نشریه کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دوره۲، شماره ۲، پائیز و زمستان۱۳۹۲ (۱۶۰ -۱۴۹)

طراحی محیط کشت برای تولید نیمه‌صنعتی باکتری *Bacillus subtilis* UTB96

۱. سلیمان قاسمی؛ ۲. مسعود احمدزاده*؛ ۳. فرامرز خدائیان چگنی
۱. دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه تربیت مدرس و کارشناس بخش تحقیق و توسعهٔ شرکت فناوری زیستی طبیعت‌گرا
۲. استاد گروه گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
۳. استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت:۹۲/۱۲/۲۶- تاریخ تصویب: ۹۳/۵/۱۳)

چکیده

هدف از این پژوهش طراحی محیط کشت صنعتی برای به‌دست آوردن حداکثر تودهٔ زیستی باکتری *Bacillus subtilis* UTB96 بود. در اولین گام به‌منظور کاهش هزینه‌های تهیهٔ اجزای محیط کشت، ترکیبات تجاری یا پسماند صنایع مانند ملاس چغندرقند، ملاس نیشکر، پسآب سیب‌زمینی و سرم شیر به‌عنوان منابع کربن و شربت ذرت، به‌عنوان منبع ازت بررسی شدند. همچنین، بعضی از ترکیبات معدنی ازته مانند سولفات آمونیوم، اوره، کود گرانولهٔ اوره و دی‌هیدروژن‌آمونیوم فسفات، به‌طور مقایسه‌ای ارزیابی شدند. در ادامه با مشخص‌شدن اجزای محیط کشت طراحی‌شده، این محیط در دو فرمنتور آزمایشگاهی و نیمه‌صنعتی، از نظر میزان تولید تودهٔ زیستی و نیز قدرت آنتاگونیستی مقایسه شد. نتایج به‌دست‌آمده در گام اول نشان داد که شربت خیساندهٔ ذرت و ملاس نیشکر به‌ترتیب در غلظت‌های ۲ و ۱۰ گرم بر لیتر می‌توانند به‌عنوان منابع کربن و ازت صنعتی در تولید استفاده شوند. در نهایت، با قراردادن محیط کشت طراحی‌شده در فرمنتور نیمه‌صنعتی میزان تولید تودهٔ زیستی به اندازهٔ ۰/۳۲ گرم بر لیتر به‌دست آمد. باکتری رشدیافته در این فرمنتور، می‌توانست رشد بیمارگرهای *Aspergillus flavus* و *Phytophthora drechsleri* را در شرایط آزمایشگاهی به‌ترتیب به میزان ۵۰ و ۷۰ درصد کنترل کند؛ این در حالی است که میزان رشد باکتری UTB96 در فرمنتور آزمایشگاهی ۰/۳۱ گرم بر لیتر بود و باکتری رشدیافته در این شرایط می‌توانست رشد بیمارگرهای *A. flavus* و *P. drechsleri* را به‌ترتیب به میزان ۷۸ و ۵۴ درصد کنترل کند.

کلیدواژگان: بیوکنترل، تودهٔ زیستی، فرمانتاسیون، منابع کربن و منابع ازت.

مقدمه

در طی دو دههٔ گذشته استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک گیاهی، به‌عنوان روش نوینی برای کنترل بیماری‌های گیاهی مطرح شده است (Ahmadzadeh 2013). بعضی از این میکروارگانیسم‌ها توسط شرکت‌های مختلفی در دنیا تولید و به‌صورت تجاری به دنیا عرضه شده‌اند. متأسفانه، اطلاعات و داده‌های مربوط به نحوهٔ تولید این فراورده‌ها و شرایط بهینهٔ کمی و کیفی مربوط به فرآیند تولید آن‌ها کم است و بسیاری از شرکت‌های تجاری این اطلاعات را به‌صورت محرمانه برای خود حفظ کرده، در نتیجه این اطلاعات در دسترس دیگران قرار نمی‌گیرد. بنابراین، بحث بومی‌سازی تولید تجاری این‌گونه محصولات اهمیت زیادی پیدا می‌کند. قارچ *Aspergillus flavus* روی گسترهٔ وسیعی از محصولات کشاورزی و مواد غذایی رشد می‌کند و با تولید زهرابهٔ آفلاتوکسین[1] موجب آلودگی آن‌ها می‌شود. آفلاتوکسین‌ها سمی و سرطان‌زا هستند، مقدار آن‌ها در محصولات کشاورزی به‌دقت بررسی می‌شود و در بیشتر کشورها حد مجاز آن‌ها بین ۵ تا ۱۵ نانوگرم در گرم مشخص شده است. آفلاتوکسین‌ها گروه بزرگی از

تلفن: ۰۹۱۲۲۰۹۱۰۰
Email: ahmadz@ut.ac.ir
1. Aflatoxin

مایکوتوکسین‌ها هستند و از سمی‌ترین متابولیت‌های قارچی به‌حساب می‌آیند. این گروه از ترکیبات، آلاینده‌های خطرناکی برای غذای انسان و خوراک دام محسوب و موجب تضعیف سیستم ایمنی بدن و بروز تومور در انسان می‌شوند (Abbas 2005). پسته به‌عنوان محصولی استراتژیک، جایگاه خاصی در بین تولیدات کشاورزی ایران دارد. این محصول بخش عمده‌ای از صادرات غیرنفتی را تشکیل می‌دهد و در حال حاضر، صادرات پسته رتبهٔ نخست را در صادرات محصولات بخش کشاورزی به خود اختصاص داده است. آلودگی پسته به آفلاتوکسین، مهم‌ترین مشکل صادرات آن و یکی از معضلات ملی و منطقه‌ای این محصول با ارزش است.

یکی از میکروارگانیسم‌های بیوکنترل مؤثر که تأثیرات کنترلی آن بر رشد قارچ *Aspergillus flavus* و میزان آفلاتوکسین آن بررسی شده است، باکتری*Bacillus subtilis* UTB96 است. طراحی ساز و کارهای مناسب برای استفاده از این‌گونه میکروارگانیسم‌ها برای مقابله با این معضل ضروری به نظر می‌رسد، بنابراین، باید به شرایط تولید تجاری این‌گونه میکروارگانیسم‌ها و بهینه‌سازی تولید آن‌ها در حجم زیاد و فرمولاسیون مناسب آن‌ها توجه ویژه شود. قرشی در بررسی امکان کنترل بیولوژیک *A. flavus* روی پسته، مشاهده کرد که استرین UTB96 توانایی خوبی در کنترل قارچ آسپرژیلوس نسبت به جدایه‌های دیگر دارد. همچنین، این استرین بیشترین میزان پاک‌سازی آفلاتوکسین تولیدی این قارچ را به خود اختصاص داد. او نشان داد که کاربرد این استرین از باکتری *B. subtilis* می‌تواند ضمن کاهش رشد قارچ *A. flavus R5* مقدار آفلاتوکسین ردیابی‌شده را هم در محیط مایع و هم روی پسته کاهش دهد. به‌طوری که این جدایه ۹۸/۳۸ درصد مقدار آفلاتوکسین را در پسته‌های آلوده به قارچ و نسبت به شاهد کاهش داد. همچنین، استرین اخیر می‌تواند به میزان قابل توجهی، آفلاتوکسین موجود در محیط را تجزیه کند و ۸۷/۲۶ درصد میزان آفلاتوکسین B1 اضافه‌شده به محیط را کاهش دهد (Ghoreshi 2011). توانایی استرین‌های *B. subtilis* در جلوگیری از رشد *A. flavus* و کاهش آفلاتوکسین قبلاً نیز گزارش شده است (Cuero *et al.* 1991, Reddy *et al.* 2009, Farzaneh 2010). طبق تحقیقات صداقت تلگرد، استرین‌های BSP1 ، BSP4، BSP5 و BSP38 باکتری *B. subtilis*، جداسازی‌شده از میوهٔ پسته، تأثیر چشمگیری در کاهش میزان آفلاتوکسین روی میوهٔ پسته نشان دادند (Sedaghat Telgerd 2008). جدایهٔ *Bacillus subtilis* NK-330 از رشد قارچ و تولید آفلاتوکسین در شرایط آزمایشگاه ممانعت می‌کند (Kimura and Hirano 1988). کاربرد *B. subtilis* روی ذرت ۴۸ ساعت قبل از آلودگی به *A. flavus* در شرایط مزرعه از آلوده‌شدن ذرت به آفلاتوکسین جلوگیری کرد (Cuero *et al.* 1991). گزارش‌هایی از تأثیر *B. subtilis* در جلوگیری از رشد میسلیومی *A. flavus* وجود دارد (Narja and Moraty 1983).

طبق تحقیقات ردی و همکاران ترشحات مایع خارج سلولی باکتری *B. subtilis* به‌طور مؤثری از رشد قارچ *A. flavus* (۶۸ درصد) و تولید آفلاتوکسین B1 (۵۸ درصد) ممانعت کرد (Reddy *et al.* 2009). باکتری‌هایی از قبیل *Rhodococcus erythropolis ; Bacillus subtilis;* *Pseudomonas fluorescens*، *Mycobacterium fluoranthenivorans* (Hormisch *et al.* 2004) و همچنین، باکتری *Nocardia corynebacterioides* (D'Souza and Brackett 2001) در تجزیهٔ آفلاتوکسین B1 مؤثر هستند.

برای تولید عوامل کنترل بیولوژیک در مقیاس زیاد و صنعتی یکی از تمهیدات مهم و لازم، پیداکردن مواد خام اولیهٔ مناسب و طراحی محیط کشت تجاری به‌صرفه با استفاده از آن‌ها است. از مهم‌ترین ویژگی‌های این مواد می‌توان به صرفهٔ اقتصادی و در دسترس‌بودن اشاره کرد. در تولیدات با مقیاس صنعتی، محیط کشت باید بیشترین تولید تودهٔ زیستی و کیفیت محصول را با کمترین هزینه فراهم کند (Lewis 1991). استفاده از ترکیبات تجاری یا پسماند صنایع غذایی و کشاورزی به‌عنوان منابع کربن و ازت به دلیل ارزان‌بودن می‌تواند تا حدودی گره از مشکلات پیش روی تولید تجاری عوامل بیولوژیک باز کند (Zabriskie *et al.* 1980). اما با وجود این، منابع خام نامطلوب و عدم یکنواختی در محتویات این ترکیبات می‌تواند استفاده از این

محصولات را در فرآیندهای صنعتی محدود کند (Zhang and Greasham 1999). بنابراین، بهینه‌سازی این محیط‌ها برای استفاده در صنایع تخمیری امری اجتناب‌ناپذیر است.

هدف اصلی این پژوهش، طراحی یک محیط کشت صنعتی برای رشد بهتر باکتری *Bacillus subtilis* UTB96 با تأکید بر منابع کربن و ازت بود. این محیط کشت طراحی‌شده در فرمنتور آزمایشگاهی و نیمه‌صنعتی اعمال شده است و میزان اثرگذاری آن بر باکتری از نظر میزان تولید تودهٔ زیستی و نیز قدرت آنتاگونیستی علیه بیمارگرهای *A. flavus* و *P. drechsleri* بررسی می‌شود.

مواد و روش‌ها

نگه‌داری میکروارگانیسم‌ها

برای نگه‌داری باکتری *Bacillus subtilis* UTB96 یک میلی‌لیتر از محلول سولفات منیزیوم ۰/۱ مولار سترون، درون ویال‌های ۱/۵ میلی‌لیتری اتوکلاوشده، ریخته شد. مقداری از باکتری ۲۴ ساعته که روی محیط کشت NA رشد یافته بود، به درون ویال‌ها منتقل شد. در نهایت، این ویال‌ها در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس یخچال نگه‌داری شدند. جدایهٔ *A. flavus* R5 که توکسین‌زایی آن قبلاً اثبات شده بود، از کلکسیون قارچ‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تهران تهیه شد. جدایهٔ مذکور داخل ویال‌های حاوی محیط PDA و یا ماسهٔ سترون، در یخچال نگه‌داری شد. برای نگه‌داری کوتاه مدت *P. drechsleri* از روش نگه‌داری در آب مقطر سترون استفاده شد. برای این منظور چند حلقه از محیط PDA حاوی ریسه‌های *P. drechsleri* در درون آب مقطر سترون ریخته، در دمای ۴ درجهٔ یخچال نگه‌داری شد.

بررسی تولید برخی آنزیم‌ها توسط باکتری *B. subtilis* UTB96

آزمون هیدرولیز چربی (آزمون تولید لیپاز)

ابتدا، محیط کشت را که از ده گرم بر لیتر پپتون، پنج گرم بر لیتر کلرور سدیم، یک دهم گرم بر لیتر کلرور کلسیم و پانزده گرم بر لیتر آگار تشکیل شده است، تهیه و در دمای ۱۲۱ درجهٔ سلسیوس و فشار ۱/۳ بار به‌مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو سترون می‌کنیم. سپس، ده میلی‌لیتر توئین ۸۰ را جداگانه اتوکلاو می‌کنیم و به محیط در حال سردشدن می‌افزاییم و پس از اختلاط کامل، محیط را در تشتک پتری پخش می‌کنیم، باکتری را به‌صورت یک خط یا چند نقطه جدا از هم کشت و پس از چند روز عکس‌العمل را بررسی می‌کنیم. وجود هالهٔ رسوبی در اطراف محل رشد باکتری نشان‌دهندهٔ هیدرولیز توئین خواهد بود.

آزمون تجزیهٔ پروتئین شیر

لایهٔ نازکی از محیط نوترینت آگار را در تشتک پتری می‌ریزیم و پس از انجماد این لایه، محیط YNA را به همراه ۱۰ درصد شیر بدون چربی (پس‌چرخ) سترون، روی آن می‌ریزیم. محیط YNA از عصارهٔ مخمر (پنج گرم بر لیتر) و آگار (بیست و سه گرم بر لیتر) تشکیل شده است. برای ساخت این محیط کشت، مقدار صد میلی‌لیتر شیر بدون چربی را به‌مدت ۳۰ دقیقه در ۳ روز متوالی می‌جوشانیم تا سترون شود، سپس، آن را به محیط اتوکلاوشده YNA می‌افزاییم و روی تشتک‌های پتری دارای یک لایهٔ آگار غذایی می‌ریزیم. تشتک‌ها را حداقل یک روز در حرارت اتاق نگه می‌داریم تا آب سطحی آگار تبخیر شود. سپس، باکتری را به‌صورت نقطه‌ای یا خطی روی محیط کشت منتقل می‌کنیم و تا یک هفته، در انکوباتور با درجه حرارت ۲۷ درجهٔ سلسیوس نگه می‌داریم. باکتری‌هایی که توانایی تجزیهٔ پروتئین شیر را داشته باشند، در اطراف محل رشد خود هالهٔ شفافی ایجاد می‌کنند.

آزمون هیدرولیز نشاسته (آزمون آمیلاز)

ابتدا، محیط SA[1] را طبق جدول ۱ تهیه می‌کنیم. سپس، آن را در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجهٔ سلسیوس و فشار ۱/۳ بار به‌مدت ۱۵ دقیقه سترون می‌کنیم و محیط را درون تشتک‌های پتری می‌ریزیم و بعد از بسته‌شدن محیط، باکتری را به‌صورت خطی یا نقطه‌ای کشت می‌دهیم و به‌مدت سه روز در انکوباتور با درجه حرارت ۲۷ درجهٔ سلسیوس نگه می‌داریم تا رشد کند. بعد از گذشت سه روز، معرف لوگول (شامل یک گرم کریستال ید، دو گرم یدید پتاسیم و سیصد میلی‌لیتر آب

1. Starch Agar

مقطر) را روی تشتک‌های پتری حاوی باکتری کشت‌شده می‌ریزیم، وجود هالهٔ شفاف اطراف محیط کشت باکتری نشان‌دهندهٔ هیدرولیزشدن نشاسته توسط باکتری است.

جدول ۱. نوع و میزان اجزای استفاده‌شده در یک لیتر محیط SA

اجزای محیط کشت	میزان مصرف (گرم بر لیتر)
نیترات پتاسیم	۰/۵
پتاسیم‌دی‌هیدروژن‌فسفات	۱
سولفات منیزیم	۰/۲
کلرید کلسیم	۰/۱
کلرید آهن	تریس
نشاستهٔ سیب‌زمینی	۱۰
آگار	۱۵

آزمون هیدرولیز پروتئین (آزمون پروتئاز)

به‌منظور بررسی تولید آنزیم پروتئاز توسط باکتری از محیط SMA[1] مطابق روش مارهوفر و همکاران (Maurhofer *et al*.1995) با اندکی تغییر استفاده شد. این محیط کشت از ۱۵ گرم پودر شیر، ۰/۵ گرم عصارهٔ مخمر و ۱۳/۹ گرم آگار در حجم یک لیتر آب مقطر تشکیل شده است. ابتدا، عصارهٔ مخمر و آگار را به آب مقطر می‌افزاییم و سپس، این محیط را درون بن‌ماری در دمای ۷۰ درجهٔ سلسیوس قرار می‌دهیم. سپس، پودر شیر را به‌تدریج به محیط می‌افزاییم و سپس، درون اتوکلاو سترون می‌کنیم. باکتری به‌صورت نقطه‌ای در تشتک‌های پتری حاوی محیط SMA کشت و در دمای ۲۷ درجهٔ سلسیوس به‌مدت ۴۸ ساعت نگه‌داری می‌شوند. تشکیل هالهٔ بیرنگ در اطراف کلونی باکتری نشانهٔ فعالیت پروتئاز است.

تهیه و آماده‌کردن منابع کربن و ازت

ملاس چغندرقند و ملاس نیشکر از منابع کربن تجاری هستند که در صنایع تخمیری به فراوانی استفاده می‌شوند. این مواد به‌ترتیب از شرکت فناوری زیستی طبیعت‌گرا و کارخانهٔ قند کرج دریافت شدند. به دلیل وجود اجسام خارجی و مواد نامحلول موجود در این ترکیبات، باید قبل از استفاده، آماده شوند. ابتدا، برای آماده‌سازی این منابع قندی برای آزمایش‌ها محلول رقیق‌تری از آن‌ها تهیه و سپس، با سانتریفیوژکردن آن‌ها در ۵ هزار دور در دقیقه، ذرات رسوبی و نامحلول آن‌ها جدا شد. شربت خیساندهٔ ذرت از محصولات جانبی کارخانجات استحصال نشاسته و روغن و نیز تهیهٔ آرد از ذرت است. ترکیب مورد استفاده در این پژوهش محصول شرکت گلوکوزان بود که از شرکت فناوری زیستی طبیعت‌گرا تهیه شد. سرم شیر یا آب‌پنیر الترافیلترشده از شرکت تولید لبنیات میهن واقع در اسلامشهر تهیه شد.

غربال منابع کربن و ازت

مایه‌زنی محیط کشت با باکتری *B. subtilis* UTB96

برای مایه‌زنی محیط کشت از باکتری نگه‌داری‌شده در $MgSO_4$ استفاده شد. باکتری از این محیط روی محیط کشت آگار مغذی[2] کشت شد. پس از ۲۴ ساعت، یک لوپ از باکتری رشدیافته در این محیط کشت به محیط کشت مایع NB با حجم ۵۰ سی‌سی منتقل شد. پس از ۲۴ ساعت، ۵۰۰ میکرولیتر (نسبت تلقیح ۱ درصد) از محیط فوق به ارلن‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ سی‌سی محیط کشت طراحی‌شده، اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت، سنجش میزان تولید تودهٔ زیستی باکتری انجام شد.

مقایسهٔ اثر پسماند برخی صنایع به تنهایی بر میزان تولید باکتری *B. subtilis* UTB96

در این مرحله پتانسیل برخی ترکیبات تجاری یا پسماند صنایع شامل ملاس چغندرقند، ملاس نیشکر، پسآب سیب‌زمینی و سرم شیر در حمایت از رشد باکتری به‌عنوان یک بستر رشد آماده بررسی شد. در این مرحله این ترکیبات به‌طور جداگانه بدون اضافه‌کردن هیچ ترکیبی برای رشد باکتری استفاده شدند. این ترکیبات به میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر درون ارلن‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری ریخته شدند و پس از تنظیم pH آن‌ها روی ۷، با استفاده از محلول سود یک نرمال (NaOH) و سترون‌کردن، در داخل شیکر انکوباتور با دور ۱۶۰ و دمای ۲۹ درجهٔ سلسیوس قرار داده شدند. ترکیبات خام

1. Skim Milk Agar

2. Nutrient Agar

استفاده‌شده در این مرحله در سه غلظت متفاوت برای رشد باکتری فراهم شدند (جدول ۲). برای هر کدام از ترکیبات سه تکرار در نظر گرفته شد.

جدول ۲. منابع کربن خام مورد استفاده برای رشد باکتری *B. subtilis* UTB96 و غلظت‌های مختلف آن‌ها

منابع کربن	سطوح غلظتی مختلف		
ملاس چغندرقند (گرم بر لیتر)	۱۰	۲۰	۴۰
ملاس نیشکر (گرم بر لیتر)	۱۰	۲۰	۴۰
آب نشاستهٔ سیب‌زمینی (درصد حجمی ـ حجمی)	۲۵	۵۰	۷۵
سرم شیر (درصد)	۱۰۰	۲۰۰	۳۰۰

مقایسهٔ اثر منابع کربن مختلف به همراه عصارهٔ مخمر بر میزان تولید باکتری *B. subtilis* UTB96

در این آزمایش اثر پسماند برخی صنایع، مانند ملاس چغندرقند، ملاس نیشکر، پسآب سیب‌زمینی و سرم شیر در حمایت از رشد باکتری به‌همراه عصارهٔ مخمر به‌عنوان منبع ازت بررسی شد. عصارهٔ مخمر با غلظت سه گرم بر لیتر به تمامی محیط‌ها اضافه شد. این محیط‌ها به میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر درون ارلن‌های ۵۰۰ میلی‌لیتر ریخته شدند و پس از تنظیم pH آن‌ها روی ۷ و سترون‌کردن در داخل شیکر انکوباتور با دور ۱۶۰ و دمای ۲۹ درجهٔ سلسیوس قرار داده شدند. در این مرحله نیز ترکیبات خام در سه غلظت متفاوت برای رشد باکتری فراهم شدند (جدول ۲). برای هر کدام از ترکیبات سه تکرار در نظر گرفته شد.

مقایسهٔ اثر منابع مختلف ازت آلی و معدنی به همراه یک منبع کربن بر میزان تولید باکتری *B. subtilis* UTB96

پس از انتخاب منبع کربنی مناسب در مرحلهٔ قبل، این منبع در تلفیق با چندین منبع ازت برای رشد باکتری استفاده شد. در این مرحله، ملاس نیشکر در غلظت ده گرم بر لیتر با غلظت‌های مختلف منابع ازت شربت خیساندهٔ ذرت، اوره خالص، کود گرانولهٔ اوره، سولفات آمونیوم، دی‌هیدروژن‌آمونیوم فسفات ترکیب و رشد باکتری در آن‌ها بررسی شد. عصارهٔ مخمر و پپتون نیز به‌عنوان منابع ازتی مرسوم به‌صورت مقایسه‌ای در این مرحله استفاده شدند. شربت خیساندهٔ ذرت، اوره خالص و کود گرانولهٔ اوره در سه غلظت و بقیهٔ منابع ازتی در یک غلظت استفاده شدند (جدول ۳). این محیط‌ها به میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر درون ارلن‌های ۵۰۰ میلی‌لیتر ریخته شدند و پس از تنظیم pH آن‌ها روی ۷ و سترون‌کردن در داخل شیکر انکوباتور با دور ۱۶۰ و دمای ۲۹ درجهٔ سلسیوس قرار داده شدند. برای هر کدام از ترکیبات سه تکرار در نظر گرفته شد.

جدول ۳. منابع مختلف ازت مورد استفاده به همراه یک منبع کربن ثابت برای رشد باکتری *B.subtilis* UTB96 و غلظت‌های مختلف آن‌ها

منابع ازت	سطوح غلظتی مختلف (گرم بر لیتر)		
	۱	۲	۳
شربت خیساندهٔ ذرت	۲	۴	۸
اوره خالص	۰/۵	۱/۵	۳
کود گرانولهٔ اوره	۱/۳	۲/۶	۵/۲
سولفات آمونیوم			۲
دی‌هیدروژن‌آمونیوم فسفات			۲
پپتون		۲	
عصارهٔ مخمر			۳

سنجش میزان تودهٔ زیستی باکتری

در این روش میزان تولید تودهٔ زیستی[1] باکتری به روش وایت (White 1954) با تغییراتی سنجش شد. 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. سپس، این سوسپانسیون‌ها با حجم یکسان در داخل ظروف آلومنیومی ریخته شدند و وزن آن‌ها سنجش و یادداشت شد. تودهٔ سلولی باقی‌مانده در روی این ظروف پس از خشک‌شدن در دمای ۱۰۵ درجهٔ سلسیوس به‌مدت یک شب، با در دست داشتن وزن اولیهٔ آن‌ها، توزین شدند. از سوی دیگر منحنی استاندارد مربوط به رابطهٔ بین تودهٔ زیستی و میزان جذب نوری باکتری در طول موج ۶۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر[2] به‌دست آمد. در مراحل مختلف آزمایش از این منحنی برای تبدیل جذب نوری باکتری به تودهٔ زیستی تولیدی آن استفاده شد.

آزمون میزان تولید *B. subtilis* UTB96 در فرمنتور نیمه‌صنعتی[3]

مایه‌زنی محیط کشت فرمنتور نیمه‌صنعتی با باکتری *B. subtilis* UTB96

برای مایه‌زنی فرمنتور از پیش‌کشت ۲۴ ساعته باکتری استفاده شد. ابتدا، یک لوپ از باکتری کشت‌شده در

1. Biomass
2. T70+UV/VIS Spectrometer, PG Instrument Ltd
3. Tabiat gara co. ALF-201

تشتک پتری حاوی محیط NA، به فلاسک ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط غذایی مایع NB منتقل شد و پس از ۲۴ ساعت به میزان ۱ درصد در ۲۴۰۰ سی‌سی محیط کشت NB به‌عنوان پیش‌کشت، تلقیح شد. پیش‌کشت باکتری در شرایط سترون زیر هود داخل فلاسک تلقیح ریخته (از قبل سترون شده بود.) و سپس، روی فرمنتور نیمه‌صنعتی نصب شد. در این مرحله محیط پیش‌کشت، پس از سترون‌شدن مسیر ورود به داخل فرمنتور، اجازه داده شد که در آن تلقیح شود. دمای محیط کشت داخل فرمنتور روی ۲۹ درجهٔ سلسیوس تنظیم شد. pH محیط روی ۷ تنظیم شد. میزان تولید تودهٔ زیستی پس از ۸ ساعت سنجش شد.

میزان تولید تودهٔ زیستی باکتری *B. subtilis* UTB96 در فرمنتور نیمه‌صنعتی

برای آزمون محیط کشت طراحی‌شده در فرمنتور نیمه‌صنعتی، از فرمنتور شرکت فناوری زیستی طبیعت‌گرا استفاده شد. برای این منظور ابتدا، محیط کشت اصلی در حجم دو لیتر به‌صورت غلیظ تهیه و پس از تنظیم pH محیط کشت درون فلاسک تلقیح ریخته شد. ابتدا، فلاسک تلقیح با استفاده از اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجهٔ سلسیوس و فشار ۱/۵ اتمسفر سترون و سپس، روی فرمنتور نیمه‌صنعتی نصب شد. مسیر ورود محیط کشت از فلاسک تلقیح به درون فرمنتور نیمه‌صنعتی قبل از این کار با بخار آب موجود در خط، سترون شد. محیط کشت غلیظ سترون پس از ورود در فرمنتور نیمه‌صنعتی با استفاده از آب سترون به حجم چهل لیتر رسید و پس از تنظیم دما، محیط کشت آمادهٔ تلقیح با باکتری شد. همچنین، برای جلوگیری از کف‌کردن محیط کشت درون فرمنتور از روغن به‌عنوان ترکیب ضدکف استفاده شد.

آزمون میزان تولید در فرمنتور آزمایشگاهی

مایه‌زنی محیط کشت فرمنتور آزمایشگاهی با باکتری *B. subtilis* UTB96

در این مرحله برای تلقیح فرمنتور از باکتری رشدیافته در محیط کشت غذایی (NB) استفاده شد. ابتدا، از باکتری نگه‌داری‌شده در محلول ۰/۱ مولار سولفات منیزیوم روی تشتک پتری حاوی محیط کشت آگار مغذی کشت داده شد. پس از مدت ۲۴ ساعت، یک لوپ از باکتری رشدیافته در این تشتک به درون ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت غذایی مایع در یک ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری انتقال داده شد و به‌مدت ۲۴ ساعت، روی شیکر انکوباتور قرار داده شد. این مایهٔ تلقیح سپس، در شرایط کاملاً سترون و در کنار شعله به درون فرمنتور منتقل شد.

میزان تولید تودهٔ زیستی باکتری *B. subtilis* UTB96 در فرمنتور آزمایشگاهی

در این مرحله محیط کشت طراحی‌شده پس از انتخاب منابع کربن و ازت، در حجم ۱/۵ لیتر درون فرمنتور 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 فرمنتور و با رعایت نکات ایمنی لازم در تنظیم تهویهٔ محفظه‌های دستگاه، فرمنتور با دقت داخل اتوکلاو قرار گرفت. زمان اتوکلاو ۲۵ دقیقه و دمای آن روی ۱۲۱ درجهٔ سلسیوس تنظیم شد. پس از نصب فرمنتور روی هیتر و برقراری اتصالات مختلف و تنظیم دمای محیط کشت، پیش‌کشت ۲۴ ساعته باکتری در آن تلقیح شد. در این مرحله دما روی ۲۹ درجهٔ سلسیوس، pH روی ۷ و هم‌زن روی ۱۶۰ دور در دقیقه تنظیم شد.

بررسی اثر محیط کشت و نوع فرمنتور بر خاصیت آنتاگونیستی باکتری

برای بررسی قدرت آنتاگونیستی باکتری در شرایط آزمایشگاه از روش هاجدرون و همکاران (Hagedron *et al.* 1989) استفاده شد. در این آزمایش استرین باکتری رشدیافته در دو فرمنتور نیمه‌صنعتی و آزمایشگاهی، به‌صورت لکه‌ای با فواصل مساوی از مرکز تشتک‌های پتری و به فاصلهٔ یک سانتی‌متری از حاشیهٔ آن‌ها از چهار طرف تشتک‌های حاوی محیط کشت PDA مایه‌زنی شدند. سپس، دیسکی به قطر ۵ میلی‌متر از حاشیهٔ کشت چند روزه *P. drechsleri* در مرکز تشتک کشت داده شد. در مورد قارچ *A. flavus* به جای دیسک حاوی ریسه از سوسپانسیون اسپور این قارچ برای تلقیح استفاده شد. در تشتک پتری شاهد از آب مقطر سترون

استفاده شد. این تشتک‌ها در دمای ۲۷ درجهٔ سلسیوس نگه‌داری شدند و زمانی که حاشیهٔ پرگنه در تشتک‌های پتری شاهد به دیوارهٔ پتری برخورد کرد، میزان رشد پرگنه اندازه‌گیری شد.

نتایج

بررسی‌های آنزیمی باکتری *B. subtilis* UTB96

تولید لیپاز به‌صورت هاله‌ای از کریستال‌های کدرتر از محیط کشت مشاهده شد که اطراف کلونی باکتری رسوب کرده بود. نتیجهٔ این بررسی نشان داد که این جدایه می‌تواند آنزیم لیپاز را به میزان قابل قبولی تولید کند. در آزمایش هیدرولیز پروتئین شیر ایجاد هالهٔ شفاف ۲/۵ سانتی‌متری در اطراف کلونی باکتری مشاهده شد که نشان می‌دهد، این استرین می‌تواند، پروتئین شیر را تجزیه کند. این استرین با تولید هاله‌ای به قطر ۳/۸ سانتی‌متر اطراف کلونی خود روی محیط کشت حاوی نشاسته پس از ۴۸ ساعت، نشان داد که می‌تواند آنزیم آمیلاز را تولید کند. قطر هالهٔ شفاف ایجادشده اطراف کلونی باکتری‌ها روی محیط کشت SMA پس از ۴۸ ساعت، اندازه‌گیری شد. نتیجهٔ این بررسی نشان داد که این باکتری می‌تواند آنزیم مهم پروتئاز را تولید کند. این استرین با تولید هاله‌ای ۴ سانتی‌متری این توانایی را تأیید کرد.

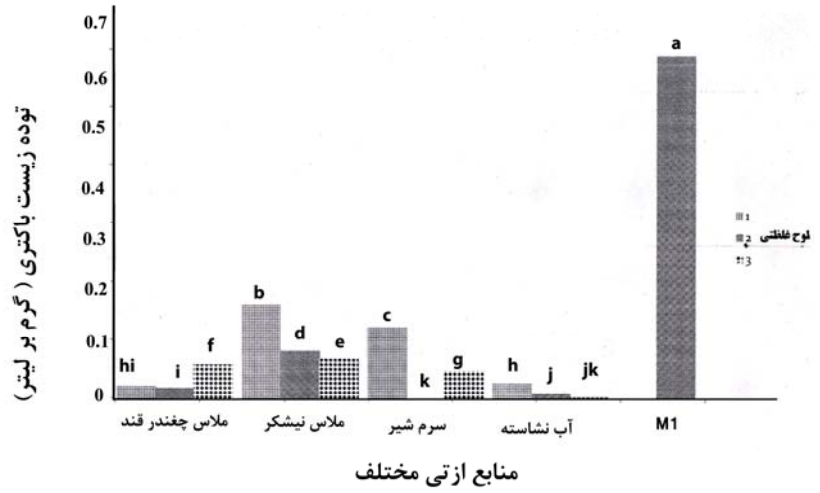
غربال منابع کربن و ازت

مقایسهٔ اثر پسماند برخی صنایع به تنهایی بر میزان تولید باکتری *B. subtilis* UTB96

در این مرحله میزان رشد باکتری در محیط‌های کشت صنعتی به‌صورت خالص و در چند غلظت در سطح آماری ۱ درصد ارزیابی شد. طبق نتایج به‌دست‌آمده (جدول ۴) مشخص شد که حداکثر رشد در غلظت ۱۰ گرم بر لیتر محیط کشت ملاس نیشکر انجام شد. 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 (شکل ۱).

جدول ۴. میزان تولید تودهٔ زیستی باکتری (گرم بر لیتر) در منابع کربن مختلف در غلظت‌های مختلف

منابع کربن	سطوح غلظتی		
	۱	۲	۳
ملاس چغندرقند	۰/۰۲۵	۰/۰۲۲	۰/۰۶۵
ملاس نیشکر	۰/۱۷۸	۰/۰۹۱	۰/۰۷۶
آب نشاستهٔ سیب‌زمینی	۰/۰۳	۰/۰۱۲	۰/۰۰۴
سرم شیر	۰/۱۳۶	۰	۰/۰۵۳



شکل ۱. میزان رشد باکتری در محیط‌های کشت تجاری بدون افزودن هیچ ترکیب کمکی، هر کدام در سه غلظت. محیط‌ها شامل M1، آب نشاسته، سرم شیر، ملاس نیشکر و ملاس چغندرقند هستند تیمارها در سطح ۱ درصد باهم مقایسه شده‌اند.

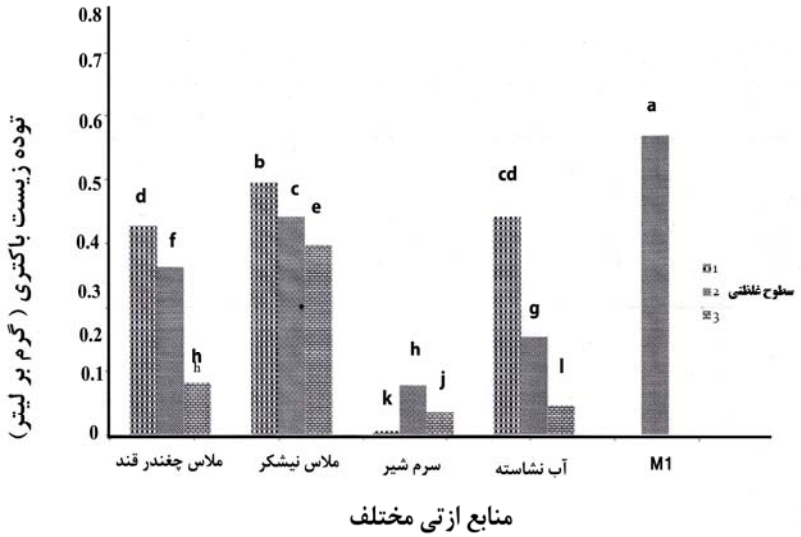
مقایسهٔ اثر منابع کربن مختلف به همراه عصارهٔ مخمر بر میزان تولید باکتری *B. subtilis* UTB96

نتایج به‌دست‌آمده در این مرحله نشان داد که ملاس نیشکر در ترکیب با منبع ازت عصارهٔ مخمر نسبت به سایر محیط‌های کشت تجاری دارای بیشترین تولید تودهٔ زیستی بود.

داده‌های به‌دست‌آمده (جدول ۵) در این مرحله نشان داد که این محیط با تأمین کامل منبع ازتی می‌تواند میزان رشد باکتری را به ۰/۵۶ گرم بر لیتر برساند (شکل ۲). بنابراین، ملاس نیشکر به‌عنوان ترکیبی کربنی مناسب برای مرحلهٔ بعد انتخاب شد. داده‌های این آزمایش در سطح آماری ۱ درصد تجزیه و تحلیل شدند.

جدول ۵. میزان تولید تودهٔ زیستی باکتری (گرم بر لیتر) در منابع کربنی تجاری در غلظت‌های مختلف به همراه سه گرم بر لیتر عصارهٔ مخمر

منابع کربنی	سطوح غلظتی		
	۱	۲	۳
ملاس چغندرقند	۰/۴۶۷	۰/۳۷۸	۰/۱۱۹
ملاس نیشکر	۰/۵۶	۰/۴۸۷	۰/۴۲۲
آب نشاستهٔ سیب‌زمینی	۰/۴۸۶	۰/۲۲۱	۰/۰۶۹
سرم شیر	۰/۰۱۲	۰/۱۱۳	۰/۰۵۴



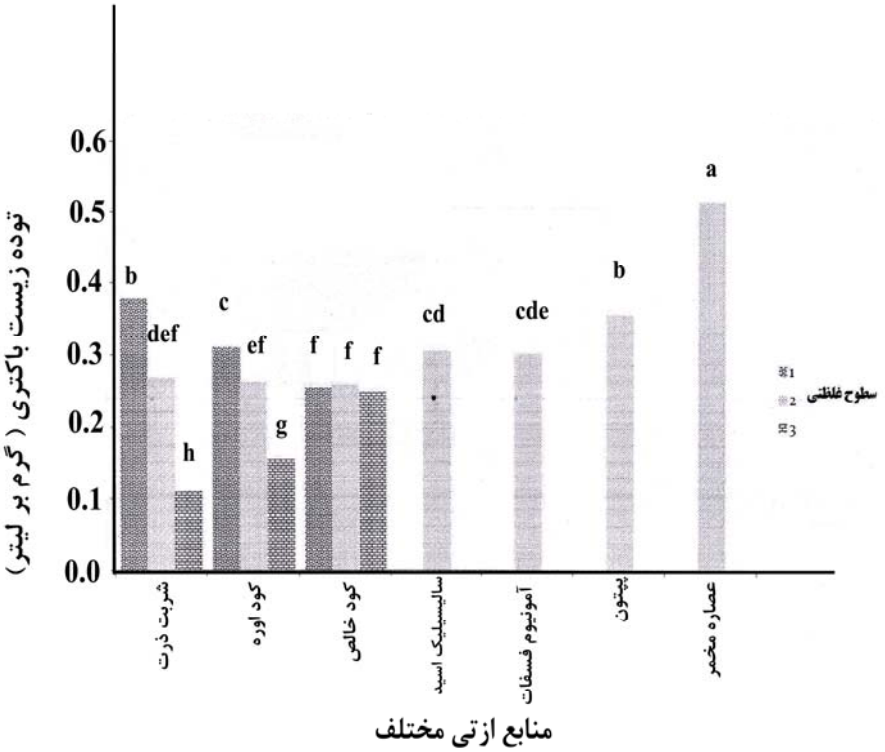
شکل ۲. میزان رشد باکتری در منابع کربن مختلف هر کدام در سه غلظت، به همراه مقدار ثابتی از منبع ازتی عصارهٔ مخمر (سه گرم بر لیتر). محیط‌ها شامل M1، آب نشاسته، سرم شیر، ملاس نیشکر و ملاس چغندرقند هستند.

مقایسهٔ اثر منابع مختلف ازت آلی و معدنی به همراه یک منبع کربن بر میزان تولید باکتری *B. subtilis* UTB96

در این مرحله غلظت‌های مختلف چند منبع ازت آلی و معدنی در ترکیب با غلظت ده گرم بر لیتر ملاس نیشکر بر میزان رشد باکتری مقایسه شدند. نتایج نشان داد که غلظت دو گرم بر لیتر شربت خیساندهٔ ذرت با تولید ۰/۳۸ گرم بر لیتر بیشترین اثر را بر تولید تودهٔ زیستی باکتری در بین سایر ترکیبات ازتی دارد (جدول ۶). البته در این آزمایش عصارهٔ مخمر که یک منبع ازتی معروف آزمایشگاهی به‌حساب می‌آید، به‌عنوان شاهد برای مقایسه استفاده شده بود که باکتری توانست در آن به میزان ۰/۵۱ گرم بر لیتر رشد کند (شکل ۳). داده‌های این آزمایش در سطح آماری یک درصد آنالیز شد.

جدول ۶. میزان تولید تودهٔ زیستی باکتری (گرم بر لیتر) در غلظت‌های مختلف منابع ازت به همراه ملاس نیشکر (ده گرم بر لیتر)

منابع ازت	سطوح غلظتی		
	۱	۲	۳
شربت خیساندهٔ ذرت	۰/۳۸	۰/۲۷	۰/۱۱
اورهٔ خالص	۰/۲۶	۰/۲۶	۰/۲۵
کود اوره	۰/۳۱	۰/۲۶	۰/۱۶
سولفات آمونیوم	۰/۳۱		
دی‌هیدروژن‌آمونیوم فسفات	۰/۳		
پپتون	۰/۳۶		
عصارهٔ مخمر	۰/۵۱		



شکل ۳. میزان رشد باکتری در منبع ثابت کربنی (ده گرم بر لیتر ملاس نیشکر) به همراه غلظت‌های مختلفی از چندین منبع ازت. منابع ازت شامل شربت خیساندهٔ ذرت، کود گرانولهٔ اوره، اورهٔ خالص، سولفات آمونیوم، دی‌هیدروژن‌آمونیوم فسفات، پپتون و عصارهٔ مخمر است.

انتخاب منبع کربنی و ازتی تجاری و تعیین اجزای محیط کشت

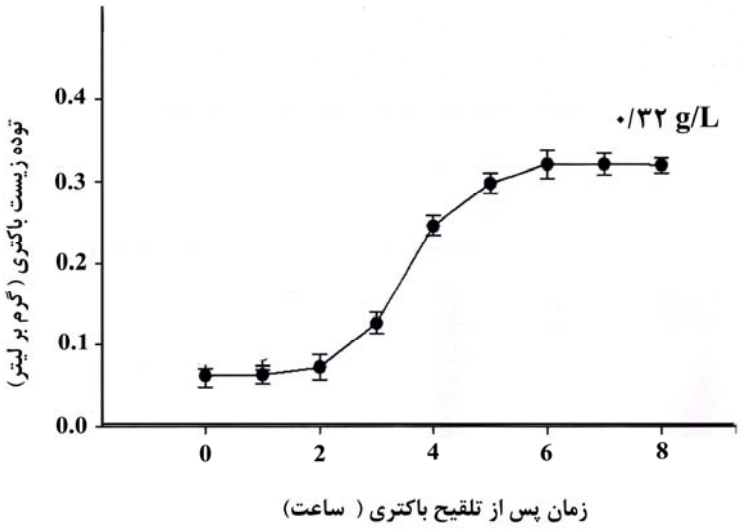
پس از انتخاب منابع ازت و کربن مناسب برای رشد باکتری و تعیین غلظت مناسب آن‌ها، با اضافه‌کردن مقادیر مناسب از نمک‌های ضروری مانند دی‌پتاسیم هیدروژن‌فسفات، سولفات منیزیوم، کلرید کلسیم، سولفات منگنز و روغن (ضدکف)، محیط کشت مناسب و پایه برای رشد این باکتری طراحی شد. در این محیط کشت ملاس چغندرقند با غلظت ده گرم بر لیتر و شربت خیساندهٔ ذرت به‌عنوان منبع ازت با غلظت دو گرم بر لیتر تعیین شد.

منحنی رشد باکتری *B. subtilis* UTB96 در محیط کشت طراحی‌شده در فرمنتور نیمه‌صنعتی

در این مرحله روند رشد باکتری در طول پروسهٔ تولید در فرمنتور نیمه‌صنعتی در طول ۸ ساعت رصد و در نهایت، میزان حداکثر تولید ارزیابی شد (شکل ۴).

در این آزمایش پتانسیل رشد باکتری در محیط کشت طراحی‌شده آزمایش شد. بیشترین میزان

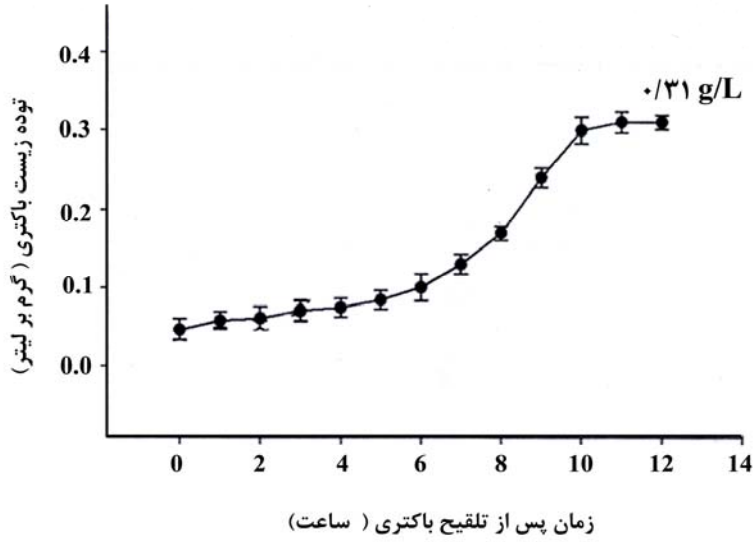
تولید تـودهٔ زیستـی پس از ۸ ساعـت رشد به حـدود ۰/۳۲گـرم بر لیتـر رسیـد.



شکل ۴. منحنی رشد باکتری UTB96 در فرمنتور نیمه‌صنعتی و محیط کشت طراحی‌شده

بیشترین تودهٔ زیستی به‌دست‌آمده برای باکتری *B. subtilis* UTB96 در فرمنتور آزمایشگاهی

در این آزمایش پتانسیل رشد باکتری در محیط کشت طراحی‌شده آزمایش شد. بیشترین میزان تولید تودهٔ زیستی پس از ۱۲ ساعت رشد به حدود ۰/۳۱ گرم بر لیتر رسید (شکل ۵).



شکل ۵. منحنی رشد باکتری *B. subtilis* UTB96 در فرمنتور آزمایشگاهی در محیط کشت طراحی‌شده

بررسی خاصیت آنتاگونیستی باکتری

در مرحلهٔ پایانی نتایج رفتار آنتاگونیستی باکتری در محیط کشت طراحی‌شده به‌دست آمد. نتایج نشان داد که باکتری رشدیافته در فرمنتور نیمه‌صنعتی حاوی محیط کشت طراحی‌شده در این تحقیق می‌تواند رشد *A. flavus* و *P. drechsleri* را به‌ترتیب به میزان ۵۰ و ۷۰ درصد کنترل کند. بنابر نتایج، باکتری *B. subtilis* UTB96 رشدیافته در فرمنتور آزمایشگاهی حاوی محیط

کشت طراحی‌شده، می‌تواند رشد بیمارگرهای *A. flavus* و *P. drechsleri* را به‌ترتیب به میزان ۷۸ و ۵۴ درصد کنترل کند.

بحث

برای قضاوت دربارهٔ قدرت آنتاگونیستی و پتانسیل بیوکنترلی یک باکتری باید عوامل زیادی را ارزیابی کرد، مانند تولید آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، آنزیم‌های مؤثر، قدرت کلنیزاسیون سطوح هدف، رقابت مؤثر، پایداری در برابر شرایط سخت و دیگر فاکتورها، اما آنچه در این پژوهش به‌عنوان یکی از فاکتورهای مؤثر در فرآیند تولید و به‌خصوص تولید تجاری مد نظر قرار گرفت و ملاک ارزیابی ما بود، میزان تولید تودهٔ زیستی بود. کوستا و همکاران تلاش کردند تا با پیداکردن منابع کربن و ازت از میان محصولات تجاری خام، ضمن کاهش هزینه‌ها، *Pantoa agglomerans* میزان تودهٔ زیستی تولیدی توسط باکتری را با حفظ اثر بیوکنترلی آن به حداکثر برسانند. در این پژوهش از محیط کشتی مرکب از منابع نیتروژنی مانند عصارهٔ مخمر (۵ گرم بر لیتر) و مخمر آبجو خشک‌شده (۱۰ گرم بر لیتر) و کربوهیدرات‌های ارزان‌قیمت مانند سوکروز (۱۰ گرم بر لیتر) و ملاس (۲۰ گرم بر لیتر)، برای رشد باکتری با حفظ کارایی آن علیه *Penicillium italicum* و *Penicillium digitatum* قارچ‌های روی پرتقال استفاده شد (Costa *et al*. 2001. در این تحقیق نیز دربارهٔ حفظ یا تغییر قدرت بیوکنترلی یا کارایی باکتری‌های بیوکنترل در شرایط مختلف تخمیر، نکات قابل توجهی مشاهده شد؛ به این ترتیب که باکتری رشدیافته در فرمنتور نیمه‌صنعتی *B. subtilis* UTB96 می‌تواند رشد بیمارگرهای *P. drechsleri* و *A. Flavus* را به‌ترتیب به میزان ۵۰ درصد و ۷۰ درصد کنترل کند، این در حالی است که باکتری رشدیافته در فرمنتور آزمایشگاهی می‌تواند رشد بیمارگرهای *A. flavus* و *P. drechsleri* را به‌ترتیب به میزان ۷۸ و ۵۴ درصد کنترل کند. این نتیجه نشان می‌دهد که میزان اثر کنترلی باکتری رشدیافته در یک محیط کشت یکسان در دو فرمنتور متفاوت و نیز در مقابل بیمارگرهای مختلف تغییر می‌کند. از سوی دیگر افزایش تودهٔ زیستی یک باکتری در یک فرمنتور همیشه با افزایش کارایی باکتری همراه نیست؛ زیرا همچنان‌که نشان داده شد، میزان تولید تودهٔ زیستی باکتری در فرمنتور نیمه‌صنعتی نسبت به فرمنتور آزمایشگاهی افزایش داشته، ولی اثر کنترلی آن بر قارچ *A. flavus* کاهش یافته است. یکی از فاکتورهای مهم در کارایی یک عامل بیوکنترل در محیط طبیعی اطراف ریشه (ریزوسفر) توانایی آن‌ها در مصرف منابع مختلف غذایی محیط پیرامونی آن‌ها است. یک باکتری مفید ساکن در محیط اطراف ریشه، زمانی در رقابت با دیگر موجودات همسایه و بیمارگرها موفق خواهد بود که بتواند از انواع مختلف مواد مترشحه از ریشهٔ گیاه و ارگانیسم‌های دیگر استفاده کند. در محیط‌های کشت تجاری نیز ارگانیسمی قابلیت تولید به‌صرفه را خواهد داشت که نیچ غذایی وسیع‌تری داشته باشد و آنزیم‌های لازم را برای هضم ترکیبات غذایی مورد *B. subtilis* UTB96 بیشتری تولید کند. باکتری استفاده در این پژوهش از این دیدگاه در جایگاه نسبتا مطلوبی قرار داشت. این استرین توانایی هضم آنزیمی ترکیبات غذایی تجاری حاوی پروتئین، لیپید و نشاسته را داشت. بنابراین، ترکیبات جانبی برخی صنایع مانند آب نشاسته، آب پنیر نیز می‌توانند در طراحی محیط کشت اقتصادی استفاده شوند. در این پژوهش ملاس نیشکر و شربت خیساندهٔ ذرت به‌ترتیب به‌عنوان منابع کربن و ازت انتخاب شدند. بنابراین، نتایج این تحقیق بار دیگر به‌جابودن کاربرد گستردهٔ محصولات جانبی ارزان‌قیمت صنایع مانند ملاس نیشکر و شربت خیساندهٔ ذرت را در صنایع فرمانتاسیون غذایی و دارویی تأکید می‌کند. نتایج نشان می‌دهند که میزان تولید تودهٔ زیستی در محیط طراحی‌شده در فرمنتور نیمه‌صنعتی بیشتر از فرمنتور آزمایشگاهی است. زمان رسیدن به حداکثر رشد در فرمنتور نیمه‌صنعتی ۸ و در فرمنتور آزمایشگاهی ۱۲ ساعت است که حاکی از سرعت رشد بیشتر باکتری در فرمنتور نیمه‌صنعتی است. این موضوع می‌تواند به دلیل سیستم هوادهی بسیار مناسب فرمنتور نیمه‌صنعتی نسبت به فرمنتور آزمایشگاهی باشد؛ زیرا سیستم هوادهی در فرمنتور نیمه‌صنعتی به‌صورت ایرلیفت[1] است و کارایی آن در تأمین اکسیژن مورد نیاز باکتری بسیار

1. Air lift

بالاست. نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش همچنین، نشان‌دهندهٔ این موضوع است که توانایی سازگاری باکتری با محیط کشت طراحی‌شده، در فرمنتور نیمه‌صنعتی سریع‌تر از فرمنتور آزمایشگاهی بود. بدین ترتیب که فاز تأخیر[1] باکتری در فرمنتور نیمه‌صنعتی دو ساعت، ولی در مورد فرمنتور آزمایشگاهی شش ساعت به طول انجامید. کاهش زمان فاز تأخیر و افزایش سرعت رشد باکتری در طول پروسهٔ تولید تجاری یک باکتری بیوکنترل یکی از راه‌های کاهش زمان تولید و هزینه‌های مرتبط با تولید مانند حامل‌های انرژی و ... است. بنابراین، یکی از اهداف محققان در حوزهٔ فرمنتاسیون عوامل بیولوژیک باکتریایی همواره بهبود این دو شاخص مهم تولید بوده است.

سپاسگزاری

از همهٔ پرسنل شرکت فناوری زیستی طبیعت‌گرا به دلیل همکاری‌های همه‌جانبه در اجرای این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌شود.

REFERENCES

Ahmadzadeh M (2013) Biological control of plant diseases-Plant probiotic bacteria. University of Tehran Press, Iran.

Abbas HK (2005) Aflatoxin and food safety. CRC Press Taylor &Francis Group. New York, USA. Pp: 565.

Costa E, Teixido N, Usall J, Atares E, and 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 RG, Duffus E, Osuji G and Pettit R (1991) Aflatoxin control in preharvest maize: effects of chitosan and two microbial agents. Journal of Agriculture Science 117:165–169.

D'Souza DH and Bracket RE (2001) Aflatoxin B1 degradation by *Flavobacterium aurantiacum* in the presence of reducing condition and seryl and sulfhydryl group inhibitors. Journal of Food Protection 64: 268-271.

Farzaneh M (2010) Mode of action of *Bacillus subtilis* on growth inhibition of *Aspergillus flavus* and aflatoxin reduction in Pistachio. A thesis submitted to the Graduate degree of PHD in Plant Pathology [Iran]: Tehran University. (In Persian)

Ghoreshi SS (2011) Study on biological control of *Aspergillus flavus* in pistachio by using some antagonistic bacterial strains. A thesis submitted to the Graduate degree of MSc in Plant Pathology. [Iran]: Tehran University. (In Persian)

Hagedorn C, Could WD and Bradinelli RT (1989) Rhizobacteria of cotton and their repression of seedling disease pathogens. Applied Environmental Microbiology 55: 2793-2797.

Kimura N and Hirano S (1988) Inhibitory strains of *Bacillus subtilis* for growth and aflatoxin- production of aflatoxigenic fungi. Agriculture Biology and Chemistry 52 (5): 1173-1179.

Lewis JA (1991) Formulation and delivery systems of biocontrol agents with emphasis on fungi. In: Keister DL, Cregan PB (eds): The rhizosphere and plant growth. Kluwer Rotterdam pp: 279–287.

Maurhofer M, Keel C, Haas D and Défago G (1995) Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 with enhanced antibiotic production. Plant Pathology 44: 40-50.

Rahimi P, Sharifnabi B and Bahar M (2007) *Aspergillus* species isolated from pistachio and determination of their aflatoxin production. Rostaniha 8: 30-42.

Reddyl KRN, Saritha P, Reddy CS and Muralidharan K (2009) Aflatoxin B1 producing potential of *Aspergillus flavus* strains isolated from stored rice grains . African Journal of Biotechnology 8(14): 3303-3308.

Sedaghat Telgerd N (2008) Evaluation of biological control of *Aspergillus flavus* in pistachio nuts using non-pathogenic *A. flavus* isolates and *Bacillus subtilis*. A thesis submitted to the Graduate degree of MSc in Plant Pathology [Iran]: Tehran University. (In Persian)

White J (1954) Yeast technology, Chapman and Hall, Ltd. London.

Wright SJ and Thompson RJ (1985) *Bacillus* volatiles antagonize cyanobacteria. FEMS Microbiology Letters 30: 263-267.

Zabriskie DW, Armiger WB, Phillips DH, Albano PA (1980) Traders' guide to fermentation medium formulation.Traders Protein, Memphis.

Zhang J and Greasham R (1999) Chemically defined media for commercial fermentations. Applied Microbiology and Biotechnology 51: 407–421.

1. Lag phase