مقاله کوتاه علمی

بررسی اثر بیوسورفکتانت جدا شده از باکتری *Staphylococcus hominis* به عنوان آفت‌کش روی لارو سوسک قرمزآرد

نوشین فضائلی[۱]، نیما بهادر[۱]، شهرام حسامی[۲]

۱-گروه میکروبیولوژی ، دانشکده علوم، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

۲-گروه حشره شناسی، دانشکده کشاورزی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

مسئول مکاتبات: نیما بهادر، پست الکترونیک: bahador@iaushiraz.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۵/۰۲ ۷(۲) ۱۵۹–۱۶۴ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۸/۱۸

چکیده

بیوسورفکتانت‌ها مولکول‌های زیستی فعال سطحی هستند که توسط میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند و کاربردهای مختلفی دارند. در سال‌های اخیر به دلیل خصوصیات ویژه آن‌ها از قبیل اختصاصی بودن، سمیّت پایین و تهیه آسان، این مولکول‌های زیستی مورد توجه بسیار زیادی قرار گرفته‌اند. در این تحقیق تأثیر بیوسورفکتانت تولیدشده باکتری *Staphylococcus hominis* روی لارو سوسک قرمز آرد *Tribolium castaneum* مورد بررسی قرار گرفت. این آزمایش با سه تکرار و در غلظت‌های مختلف انجام شد و نتایج با نرم‌افزار SAS مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج میانگین درصد مرگ و میر نشان داد بیوسورفکتانت باکتری مذکور در غلظت ۱۰۰۰۰µg/g در نهمین روز تیمار با ۶۶/۶۷ درصد بالاترین اثر را روی مرگ و میر لارو داشته است. غلظت LD_{50} در روزهای پنجم، هفتم و نهم به‌ترتیب معادل ۶۳۹۵۷۵۸/۴۹، ۱۱۳۱۸۲۳/۶۰ و µg/g ۱۵۳۵۹/۴ محاسبه شد. نتایج نشان داد که بیوسورفکتانت تولیدشده توسط این باکتری توانایی قابل قبول در کنترل این آفت داشته است.

واژه‌های کلیدی: بیوسورفکتانت، آفت‌کش زیستی، سوسک آرد، *Staphylococcus hominis*

مقدمه

بیوسورفکتانت‌ها ترکیبات فعال سطحی دوگانه دوستی هستند که توسط میکروارگانیسم‌ها و گیاهان تولید می‌شوند و متعلق به دسته‌ای از ترکیبات شامل گلیکولیپیدها، گلیکولیپوپروتئین‌ها، گلیکوپپتیدها، لیپوپپتیدها، لیپوپروتئین‌ها، اسیدهای چرب، فسفولیپیدها، لیپیدهای طبیعی، لیپوپلی‌ساکاریدها (Banat *et al.*, 2010) و گلیکوگلیسرولیپیدها می‌باشند (Wicke *et al.*, 2000). بیوسورفکتانت‌ها مزایای متعددی نسبت به سورفکتانت‌های سنتزشده شیمیایی دارند مانند: تولید در محل از سوبستراهای قابل تجدید، سمیّت کمتر، تجزیه زیستی و سازگاری زیست‌محیطی (Marchant & Banat, 2012). مشکل عمده استفاده از آفت‌کش‌های شیمیایی اثراتی است که روی ارگانیسم‌های غیرهدف شامل انسان ها، حیوانات خانگی، حشرات مفید و حیات وحش دارد و پایداری آن ها در طبیعت اغلب طولانی است (Kosaric & Sukan, 2014). در میان ترکیبات ضد میکروبی و آفت‌کش‌های زیستی، بیوسورفکتانت‌ها به خاطر فعالیت ضد میکروبی علیه پاتوژن‌های انسانی و گیاهی شناخته شده‌اند (Renga Thavasi *et al.*, 2014). در تحقیق حاضر تأثیر بیوسورفکتانت باکتری *Staphylococcus hominis* Kloos & Schleifer که از جنس لیپوپپتید بود (Fazaeli *et al.* 2020) روی شپشه یا سوسک قرمز آرد (*Tribolium castaneum* Hbst.) مورد بررسی قرار گرفت. سوسک قرمز آرد از آفات مهم در صنعت کشاورزی می‌باشد و نسبت به حشره‌کش‌های متعدد مقاومت نشان داده است (Zhu *et al.*,

2016). این حشره یک آفت انباری محسوب شده که به دانه‌های ذخیره‌شده، آرد، محصولات غلات و محصولات دیگر حمله می‌کند (Brown *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2008) و باعث کاهش عملکرد آماری سالیانه می‌شوند. از این رو این حشره به عنوان آفت بسیار مخرب برای دانه‌های ذخیره‌ای به شمار می‌رود (Chen *et al.*, 2015). هدف از این تحقیق استفاده از این حشره به‌عنوان یک مدل مقاوم به سموم برای بررسی اثر این بیوسورفکتانت به‌عنوان آفت‌کش می‌باشد.

مواد و روش‌ها

سوسک قرمز آرد از آزمایشگاه حشره‌شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی شیراز تهیه گردید. نمونه‌ها طی حدود یک ماه در مکان تاریک و دمای بین ۲۸–۲۷ درجه سلسیوس گذاشته شد تا سوسک‌ها از آرد تغذیه کرده و تعداد لاروها افزایش یابد. سپس آزمایش تاثیر بیوسورفکتانت بر روی لارو سن سوم مورد ارزیابی قرار گرفت. برای استخراج بیوسورفکتانت از باکتری *S. hominis* جداسازی شده از پسماند پتروشیمی شیراز، کلنی تک باکتری در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت برین هارت اینفیوژن براث که به همراه یک میلی‌لیتر پارافین سترون غنی‌سازی شده بود کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده سپس بر اساس روش واتر و همکاران سوپرناتنت عاری از سلول روی (مقدار مساوی یخ) قرار داده شد تا به کمک اتانول رسوب به‌دست آید (Vater *et al.*, 2002). میزان رسوب به دست آمده ۰/۶ درصد بود که از آن برای آزمون‌های فعالیت آفت‌کشی مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور غلظت‌های مختلف بیوسورفکتانت استخراج شده از باکتری (۵۰، ۱۰۰،۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰، ۱۶۰۰، ۲۰۰۰، ۵۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ µg/g) که با آب مقطر سترون رقیق شده بود، تهیه گردید و تأثیر آن روی لاروهای سوسک آرد که همه هم سن و هم اندازه بودند بررسی گردید. تعداد ۱۰ عدد لارو سن سوم به ظرف پتری سترون که حاوی ۰/۵ گرم آرد گندم آغشته به بیوسورفکتانت بود منتقل گردید و در دمای ۲۸–۲۷ درجه سلسیوس نگهداری شد تا لاروها در معرض آرد گندم حاوی بیوسورفکتانت قرار گیرند. همچنین یک ظرف پتری حاوی ۱۰ عدد لارو به همراه آرد گندم بدون بیوسورفکتانت به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. تحقیق حاضر با استفاده از طرح آزمایشی فاکتوریل در قالب کاملا تصادفی با سه تکرار انجام و مرگ و میر در روزهای اول، سوم، پنجم، هفتم و نهم ثبت گردید (Mnif *et al.*, 2013). در صد تلفات اصلاح شده طبق فرمول آبوت محاسبه گردید.

$$\%\text{تلفات اصلاح شده} = \frac{\%\text{میرو مرگ در شاهد} - \%\text{مرگ و میر مشاهده شده}}{\%\text{میرو مرگ در شاهد} - ۱۰۰} \times ۱۰۰$$

نتایج در سطح احتمال یک درصد و با استفاده از نرم‌افزار SAS مورد آنالیز قرار گرفتند. برای بررسی میزان LD_{50} نمونه بیوسورفکتانت از نرم افزار Probit analysis– MSChart استفاده شد.

نتایج و بحث

در این تحقیق برای اولین بار اثرات حشره‌کشی بیوسورفکتانت استخراجی از *S. hominis* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مربوط به تجزیه واریانس و میانگین درصد مرگ و میر لارو به ترتیب در جدول‌های ۱ و ۲ آمده است. مقایسه اثر غلظت‌های مختلف بیوسورفکتانت *S. hominis* بر روی مرگ و میر لارو نشان داد که این بیوسورفکتانت در روز نهم با غلظت ۱۰۰۰۰ µg/g بالاترین اثر را در میزان کشندگی لاروها داشته است.

در بررسی نتایج توسط نرم‌افزار Probit Analysis–MSChart، غلظت LD_{50}، ۶۳۹۵۷۵۸/۴۹، ۱۱۳۱۸۲۳/۶۰ و ۱۵۳۵۹/۴ µg/g به ترتیب در روزهای پنجم، هفتم و نهم برآورد شد.

در تحقیق حاضر به بررسی اثر بیوسورفکتانت تولیدشده توسط *S. hominis* روی لارو سوسک قرمز آرد *T. castaneum* پرداخته شد. نتایج مرگ و میر به این صورت بود که بالاترین میانگین درصد مرگ و میر در غلظت ۱۰۰۰۰µg/g بیوسورفکتانت *S. hominis* در نهمین روز تیمار بوده است.

پس از مقایسه نتایج نسبت به میزان مرگ و میر در کنترل و همینطور آنالیز داده‌ها با نرم افزار SAS نتایج معنی‌داری به‌دست آمد. همچنین با مقایسه LD_{50} در روزهای مختلف می‌توان به این نتیجه رسید که بیوسورفکتانت به دلیل نحوه اعمال آن از طریق بلع توسط لارو و مکانیسم آن در بدن لارو به‌صورت سریع اثر نکرده و به تدریج در روزهای مختلف اثر آن را مشاهده می‌کنیم. Ahmed *et al.* (2012) نشان دادند آزمایش زیست‌سنجی بر روی کاغذ صافی آغشته به رامنولیپیدهای جداسازی شده از *Pseudomonas* sp. سویه ICTB–745 اثر حشره‌کشی بر روی *T. castaneum* نداشتند که احتمالا به‌دلیل وجود موم‌هایی است که در سطح کوتیکول سوسک وجود دارد و مانع نفوذ بیوسورفکتانت شده است (Ahmed *et al.*, 2012). در مطالعه دیگری بیوسورفکتانت رامنولیپیدی تولیدشده توسط *Pseudomonas aeruginosa* به طور بالقوه‌ای برای کنترل *Aedes aegypti* استفاده شده است (Silva *et al.*, 2015). همچنین دی–رامنولیپید تولیدشده توسط *P. fluorescens* بر علیه شفیره *A. aegypti* و *A. stephensi* فعال بود (Prabakaran *et al.*, 2015). باکتری‌های دیگری همچون *B. subtilis* A1 و *P. stutzeri* NA3 بیوسورفکتانت لیپوپپتیدی تولید می‌کنند که فعالیت لاروکشی و شفیره‌کشی بر علیه *A. stephensi* دارند.

کشندگی بیوسورفکتانت هر دو باکتری روی لارو و شفیره ناشی از کاهش کشش سطحی آب و به دنبال آن فقدان اکسیژن در زیر آب، جایی که لارو و شفیره وجود دارند، می‌شود و این شرایط منجر به مرگ آن ها می‌گردد. گزارش دیگری مبنی بر اثر حشره‌کش رامنولیپیدهای جدا شده از *Pseudomonas* EP–3 بر علیه شته سبز هلو *Myzus persicae* صورت گرفته است (Kim *et al.*, 2011). سوپرناتانت عاری از سلول EP–3 روی محیط حاوی نمک‌های معدنی وگلوکز در طول ۲۴ ساعت تیمار، باعث مرگ بیش از ۸۰ درصد از شته‌ها شده است.

رامنولیپیدهای استفاده شده در این تیمار فعالیت وابسته به دُز بر علیه شته‌ها داشتند به طوری که در غلظت ۴۰µg/ml و ۱۰۰µg/ml به ترتیب ۵۰ و ۱۰۰ درصد مرگ و میر نشان دادند.

آنالیز میکروسکوپی شته‌های تیمارشده با رامنولیپید نشان داد که مکانیسم حشره‌کشی، تخریب غشا کوتیکولی بود (Kim *et al.*, 2011). همچنین *B. subtilis* SPB1 که بیوسورفکتانت قدرتمندی تولید می‌کند می‌تواند لارو چهار گونه بال‌پولک‌دار مختلف (*Ephestia kuehniella Zeller*، *Prays olea Bernard*، *Spodoptera littoralis* و *Zeller Ectomyelois ceratoniae*) را از بین ببرد (Ghribi *et al.*, 2012).

مطالعه اثرات هیستوپاتولوژیکی بیوسورفکتانت *B. subtilis* SPB1 روی لارو *E. ceratoniae* نشان داد که این بیوامولسیفایر به قسمت میانی مجرای هاضمه حمله می‌کند و باعث تخریب سلول‌های اپیتلیال و نشت مواد به لومن می‌شود (Mnif *et al.*, 2013). در زمینه اثر حشره‌کشی بیوسورفکتانت مورد مطالعه در این تحقیق که اخیراً در ایران تعیین هویت شده‌اند (Fazaeli *et al.*, 2020) گزارشی وجود ندارد. نتایج این آزمایش نشان داد که بیوسورفکتانت تولیدشده توسط باکتری مورد مطالعه دارای توانایی قابل قبول در کنترل این آفت بوده است. این نتایج اولین تحقیق در ایران در مورد اثر بیوسورفکتانت های بدست آمده از پسماند پتروشیمی شیراز می باشد که اثر کشندگی آن ها روی حشرات را نشان می دهد. پیشنهاد می شود بررسی های تکمیلی جهت مطالعه اثرات هیستولوژیک آن نیز مورد بررسی قرار گیرد. به علاوه مطالعه اثر مواد اقزودنی وسینرژیست ها نیز می تواند در کاربرد و کارآیی آن مورد تحقیق قرار گیرد.

جدول ۱- تجزیه واریانس درصد مرگ و میر لارو سوسک *Tribolium castaneum* توسط بیوسورفکتانت استخراج شده از *Staphylococcus hominis* در روزهای مختلف پس از تیمار.

Table 1. Analysis of variance for mortality rate of *Tribolium castaneum* larvae by biosurfactant extracted from *Staphylococcus hominis* in different days after treatment.

S.O.V.	df	Mean Square	F-value	Pr > F
Day (A)	4	12015.67	83.06	<0.0001
Concentration (B)	9	387.33	2.68	0.0079
A × B	36	104.55	0.72	0.86
Error	100	144.67	-	-
CV (%)	-	16.14		

جدول ۲- میانگین درصد مرگ و میر (M±SE) لارو لارو سوسک *Tribolium castaneum* توسط بیوسورفکتانت استخراج شده از *Staphylococcus hominis*.

Table 2. Mean mortality rate (M±SE) of *Tribolium castaneum* larvae by biosurfactant extracted from *Staphylococcus hominis.*

Concentration (µg/g)	Mortality (%)				
	1st day	3rd day	5th day	7th day	9th day
50	6.67 ± 3.33 hi	13.33 ± 3.33 f-i	20.00 ± 5.77 d-i	40.00 ± 5.77 a-g	40.00 ± 5.77 a-g
100	6.67 ±3.33 hi	13.33 ± 3.33 f-i	20.00 ± 5.77 d-i	33.33 ± 3.33 b-i	40.00 ± 10.0 a-g
200	3.33 ± 3.33 i	6.67 ± 3.33 hi	13.33 ± 8.81 f-i	33.33 ± 14.5 b-i	50.00 ± 10.0 a-d
400	6.67 ± 3.33 hi	13.33 ± 6.67 f-i	13.33 ± 6.66 f-i	30.00 ± 11.5 c- i	56.67 ± 8.81 a-c
800	3.33 ± 3.33 i	10.00 ± 5.77 g-i	20.00 ± 5.77 d-i	30.00 ± 5.77 c-i	43.33 ± 3.33 a-f
1000	6.67 ± 3.33 hi	16.67 ± 3.33 e-i	36.67 ± 8.81 a-h	46.67 ± 3.33 a-e	56.67 ± 12.0 a-c
1600	3.33 ± 3.33 i	10.00 ± 5.77 g-i	23.33 ± 13.3 d-i	43.33 ± 8.81 a-f	63.33 ± 8.81 ab
2000	3.33 ± 3.33 i	6.67 ± 3.33 hi	16.67 ± 8.81 e-i	36.67 ± 12.0 a-h	63.33 ± 6.67 ab
5000	6.67 ± 3.33 hi	6.67 ± 3.33 hi	10.00 ± 5.77 g-i	33.33 ± 6.67 b-i	63.33 ± 12.0 ab
10000	13.33 ± 3.33 f-i	16.67 ± 3.33 e-i	30.00 ± 0.0 c-i	56.67 ± 3.33 a-c	66.67 ± 8.81 a

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون و ردیف تفاوت معنی‌داری از نظر آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد با یکدیگر ندارند.

The means with the same letters in each column and row do not have a significant difference in the Duncan test at 1% probability level.

References

Ahmed, K., Shaik, A.B., Kumar, G.C., Mongolla, P., Usha Rani, P., Krishna, K.V.S.R., Mamidyala, S.K. & Joseph, J. 2012. Metabolic profiling and biological activities of bioactive compounds produced by *Pseudomonas* sp. strain ICTB–745 isolated from Ladakh, India. Journal of Microbiology and Biotechnology, 22: 69–79.

Banat, I. M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M.G., Fracchia, L., Smyth, T.J. & Marchant, R. 2010. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. Applied Microbiology and Biotechnology, 87: 427–444.

Brown, S.J., Shippy, T.D., Miller, S., Bolognesi, R., Beeman, R.W., Lorenzen, M.D., Bucher, G., Wimmer, E.A. & Klingler, M. 2009. The red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera): a model for studies of development and pest biology. Cold Spring Harbor Protocols, pdb.emo126.

Chen, Z., Schlipalius, D., Opit, G., Subramanyam, B. & Phillips, T.W. 2015. Diagnostic molecular markers for phosphine resistance in US populations of *Tribolium castaneum* and *Rhyzopertha dominica*. PloS One, 10: e0121343.

Fazaeli, N., Bahador, N. & Hesami, Sh. 2020. Phylogenetic analysis and evaluation of bacterial biosurfactant gene isolated from Shiraz petrochemical wastes and their impact as pesticide. Ph.D. thesis. Department of microbiology. Islamic Azad University, Shiraz Branch.

Ghribi, D., Abdelkefi–Mesrati, L., Boukedi, H., Elleuch, M., Ellouze–Chaabouni, S. & Tounsi, S. 2012. The impact of the *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant on the midgut histology of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) and determination of its putative receptor. Journal of Invertebrate Pathology, 109: 183–186.

Kim, S.K., Kim, Y.C., Lee, S., Kim, J.C., Yun, M.Y. & Kim, I.S. 2011. Insecticidal activity of rhamnolipid isolated from *Pseudomonas* sp. EP–3 against green peach aphid (*Myzus persicae*). Journal of Agricultural and Food, 59: 934–8.

Kosaric, N. & Sukan, F.V. 2014. Biosurfactants: production and utilization–processes, technologies, and economics. Boca Raton: CRC Press, London.

Marchant, R. & Banat, I. M. 2012. Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants? Biotechnology Letters, 34: 1597–605.

Mnif, I., Elleuch, M., Chaabouni, S.E. & Ghribi, D. 2013. *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant: Production optimization and insecticidal activity against the carob moth *Ectomyelois ceratoniae*. Crop Protection, 50: 66–72.

Park, Y., Aikins, J., Wang, L.J., Beeman, R.W., Oppert, B., Lord, J.C., Brown, S.J., Lorenzen, M.D., Richards, S., Weinstock, G.M. & Gibbs, R.A. 2008. Analysis of transcriptome data in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 38: 380–6.

Prabakaran, G., Hoti, S.L., Rao, H.S. & Vijjapu, S. 2015. Di–rhamnolipid is a mosquito pupicidal metabolite from *Pseudomonas fluorescens*(VCRC B426). Acta Tropica, 148: 24–31.

Renga Thavasi, T., Marchant, R. & Banat, I. 2014. Biosurfactant applications in agriculture. In book: Biosurfactants, 313–326.

Silva, V.L., Lovaglio, R.B., Von Zuben, C.J. & Contiero, J. 2015. Rhamnolipids: solution against *Aedes aegypti*?. Frontiers in Microbiology, 6: 1–5.

Vater, J., Kablitz, B., Wilde, C., Franke, P., Mehta, N. & Cameotra, S.S. 2002. Matrix–assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C–1 isolated from petroleum sludge. Applied and Environmental Microbiology, 68: 6210–6219.

Wicke, C., Hüners, M., Wray, V., Nimtz, M., Bilitewski, U. & Lang, S. 2000. Production and structure elucidation of glycoglycerolipids from a marine sponge–associated *Microbacterium* species. Journal of Natural Products, 63: 621–626.

Zhu, C., Fang, G., Dionysiou, D.D., Liu, C., Gao, J., Qin, W. & Zhou, D. 2016. Efficient transformation of DDTs with persulfate activation by zero–valent iron nanoparticles: A mechanistic study. Journal of Hazardous Materials, 316: 232–41.

The effect of biosurfactant isolated from *Staphylococcus hominis* as a pesticide on red flour beetle larvae

Nooshin Fazaeli[1], Nima Bahador[1], Shahram Hesami[2]

1. Department of Microbiology, College of Science, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran
2. Department of Entomology, College of Agriculture, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran
Corresponding author: Nima Bahador: bahador@iaushiraz.ac.ir

Received: July, 23, 2020 7(2) 159-164 Accepted: Nov., 08, 2020

Abstract

Biosurfactants are surface active biomolecules that are produced by microorganisms and have diffetent applications. In recent years, these biological molecules have received much attention due to their special properties such as specificity, low toxicity and easy preparation. The effect of biosurfactant produced by *Staphylococcus hominis* on red flour beetle larvae (*Tribolium castaneum*) was investigated. This experiment was done with three replications by different concentrations, and the results were analysed by SAS software. The results of the mean mortality percentage showed that the mentioned bacterial biosurfactant at a concentration of 10000 µg/g on the ninth day of treatment with 66.67% had the highest effect on larval mortality. LD_{50} was evaluated as 6395758/49, 1131823.60 and 15359.4 µg/g on the fifth, seventh and ninth days, respectively. The results showed that the biosurfactant produced by *S. hominis* had an acceptable ability to control *T. castaneum*.

Keywords: biosurfactant, biopesticide, red flour beetle, *Staphylococcus hominis*