مایع گلوکز، آزمون حداقل و حداکثر دمای رشد در محیط غذایی مایع و هم‌چنین رنگ‌آمیزی اسپور به‌روش 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 به‌منظور ارزیابی DNA استخراج شده از روش الکتروفورز ژل آگارز یک درصد استفاده شد. سپس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر ناحیهٔ ژنی 16SrDNA با استفاده از آغازگرهای PAF (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') و (5'-PAR AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') به‌کمک دستگاه ترموسایکلر در ۳۸ چرخه با اندکی تغییرات انجام شد (ذکریا و همکاران ۲۰۱۰). قطعات حاصل از توالی 16S rDNA به‌منظور تعیین توالی به‌شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال شد. پس از دریافت نتیجه توالی نوکلئوتیدی نمونه‌ها توسط نرم‌افزار BioEdit اصلاح‌شد و سپس توالی به‌دست‌آمده 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 R5 *A. flavus*- 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 به‌مدت 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}به‌محل زخم هر پسته تزریق شد، ظروف پتری به‌مدت ۶ روز در انکوباتور نگهداری شدند پس از آن آفلاتوکسینB1 تولید شده طبق روش تنیولا 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 به‌فلاسک‌های ارلن ۱۰۰ میلی لیتری حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع PDB+LB اضافه شده و هم‌زمان یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون 10^{4}اسپور قارچ در میلی‌لیتر، تهیه و به‌هر فلاسک ارلن اضافه شد. پس از ۷ روز روی شیکر انکوباتور در دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس توده‌های میسیلیومی به‌کمک کاغذ صافی از محیط کشت جدا شده و در آون در دمای ۶۰ درجه سلسیوس خشک شدند. وزن خشک میسیلیوم محاسبه و آفلاتوکسین B1 تولید شده تعیین شد (تنیولا و همکاران، ۲۰۰۵).

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

تأثیر عصارهٔ برون سلولی باکتری در جلوگیری از رشد میسیلیومی قارچ در محیط جامد – سوسپانسون اسپور قارچ به میزان 10^5 در میلی‌لیتر به‌محیط کشت PDA پس از اتوکلاو اضافه شده و به‌ظروف پتری منتقل شد. سه چاهک درون هر ظرف پتری ایجاد و بلافاصله حدود ۲۰۰ میکرولیتر از عصارهٔ برون سلولی باکتری به‌هر چاهک اضافه شد. به‌منظور تهیه عصارهٔ برون سلولی باکتری، این سویه در محیط کشت مایع به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس در شیکرانکوباتور رشد کرده و سپس به‌مدت پانزده دقیقه در g ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شد و در مرحله آخر عصارهٔ بدون سلول‌های باکتری از فیلتر ۰/۲ عبور داده شد. میزان هاله پس از ۷۲ ساعت نگهداری در ۳۰ درجه سلسیوس اندازه‌گیری شد.

تأثیر متابولیت‌های خارج سلولی در جلوگیری از رشد قارچ - در محیط مایع غلظت‌های ۱۰، ۲۵ و ۵۰ درصد از عصارهٔ خارج سلولی در محیط کشت PDB تهیه و سوسپانسیون 10^4 اسپور قارچ به‌آن اضافه شد. پس از نگهداری به‌مدت ۷ روز در دمای ۳۰، میزان رشد قارچ با اندازه‌گیری وزن خشک توده میسیلیومی تولید شده تعیین شد. در روش اختلاط با محیط عصارهٔ برون سلولی با غلظت‌های ۱۰، ۲۵ و ۵۰ به‌محیط PDA اضافه و درون ظروف پتری ریخته شد. سپس سوسپانسیون اسپور در وسط هر تشتک قرارگرفت و میزان بازدارندگی از طریق اندازه-گیری قطر رشد محاسبه‌شد.

تأثیر عصارهٔ برون سلولی در جلوگیری از جوانه زنی اسپور - به‌روش چیتارا و همکاران (۲۰۰۳) انجام شد. غلظت‌های ۱۰، ۲۵ و ۵۰ از عصاره در یک میلی‌لیتر محیط PDB تهیه و سوسپانسیون 10^4 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 محاسبه‌شد.

تأثیر باکتری در کاهش میزان آفلاتوکسین محیط کشت - ۲۰۰ میکرولیتر از کشت ۱۸ ساعته باکتری در محیط مایع به ۵ میلی‌لیتر محیط مایع PDB حاوی ppm ۲، آفلاتوکسین B1 اضافه شد. پس از ۵ روز روی شیکر انکوباتور و دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس، میزان آفلاتوکسین به‌روش تنیولا و همکاران (۲۰۰۵) اندازه‌گیری شد.

استخراج ترکیبات ضدقارچی مؤثر در جلوگیری از رشد قارچ

استخراج لیپوپپتیدهای برون سلولی باکتری - عصارهٔ برون سلولی باکتری، پس از کشت ۷۲ ساعته باکتری تهیه و به‌روش ژنگ و همکاران (۲۰۰۷) انجام شد. در مرحلهٔ بعد حلال متانول به‌کمک دستگاه روتاری حذف و رسوب حاصل در ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار حل شد.

استخراج آفلاتوکسین از محیط کشت مایع - استخراج افلاتوکسین موجود در محیط کشت مایع با استفاده از حلال کلروفورم و براساس روش تنیولا و همکاران (۲۰۰۵) انجام شد. سپس افلاتوکسین خشک شده در یک میلی‌لیتر کلروفورم حل شد و پس برای اندازه‌گیری 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 به‌تنهایی بر میزان تولید باکتری

در این مرحله پتانسیل ترکیبات تجاری یا پسماند برخی صنایع مانند ملاس چغندرقند، ملاس نیشکر، نشاسته سیب‌زمینی و سرم شیر در حمایت از رشد باکتری به‌عنوان یک بستر رشد آماده بررسی شد. این ترکیبات به‌طور 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 عصارهٔ مخمر به‌عنوان منبع ازت با غلظت ۳ گرم بر لیتر به‌تمامی محیط‌ها اضافه وترکیبات خام در سه

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

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

Table1. 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 به‌همراه 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 درنظر گرفته شد و داده‌های آن برای آنالیز آماری به‌دست آمد.

جدول ۲- منابع مختلف ازت مورد استفاده به‌همراه 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
$(NH_4)_2SO_4$	0	2	0
$NH_4H_2PO_4$	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 خیسانده ذرت که به‌صورت مایع تهیه شده بود برای تعیین وزن خشک آن‌ها بایستی به‌صورت پودر خشک در آورده می‌شدند. این دو ترکیب که به‌ترتیب به‌عنوان منابع اصلی کربن و ازت در این پژوهش انتخاب شدند با استفاده از دستگاه لیوفیلیز به‌صورت پودر خشک در آورده شدند. این پودر برای محاسبه‌میزان 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 خیسانده ذرت برای آنالیز مورد استفاده قرارگرفت.

سنجش زیست توده باکتری - میزان تولید زیست تودهٔ باکتری به‌روش 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 تودهٔ سلولی باقی‌مانده در روی این ظروف پس از خشک شدن در دمای ۱۰۵ درجهٔ سلسیوس به‌مدت یک شب، با در دست داشتن وزن اولیه آن‌ها، توزین شدند. از سوی دیگر منحنی استاندارد مربوط به‌رابطهٔ بین زیست توده و میزان جذب نوری باکتری در طول موج ۶۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر به‌دست آمد. در مراحل مختلف آزمایش از این منحنی برای تبدیل جذب نوری باکتری به‌زیست تودهٔ تولیدی آن استفاده شد.

غربال (Screening) فاکتورهای محیطی مؤثر در رشد باکتری- برای انتخاب فاکتورهای اصلی و مؤثر از طرح آزمایشی ویژه غربال‌گری، یعنی طرح فاکتوریل خردشده با ۱۲ تیمار آزمایشی و با چهار نقطه مرکزی استفاده شد. برای متمایز نمودن فاکتورهای مؤثر و معنی‌دار از نمودار پارتو در سطح احتمال ۹۹ درصد استفاده شد. در این مرحله پنج فاکتور مورد بررسی و غربال قرار گرفتند، تا این‌که 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 به‌ازت، میزان تکان خوردن محیط و غلظت نمک

K_2HPO_4، بود. این فاکتورها در سه سطح و با استفاده از روش پلاکت بِرِمن مورد ارزیابی قرار گرفتند. نوع و میزان سطوح این فاکتورها در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۳- فاکتورهای محیطی مورد استفاده در مرحلهٔ غربال‌گری با روش پلاکت بِرِمن در سه سطح مختلف.

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

Independent variables	Domain use		
	-1	0	+1
Temeprature (°C)	25	30	35
pH	6	7	8
RPM	100	150	200
C/N	10	20	30
K_2HPO_4	0/5	1	1/5

جدول داده‌های مربوط به‌پلاکت برمن با استفاده از نرم افزار آماری مینی‌تب طراحی شد. براساس این طرح پنج فاکتور مذکور در ۱۶ ارلن اصلی و ۱۶ ارلن شاهد از نظر میزان تأثیرشان مورد مقایسه قرارگرفتند.

بهینه‌سازی 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 جمله‌ای درجه دوم یا روش رگرسیون چندگانه مطابق بود. مدل مکعبی انتخابی برای پیش بینی نقطه اپتیمم بیان شد. نرم‌افزار مینی‌تب برای آنالیزهای رگرسیون و رسم نمودارهای بهینه‌سازی مورد استفاده قرار گرفتند.

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

آزمون میزان تولید در فرمانتور آزمایشگاهی

آزمون میزان تولید در فرمانتور آزمایشگاهی قبل از بهینه‌سازی - محیط کشت به‌دست 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 برای جلوگیری از ایجاد کف در سطح محیط کشت و خطرات بعدی آن، از روغن کرچک به‌عنوان ضدکف استفاده شد. پس از تنظیم pH متر فرمانتور و با رعایت نکات ایمنی لازم در تنظیم تهویه محفظه‌های دستگاه، فرمانتور با دقت داخل اتوکلاو قرار گرفت. پس از نصب فرمانتور بر روی هیتر و برقراری اتصالات مختلف و تنظیم دمای محیط کشت، پیش‌کشت ۲۴ ساعته باکتری به‌نسبت پنج درصد در آن تلقیح شد. در مرحلهٔ غیربهینه، دما روی ۲۹ درجهٔ سلسیوس، pH روی ۷/۳ و همزن روی ۱۶۰ دور در دقیقه تنظیم شد.

آزمون میزان تولید در فرمانتور آزمایشگاهی پس از بهینه‌سازی- در این مرحله نقاط بهینه به‌دست آمده برای سه فاکتور دما، pH و نسبت کربن به‌ازت بر محیط فرمانتور اعمال شد. دمای بهینه اعمال شده در این مرحله ۳۰ درجهٔ سلسیوس، نسبت کربن به‌ازت ۱:۲۳ و pH بهینه حدود ۷ بود. سایر شرایط مانند ترکیبات معدنی شبیه محیط کشت قبل از بهینه‌سازی بود و روغن کرچک به‌عنوان یک ترکیب ضدکف در این مرحله نیز به‌میزان ۰/۴ گرم بر لیتر به‌محیط کشت اضافه شد.

آزمون میزان تولید در فرمانتور نیمه‌صنعتی

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

آزمون میزان تولید در فرمانتور نیمه‌صنعتی قبل از بهینه‌سازی- محیط کشت طراحی شده در فرمانتور نیمه‌صنعتی قبل از بهینه‌سازی، از فرمانتور air lift شرکت فناوری زیستی طبیعت‌گرا استفاده شد. برای این منظور ابتدا محیط کشت اصلی در حجم ۲ لیتر به‌صورت غلیظ تهیه شد

و پس از تنظیم pH، محیط کشت درون فلاسک تلقیح ریخته شد. فلاسک تلقیح اتوکلاو و سپس روی فرمانتور نیمه‌صنعتی نصب شد. مسیر ورود محیط کشت از فلاسک تلقیح به‌درون فرمانتور نیمه‌صنعتی قبل از این کار بوسیله بخار آب موجود در خط سترون شد. محیط کشت غلیظ سترون پس از ورود در فرمانتور نیمه‌صنعتی با ۴۰ لیتر آب سترون مخلوط شد و پس از تنظیم دما، محیط کشت آماده تلقیح با باکتری شد. لازم به‌ذکر است که برای جلوگیری از کف کردن محیط کشت درون فرمانتور از روغن مایع به‌عنوان یک ترکیب ضدکف استفاده شد.

آزمون میزان تولید در فرمانتور نیمه‌صنعتی پس از بهینه‌سازی- نقاط بهینه به‌دست آمده برای سه فاکتور دما، pH و نسبت کربن به‌ازت در محیط فرمانتور اعمال شد. دمای بهینه اعمال شده در این مرحله ۳۰ درجهٔ سلسیوس، نسبت کربن به‌ازت ۱:۲۳ و pH بهینه حدود ۷ بود. سایر شرایط مانند ترکیبات معدنی مانند محیط کشت قبل از بهینه‌سازی بود و روغن مایع به‌عنوان یک ترکیب ضدکف در این مرحله نیز به‌محیط کشت اضافه شد.

بررسی اثر محیط کشت و نوع فرمانتور 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 به‌دست آمده در مراحل مختلف آزمایش شامل قبل و پس از بهینه‌سازی محیط کشت و در دو فرمانتور نیمه‌صنعتی و آزمایشگاهی، به‌صورت لکه‌ای به‌فواصل مساوی از مرکز تشتک‌های پتری و به‌فاصله یک سانتی‌متری از حاشیه آن‌ها از چهار طرف تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت PDA مایه‌زنی شدند. سپس دیسکی به‌قطر ۵ میلی‌متر از حاشیه کشت چند روزه *P. drechsleri* در مرکز تشتک کشت داده شد. در مورد قارچ *A. flavus* به‌جای دیسک حاوی ریسه از سوسپانسیون اسپور این قارچ برای تلقیح استفاده شد. در تشتک پتری شاهد از آب مقطر استریل استفاده شد. این تشتک‌ها در دمای ۲۷ درجهٔ سلسیوس نگهداری و سپس میزان رشد پرگنه اندازه‌گیری شد.

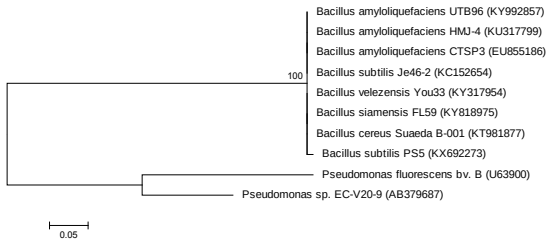
نتایج

خصوصیات مرفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی- این جدایه از نظر تولید اسپور، هیدرولیز کازئین، ژلاتین و نشاسته، مصرف سیترات، واکنش کاتالاز و تولید اسید از قندهای ال 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 لوان و اندول نمی‌کند. تولید اسید از لاکتوز می‌کند اما از اینولین اسید تولید نمی‌کند. این جدایه قادر است آنزیم لیپاز را به‌میزان قابل قبولی تولید و پروتئین شیر را تجزیه نماید. هم‌چنین قادر به‌تولید آنزیم آمیلاز و آنزیم مهم پروتئاز می‌باشد.

مطالعات فیلوژنتیکی و ترسیم درخت فیلوژنتیکی- مطالعات فیلوژنتیکی و آزمون‌های بیوشیمیایی انجام شده نشان داد که این استرین باکتری با احتمال ۹۹ درصد متعلق به‌گونه *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 توالی‌های مشابه‌در بانک ژن درخت فیلوژنتیکی با نرم افزار MEGA رسم شد.

شکل ۱- درخت فیلوژنتیکی مربوط به‌جدایه *B. amyloliquefaciens* UTB96.

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



تأثیر باکتری و ترکیبات فرّار در کاهش میزان آفلاتوکسین بر روی مغز پسته و جلوگیری از رشد و کاهش افلاتوکسین 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. هم‌چنین توانایی بالایی در جلوگیری از رشد قارچ و هم‌چنین کاهش میزان آفلاتوکسین تولید شده به‌میزان ۹۵/۹۹ درصد دارد. این s,di

به‌میزان ۸۷/۲۶ درصد کاهش میزان آفلاتوکسین نسبت به‌شاهد 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 عصارهٔ برون سلولی- این آزمون با بررسی هاله عدم رشد روی محیط کشت، مورد مطالعه قرار گرفت. این جدایه به‌میزان ۸ میلی‌متر 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 معنی‌دار در سطح یک درصد هستند. عصارهٔ برون سلولی این باکتری در غلظت ۵۰، ۸۰/۹۱ درصد قدرت بازداری از رشد میسیلیوم قارچ را داشته و باعث بازداری از جوانه زنی اسپور به‌میزان ۷۲ درصد شد. و در غلظت ۱۰ درصد به‌میزان ۵۴ درصد بازداری از جوانه زنی اسپور را داشت.

خاصیت ضد قارچی لیپوپپتیدهای برون سلولی به‌روش ایجاد چاهک- در بررسی هاله عدم رشد روی محیط کشت، این جدایه ایجاد هاله ۱۲ میلی‌متری کرد.

اثر محصولات جانبی برخی صنایع به‌تنهایی بر میزان تولید زیست توده باکتری- در این مرحله میزان رشد باکتری در محیط‌های کشت صنعتی به‌صورت خالص و در چند غلظت در سطح آماری ۱ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. طبق نتایج به‌دست 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 به‌میزان 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 ($P < 0.01$).

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 به‌همراه عصارهٔ مخمر بر میزان تولید زیست تودهٔ باکتری- نتایج به‌دست آمده در این مرحله نشان داد که ملاس نیشکر در ترکیب با ۳ گرم بر لیتر عصارهٔ مخمر به‌عنوان منبع ازت نسبت به‌سایر محیط‌های کشت تجاری دارای بیشترین تولید زیست تودهٔ باکتریایی بود. داده‌های به‌دست آمده (جدول ۵) در این مرحله نشان داد که این محیط به‌دلیل تأمین کامل منبع ازت مورد نیاز باکتری می‌تواند میزان رشد آن را به۰/۵۶ گرم بر لیتر برساند. لذا ملاس نیشکر به‌عنوان یک ترکیب کربن مناسب برای مرحله بعد انتخاب شد.

جدول ۵- مقایسه میزان تولید زیست تودهٔ باکتری (گرم بر لیتر) در پسماندهای صنعتی در غلظت‌های مختلف به‌همراه ۳ گرم بر لیتر عصارهٔ 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 به‌همراه یک منبع کربن بر میزان تولید زیست تودهٔ 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 خیسانده ذرت با تولید ۰/۳۸ گرم بر لیتر بیشترین اثر را بر تولید زیست تودهٔ باکتری در بین سایر ترکیبات ازت دارد. البته در این آزمایش عصارهٔ مخمر که یک منبع ازت معروف آزمایشگاهی به‌حساب

می‌آید به‌عنوان شاهد برای مقایسه استفاده شده بود که باکتری توانست در آن به‌میزان 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 آن‌ها، محیط کشت مناسب و پایه برای رشد این باکتری طراحی شد. در این محیط کشت ملاس نیشکر با غلظت ۱۰ گرم بر لیتر به‌عنوان منبع کربن و شربت خیسانده ذرت به‌عنوان 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 به‌محیط 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.

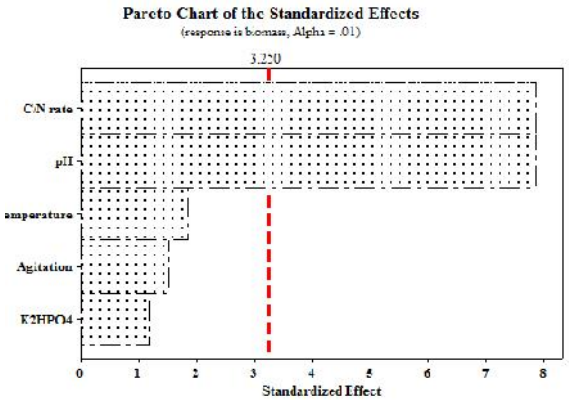
جدول۶- مقایسه میزان تولید زیست توده باکتری (گرم بر لیتر) در غلظت‌های مختلف منابع ازت به‌همراه ملاس نیشکر (۱۰ گرم بر لیتر) در سطح یک درصد.

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
$(NH_4)_2SO_4$		0.31cd	
NH4H2PO4		0.3cde	
Pepton		0.36b	
Yeast extract		0.51a	

نتایج آنالیز منابع کربن و ازت با دستگاه CHN ANALYZER- به‌منظور تعیین نسبت‌های مختلف کربن به‌ازت (C/N) منابع کربن و ازت انتخاب شده برای بررسی اثر آن‌ها 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 می‌باشد. هم‌چنین کربن و ازت به‌ترتیب ۳۳/۳۹ و ۶/۷۵ درصد از محتوای شربت خیسانده ذرت را تشکیل می‌داد.

غربالگری و بررسی اثر فاکتورها بر تولید زیست توده- اولین هدف از آزمایشات غربالگری، انتخاب فاکتورهای مهم و مؤثر از میان فاکتورهای مختلف می‌باشد. در این مطالعه یک طرح فاکتوریل خرد شده برای تشخیص میزان اثر پنج فاکتور مؤثر بر میزان تولید زیست توده باکتری در فلاسک‌های ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری مورد استفاده قرارگرفت. در بررسی اثر فاکتورها، داده‌های به‌دست آمده با یک مدل درجه اول قابل ارزیابی بود. برای انجام آنالیز از سطح احتمال ۹۹ درصد استفاده شد. پس از تجزیهٔ واریانس (ANOVA) مشخص شد که مدل درجه اول برای تولید زیست توده مناسب می‌باشد. جدول پارتو که به‌عنوان یک ابزار مفید در تشخیص مهم‌ترین اثرات می‌باشد، برای تعیین فاکتورهای معنی‌دار به‌کار برده شد. در این جدول طول هر ستون در نمودار پارتو استاندارد نشانگر ضریب رگرسیون فاکتور مورد نظر می‌باشد و نشان می‌دهد که نسبت کربن به‌ازت، pH، دما و میزان هم خوردن محیط کشت به‌ترتیب دارای اثرات مهم‌تری در تولید زیست توده هستند. بنابراین از بین این پنج فاکتور سه فاکتور دما، pH و نسبت کربن به‌ازت برای آزمایش‌های بهینه‌سازی انتخاب شدند. نسبت کربن به‌ازت 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 به‌غربالگری فاکتورهای مؤثر در تولید زیست توده باکتری.

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

اثرات متقابل بین فاکتورها- اثر متقابل نسبت کربن به‌ازت و pH- اگر دما در حد بهینه که ۳۰ درجهٔ سلسیوس می‌باشد، ثابت نگه داشته شود، حداکثر زیست توده، یعنی ۰/۵۵ گرم بر لیتر هنگامی به‌دست می‌آید که نسبت کربن به‌ازت از ۱۵ و ۳۰ به‌سمت ۲۳ میل کند و به‌موازات آن pH از ۷/۸ و ۶/۲ به‌سمت ۷ تغییر نماید.

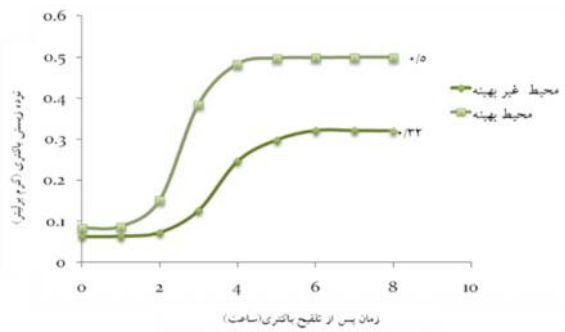
اثر متقابل نسبت کربن به‌ازت و دما- اگر pH در حد بهینه ۷ نگه داشته شود، در دمای ۲۹ درجهٔ سلسیوس و نسبت کربن به‌ازت ۱:۲۳ بیشترین زیست توده باکتری به‌میزان ۰/۵۲ گرم بر لیتر تولید می‌شود. با خروج از محدوده دمایی ۲۳ درجهٔ سلسیوس و نسبت کربن به‌ازت ۱۸ تا ۲۸ میزان تولید زیست تودهٔ سلولی به‌تدریج کم شده و به‌کمترین میزان خود می‌رسد.

اثر متقابل دما و pH - هنگامی که نسبت کربن به‌ازت در نسبت بهینه ۱:۲۳ ثابت نگه داشته شود در دمای ۲۷ درجهٔ 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 درجهٔ سلسیوس تولید زیست توده به‌تدریج کاهش می‌یابد و کمترین زیست تودهٔ باکتری در دمای بالاتر از ۳۸ و pH معادل ۷/۵ به‌دست می‌آید.

فرمانتور نیمه‌صنعتی

حداکثر زیست توده به‌دست آمده برای باکتری در فرمانتور نیمه‌صنعتی در محیط کشت بهینه و غیربهینه در این آزمایش پتانسیل رشد باکتری در محیط کشت بهینه نشده مورد آزمایش قرارگرفت. حداکثر میزان تولید زیست توده پس از ۸ ساعت رشد به‌حدود ۰/۳۲گرم بر لیتر رسید. اما پس از به‌دست آوردن نقاط بهینه فاکتورهایی مانند دما، pH و نسبت کربن به‌ازت در فلاسک‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری، این نقاط برای رسیدن به‌حداکثر زیست تودهٔ باکتری در فرمانتور نیمه‌صنعتی مورد آزمون قرار گرفت. با اعمال این نقاط میزان رشدی در حدود ۰/۴۹۹ گرم بر لیتر به‌دست آمد که با توجه به‌نتایج حاصل مشخص شد که میزان رشد باکتری در حالت بهینه شده نسبت به‌حالت قبلی بهبود یافته است (شکل ۳).

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



شکل ۳- منحنی رشد باکتری در فرمانتور نیمه‌صنعتی، پیش و پس از بهینه‌سازی.

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

روند افزایش تولید در طول طراحی و بهینه‌سازی محیط کشت- در طول طراحی محیط کشت یکی از اهداف، حداکثر نمودن تولید بود. این هدف مهم‌ترین فاکتور در مرحله بهینه‌سازی شرایط رشد بود. نتایج در سطح یک درصد معنی‌دار بوده و نشان داد که میزان تولید زیست توده باکتری از مرحله انتخاب منابع کربن و ازت مناسب روند روبه‌رشد را طی نموده و در نهایت در محیط کشت بهینه شده به‌حداکثر مقدار رسیده است. حداکثر مقدار تولید زیست توده در فرمانتور نیمه‌صنعتی به‌دست آمد که مقدار آن بسیار نزدیک به‌مقدار پیش‌بینی شده توسط روش سطح پاسخ بود. میزان تولید در ملاس نیشکر بدون هیچ افزودنی

دیگر حدود ۰/۱۸ گرم بر لیتر شد. این مقدار پس از تعیین منبع ازت مناسب یعنی شربت خیسانده ذرت و اضافه کردن به‌آن افزایش یافت و به۰/۳۸ گرم بر لیتر رسید. اما بهینه‌سازی محیط کشت طراحی شده با استفاده از روش سطح پاسخ و اعمال نقاط بهینه در فرمانتور نیمه صنعتی باعث شد تا مقدار تولید این باکتری به‌حدود ۰/۴۹۹گرم بر لیتر برسد و این مقدار نزدیک‌ترین مقدار به‌مقدار پیش‌بینی شده توسط سطح پاسخ که حدود ۰/۵۵ گرم برلیتر بود، می‌باشد. اما میزان تولید در شرایط بهینه در فرمانتور آزمایشگاهی اگرچه بیشتر از حالت غیر بهینه بود، اما نسبت به‌فرمانتور نیمه‌صنعتی کمتر بود.

بررسی خاصیت آنتاگونیستی باکتری در فرمانتور آزمایشگاهی- نتایج به‌دست آمده نشان داد که باکتری UTB96 رشد یافته در محیط کشت غیربهینه، قادر است رشد بیمارگرهای *A. flavus* و *P. drechsleri* را به‌ترتیب به‌میزان ۷۸ و ۵۴ درصد کنترل نماید. این در حالی است که باکتری حاصل از محیط کشت بهینه توانست از رشد این دو قارچ به‌ترتیب به‌میزان ۴۹ و ۷۹ درصد جلوگیری نماید. البته قدرت آنتاگونیستی باکتری رشد یافته در محیط کشت بهینه نسبت به‌محیط غیربهینه تنها در مورد *P. drechsleri* به‌طور 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 به‌حالت غیربهینه نه تنها افزایش نداشت، بلکه کاهش معنی‌داری (در سطح ۱ درصد) نیز یافته است.

بررسی خاصیت آنتاگونیستی باکتری در فرمانتور نیمه‌صنعتی- نتایج به‌دست آمده نشان داد که باکتری UTB96 رشد یافته در محیط کشت غیربهینه، قادر است رشد بیمارگرهای *A. flavus* و *P. drechsleri* را به‌ترتیب به‌میزان ۵۰ و ۷۰ درصد کنترل نماید. این درحالی است که باکتری حاصل از محیط کشت بهینه توانست از رشد این دو، به‌ترتیب به‌میزان ۵۴ و ۷۸ درصد جلوگیری نماید. البته قدرت آنتاگونیستی باکتری رشد یافته در محیط کشت بهینه نسبت به‌محیط غیر بهینه تنها در مورد قارچ *P. drechsleri* به‌طور معنی‌داری (در سطح ۱٪) افزایش داشته است. در 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 به‌شکل معنی‌داری کاهش می‌دهد به‌نحوی که به‌میزان ۹۸/۳۸ درصد مقدار آفلاتوکسین را در پسته‌های آلوده به‌قارچ و نسبت به‌شاهد کاهش داد. هم‌چنین قادر است به‌میزان قابل توجهی آفلاتوکسین موجود در محیط را تجزیه کند، زیرا توانست به‌میزان ۸۷/۲۶ درصد آفلاتوکسین B1 اضافه شده به‌محیط 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؛ Reddyl et al., 2009). تأثیر متابولیت‌های فرار باکتری *B. subtilis* در کاهش رشد سیانوباکتری ها توسط رایت و تامسون (۱۹۸۵) گزارش شده است. طبق تحقیقات ردی و همکاران (۲۰۰۹) عصارهٔ خارج سلولی باکتری *B. subtilis* به‌طور مؤثری از رشد قارچ *A. flavus* به‌میزان ۶۸ درصد و از تولید آفلاتوکسینB1 به‌میزان ۵۸ درصد ممانعت کرد. بیشتر اعضای جنس باسیلوس قادرند طیف وسیعی از مولکول های فعال بیولوژیکی با خاصیت بازدارندگی از رشد بیمارگرها را تولید کنند (Emmert and Handelsman, 1999). هم‌چنین توانایی تولید اسپور که مقاومت بالایی به‌شرایط خشکی دارد، قابلیت این باکتری را به‌عنوان بهترین کاندیدا برای ساخت آفت‌کش‌های بیولوژیک افزایش داده است. به‌طور متوسط ۵-۴ 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 افلاتوکسین 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

به‌افلاتوکسین جلوگیری کرد (Cuero *et al.*, 1991). طبق تحقیقات گوآن و همکاران (۲۰۰۸) باکتری‌های *Stenotrophomonas maltophilia* و *Bacillus* sp. به‌ترتیب با ۸۲ درصد و ۸۰ درصد کاهش کومارین در تجزیه کومارین و افلاتوکسین B1 نقش دارند. طبق تحقیقات صداقت تلگرد (۱۳۸۸)، سویه‌های BSP1، BSP4، BSP5 و BSP38 باکتری *B. subtilis* جداسازی شده از میوه پسته، تأثیر چشم‌گیری در کاهش میزان افلاتوکسین روی میوه پسته نشان دادند. خانافری و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که باکتری *Lactobacillus plantarum* از جوانه‌زنی اسپور قارچ *A. flavus* ممانعت کرده و باعث کاهش ۷۷ درصدی آفلاتوکسین B1 موجود در ذرت شدند. پتانسیل خوب این باکتری در مهار زیستی قارچ و کاهش مقدار آفلاتوکسین، امکان کاربرد تجاری آن را در جهت کاهش میزان آلودگی محصولات کشاورزی به‌آفلاتوکسین و تامین امنیت غذایی فراهم می‌کند. برای قضاوت در خصوص قدرت آنتاگونیستی و پتانسیل مهارگری زیستی یک باکتری بایستی فاکتورهای زیادی را مورد ارزیابی قرار داد، مانند تولید آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، آنزیم‌های مؤثر، قدرت کلنیزاسیون سطوح هدف، رقابت مؤثر، پایداری به‌شرایط و سایر فاکتورها، اما آن‌چه که در این پژوهش به‌عنوان یکی از فاکتورهای مؤثر در فرایند تولید و به‌ویژه تولید تجاری مد نظر قرارگرفت 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 آن‌ها در مصرف منابع مختلف غذایی محیط پیرامونی آن‌هاست. در محیط‌های کشت تجاری نیز میکروارگانیسمی قابلیت تولید به‌صرفه را خواهد داشت که نیچ غذایی وسیع‌تری داشته باشد و آنزیم‌های 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، لیپید و نشاسته را داشت. لذا ترکیبات جانبی برخی صنایع مانند آب نشاسته، آب پنیر نیز می‌توانند در طراحی محیط کشت اقتصادی استفاده شوند. با توجه به‌این‌که یک منبع کربن مناسب زمانی می‌تواند حمایت بالقوه خود را از رشد باکتری بالفعل نماید که منبع ازت مناسبی در کنار آن قرارگیرد. زمانی که یک غلظت ثابت ملاس نیشکر به‌تنهایی برای رشد باکتری استفاده می‌شود، عملکردی به‌مراتب کمتر از زمانی دارد که در تلفیق با یک منبع ازت تجاری مانند شربت خیسانده ذرت استفاده می‌شود. از طرف دیگر میزان تولید در یک منبع قندی تجاری مانند ملاس و یک منبع ازت تجاری مانند شربت خیسانده ذرت به‌مراتب کمتر از یک محیط با منبع کربن ملاس و منبع ازت قوی آزمایشگاهی مانند عصارهٔ مخمر است. و این به‌دلیل ایده‌آل بودن منبع ازت موجود در محیط کشت است. البته در مقیاس تجاری استفاده از عصارهٔ مخمر مقرون به‌صرفه 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 به‌ترتیب به‌عنوان منابع کربن و ازت محیط کشت با میزان تولید زیست تودهٔ ۰/۳۸ گرم بر لیتر انتخاب شدند. با استفاده از یک استراتژی بهینه‌سازی ترتیبی، شرایط بهینه برای بیشترین تولید زیست توده باکتری شامل دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس، pH برابر ۷ و نسبت کربن به‌ازت ۱:۲۳ بودند. حداکثر تولید قابل پیش‌بینی زیست توده در شرایط بهینه ۰/۵۵ گرم بر لیتر به‌دست آمد. در بررسی اهمیت فاکتورهای مختلف در تولید زیست توده مشاهده شد که pH و نسبت کربن به‌ازت محیط کشت بیشترین اثر را بر میزان تولید زیست توده باکتریایی دارند. و پس از آن‌ها دما و میزان تکان محیط، در جایگاه‌های بعدی قرار گرفتند. در مقایسه میزان اثر فاکتورهای محیطی بر میزان تولیدزیست توده با استفاده از روش پلاکت برمن pH جزء مؤثرترین فاکتورها بود. این در حالیست که اسریکومار و همکاران (۲۰۱۰) نیز در بررسی خود pH را به‌عنوان مؤثرترین فاکتور در تولید زیست توده باکتری *Bacillus subtilis* SK09، معرفی کردند. در بررسی برهمکنش‌های بین فاکتورهای مؤثر در تولید زیست توده، اگر دما در حد بهینه که ۳۰ درجهٔ سلسیوس می‌باشد، ثابت نگه داشته شود، حداکثر

زیست توده، یعنی ۰/۵۵ گرم بر لیتر هنگامی به‌دست می‌آید که نسبت کربن به‌ازت از ۱۵ و ۳۰ به‌سمت ۲۳ میل کند و به‌موازات آن pH از ۷/۸ و ۶/۲ به‌سمت ۷ تغییر نماید. اما اگر pH در حد بهینه یعنی ۷ نگه داشته شود، در دمای ۲۹ درجهٔ سلسیوس و نسبت کربن به‌ازت ۲۴ بیشترین زیست توده باکتری به‌میزان ۰/۵۲ گرم بر لیتر تولید می‌شود. با خروج از محدوده دمایی ۲۳ درجه و نسبت کربن به‌ازت ۱۸ تا ۲۸ میزان تولید زیست توده به‌تدریج کم شده و به‌کمترین میزان خود می‌رسد. از سوی دیگر هنگامی که نسبت کربن به‌ازت در نسبت بهینه یعنی ۲۳/۱ ثابت نگه داشته شود در دمای ۲۷ درجهٔ 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 به‌تدریج کاهش می‌یابد و کمترین زیست تودهٔ باکتری در دمای بالاتر از ۳۸ و pH ۷/۵ به‌دست 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 به‌ترتیب ۳۹/۲ درصد، ۹۵/۹ درصد و ۳۱۰/۸ درصد افزایش پیدا می‌کند (Sousa *et al.*, 2014). تولید بایومَس 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 درجهٔ سلسیوس بود؛ در صورتیکه در محیط بهینه این میزان به۳ گرم بر لیتر می‌رسد، در واقع حضور یون‌های کلسیم و منیزیم در محیط طراحی شده برای زنده‌مانی سلول‌های باکتریایی بسیار مهم هستند (Tuan and Houng, 2014). آزمایش‌ها برای بهینه سازی شرایط کشت و افزایش تولید زیست‌توده *B. subtilis* SK09 با استفاده از طرح پلاکت برمن موفقیت آمیز بود و pH، آمونیوم سیترات و پپتون بصورت معنی‌دار باعث افزایش محصول بیومس پروبیوتیک می‌شود (Sreekumar and Krishnan, 2010). نتایج نشان می‌دهد که میزان تولید زیست‌توده در هر دو محیط بهینه و غیربهینه در فرمانتور نیمه‌صنعتی بیشتر از فرمانتور آزمایشگاهی است. زمان رسیدن به‌حداکثر رشد در فرمانتور نیمه‌صنعتی ۸ و در فرمانتور آزمایشگاهی ۱۲ ساعت می‌باشد که حاکی از سرعت رشد بالاتر باکتری در فرمانتور نیمه‌صنعتی می‌باشد. این موضوع می‌تواند به‌دلیل سیستم هوادهی بسیار مناسب فرمانتور نیمه‌صنعتی نسبت به‌فرمانتور آزمایشگاهی باشد چراکه سیستم هوادهی در فرمانتور نیمه‌صنعتی به‌صورت 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 تودهٔ باکتری در فرمانتور آزمایشگاهی از ۰/۳۱ گرم بر لیتر در حالت غیربهینه به۰/۴۴ 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 به۰/۴۹۹ گرم بر لیتر در حالت بهینه برسد. این پژوهش هم‌چنین نشان دهندهٔ این موضوع بود که توانایی سازگاری باکتری با محیط کشت طراحی شده در محیط کشت بهینه شده نسبت به‌حالت غیربهینه در فرمانتور نیمه‌صنعتی بهبود یافت. بدین‌ترتیب که فاز تاخیر باکتری در حالت غیربهینه ۲ ساعت اما در حالت بهینه یک ساعت به‌طول 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 زیست‌تودهٔ تولیدی توسط مخمر *P. agglomerans* را با حفظ اثر بیوکنترلی آن به‌حداکثر برسانند. در این پژوهش از محیط کشتی مرکب از منابع نیتروژنی مانند عصارهٔ مخمر (۵ گرم بر لیتر) و مخمر آبجو

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

باکتری UTB96 رشد یافته در فرمانتور نیمه‌صنعتی، قبل از بهینه‌سازی قادر است رشد بیمارگرهای *A. flavus* و *P. drechsleri* را به‌ترتیب به‌میزان ۵۰ درصد و ۷۰ درصد کنترل نماید. این در حالی است که باکتری حاصل از محیط کشت بهینه توانست از رشد این دو قارچ به‌ترتیب به‌میزان ۵۴ درصد و ۷۸ درصد جلوگیری کند. البته قدرت آنتاگونیستی باکتری رشد یافته در محیط کشت بهینه نسبت به‌محیط غیربهینه تنها در مورد *P. drechsleri* به‌طور معنی‌داری (در سطح ۱ درصد) افزایش داشته است. درحالی‌که در جلوگیری از رشد قارچ *A. flavus*، باکتری رشد یافته در دو محیط کشت بهینه و غیربهینه تفاوت معنی‌داری نشان ندادند. هم‌چنین بهینه‌سازی شرایط رشد در فرمانتور آزمایشگاهی، اثر بازدارندگی باکتری از رشد *P. drechsleri* را به‌میزان ۲۵ درصد افزایش داد. در حالی‌که در مورد *A. flavus* نه تنها باعث افزایش کارایی باکتری نشد بلکه آن را به‌میزان ۲۹درصد کاهش داد. در پی مشاهده این نتایج دو نکته مهم مورد تاکید قرار می‌گیرد: اول این‌که افزایش تولید زیست تودهٔ یک باکتری در طول فرایند تولید لزوما با افزایش قدرت آنتاگونیستی باکتری همراه نبوده و چه بسا ممکن است باعث کاهش کارایی باکتری نیز بشود. دلیل احتمالی این پدیده را می‌توان با تجمع موتانت‌های سریع‌الرشد باکتری در محیط کشت دانست. در نتیجه مطالعات و تحقیقات تکمیلی به‌منظور بهینه‌سازی این جدایه در شرایط مختلف پیشنهاد می‌شود.

گونهٔ *Bacillus* این تحقیق شباهت‌هایی با گونه *B. velezensis* نشان می‌دهد که بررسی ملکولی آن در حال انجام است.

سپاسگزاری

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

References

Abalos, A. 2002. Utilization of response surface methodology to optimize the culture media for the producion 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., Teixdo, 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 Springer 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 microbs 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., Miraboulfathi, 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.

Reddyl, 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 bological 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 fluoranthenivorans* sp.nov. DSM 44556 (T). International Journal of Food Microbiology, 105: 111-117.

Tuan, N.A. & Houng, 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[1], Masoud Ahmadzadeh[1], Soleiman Ghasemi[2], Malihe Vahidinasab[1], Shoukat Sadat Ghoreshi[1]

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

2. Head of R&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