Iranian Journal of Plant ProtectionScience
Vol 51, No 2, Autumn and winter 2020 (275-285)
DOI: 10.22059/ijpps.2020.288286.1006905

دانش گیاهپزشکی ایران
دورهٔ ۵۱، شمارهٔ ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۹ (۲۸۵-۲۷۵)

اثرات باکتری *Bacillus velezensis* UTB96 در کاهش توکسین زرالنون ناشی از قارچ *Fusarium graminearum* جداشده از گندم

زهرا داودی[1*]، حسین صارمی[2]، مسعود احمدزاده[2] و علی ملیحی‌پور[3]

۱. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران
۲. استاد، گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران
۳. استادیار، بخش تحقیقات غلات، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
(تاریخ دریافت: ۹۹/۰۲/۲۸ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۵/۱۷)

چکیده

گندم در معرض آلودگی به بیمارگرهای قارچی و مایکوتوکسین‌های تولیدی آن‌ها قرار دارد. دراین‌بین، توکسین استروژنیک زرالنون یکی از معروف‌ترین توکسین‌هایی است که توسط قارچ عامل بیماری بلایت فوزاریومی سنبلهٔ گندم (گونهٔ *Fusarium graminearum*) در گندم تولید می‌شود. آلوده شدن گندم و محصولات غذایی به‌دست‌آمده از آن به زرالنون و خطرات ناشی از آن برای سلامت انسان و دام سبب شده است تمهیدات مختلف فیزیکی، شیمیایی و زیستی برای کاهش میزان آلودگی به این توکسین اتخاذ شود. جدایهٔ *F. graminearum* تهیه‌شده از کلکسیون آزمایشگاه بخش تحقیقات غلات موسسه تحقیقات اصلاح و تهیهٔ نهال و بذر به‌منظور انجام این پژوهش استفاده شد. بر اساس روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)، جدایهٔ *F. graminearum* موردبررسی توانایی تولید توکسین زرالنون را دارا بود. نتایج آزمایش‌های زیست‌کنترلی و کشت متقابل قارچ *F. graminearum* و جدایهٔ باکتری *Bacillus velezensis* UTB96 نشان دادند که این جدایه از باکتری منجر به کنترل رشد قارچ تا ٤٠ درصد می‌گردد. همچنین، ترکیبات خارج سلولی به‌دست‌آمده از این جدایهٔ باکتری توانایی کنترل قارچ را تا ٥٤/٥ درصد داشت. بعلاوه، این باکتری توانایی کاهش زرالنون تا ۷۹ درصد را دارا بود. برعکس، جدایهٔ باکتری *Bacillus subtilis* UTB1 در کاهش میزان زرالنون در شرایط آزمایشگاه در سطح یک درصد تفاوت معنی‌داری نشان نداد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش، جدایهٔ باکتری *Bacillus velezensis* UTB96 توانایی کنترل قارچ عامل بلایت فوزاریومی سنبلهٔ گندم و همچنین کاهش میزان توکسین زرالنون را دارا است، لذا می‌تواند به‌عنوان عامل زیست‌کنترلی بیشتر بررسی شود.

واژه‌های کلیدی: گندم، توکسین، زرالنون، عامل زیست‌کنترل.

Effectives of Bacillus velezensis UTB96 on reduction of zearalenone produced by Fusarium graminearum isolated from wheat

Zahra Davoodi[1*], Hossein Saremi[2], Masoud Ahmadzadeh[2], Ali Malihipour[3]

1. Former M.Sc. student, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences & Engineering, University of Tehran, Karaj 31587-77871, Iran
2.Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences & Engineering, University of Tehran, Karaj 31587-77871, Iran
3.Cereal Research Department, Seed and Plant Improvement Institute (SPII), AREEO, Karaj, Alborz, Iran.
(Received: May 17, 2020 - Accepted: August 7, 2020)

ABSTRACT

Wheat is exposed to various fungal pathogens, especially *Fusarium* and their mycotoxins. Zearalenone is an estrogenic toxin and one of the most popular toxins produced by the fungal agent of wheat head blight disease (*Fusarium graminearum*). Due to zearalenone contamination in wheat and wheat-based foods and its dangers to human and animal health, various physical, chemical, and biological measures have to be established to reduce or prevent zearalenone contamination. A *F. graminearum* isolate obtained from the cereal pathology department of seed and plant improvement institute was selected for further studies. Based on high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis, *F. graminearum* isolate could produce zearalenone. Biological experiments showed duel-culture of *Bacillus velezensis* UTB96 and *F. graminearum* isolates decreased the fungal growth to 40%, as well as the supernatant supplied from *Bacillus velezensis* UTB96, which decreased the fungal growth to 54.5%. *B. velezensis* UTB96 strain could decrease the zearalenone to 79% but *B. velezensis* UTB1strain did not have any difference at 1% level to reduce the zearalenone toxin. Results showed *B. velezensis* UTB96 strain was capable of moderating the growth of *Fusarium* head blight and zearalenone contamination in wheat.

Keywords: Wheat, toxin, Zearalenone, Biocontrol agent.

* Corresponding author E-mail: Zahra.davoudi.k.89@gmail.com

مقدمه

گندم در معرض خسارت انواع عوامل خسارت‌زا ازجمله آفات، بیماری‌ها و علف‌های هرز قرار دارد. بیماری بلایت فوزاریومی سنبله که توسط قارچ *Fusarium graminearum* یا گونه‌های دیگر از قارچ *Fusarium* ایجاد می‌شود، یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گندم به شمار می‌رود. گونه‌های مختلف قارچ *Fusarium* قادر به تولید متابولیت‌های ثانویه ازجمله مایکوتوکسین روی گیاهان و مواد غذایی تولیدشده از آن هستند. از مهم‌ترین مایکوتوکسین‌های تولیدشده توسط قارچ‌های *Fusarium* می‌توان به زرالنون (zearalenone)، تریکوتسن‌ها (trichothecenes) و فومونیزین‌ها (fumonisins) اشاره کرد (Desjardins, 2006).

زرالنون یکی از مهم‌ترین توکسین‌های قارچی است که توسط قارچ *F. graminearum* و گونه‌های مرتبط در محصولاتی نظیر گندم، جو و ذرت تولید می‌شود (Gromadzka *et al.,* 2009) اثرات توکسین قارچی زرالنون در حیوانات به‌خوبی مشخص‌شده است، به‌طوری‌که مصرف ذرت، جو و دانه‌های گندم حاوی زرالنون در حیوانات اهلی بیشتر با اختلالات دستگاه تناسلی همراه است (Sundlof & Strickland, 1986; Pitt, 2000).

همچنین زرالنون می‌تواند نقشی در عدم توازن هورمونی و سرطان سینه در انسان در نواحی که مصرف زرالنون بالا است، داشته باشد (IARC, 1999; Pitt, 2000). در اروپا حد مجاز زرالنون برای انسان در غلات به‌جز ذرت ۱۰۰، برای ذرت ۲۰۰، برای آرد غلات و فراورده‌هایی که مستقیماً مصارف انسانی دارند ۷۵، برای نان ۵۰ و غذاهای کودک ۳۰-۲۰ میکروگرم در کیلوگرم در نظر گرفته‌شده است (EFSA, 2011).

ازآنجایی‌که غلات وارداتی از خارج یا تولیدشده در داخل کشور، قبل از مصرف ممکن است مدت‌زمان قابل‌توجهی در مراکز خرید، انبارها یا سیلوها نگهداری شوند در صورت استاندارد نبودن نگهداری، آلودگی دانه‌های غلات به قارچ‌های فوزاریوم و تولید توکسین‌های ناشی از آن می‌تواند به‌راحتی اتفاق افتد. یکی از روش‌های زیستی برای کنترل قارچ *F. graminearum* و کاهش مایکوتوکسین‌های تولیدی توسط آن استفاده از باکتری‌های جنس *Bacillus* است (Zalila-Kolsi *et al.,* 2016). این باکتری‌ها به دلیل حضور گسترده در خاک، تحمل تغییرات دمایی، اسیدیته، شوری محیط و تولید فرم مقاوم به‌صورت اندوسپور (endospore) به‌عنوان یک عامل مناسب در کنترل زیستی قارچ‌های فوزاریوم مطرح بوده (Melnick *et al.,* 2008) و در افزایش رشد گیاهان نیز نقش قابل‌توجهی داشته است (Broadbent *et al.,* 1977). جدایه‌های مختلف گونهٔ *Bacillus subtilis* نسبت به عوامل بیماری‌زای متعددی خاصیت بازدارندگی دارند (Zalila-Kolsi *et al.,* 2016). تولید لیپوپپتیدهای حلقوی خانواده‌های سورفکتین (surfactin)، ایتورین (iturin) و فنجایسین (fengycin) نقش مهمی در خاصیت بازدارندگی گونهٔ *B. subtilis* دارند (Leifert *et al.,* 1995;Toure *et al.,* 2004) همچنین خاصیت حشره‌کشی و قارچ‌کشی این متابولیت‌های ثانویه اثبات شده است (Raaijmakers, 2010). باکتری *B. subtilis* از طریق آنتاگونیسم و نیز تولید مواد فرّار در بازدارندگی از رشد قارچ‌های *Fusarium* نقش ایفا می‌کند (Kai *et al.,* 2009).

با توجه به شیوع قارچ *F. graminearum* و سایر گونه‌های *Fusarium* روی دانه‌های گندم در فاصلهٔ زمانی برداشت تا مصرف و خطر تولید مایکوتکسین‌های قارچی در آن‌ها، بررسی حاضر به‌منظور تأثیر باکتری *B. velezensis* UTB96روی قارچ عامل تولید زرالنون و همچنین ارزیابی اثر این باکتری روی کاهش میزان زرالنون انجام شد. لازم به ذکر است جدایهٔ باکتری اشاره‌شده در گذشته به نام *B. subtilis* UTB96 شناخته می‌شد؛ اما در پژوهش‌هایی که به‌منظور توصیف زمینهٔ ژنتیکی و شناسایی ژن‌های مسئول تولید زیستی لیپوپپتیدها و متابولیت‌های ضد قارچی جدایهٔ UTB96 انجام شد، کل ژنوم آن توالی‌یابی شد و مشخص شد این جدایه بیشترین شباهت را به *B. velezensis* FZB42 دارد (Vahidinasab *et al.,* 2019).

مواد و روش‌ها

بررسی تولید توکسین زرالنون توسط جدایهٔ *Fusarium graminearum*

در این پژوهش، جدایهٔ *Fusarium graminearum* تهیه‌شده از بخش تحقیقات غلات موسسه تحقیقات اصلاح و تهیهٔ نهال و بذر به‌منظور بررسی توانایی تولید توکسین زرالنون، مطابق روش سامسودین در سال ۲۰۱۵ با اعمال اندکی تغییرات به شرح زیر بررسی شد. ابتدا مقدار کافی سوسپانسون اسپورهای قارچ تهیه گردید. برای این منظور، مقدار ۲/۵ گرم کاه خشک آسیاب‌شدهٔ گندم همراه با ۱۲۵ میلی‌لیتر آب در فلاسک‌های ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شده و دو بار با فاصله ۲۴ ساعت اتوکلاو شدند. سپس ۵ قطعه قارچی به ابعاد حدود ۰/۵× ۰/۵ سانتی‌متر مربع از کشت ۱۰ روزهٔ آن روی محیط کشت PDA به داخل فلاسک‌های ارلن مایر افزوده شده و به مدت ۵ روز در داخل شیکر انکوباتوری که شیکر آن روی ۱۲۰ دور در دقیقه و دمای آن روی ۲۸ درجهٔ سلسیوس تنظیم شده بود قرار داده شدند. در مرحلهٔ بعد، میزان ۵۰ گرم بذر گندم سالم داخل ظرف ارلن مایر، دو بار با فاصله ۲۴ ساعت اتوکلاو شده و حدود ۵۰ میلی‌لیتر آب به آن اضافه گردید. سپس گندم آماده‌شده با این روش، با استفاده از یک میلی‌لیتر سوسپانسیون اسپور به غلظت 10^6 اسپور در هر میلی‌لیتر مایه‌زنی شده و به مدت ۲۰ روز در دمای محیط و در شرایط تاریکی قرار گرفت. به‌منظور استخراج توکسین قارچ، بعد از آسیاب نمودن گندمی که جدایهٔ قارچی موردنظر روی آن رشد کرده بود، میزان ۲۵ گرم از نمونه گندم به‌اضافه یک گرم نمک وزن شد، محتویات ظرف به مخلوط‌کن با دور بالا (۸۰۰۰ دور در دقیقه) منتقل و به مدت سه دقیقه مخلوط شد. عصارهٔ به‌دست‌آمده از این مرحله توسط کاغذ صافی صاف شد و ۱۰ میلی‌لیتر از عصارهٔ صاف‌شده با ۶۵ میلی‌لیتر آب رقیق گردید. محلول رقیق‌شده از کاغذ صافی عبور داده شد. مقدار ۶۵ میلی‌لیتر از این عصاره به‌منظور عبور از ستون ایمیونوافینیتی (Immunoaffinity) برداشته شد. به‌منظور آماده کردن ستون ایمیونوافینیتی دارای آنتی‌بادی زرالنون، مخزن مربوطه توسط آداپتور به سرستون متصل شده و مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از PBS (Phosphate-buffered saline) به آن منتقل شده و بدون فشار خارجی از ستون عبور داده شد. سپس مقدار ۶۵ میلی‌لیتر از عصاره رقیق‌شده که در مراحل قبل آماده شده بود از ستون آماده‌شده با سرعت یک قطره در ثانیه عبور داده شد. ستون با ۱۰ تا ۲۰ میلی‌لیتر از PBS یا آب شستشو داده شده و سپس با فشار هوای مثبت به مدت ۵ تا ۱۰ ثانیه خشک شد. از ستون مقدار ۲۰۰۰ میکرولیتر متانول مناسب برای کروماتوگرافی مایع عبور داده شد و تا آخرین قطره از آن وارد ویال گردید. به ویال حاوی متانول مقدار ۲۰۰۰ میکرولیتر آب اضافه شده و با استفاده از ورتکس مخلوط شدند. درنهایت اندازه‌گیری میزان تولید توکسین زرالنون توسط جدایهٔ *F. graminearum*، مطابق با استاندارد ملی ایران به شمارهٔ ۹۲۳۹ عمل شد و از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) استفاده شد. به‌منظور جداسازی توکسین در دستگاه HPLC از روش فازمعکوس استفاده شد و تشخیص توکسین با کمک آشکارساز فلورسانس با طول‌موج برانگیختگی ۲۷۵ nm و نشر ۴۵۰ nm صورت گرفت. درنهایت برای سنجش کمی توکسین، ابتدا سطح زیر منحنی ترسیم‌شده برای هر نمونه محاسبه شد و این مقدار در معادلهٔ خط مربوطه که بر اساس نمونه‌های استاندارد توکسین به‌دست‌آمده است، قرار داده شد تا مقدار کمی میزان توکسین ارزیابی گردد (Iranian National Standards Organization, 2012).

بررسی اثر باکتری *Bacillus velezensis* UTB96 روی کاهش رشد قارچ *F. Graminearum*

به‌منظور بررسی اثر باکتری *B. velezensis* روی کاهش رشد قارچ *F. graminearum*، جدایهٔ UTB96 *B. velezensis* که از کلکسیون آزمایشگاه کنترل زیستی بخش بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تهران، دریافت شده بود استفاده شد. یک قطره ۱۰ میکرولیتری از سوسپانسیون اسپور با غلظت 10^6 اسپور در هر میلی‌لیتر قارچ *F. graminearum* تهیه‌شده در وسط تشتک‌های پتری

حاوی محیط کشت PDA و NA (Nutrient agar) (به نسبت مساوی) کشت داده شد. با استفاده از سوزن کشت مخصوص (loop) از کشت جدایهٔ *B.* UTB96 *velezensis* با غلظت $۱۰^{۸}$ (CFU/ml) در سه نقطه و یک نقطه با آب مقطر سترون به‌عنوان شاهد با فاصله یکسان از یکدیگر و فاصله یک سانتی‌متری از حاشیهٔ پتری به‌صورت لکه‌ای کشت داده شدند. پتری‌ها به انکوباتور با دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس منتقل شدند. پس‌ازآنکه حاشیهٔ پرگنهٔ قارچ در قسمت مربوط به شاهد در پتری به لبهٔ پتری رسید، میزان هالهٔ بازدارندگی از قارچ اندازه‌گیری شد. به‌منظور اندازه‌گیری درصد شعاع بازدارندگی از معادلهٔ زیر استفاده شد (Ji *et al.,* 2013).

شعاع – شعاع قارچ شاهد)] = درصد شعاع بازدارندگی
100 × [شعاع قارچ شاهد/(قارچ تیمار شده با باکتری

بررسی اثر عصارهٔ خارج سلولی باکتری UTB96 *B. velezensis* روی کاهش رشد قارچ *F. graminearum*

به‌منظور بررسی اثر عصارهٔ خارج سلولی باکتری *B. velezensis* در کاهش رشد قارچ *F. graminearum* از روش فرزانه و همکاران به شرح زیر استفاده شد. ابتدا جدایهٔ باکتری UTB96 در محیط مایع LB (Luria Broth) کشت داده شده و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس قرار گرفت. بعدازاین مدت، محیط کشت یادشده همراه با باکتری رشدکرده در آن به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و فاز رویی محلول سانتریفیوژشده از فیلتر ضد باکتری ۰/۲۲ میکرومتری عبور داده شد. سپس عصارهٔ حاصل به میزان ۲۰ درصد به پتری‌های حاوی محیط کشت (Potato Dextrose Agar) اضافه و خوب مخلوط شد. پس از سرد شدن محیط کشت یاشده، یک قطعهٔ ۵ میلی‌متری از قارچ *F. graminearum* روی آن قرار داده شده و در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس در انکوباتور نگه داشته شدند. در شاهد به‌جای عصارهٔ باکتری، محیط LB به محیط کشت PDA اضافه شد. بعدازاینکه پرگنه قارچ در پتری شاهد به حاشیهٔ آن رسید، درصد بازدارندگی اندازه‌گیری شد (Kazempour, 2004).

بررسی اثر متابولیت‌های فرّار باکتری *B.* UTB96 *velezensis* روی کاهش رشد قارچ *F. graminearum*

به‌منظور بررسی اثر متابولیت‌های فرّار باکتری روی میزان رشد قارچ از روش فیدامان و روسال (۱۹۹۳) استفاده شد. به این صورت که ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور باکتری به‌دست‌آمده از ۲۴ ساعت رشد باکتری در محیط LB با جمعیت $۱۰^{۸}$ (CFU/ml)، با کمک پیپت پاستور روی محیط NA پخش شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت از استقرار باکتری در محیط NA، قطعات قارچی در پتری‌های جداگانه حاوی PDA کشت داده شدند. در این زمان، درب دو پتری حاوی باکتری و قارچ برداشته و این دو پتری به‌طور وارونه روی‌هم قرار داده شده و با کمک پارافیلم محکم شدند. در تیمار شاهد، پتری حاوی قارچ بر روی پتری NA تیمارشده با آب مقطر استریل قرار گرفت. بعد از رسیدن پرگنه قارچ به حاشیه پتری شاهد، میزان رشد قارچ مطابق معادلهٔ گفته‌شده در قبل ارزیابی شد (Fiddaman & Rossall, 1993).

بررسی اثر باکتری UTB96 *B. velezensis* روی کاهش تولید زرالنون در محیط کشت PDB

به‌منظور بررسی اثر باکتری *B. velezensis* روی کاهش تولید زرالنون از روش فرزانه و همکاران استفاده شد. برای انجام این قسمت از پژوهش، ابتدا زرالنون استاندارد از آزمایشگاه پژوهشی علوم حیاتی فاروق (تهران، ایران) تهیه شد. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از جمعیت $۱۰^{۸}$ (CFU/ml) باکتری به محیط کشت PDB حاوی ۱۰۰ پی‌پی‌بی زرالنون اضافه شد. در شاهد به‌جای باکتری از آب مقطر سترون استفاده شد. نمونه‌های تیمار و شاهد به مدت ۵ روز در دمای اتاق روی شیکر قرار گرفتند. بعدازآن به‌منظور تغلیظ سم، از سامانهٔ انجماد خشک استفاده شد تا حجم آن به یک میلی‌لیتر کاهش یابد. به‌منظور استخراج توکسین،

به میزان چهار برابر حجم محلول نهایی استخراج‌شده، متانول ۸۰ درصد اضافه شد و با HPLC بررسی شد (Farzaneh *et al.,* 2011).

تأثیر متابولیت‌های خارج سلولی (رونشین) باکتری *B. velezensis* UTB96 در کاهش زرالنون روی محیط کشت LB

از کشت ۷۲ ساعته باکتری در محیط مایع LB، سلول‌های باکتری با استفاده از سانتریفیوژ در ۸۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شدند، مایع رویی از فیلتر غشایی ۰/۲۲ میکرومتری عبور داده شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از محلول پایهٔ زرالنون به ۴۹۵۰ میکرولیتر از این مایع تصفیه‌شده مخلوط شد. در ارلن‌های شاهد به‌جای رونشین باکتری، محیط LB استفاده شد. مخلوط حاصل در انکوباتور در دمای ۲۸ درجهٔ سلسیوس به مدت ۴ روز نگهداری شد و بعدازآن به‌منظور تغلیظ سم، از دستگاه لیوفیلیز استفاده شد تا حجم آن به یک میلی‌لیتر کاهش یابد. به‌منظور استخراج توکسین، به میزان ۴ برابر متانول ۸۰ درصد اضافه شد و مطابق روش گفته‌شده با HPLC آنالیز شد (Alberts *et al.,* 2006).

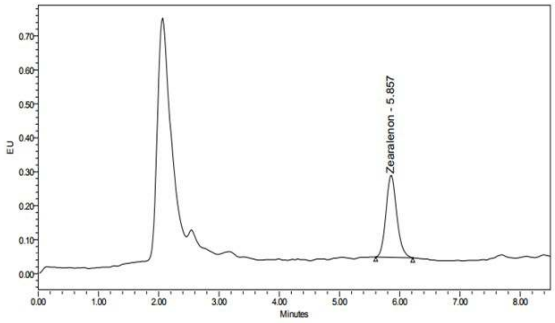
بررسی اثر باکتری *B. velezensis* UTB96 و *B. subtilis* UTB1 در کاهش میزان زرالنون موجود در بذرهای گندم تلقیح‌شده با *F. graminearum*

بذر گندم سالم به میزان ۲۵ گرم وزن و به هرکدام از ارلن‌ها میزان ۳ میلی‌لیتر آب اضافه شد و دو بار بافاصله ۲۴ ساعت اتوکلاو شدند و سپس به‌طور هم‌زمان با یک میلی‌لیتر سوسپانسیون اسپوری جدایه‌های UTB96 و UTB1 با جمعیت حدود 10^{7} (CFU/ml) به‌طور جداگانه و نیز سوسپانسیون اسپوری از قارچ با جمعیت حدود 2×10^{5} (conidia/ml) تلقیح شدند. در ارلن‌های شاهد به‌جای سوسپانسیون باکتری‌ها از آب مقطر استریل استفاده گردید. بعد از ۱۸ روز قرارگیری در دمای ۲۸ درجهٔ سلسیوس و در شرایط تاریکی انکوباتور، ۴ گرم از بذور گندم از هرکدام از ارلن‌ها به کمک آسیاب پودر گردیدند. به‌منظور استخراج توکسین، این مقدار با ۲۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد مخلوط شدند و به مدت نیم ساعت بر روی شیکر با دور ۱۲۰ قرار گرفتند و سپس ازلحاظ وجود زرالنون به روش HPLC مطابق شرح قبلی ارزیابی شدند (Samsudin, 2015).

نتایج و بحث

تأیید امکان تولید توکسین زرالنون توسط جدایهٔ *Fusarium graminearum*

بررسی تولید توکسین زرالنون روی گندم توسط جدایهٔ *F. graminearum* موردبررسی به روش HPLC نشان داد که این جدایه قادر به تولید این توکسین به میزان ۳۶۹ پی‌پی‌بی است (شکل ۱). این نتایج نشان‌دهندهٔ توانایی این جدایهٔ قارچی در تولید توکسین زرالنون در شرایط آزمایشگاهی است که برای آزمایش‌های بعدی استفاده شد. آزمایشی مشابه بر روی دانه‌های ذرت در شرایط آزمایشگاهی انجام و مشخص شد دمای بهینه برای تولید زرالنون ۲۸ درجهٔ سلسیوس در مدت ۱۵ روز است (Martins & Martins, 2002).

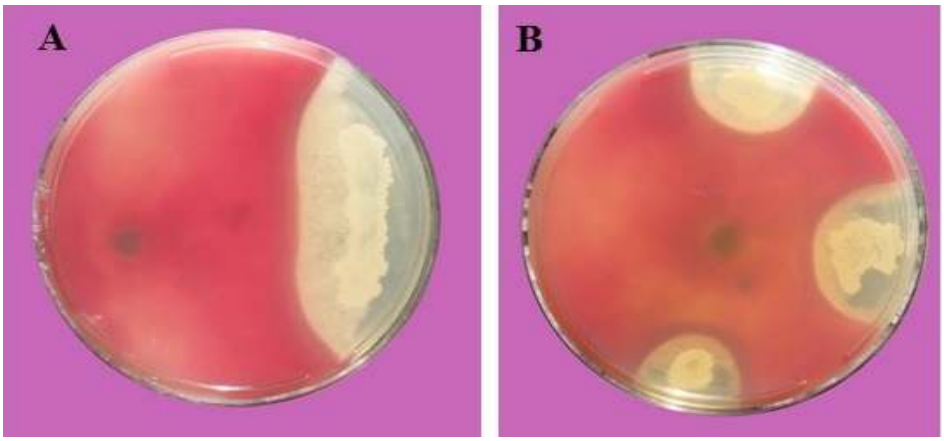


شکل ۱. کروماتوگرام تولید زرالنون توسط قارچ *Fusarium graminearum*.

Figure 1. Chromatogram of zearalenone produced by *Fusarium graminearum*.

کشت متقابل باکتری *B. velezensis* UTB96 با قارچ *Fusarium graminearum*

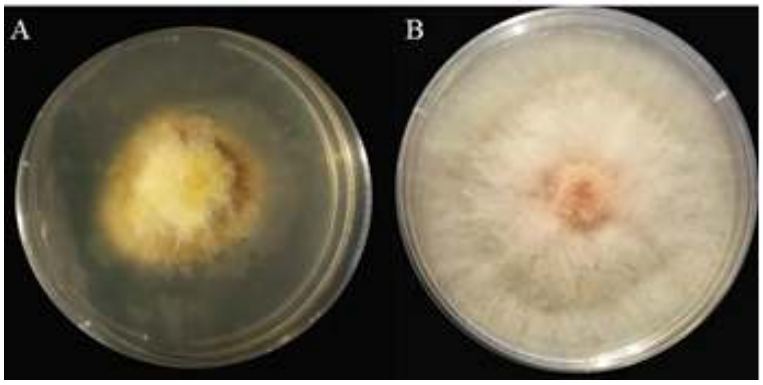
مقایسهٔ میانگین داده‌ها نشان می‌دهد که باکتری *B. velezensis* UTB96 قادر است رشد قارچ را به میزان ۴۰ درصد کنترل نماید (شکل ۲). در کشت متقابل هیچ تماس فیزیکی بین باکتری آنتاگونیست و جدایهٔ قارچی موردآزمایش مشاهده نشد. به‌علاوه وجود هالهٔ بازدارندگی نشان از حضور متابولیت‌های ضد قارچی ترشح‌شده به‌وسیلهٔ باکتری دارد. نتایج مشابهی توسط سی‌یرا و همکاران در سال ۲۰۱۶ با آزمایش بر روی جدایه‌های متفاوتی از *B. subtilis* در تقابل با *Fusarium graminearum* به دست آمد (Sierra *et al.*, 2016). این فعالیت ضد قارچی می‌تواند نتیجهٔ تولید سه لیپوپپتید از خانواده‌های سورفکتین، ایتورین و فنجایسین توسط جدایهٔ *B. velezensis* UTB96 باشد (Vahidinasab *et al.*, 2019).



شکل ۲. کشت متقابل باکتری *Bacillus velezensis* و قارچ *Fusarium graminearum* A: کشت خطی، B: کشت سه‌نقطه‌ای.
Figure 2. Dual culture of *Bacillus velezensis* and *Fusarium graminearum.* A:Linear culture B:three-point culture.

بررسی اثر عصارهٔ خارج سلولی (سوپرناتانت) باکتری *B. velezensis* UTB96 در کاهش رشد قارچ *F. graminearum*

عصارهٔ ۲۰ درصدی باکتری *B. velezensis* UTB96 قادر است رشد قارچ *F. graminearum* به میزان ۵۴/۵ درصد را کاهش دهد (شکل ۳). در پژوهش دان لپ و همکاران (۲۰۱۱) که بر روی فعالیت ضد قارچی سوپرناتانت (supernatant) و هرکدام از لیپوپپتیدهای مستقل سه جدایهٔ از *B. subtilis* کار کردند، مشخص شد که هرکدام از آن‌ها مشخصات لیپوپپتیدی مختلفی دارند. یکی از جدایه‌ها بر اساس داده‌های حاصل از کشش سطحی و HPLC لیپوپپتیدهای کمی تولید کرد. طیف‌سنجی جرمی نشان داد که تنها لیپوپپتید تولیدشده توسط آن سورفکتین است. سورفکتین خواص ضد قارچی کمی دارد (Ongena & Jacque, 2008) و رونشین این جدایه نتوانست از رشد قارچ عامل بلایت خوشه جلوگیری کند. این اثبات می‌کند، جدایهٔ مذکور از لیپوپپتیدها در خواص آنتاگونیسم خود استفاده نمی‌کند. این جدایه ممکن است قارچ را از طریق رقابت مستقیم مواد غذایی یا سایر سازوکارها کنترل کند. پیش‌تر نشان داده شده که جدایه‌های *B. subtilis* بیماری‌های گیاهان را از طریق القای سامانهٔ دفاعی گیاه سرکوب می‌کند. دو جدایهٔ دیگر این باکتری لیپوپپتیدهای سورفکتین، ایتورین و فنجایسین را تولید کردند بنابراین رونشین آن‌ها توانست از رشد قارچ عامل بلایت خوشه جلوگیری کند (Dunlap *et al.*, 2011). همان‌طور که اشاره شد، جدایهٔ استفاده‌شده در پژوهش حاضر نیز توانایی بالایی در تولید لیپوپپتیدهای یادشده دارد.

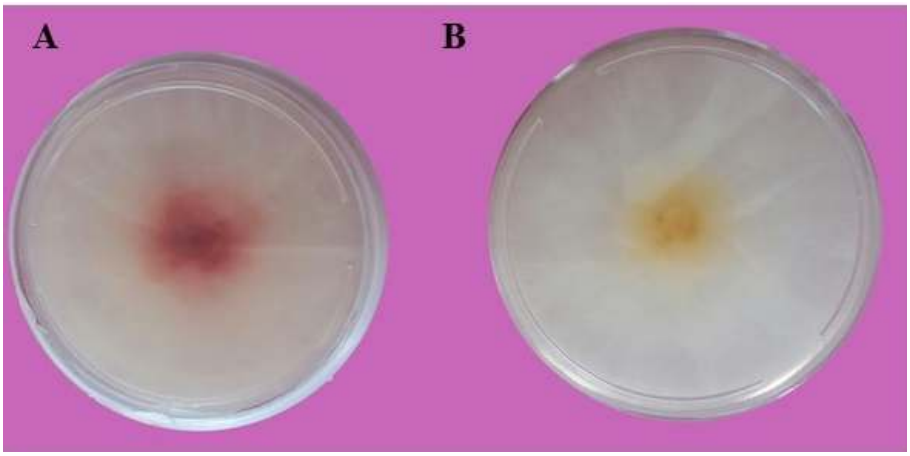


شکل ۳. بررسی اثر رونشین باکتری *Bacillus velezensis* روی رشد قارچ *Fusarium graminearum* A: تیمار، B: شاهد.

Figure 3. Effect of *Bacillus velezensis* supernatant on *Fusarium graminearum* growth A: Treatment B: Control

بررسی اثر متابولیت فرّار باکتری *B. velezensis* UTB96 در میزان رشد *F. graminearum*

داده‌ها نشان دادند که باوجود تکرار آزمایش در زمان‌های مختلف، تفاوتی ازنظر میزان رشد در پتری‌های شاهد و باکتری مشاهده نشد و کلنی‌ها تنها ازلحاظ رنگ تفاوت داشتند (شکل ۴). در پژوهش فیدامن و روزال نشان داده شد که آنتاگونیسم متابولیت‌های فرار *B. subtilis* نسبت به قارچ *Rhizoctonia solani* نسبت مستقیمی با دما دارد، به‌نحوی‌که دمای بالاتر باعث فعالیت ضد قارچی بیشتری می‌شود که می‌تواند به دلیل عوامل مختلفی ازجمله فعالیت متابولیکی بیشتر باکتری، انتشار و انحلال‌پذیری بیشتر این مواد فرار همراه با شرایط دمایی فوق بهینه برای قارچ باشد که باعث بازداری از رشد بیمارگر می‌شود. همچنین آزمایش‌های اولیه در این پژوهش ثابت کرد که فعالیت متابولیت‌های فرار ضد قارچی، به محیط کشتی که باکتری در آن رشد می‌کند بستگی دارد. به‌عنوان‌مثال بعضی از محیط‌های کشت ازجمله Nutrient Agar بسترهای ضعیفی برای تولید متابولیت فرار ایجاد کردند. بیشترین تولید متابولیت فرار مربوط به محیط کشت (PDA) بود (Fiddaman & Rossall, 1993). با توجه به این بررسی‌ها می‌توان نتیجه گرفت علت عدم اثربخشی متابولیت‌های فرار در پژوهش حاضر به دلیل فراهم نبودن دمای بهینهٔ باکتری و نیز محیط کشت (NA) است که برای تولید متابولیت فرار مناسب نیست.

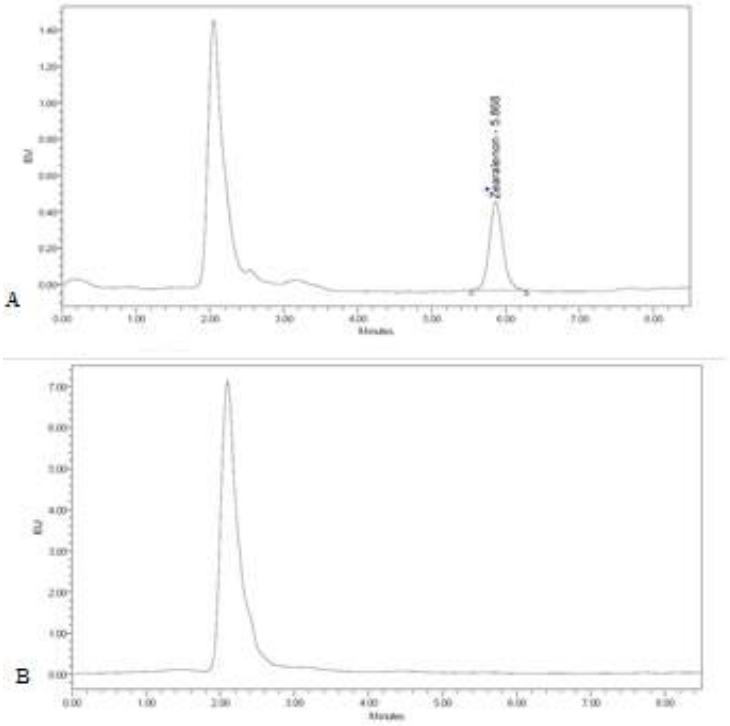


شکل ۴. اثر متابولیت فرار باکتری *Bacillus velezensis* در رشد قارچ A: شاهد B: تیمار با متابولیت فرار باکتری.

Figure 4. Effect of *Bacillus velezensis* volatile metabolites on *Fusarium graminearum* growth A: Control B: Treatment by *Bacillus velezensis* volatile metabolites.

اثر باکتری *B. velezensis* UTB96 در کاهش میزان زرالنون محیط کشت PDB

با توجه به بررسی‌های HPLC، باکتری *B. velezensis* UTB96 پس از ۵ روز توانست زرالنون را به‌طور کامل پاک‌سازی کند. با توجه به شکل ۵، سطح زیر منحنی و نیز میزان زرالنون برای هر سه تیمار باکتریایی صفر است درحالی‌که تیمارهای شاهد به‌طور میانگین محتوی ۵۰۰ پی‌پی‌بی زرالنون است. این نشان می‌دهد که باکتری در کاهش زرالنون در محیط مایع مؤثر است. توکسین‌زدایی از زرالنون و نیز سایر مایکوتوکسین‌ها ازجمله آفلاتوکسین توسط بعضی از جدایه‌های باکتری *B. subtilis* در گذشته گزارش شده‌اند (Cho *et al*., 2010; Farzaneh *et al*., 2012; Tinyiro *et al*., 2011).



شکل ۵. کروماتوگرام تأثیر کاهشی جدایهٔ باکتریایی *B. velezensis* UTB96 در میزان زرالنون پس از نگهداری به مدت ۵ روز در دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس روی محیط PDB A: شاهد B: تیمار حاوی باکتری.

Figure 5. Chromatogram of zearalenone degradation under *Bacillus velezensis* UTB96 treatment after 5 days at 30 °C on PDB culture. A: Control B: Treatment by BV96 isolate.

تأثیر متابولیت‌های خارج سلولی (رونشین) باکتری *B. velezensis* UTB96 در کاهش زرالنون در محیط PDB

تأثیر عصارهٔ خارج سلولی باکتری *Bacillus velezensis* در کاهش زرالنون با نتایج یادشده در مورد کاربرد مستقیم باکتری مطابقت نداشت، همچنین تفاوتی بین نمونه تیمار با شاهد در این بخش مشاهده نشد. بااین‌وجود، بر اساس برخی گزارش‌ها، سلول‌های باکتریایی مانند *Bifidobacterium*، *Propionibacterium* و *Lactococcus* می‌توانند توکسینی مانند آفلاتوکسین را از طریق اتصال فیزیکی پاک‌سازی کنند (Ahlberg *et al.,* 2015). در پژوهش حاضر نیز، با توجه به عدم تأثیر عصارهٔ خارج سلولی در میزان زرالنون، احتمال پاک‌سازی به علت باند شدن فیزیکی سلول باکتری وجود دارد. بر اساس داده‌های منتشرنشده، باکتری مورداستفاده ازلحاظ تولید پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی قوی عمل می‌کند.

اگرچه کاهش مایکوتوکسین از طریق تخریب زیستی نسبت به اتصال به دیواره سلولی راه‌حلی دائمی است، لیکن اتصال فیزیکی مزایایی نسبت به آن دارد:

تخریب زیستی نه‌تنها فرایندی زمان‌بر است بلکه ممکن است مایکوتوکسین‌ها را به مواد سمی‌تری تبدیل کند. به‌عنوان نمونه زرالنون ممکن است به سایر مشتقاتش به نام آلفا زرالنول که ترکیبی سه تا چهار برابر سمی‌تر از خود زرالنون است، تبدیل شود (Mirocha *et al*., 1979; Sadiq *et al*.,2019).

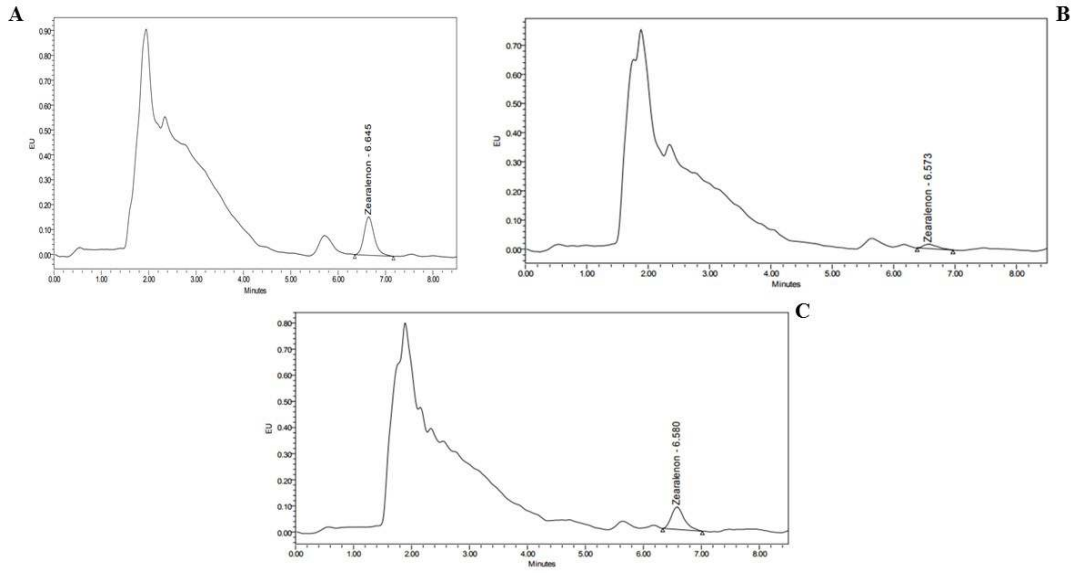
بررسی اثر باکتری‌های *B. velezensis* UTB96 و *B. subtilis* UTB1 در کاهش میزان زرالنون موجود در بذرهای گندم تلقیح شده با *F. graminearum*

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده و مقایسهٔ میانگین‌ها، تیمار *B. velezensis* UTB96 نسبت به شاهد اختلاف معنی‌دار با درصد کاهش در زرالنون به میزان ۷۹ درصد داشت. درحالی‌که جدایهٔ *B. subtilis* UTB1 در سطح یک درصد فاقد تفاوت معنی‌دار بود (جدول ۱، شکل ۶). سی‌را و همکاران نیز نشان دادند اعمال جدایهٔ *B. subtilis* HG77 بر روی گندم از رشد قارچ و تولید زرالنون در شرایط آزمایشگاه ممانعت می‌کند (Sierra *et al*., 2016). لازم به ذکر است تولید توکسین وابسته به نوع گونه و جدایه است و تحت تأثیر بستر رشدی، شرایط محیطی و نیز رقابت با دیگر میکروارگانیسم‌ها قرار دارد (Sanchis *et al*., 2004; Cotty & Bhatnagar, 1994; Kokkonen *et al*., 2005).

جدول ۱. تأثیر جدایه‌های *B. velezensis* UTB96 و *B. subtilis* UTB1 در کاهش توکسین زرالنون

Table1. Effect of *Bacillus velezensis* isolates on zearalenone reduction

Bacterial isolates -۴-۵	Mean of zearalenone (ppb) -۳-۵	earalenone reduction (%) -۲-۵	Treatments grouping* -۱-۵
BV96 -۸-۵	-۷-۵	**79** -۶-۵	B -۵-۵
BS1 -۱۲-۵	-۱۱-۵	**8** -۱۰-۵	A -۹-۵
Control -۱۶-۵	-۱۵-۵	- -۱۴-۵	A -۱۳-۵



شکل ۶. کروماتوگرام زرالنون تولیدشده توسط قارچ *Fusarium graminearum* تحت تیمار باکتری *Bacillus velezensis* UTB96 و *B. subtilis* UTB1، پس از ۱۸ روز در دمای ۲۸ درجهٔ سلسیوس روی بذر گندم. A: شاهد، B: تیمار با باکتری BV96 C: تیمار با باکتری BS1.

Figure 7. chromatogram of zearalenone produced by *Fusarium graminearum* under *Bacillus velezensis* UTB96 and *B.surtilis* UTB1 treatment after 18 days ar 28 °C on wheat seed A: Control B: Treatment by BV96 isolate C: Treatment by BS1 isolate

نتیجه‌گیری

به‌طور خلاصه در این مقاله اثرات باکتری روی کاهش توکسین زرالنون بررسی شد. با توجه به کاربرد مستقیم باکتری و پاک‌سازی کامل زرالنون و عدم تأثیر سوپرناتانت باکتری روی آن، فعالیت کاهش زرالنون احتمالاً به دلیل اتصال فیزیکی زرالنون به پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی باکتری است. باکتری مورداستفاده در پژوهش حاضر پیش‌تر با نام *B. subtilis* UTB96شناخته می‌شد، اما بعد از توالی یابی کل ژنوم آن مشخص شد بیشتر شبیه به گونهٔ *B. velezensis* است (Vahidinasab *et al*., 2019). با توجه به تأثیر این جدایه در کاهش رشد قارچ و نیز پاک‌سازی زرالنون، تلقیح محصولات کشاورزی به‌وسیلهٔ این جدایه در مزرعه و مرحلهٔ انبارداری می‌تواند موجب کاهش این مایکوتوکسین در آن‌ها شود. بررسی‌های پزشکی نیز نشان می‌دهند که *B. subtilis* یک باکتری پروبیوتیک مهم است که کاربرد آن‌ها در حال افزایش است. این باکتری باعث تحریک ایمنی بدن می‌شود و اثرات ضد میکروبی دارد. مهم‌ترین مزیت محصولات مرتبط با این باکتری سهولت تولید آن‌ها و اطمینان از ثبات محصول نهایی است. علاوه بر این می‌تواند در غذاهای روزانه انسان استفاده شود (Shahcheraghi *et al*., 2015).

REFERENCES

1. Ahlberg, S. H., Joutsjoki, V., & Korhonen, H. J. (2015). Potential of lactic acid bacteria in aflatoxin risk mitigation. *International Journal of Food Microbiology*, *207*, 87-102.
2. Alberts, J. F., Engelbrecht, Y., Steyn, P. S., Holzapfel, W. H., & Van Zyl, W. H. (2006). Biological degradation of aflatoxin B1 by *Rhodococcus erythropolis* cultures. *International Journal of Food Microbiology*, *109*(1-2), 121-126.
3. Broadbent, P., & KF, B. (1977). Effect of *Bacillus* spp. on increased growth of seedlings in steamed and in nontreated soil.
4. Cho, K. J., Kang, J. S., Cho, W. T., Lee, C. H., Ha, J. K., & Song, K. B. (2010). In vitro degradation of zearalenone by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Letters*, *32*(12), 1921-1924.
5. Cotty, P. J., & Bhatnagar, D. (1994). Variability among atoxigenic *Aspergillus flavus* strains in ability to prevent aflatoxin contamination and production of aflatoxin biosynthetic pathway enzymes. *Applied and Environmental Microbiology*, *60*(7), 2248-2251.
6. Desjardins, A. E. (2006). *Fusarium mycotoxins: chemistry, genetics, and biology*. American Phytopathological Society (APS Press).
7. Dunlap, C. A., Schisler, D. A., Price, N. P., & Vaughn, S. F. (2011). Cyclic lipopeptide profile of three *Bacillus subtilis* strains; antagonists of *Fusarium* head blight. *The Journal of Microbiology*, *49*(4), 603.
8. EFSA. (2011). (http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2011.2197/epdf).
9. Farzaneh, M., Ahmadzadeh, M., Gasempour, A., Mirabolfathy, M., Javan-Ninkkhah, M., & Sharifi-Tehrani, A. (2011). survey on degradation mechanism of *Bacillus subtilis* in aflatoxin produced by *Aspergillus flavous*. *Plant Protection Science*, *42*(2), 191-198.(in farsi)
10. Farzaneh, M., Shi, Z. Q., Ghassempour, A., Sedaghat, N., Ahmadzadeh, M., Mirabolfathy, M., & Javan-Nikkhah, M. (2012). Aflatoxin B1 degradation by *Bacillus subtilis* UTBSP1 isolated from pistachio nuts of Iran. *Food Control*, *23*(1), 100-106.
11. Fiddaman, P. J., & Rossall, S. (1993). The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology*, *74*(2), 119-126.
12. Gromadzka, K., Waśkiewicz, A., Goliński, P., & Świetlik, J. (2009). Occurrence of estrogenic mycotoxin–zearalenone in aqueous environmental samples with various NOM content. *Water Research*, *43*(4), 1051-1059.
13. International Agency for Research on Cancer, IARC. (1999). Overall Evaluations of Carcinogenicity to Humans. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, IARC Monographs (Vol. 1). Lyon: IARC. 1–36.
14. Iranian National Standards Organization. (2011). (http://isiri.gov.ir/oldstandard/portal/home/?65660)
15. Ji, S. H., Paul, N. C., Deng, J. X., Kim, Y. S., Yun, B. S., & Yu, S. H. (2013). Biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CNU114001 against fungal plant diseases. *Mycobiology*, *41*(4), 234-242.
16. Kai, M., & Piechulla, B. (2009). Plant growth promotion due to rhizobacterial volatiles–An effect of CO2. *FEBS Letters*, *583*(21), 3473-3477.

17. Kazempour, M. N. (2004). Biological control of *Rhizoctonia solani*, the causal agent of rice sheath blight by antagonistics bacteria in greenhouse and field conditions. *Plant Pathology Journal, 3*(2), 88-96.
18. Kokkonen, M., Jestoi, M. & Rizzo, A. (2005). The effect of substrate on mycotoxin production of selected *Penicillium* strains. *International Journal of Food Microbiology*, *99*(2), 207-214.
19. Leifert, C., Li, H., Chidburee, S., Hampson, S., Workman, S., Sigee, D. ... & Harbour, A. (1995). Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45. *Journal of Applied Bacteriology, 78*(2), 97-108.
20. Martins, M. L. & Martins, H. M. (2002). Influence of water activity, temperature and incubation time on the simultaneous production of deoxynivalenol and zearalenone in corn (Zea mays) by *Fusarium graminearum*. *Food Chemistry*, *79*(3), 315-318.
21. Melnick, R. L., Zidack, N. K., Bailey, B. A., Maximova, S. N., Guiltinan, M. & Backman, P. A. (2008). Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. from annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao. *Biological Control*, *46*(1), 46-56.
22. Mirocha, C. J., Schauerhamer, B., Christensen, C. M., Niku-Paavola, M. L. & Nummi, M. (1979). Incidence of zearalenol (*Fusarium* mycotoxin) in animal feed. *Applied and Environmental Microbiology*, *38*(4), 749-750.
23. Ongena, M. & Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, *16*(3), 115-125.
24. Pitt, J. I. (2000). Toxigenic fungi: which are important?. *Sabouraudia*, 38(Supplement_1), 17-22.
25. Raaijmakers, J. M., De Bruijn, I., Nybroe, O. & Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, *34*(6), 1037-1062.
26. Sadiq, F. A., Yan, B., Tian, F., Zhao, J., Zhang, H. & Chen, W. (2019). Lactic Acid Bacteria as Antifungal and Anti-Mycotoxigenic Agents: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *18*(5), 1403-1436.
27. Samsudin, N. I. P. B. (2015). Potential biocontrol of fumonisin B1 production by *Fusarium verticillioides* under different ecophysiological conditions in maize. Cranfield University.
28. Sanchis, V. & Magan, N. (2004). Environmental conditions affecting mycotoxins. *Mycotoxins in Food: Detection and Control*, 174-189.
29. Shahcheraghi, S. H., Ayatollahi, J. & Lotfi, M. (2015). Applications of *Bacillus subtilis* as an important bacterium in medical sciences and human life. *Tropical Journal of Medical Research*, *18*(1), 1.
30. Sierra, A.G., El- Hassan, A., Hoglinger, B. & Voegele, R.T. (2016). Inhibitory actions of *Bacillus subtilis* HG77 on *Fusarium graminearum* and its zearalenone production. University of Hohenheim, Germany.
31. Sundlof, S. F. & Strickland, C. (1986). Zearalenone and zeranol: potential residue problems in livestock. *Veterinary and Human Toxicology*, *28*(3), 242.
32. Tinyiro, S. E., Wokadala, C., Xu, D. & Yao, W. (2011). Adsorption and degradation of zearalenone by *Bacillus* strains. *Folia Microbiologica*, *56*(4), 321.
33. Toure, Y., Ongena, M. A. R. C., Jacques, P., Guiro, A. & Thonart, P. (2004). Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *Journal of Applied Microbiology*, *96*(5), 1151-1160.
34. Vahidinasab, M., Ahmadzadeh, M., Henkel, M., Hausmann, R. & Heravi, K. M. (2019). *Bacillus velezensis* UTB96 Is an Antifungal Soil Isolate with a Reduced Genome Size Compared to That of *Bacillus velezensis* FZB42. *Microbiology Resource Announcements, 8*(38), e00667-19.
35. Zalila-Kolsi, I., Mahmoud, A. B., Ali, H., Sellami, S., Nasfi, Z., Tounsi, S. & Jamoussi, K. (2016). Antagonist effects of *Bacillus* spp. strains against *Fusarium graminearum* for protection of durum wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*). *Microbiological Research*, *192*, 148-158.