



## تاثیر منابع کربن و ازت بر رشد و فعالیت ضد قارچی *Bacillus subtilis* علیه *Pythium aphanidermatum*

فاطمه صفری اصل<sup>۱\*</sup> - حمید روحانی<sup>۲</sup> - ماهرخ فلاحتی رستگار<sup>۳</sup> - وحید جهانبخش<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۰/۱۵

تاریخ پذیرش: ۸۷/۴/۱۰

### چکیده

ترکیب محیط‌های کشت به ویژه از نظر منابع کربن و ازت اثر قابل توجهی روی رشد و فعالیت ضدقارچی میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست دارد. در این بررسی اثر ۴۰ نوع محیط کشت مایع که از نظر منابع کربن، ازت و نسبت آنها متفاوت بودند روی میزان رشد باکتری *Bacillus subtilis* و فعالیت ضدقارچی آن در کاهش رشد *Pythium aphanidermatum* مورد بررسی قرار گرفت. منابع کربن شامل: گلوکز، ملاس، نشاسته عصاره سیب‌زمینی، سیبوس برنج و گندم، و ازت شامل: پیتون، عصاره مخمر و سویا بود. میزان رشد باکتری بعد از ۴۸ ساعت با شمارش تعداد باکتری توسط لام هموسیئومتر تعیین گردید. اثر ضد قارچی محیط‌های کشت حاوی باکتری روی *Pythium aphanidermatum* با اندازه‌گیری رشد کلنی پیتوم روی آب و آگار ۲ درصد در مقایسه با شاهد که فاقد باکتری بود تعیین گردید. آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی با ۴۰ تیمار مربوط به ۴۰ محیط کشت و ۳ تکرار اجرا شد. نتایج به دست آمده نشان داد که اختلاف معنی‌داری در سطح ۱ درصد از نظر میزان رشد باکتری در محیط‌های مختلف وجود دارد. از این نظر محیط‌های کشت عصاره سیب‌زمینی - سویا همراه و بدون سولفات منگنز به ترتیب با  $2/46 \times 10^9$  و  $2/27 \times 10^9$  سلول باکتری در هر میلی‌لیتر به عنوان بهترین محیط‌ها از نظر رشد باکتری شناسایی شدند. از نظر فعالیت ضدقارچی علیه قارچ مذکور نیز همین محیط‌ها، به ترتیب با ۹۰/۷۴ و ۸۲/۵۹ درصد کاهش در رشد کلنی قارچ مذکور نسبت به شاهد، بیشترین فعالیت ضدقارچی را از خود نشان دادند. به این ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که در بین ۴۰ محیط کشت بررسی شده، محیط‌های کشت عصاره سیب‌زمینی - سویا همراه یا بدون سولفات منگنز مناسب‌ترین محیط کشت برای حصول بهترین میزان رشد و همچنین بیشترین فعالیت ضد قارچی *B. subtilis* علیه *P. aphanidermatum* می‌باشد.

**واژه‌های کلیدی:** فعالیت آنتاگونیستی، کنترل بیولوژیکی، منابع کربن و ازت، محیط کشت، *Bacillus subtilis*، *Pythium aphanidermatum*

### مقدمه

از محصولات بیولوژیک به روش فوق تهیه می‌شوند (۳۵). در میان عوامل بیوکنترل باکتریایی، گونه‌های *Bacillus spp.* به دلیل تولید اسپور مقاوم و ترشح آنتی‌بیوتیک‌های متعددی نظیر Iturin، Bacilysin، Mycobacilin، Surfactin، Fengymycin و Chlorotetain و Rhizocticin و همچنین توانایی القای مقاومت در گیاه و تولید فیتوهورمون‌های رشدی دارای موقعیت مناسبی جهت کنترل عوامل بیماری‌زای خاکزاد می‌باشند (۱۷، ۱۹، ۲۳ و ۳۰). در حال حاضر استرین‌های مختلف این باکتری به صورت تجاری تولید و جهت کنترل بسیاری از بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. در سال ۲۰۰۵ لیستی از ۱۹ محصول بیولوژیک که براساس *B. subtilis* تهیه شده‌اند معرفی گردید. بعضی از این محصولات که برای کنترل طیف وسیعی از بیماری‌ها توصیه شده‌اند عبارتند از:

Impression, Cillus, Serenad, Subtilex, Histic Yodia, Companion (۱۵).

جهت تکثیر عوامل بیوکنترل به صورت انبوه و در حجم زیاد،

در سال‌های اخیر بحث استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست در کنترل بیماری‌های قارچی و باکتریایی گیاهان مورد توجه قرار گرفته است (۱۶). این میکروارگانیسم‌ها پس از تکثیر در محیط‌های کشت، همراه و یا بدون متابولیت‌های تولید شده در فرایند رشد، فرموله شده و مورد استفاده قرار می‌گیرند. ترکیب محیط کشت به ویژه در مواردی که میکروارگانیسم و متابولیت‌های آنها همراه یکدیگر باشند از حساسیت بیشتری برخوردار است. زیرا در این صورت نیاز به محیط کشتی است که بهترین شرایط را به طور توأم برای رشد و فعالیت ضد قارچی آنتاگونیست فراهم آورد. در سال‌های اخیر بسیاری

۱، ۲، ۳ و ۴- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استاد، استاد و مربی گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد  
(Email: [f.safariasl@gmail.com](mailto:f.safariasl@gmail.com))  
\* - نویسنده مسئول:

### آماده سازی محیط کشت

۴۰ محیط کشت با استفاده از منابع مختلف کربن و ازت به نسبت‌های متفاوت به صورت مایع با pH ۷ تا ۷/۲ تهیه شدند (جدول ۱). محیط پایه که در برگزیده عناصر معدنی برای تمام محیط‌های کشت به طور یکسان بود (به جز مواردی که در جدول ۱ به آنها اشاره شده است) دارای ۳ گرم NaCl، ۱ گرم  $K_2HPO_4$ ، ۱۰ میلی‌گرم  $MnSO_4$  (به عنوان محرک تولید آنتی‌بیوتیک در میکروارگانیسم‌ها) و یک گرم کود میکرو (تولیدی شرکت تولیدات شیمیایی و کشاورزی گیاه جهت مصرف در گیاهان، این کود حاوی غالب عناصر ماکرو و میکرو به صورت قابل جذب می‌باشد) بود. به منظور تهیه عصاره‌های سویا، سبوس برنج، گندم و سیب‌زمینی به ترتیب ۱۰۰، ۴۰، ۵۰ و ۲۵۰ گرم از هر کدام به مدت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه جوشانده و پس از عبور از پارچه لمل حجم عصاره آنها با آب مقطر به یک لیتر رسانده شد.

### تعیین جمعیت باکتری در محیط‌های کشت

برای این منظور ۱۰۰ میلی‌لیتر از هر محیط‌غذایی در یک ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری تهیه و در ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل گردید، هر محیط غذایی توسط ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ۲۴ ساعته باکتری حاوی  $2 \times 10^8$  cfu تلقیح گردید. ارلن‌ها به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور تکان دهنده با ۱۵۰ دور در دقیقه و دمای ۲۹ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. تعیین جمعیت باکتری بعد از ۴۸ ساعت به کمک لام هموسیستمتر صورت گرفت. به منظور مقایسه جمعیت، آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴۰ تیمار مربوط به ۴۰ محیط کشت و ۳ تکرار اجرا شد.

### اثر ترکیب محیط کشت روی فعالیت ضد قارچی *B.*

#### *subtilis* علیه *P. aphanidermatum*

برای این منظور ۱۰ میلی‌لیتر از هر محیط‌کشت حاوی باکتری و متابولیت‌ها و ۱۰ میلی‌لیتر آب آگار غلیظ (۲۴ گرم در لیتر) در تشتک‌های پتری ۹ سانتیمتری استریل کاملاً با هم مخلوط شدند، پس از سرد شدن و بستن محیط، محتویات هر تشتک پتری توسط یک لایه نازک آب آگار (۱۲ گرم در لیتر) پوشش داده شد، پس از گذشت ۴۸ ساعت، یک دیسک ۵ میلیمتری از کشت دو روزه *P. aphanidermatum* روی محیط CMA در مرکز تشتک پتری قرار داده شد، نسبت رشد کلنی قارچ در تیمارها نسبت به شاهد (محیط کشت بدون باکتری) به عنوان فعالیت ضدقارچی *B. subtilis* در محیط‌های کشت مختلف مورد استفاده قرار گرفت. درصد کاهش قطر کلنی قارچ از رابطه زیر محاسبه شد (۲۲ و ۳۴). آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴۰ تیمار (محیط‌کشت) و ۳ تکرار اجرا گردید.

محیط کشت باید به گونه‌ای باشد که با حداقل هزینه اقتصادی، حداکثر میزان رشد سلولی، و متابولیت‌های آنتی‌بیوتیکی با کیفیت بالایی تولید شود. منابع کربن، ازت و نسبت آن‌ها در محیط کشت از جمله مهمترین عواملی به شمار می‌روند که روی شرایط محیط کشت اثرگذار می‌باشند (۲، ۵، ۱۷ و ۱۹).

کاستا و همکاران (۴) عصاره مخمر، مخمر خشک آبیجو (Dry Beer Yeast)، پودر سویا، ساکارز و ملاس چغندر قند را به ترتیب بهترین منابع ازت و کربن جهت تکثیر انبوه *Pantoea agglomerans* CPA-2 معرفی کردند، بیشترین میزان رشد سلولی در این منابع  $2 \times 10^9$  و  $4 \times 10^9$  سلول باکتری در هر میلی‌لیتر (cfu) گزارش شده است. در محیط NYDB (Nutrient Yeast Extract Dextrose Broth) *B. subtilis* B-3 به میزان  $2 \times 10^9$  cfu بوده و نسبت به سایر محیط‌های بررسی شده در تحقیق، بیشترین رشد را دارا بوده است و نیز حداکثر هاله بازدارندگی (فعالیت ضد قارچی) را در برابر *Monilinia fructicola* عامل پوسیدگی قهوه‌ای هلو از خود نشان داده است (۲۷). گلوکز، فروکتوز، ساکاروز، تریپتون و عصاره مخمر نیز بهترین منابع کربن و ازت برای رشد سلولی *B. circulans* معرفی شده‌اند (۱۶). نشاسته، پپتون، آمونیوم فسفات هیدروژن به عنوان منابع کربن و ازت مناسب برای تولید آنزیم آمیلاز در *B. licheniformis* SPT27 شناخته شده‌اند، برای این منظور نسبت ۱:۱ کربن به ازت به عنوان نسبت مطلوب پیشنهاد شده است (۶). باهاچرا و همکاران (۴) گلیسرول را به عنوان منبع کربنی مناسب در تولید ترکیبات آنتی‌بیوتیکی در *Streptomyces hygroscopicus* معرفی نموده‌اند. از این رو در این تحقیق تاثیر منابع مختلف کربن و ازت با نسبت‌های مختلف در میزان رشد و فعالیت ضد قارچی *B. subtilis* BS علیه *P. aphanidermatum* که عامل مرگ گیاهچه و پوسیدگی ریشه و طوقه بسیاری از گیاهان زراعی است به منظور استفاده در تولید انبوه مورد بررسی قرار گرفته است.

### مواد و روش‌ها

#### تهیه استرین‌های مورد استفاده

استرین تأیید شده *Bacillus subtilis* از کلکسیون آزمایشگاه گیاهپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد دریافت گردید. این استرین در حال حاضر در تولید سوبتیلین که یک محصول بیولوژیک است به کار می‌رود. باکتری مزبور در لوله‌های آزمایش حاوی آگار مغذی (NA) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به صورت سوسپانسیون در آب مقطر (طولانی مدت) نگهداری شد. قارچ *P. aphanidermatum* از بانک ژن بیماری شناسی گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه گردید و در محیط‌های PDA و CMA کشت و نگهداری گردید.

(جدول ۱) - منابع کربن و ازت مورد استفاده در تهیه محیط‌های کشت جهت تکثیر *Bacillus subtilis* BS

کد محیط	علامت اختصاری	کربن	ازت
۱	شاهد	محیط آماده آگار مندی مایع (NB) ۸ g	
۲	GS <sub>1</sub> PY	گلوکز ۲۵g	عصاره سویا ۱۵ml، پپتون ۵g، مخمر ۶g
۳	M <sub>1</sub> S <sub>3</sub> N <sub>1</sub> Y	مالس ۱۰g، نشاسته ۵g	عصاره سویا ۵۰ml، مخمر ۶g
۴	M <sub>1</sub> S <sub>4</sub> N <sub>1</sub>	مالس ۱۰g، نشاسته ۵g	عصاره سویا ۱۰۰ml
۵	PDBY	عصاره سیب‌زمینی، دکستروز ۲۰g	مخمر ۶g
۶	PDBPS <sub>2</sub>	عصاره سیب‌زمینی، دکستروز ۲۰g	پپتون ۳۰ml، عصاره سویا ۵g
۷	R <sub>1</sub> M <sub>2</sub> N <sub>1</sub>	عصاره سیوس برنج ۱۰۰۰ml، مالس ۲۵g، نشاسته ۵g	
***۸	TSB	محیط آماده تریپتون سویا	
***۹	W <sub>1</sub> M <sub>2</sub> N <sub>1</sub>	عصاره سیوس گندم ۱۰۰۰ml، مالس ۲۵g، نشاسته ۵g	
۱۰	W <sub>2</sub> M <sub>2</sub> N <sub>1</sub> Y	عصاره سیوس گندم ۵۰۰ml، مالس ۲۵g، نشاسته ۵g	مخمر ۶g
۱۱	GS <sub>1</sub>	گلوکز ۲۵ g	عصاره سویا ۱۵ ml
۱۲	GS <sub>2</sub>	گلوکز ۲۵g	عصاره سویا ۳۰ml
۱۳	M <sub>1</sub> S <sub>3</sub> N <sub>1</sub> P	مالس ۱۰g	عصاره سویا ۵۰ml، نشاسته ۵g، پپتون ۵ g
۱۴	M <sub>1</sub> S <sub>4</sub> N <sub>2</sub>	مالس ۱۰g	عصاره سویا ۱۰۰ml، نشاسته ۱۰ g
۱۵	WhM <sub>2</sub> N <sub>1</sub>	تفاله سیوس گندم ۵۰ g، مالس ۲۵ g	
۱۶	PDBS <sub>2</sub>	عصاره سیب‌زمینی، دکستروز ۲۰g	عصاره سویا ۳۰ ml
۱۷	R <sub>1</sub> M <sub>2</sub> N <sub>1</sub> Y	عصاره سیوس برنج ۱۰۰۰ml، مالس ۲۵ g، نشاسته ۵g	مخمر ۶ g
***۱۸	TSBD	دکستروز ۲۰ g	محیط آماده تریپتون سویا
۱۹	W <sub>1</sub> M <sub>2</sub> N <sub>1</sub> Y	عصاره سیوس گندم ۱۰۰۰ml، مالس ۲۵۰g، نشاسته ۵g	مخمر ۶ g
۲۰	WhM <sub>2</sub>	تفاله سیوس گندم ۵۰ g، مالس ۲۵ g	
۲۱	GS <sub>1</sub> Y	گلوکز ۲۵ g	سویا ۱۵ ml، مخمر ۶ g
۲۲	M <sub>1</sub> Y	مالس ۲۵ g	مخمر ۶ g
۲۳	M <sub>1</sub> S <sub>3</sub> N <sub>1</sub> PY	مالس ۲۵g، نشاسته ۵g	عصاره سویا ۵۰ml، پپتون ۵g، مخمر ۶g
۲۴	N <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	شاسته ۱۰ g	عصاره سویا ۳۰ ml
۲۵	PDBP	عصاره سیب‌زمینی، دکستروز ۲۰g	پپتون ۵g
***۲۶	PSB	عصاره سیب‌زمینی	عصاره سویا ۱۵ ml
۲۷	R <sub>2</sub> M <sub>2</sub> N <sub>1</sub>	عصاره سیوس برنج ۵۰۰ml، مالس ۲۵g، نشاسته ۵g	
***۲۸	TSBZ	محیط آماده تریپتون سویا	
۲۹	W <sub>2</sub> M <sub>2</sub> N <sub>1</sub>	عصاره سیوس گندم ۵۰۰ml، مالس ۲۵g، نشاسته ۵g	
۳۰	PDBPY	عصاره سیب‌زمینی، دکستروز ۲۰g	پپتون ۵g، مخمر ۶g
۳۱	GS <sub>1</sub> P	گلوکز ۲۵ g	عصاره سویا ۱۵ ml، پپتون ۵ g
۳۲	M <sub>1</sub> S <sub>3</sub> N <sub>1</sub>	مالس ۲۵g، نشاسته ۵ g	عصاره سویا ۵۰ ml
۳۳	M <sub>1</sub> S <sub>3</sub> N <sub>2</sub>	مالس ۲۵g، نشاسته ۱۰ g	عصاره سویا ۵۰ ml
۳۴	PDB	عصاره سیب‌زمینی، دکستروز ۲۰g	
۳۵	PDBPYS <sub>2</sub>	عصاره سیب‌زمینی، دکستروز ۲۰g	پپتون ۵g، مخمر ۶g، عصاره سویا ۳۰ ml
***۳۶	PSBZ	عصاره سیب‌زمینی	عصاره سویا ۱۵ ml
۳۷	R <sub>2</sub> M <sub>2</sub> N <sub>1</sub> Y	عصاره سیوس برنج ۵۰۰ml، مالس ۲۵g، نشاسته ۵g	مخمر ۶g
۳۸	W <sub>1</sub> M <sub>2</sub> N <sub>1</sub>	عصاره سیوس گندم ۱۰۰۰ml، مالس ۲۵g، نشاسته ۵g	
***۳۹	W <sub>2</sub> M <sub>2</sub> N <sub>1</sub>	عصاره سیوس گندم ۵۰۰ml، مالس ۲۵g، نشاسته ۵g	
۴۰	PDBYS <sub>2</sub>	عصاره سیب‌زمینی، دکستروز ۲۰g	مخمر ۶g، عصاره سویا ۳۰ ml

\* بدون کود میکرو، \*\* بدون سولفات منگنز، بدون کود میکرو و \*\*\* سولفات منگنز

در سطح ۱ و ۵ درصد صورت گرفت.  
 $100 \times [( \text{قطر کلنی قارچ در تشک پتری شاهد} / \text{قطر کلنی قارچ در تشک پتری تیمار}) - 1] = \text{درصد کاهش قطر کلنی قارچ}$

## نتایج و بحث

### اثر ترکیب محیط کشت روی جمعیت باکتری

با توجه به نتایج حاصل از آزمون F، در میان محیط‌های غذایی مختلف اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد مشاهده گردید.

### محاسبات آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها بوسیله نرم افزار MINITAB13 و MSTATC. و مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون LSD

سویا را به جهت دارا بودن آمینواسیدها و پپتید و هیدرات‌های کربن در افزایش رشد سلولی و فعالیت ضد قارچی *P. agglomerans* CPA-2 علیه *Penicillium italicum* و *P. digitatum* مؤثر دانستند. محیط حاوی عصاره پروتئین سویا (ترکیب تجاری Samprosoy 90NB) تولید *Culvulanic acid* در *Streptomyces clavuligerus* را به ۲ برابر (۹۲ mg/l) حالتی که از پودر سویا استفاده شده بود (۳۵۰-۳۰۰ mg/l) رسانده است (۱۲). سولفات منگنز نیز روی رشد و فعالیت ضد میکروبی *B. subtilis* اثر مثبت نشان داد، به طوری که تیمارهای حاوی این ماده معدنی از نظر میزان رشد و فعالیت آنتی‌بیوتیکی در گروه a و آنهایی که فاقد آن بودند در گروه b قرار گرفتند. سولفات منگنز نیز در کارهای دیگران به عنوان محرک تولید آنتی‌بیوتیک و افزایش جمعیت در میکروارگانیسم‌ها معرفی شده است (سایت DSMZ). این ترکیب احتمالاً در فعالیت آنزیمی باکتری‌ها از جمله استرین مزبور نقش مهمی ایفا می‌کند. از طرفی اکثر باسیلوس‌ها دارای آنزیم آمیلاز می‌باشند و قادرند نشاسته سیب‌زمینی را تجزیه و به عنوان منبع کربن مورد استفاده قرار دهند (۲۹). این موضوع در مورد *B. licheniformis* SPT 27 اثبات شده است (۶). میزان رشد سلولی در سایر محیط‌هایی که حاوی عصاره سیب زمینی بودند به جز محیط ۱۶ بیش از  $1/11 \times 10^9$  سلول در هر میلی‌لیتر بوده است، این نتیجه بیانگر تاثیر مفید این عصاره در میزان رشد سلولی می‌باشد، در حالی که این وضعیت در مورد فعالیت ضد قارچی استرین مورد

استفاده صادق نبود. این تفاوت را می‌توان به ترکیباتی دیگری نسبت داد که همراه عصاره سیب‌زمینی مورد استفاده قرار گرفتند. این محیط‌ها علاوه بر عصاره سیب‌زمینی حاوی دکستروز به عنوان منبع کربن و پیتون، و مخمر و سویا به عنوان منبع ازت بوده‌اند، در نتیجه نسبت کربن به ازت آنها نسبت به محیط‌های غذایی سیب زمینی سویا (کدهای ۳۶ و ۲۶) متفاوت بوده است. در این مورد می‌توان پذیرفت که تنها محیط غذایی سیب‌زمینی سویا با نسبت کربن به ازت ۵ به ۱ مناسب‌ترین محیط غذایی برای رشد بهینه و حداکثر فعالیت ضد قارچی استرین *B. subtilis* می‌باشد.

محیط‌های ۴۰ و ۵ نیز از نظر میزان رشد سلولی و محیط ۲۱ از نظر فعالیت ضد قارچی نتایج خوبی نشان دادند. در این محیط‌ها از عصاره مخمر به عنوان تنها منبع ازت به میزان ۶ گرم در لیتر استفاده شد. این نتیجه نیز با نتایج تحقیقات کاستا و همکاران (۵)، خادمی و همکاران (۱۶) و لونا و همکاران (۲۱) مطابقت دارد. عصاره مخمر در افزایش رشد سلولی *Pantoea agglomerans* CPA-2 و افزایش فعالیت ضد قارچی علیه *Penicillium italicum* و *P. digitatum* به ترتیب با ۷۷ و ۶۶ درصد بازدارندگی از رشد آنها مؤثر بوده است (۵).

محیط‌های عصاره سیب‌زمینی سویا همراه و یا بدون سولفات منگنز (کد ۳۶ و ۲۶)، عصاره سیب‌زمینی دکستروز پیتون مخمر (کد ۳۰)، عصاره سیب‌زمینی دکستروز مخمر (کد ۴۰)، عصاره سیب‌زمینی دکستروز مخمر (کد ۵) و عصاره سیب‌زمینی دکستروز مخمر (کد ۳۷) به ترتیب با  $2/46 \times 10^9$ ،  $2/27 \times 10^9$ ،  $2 \times 10^9$ ،  $1/95 \times 10^9$  و  $1/90 \times 10^9$  سلول باکتری در هر میلی‌لیتر بیشترین میزان رشد را فراهم نمودند و به عنوان ۶ محیط برتر از نظر رشد باکتری شناخته شدند (شکل ۱).

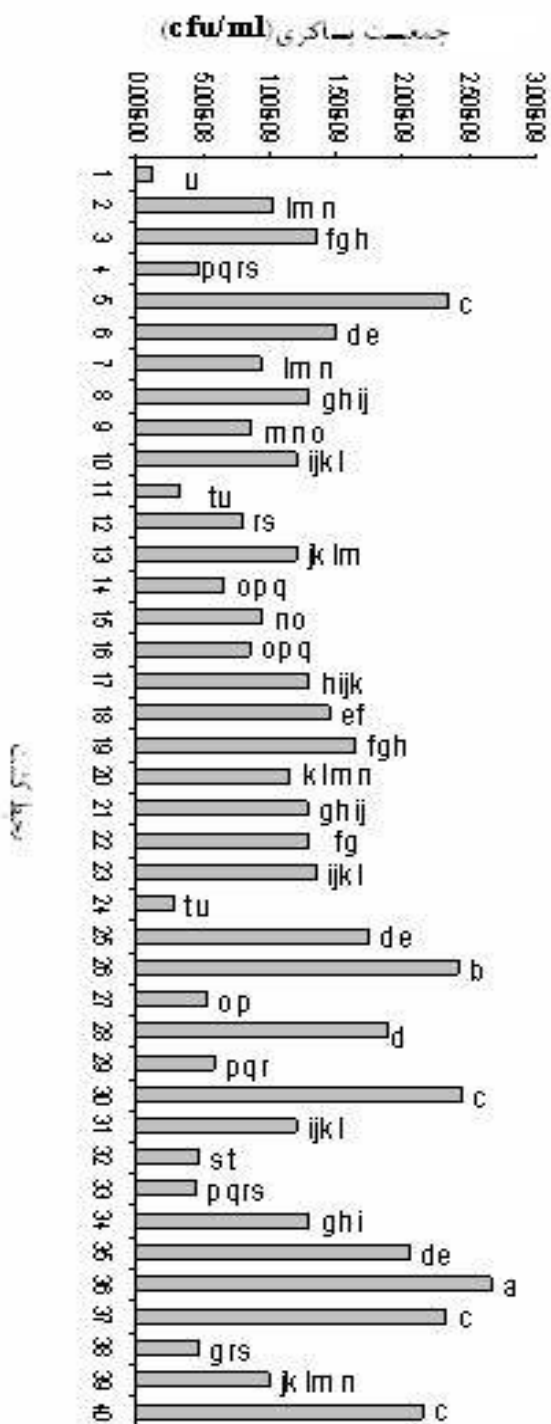
#### اثر ترکیب محیط کشت روی فعالیت ضد قارچی *B. subtilis*

##### BS علیه *P. aphanidermatum*

نتایج حاصل از آزمون F نشان داد که فعالیت ضد قارچی استرین *B. subtilis* در محیط‌های کشت مختلف علیه *P. aphanidermatum* در مقایسه با شاهد در سطح یک درصد اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد (شکل ۲). در تیمارهای حاوی محیط‌های کشت عصاره سیب‌زمینی سویا همراه و بدون سولفات منگنز (کد ۳۶ و ۲۶)، گلوکز سویا مخمر (کد ۲۱) گلوکز سویا مخمر پیتون (کد ۲) و تریپتون سویا همراه و بدون سولفات منگنز (کد ۲۸ و ۸) به ترتیب با  $90/74$ ،  $82/59$ ،  $82/22$ ،  $79/63$ ،  $78/14$  و  $78/14$  درصد کاهش در رشد کلنی *P. aphanidermatum* نسبت به شاهد بیشترین فعالیت ضد قارچی را نشان دادند.

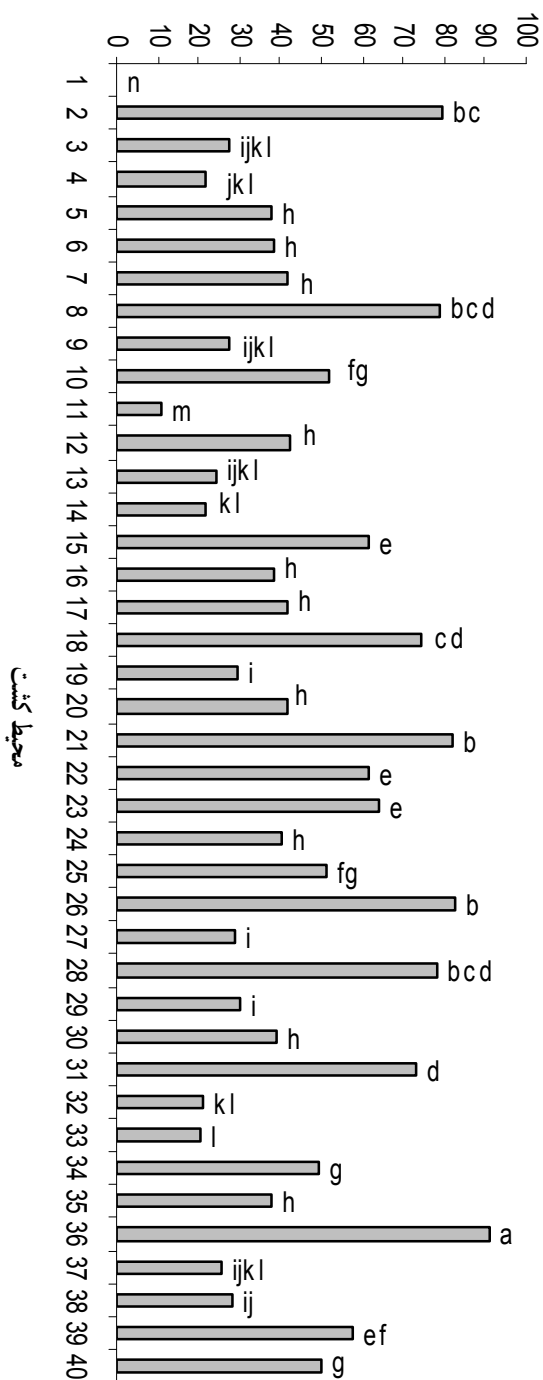
#### بحث

با توجه به بررسی‌های به عمل آمده در این تحقیق از میان ۴۰ محیط غذایی بررسی شده، محیط سیب زمینی سویا همراه و بدون سولفات منگنز (*PSB* و *PSBZ* کد ۳۶ و ۲۶)، با نسبت کربن به ازت، ۵ به ۱، هم از نظر میزان رشد سلولی و هم از نظر فعالیت ضد قارچی *B. subtilis* علیه *P. aphanidermatum* نتایج بهتری را نسبت به سایر محیط‌های کشت نشان داد. تاثیر سیب‌زمینی در میزان رشد سلولی و فعالیت ضد قارچی را می‌توان به نوع کربوهیدرات‌های موجود در ترکیب سیب‌زمینی و همچنین انواع ویتامین‌ها و عناصر معدنی مختلف به ویژه ریزمغذی‌های آن نسبت داد، زیرا در ترکیب سیب‌زمینی ۸۰ درصد آب و ۲۰ درصد ماده خشک وجود دارد که اجزاء ماده خشک شامل حدود ۱۶/۹ درصد کربوهیدرات، یک درصد پروتئین، یک درصد لیپید و یک درصد خاکستر می‌باشد و یکی از منابع عالی ویتامین‌های محلول در آب شامل تعدادی از ویتامین‌های گروه B، C و مقداری مواد معدنی بوئیه پتاسیم، فسفر، منگنز، کلسیم و سدیم محسوب می‌شود (۳) عصاره پودر سویا (Soy Meal) نیز حاوی ۲۷ درصد پروتئین و ۵۳ درصد کربوهیدرات می‌باشد (۶ و ۲۲). کاستا و همکاران (۴) نیز مصرف پودر



شکل ۱: مقایسه میانگین شاخص جمعیت باکتری *B. subtilis* BS در محیط‌های کشت حارای منابع مختلف کربن و ازت پس از ۴۸ ساعت تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند در آزمون ISD در سطح یک در صد دارای اختلاف معنی‌داری باشند. هر عدد میانگین سه تکرار می‌باشد.

در صد کاهش قطر کلونی قارچ



شکل ۲: مقایسه میانگین شاخص فعالیت ضد قارچی *B. subtilis* BS در محیط‌های کشت بر اساس درصد کاهش قطر کلنی *F. oxysporum* که با معروف مختلف نشان داده شده‌اند در آزمون LSD در سطح یکی درصد دارای اختلاف معنی دار با یکدیگر می‌باشد. هر عدد میانگین سه تکرار می‌باشد.

مخمر را بهترین منبع ازت در افزایش رشد سلولی *Bacillus* *circulans* معرفی نمودند (۱۶). لونا و همکاران (۲۱) رشد بهتر *B. subtilis* R14 در محیط کشت حاوی عصاره مخمر نسبت

محیط‌های ۸ و ۲۸ نیز که دارای تریپتون و سویا بوده‌اند نیز از نظر فعالیت ضدقارچی خوب عمل نمودند و با نتایج بررسی‌های خادمی و همکاران مطابقت دارد (۱۶) این محققین تریپتون و عصاره

*C. xerosis* به ترتیب در محیط‌های حاوی گالاکتوز و گلوکز قادر به تولید بیشترین ترکیبات آنتی‌بیوتیکی می‌باشند، در حالی که در محیط‌های حاوی ریبوز و لاکتوز کمترین فعالیت ضد میکروبی را از خود نشان دادند. در این تحقیق نیز مشخص شد که گلوکز منبع مناسبی برای افزایش تولید متابولیت‌های آنتی‌بیوتیکی می‌باشد. ملاس چغندر قند به عنوان تنها منبع کربن مورد استفاده در محیط‌های غذایی اثر متوسطی روی میزان رشد سلولی و فعالیت ضد قارچی استرین *B. subtilis* از خود نشان داد، با وجود اینکه ملاس حاوی ۴۷ تا ۵۰ درصد ساکارز و سایر قندهای کتوز و رافینوز و گالاکتینول، فروکتوز و گلوکز (به میزان خیلی کم) و همچنین پروتئین و عناصر معدنی و ویتامین می‌باشد و این غلظت بالای ساکارز قادر است به تنهایی بیومس بالایی را ایجاد نماید، ولی چون ملاس حاوی بعضی ترکیبات بازدارنده از رشد می‌باشد و همچنین قادر است pH محیط را اسیدی نماید، اثر آن نسبت به اثر عصاره سیب زمینی و گلوکز روی میزان رشد باکتری و فعالیت ضدقارچی آن ضعیف‌تر بوده است (۱۴). محیط‌های حاوی سبوس برنج و گندم با وجود دارا بودن کربوهیدرات و ازت، در هیچ یک از موارد اثر خوبی روی رشد و فعالیت ضد قارچی باکتری نشان ندادند، این امر را می‌توان به نامناسب بودن نوع و نسبت منابع کربن و ازت آنها نسبت داد. بررسی‌های البنا و پوسی (۷ و ۲۷) نیز نشان داده است که مصرف مناسب پپتون و تریپتون ۵ g/l تا ۶ عصاره پودر سویا ۱۵ ml/l، گلوکز ۲۰ تا ۲۵ g/l و عصاره سیب‌زمینی نیز ۲۵۰ g/l مناسب‌ترین ترکیب محیط غذایی برای *B. subtilis* و *Corynebacterium* spp. می‌باشد، و با نتایج به‌دست آمده در این تحقیق هم‌مانگی دارد. در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که میزان رشد و فعالیت ضد قارچی *B. subtilis* BS به میزان زیادی تحت تأثیر ترکیب محیط غذایی، به ویژه از نظر نوع و نسبت کربن و ازت می‌باشد (۱۷). مسلم است که ترکیب محیط غذایی بهینه از استرینی به استرین دیگر متفاوت است و لازم است در هر مورد، با توجه به جنبه‌های اقتصادی، مطالعات دقیقی روی نیازهای هر استرین صورت پذیرد تا مناسب‌ترین و اقتصادی‌ترین ترکیب برای تکثیر انبوه استرین مورد نظر مشخص گردد.

به محیط‌کشت حاوی اوره را نشان داده و علت آن را غنی بودن عصاره مخمر از آمینواسیدها، ویتامین‌ها و سایر فاکتورهای رشدی بیان نمودند. عصاره مخمر به دلیل دارا بودن تعداد زیادی آمینواسید، پپتید، ویتامین‌های محلول در آب و کربوهیدرات باعث افزایش رشد سلولی و تولید متابولیت‌های آنتی‌بیوتیکی می‌شود (۲۶)، این ترکیبات سوبسترای بسیار مناسبی برای میکروارگانیسم‌ها به‌شمار می‌روند (۳۰). مصرف عصاره مخمر در فرایندهای تجاری از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نمی‌باشد، ولی چون با غلظت اندک (۵ تا ۶ گرم در لیتر) افزایش رشد قابل توجهی را در میکروارگانیسم‌ها باعث می‌شود، در غالب موارد از آن استفاده می‌شود (۵ و ۲۱). پپتون و تریپتون نیز به دلیل دارا بودن اسیدهای آمینه ضروری به عنوان بهترین منابع ازت به ترتیب در تولید آنزیم آمیلاز در *B. licheniformis* SPT 27 (۶) و افزایش رشد سلولی در *B. circulans* MAS2 (۱۶) معرفی شده‌اند، منبع کربن در محیط‌های ۲، ۱۱، ۱۲ و ۲۱ گلوکز بوده و منبع ازت در محیط ۱۱ و ۱۲ سویا و در محیط ۲ و ۲۱ پپتون و مخمر بوده است، دو محیط اخیر از نظر فعالیت ضد قارچی خوب عمل نمودند، در حالی که دو محیط ۱۱ و ۱۲ از نظر میزان رشد سلولی و فعالیت ضد قارچی کمترین تأثیر را داشته‌اند، این امر را می‌توان به کمبود سایر ترکیبات موثر در رشد مانند پپتون و مخمر در محیط‌های ۱۱ و ۱۲ نسبت داد. با توجه به این نتایج می‌توان به اهمیت و تأثیر مخمر و پپتون در فعالیت ضد قارچی استرین *B. subtilis* پی برد. نتایج حاصل از نظر تأثیر گلوکز در فعالیت ضد قارچی با نتایج گالو و همکاران (۱۱)، هویک (۱۳)، اسلینینگر و همکاران (۳۰) و البنا (۷) مطابقت دارد. گالو و همکاران نشان دادند که سنتز متابولیت‌های ثانویه نظیر Actinomycin و آنزیم Phenoxazinone که خود در بیوسنتز آنتی‌بیوتیک‌ها مؤثر می‌باشند در حضور گلوکز در محیط‌کشت افزایش می‌یابند (۱۱). هویک (۱۳) گلوکز را به عنوان افزایش دهنده بیوسنتز آنتی‌بیوتیک Bacitracin در *Bacillus licheniformis* معرفی نموده است. اسلینینگر و همکاران (۳۰) در مورد *Pseudomonas fluorescens* 2-79 ثابت کرده‌اند که وجود گلوکز در محیط کشت باعث افزایش تولید آنتی‌بیوتیک فنازین می‌گردد. البنا (۷) بیان کرد که *Corynebacterium kutscheri*

## منابع

- ۱- اعتباریان ح. ر. ۱۳۸۱. بیماری‌های سبزی و صیفی و روش‌های مبارزه با آنها. چاپ دوم. انتشارات دانشگاه تهران. ۶۰۰ صفحه.
- ۲- حسن‌زاده ن. ۱۳۸۵. اصول و روش‌های باکتری شناسی گیاهی. چاپ دوم. مرکز انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی. ۶۴۱ صفحه.
- ۳- روشندل س، طاهری ع، بابایی ق. و مرشدی ع. ۱۳۸۵. مدیریت سلامت سیب‌زمینی. انتشارات هادیان. ۴۴۸ صفحه.
- 4- Bhattacharya B., Sushil P. and Sukanta S. 1998. Antibiotic production by *Streptomyces hygroscopicus* D 1.5: cultural effect. Rev. Microbiol., 29 (3). ISSN 0001-3714.
- 5- Costa E., Teixeira N., Usall J., Ares E. and Vinas I. 2001. Production of biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 using commercial products and by-products. Appli Microbil. Biotechnol., 56



- : 367-371.
- 6- Daharani Aiyer P.V. 2004. Effect of C:N ratio on alpha amylase production by *Bacillus licheniformis* SPT 27. *Afric. J. Biotechnol.*, 3 (10) : 519-522.
  - 7- El-Banna N.M. 2006. Effect of carbon source on the antimicrobial activity of *Corynebacterium kutscheri* and *Corynebacterium xerosis*. *Afric. J. Biotechnol.*, 5 (10) : 833-835.
  - 8- El-Banna N. 1989. Isolation and characterization of an antibacterial and antifungal antibiotic From *Bacillus subtilis*. M. Sc. Thesis. University of Jordan.
  - 9- El-Banna N. and Winkelmann G. 1998. Pyrrolnitrin from *Burkholderia cepacia*: antibiotic activity against fungi and novel activities against Streptomycetes. *J. Appl. Microbiol.*, 85 : 69-76.
  - 10- Emert E.A.B. and Handelsman J. 1999. Biocontrol of Plant disease: a (Gram) positive perspective. *FEMS Microbiol. Lett.*, 171 : 1-9.
  - 11- Gallo M., and Katz E. 1972. Regulation of secondary metabolite biosynthesis: Catabolite repression of phenoxazinone synthase and actinomycin formation by glucose. *J. Bact.*, 109 (2) : 659-667.
  - 12- Gouveia E.R., Baptista-Neto A., Azevedo A.G., Badino-Jr A.C. and Hokka C.O. 1999. Improvement of clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* in medium containing soybean derivatives. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 15 : 623-627.
  - 13- Haavik H. 1974. Studies on the formation of bacitracin in *Bacillus licheniformis*: effect of glucose. *J. General. Microbiol.*, 81 : 383- 390.
  - 14- Imrie F.K.E. 1969. Fermentation media. Sugarand molasses. *Process Biochem.*, Jan : 34-35.
  - 15- Kabaluk T., and Gazdic K. 2005. Directory of Microbial Pesticides for Agriculture and Agrifood. Canada., 242p.
  - 16- Kademi A., Fakhreddine L., Abdelkader N.A., and Barrati J.C. 1999. Effect of culture conditions on growth and esterase production by the moderate Thermophile *Bacillus circulans* MAS2. *Industrial Microbiol. Biotechnol.*, 23 : 188-193.
  - 17- Kilian M., Steiner U., Krebs B., Junge H., Schmiedeknecht G. and Hain R. 2000. FZB24® *Bacillus subtilis* mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer.*, 1/00 (1) : 72-93.
  - 18- Kloepper J.W., Ryu C.M. and Zhang S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathol.*, 94 : 1259-1266.
  - 19- Lewis J.A. 1991. Formulation and delivery systems of biocontrol agent with emphasis on fungi. In: Keister D.L., Cregan, P.B.(eds). *The rhizosphere and plant growth*. Kluwer. Rotterdam. : 279-287.
  - 20- Leclère V., Bechet M., Adam A., Guez J., Wathelet B., Ongena M., Thonart P., Gancel F. and Chollet-Imbert M. 2005. Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Appl. Envir and Microbial.*, 71 (8) : 4577–4584.
  - 21- Luna C.L., Mariano R.L.R. and Souto-Maior A.M. 2002. Production of a biocontrol agent for crucifers black rot disease. *Brazil J. Chemic. Engineer.*, 19 (02) : 133–140.
  - 22- Ma C.Y., Liu W.S., Kwok, K.C. and Kwok F. 1997. Isolation and characterization of proteins from soymilk residue (okara). *Food. Res. Int.*, 29 : 799–805.
  - 23- Mahadnanapuk S., Sanguanserm Sri M., Cutler R.W., Sardud V. and Anuntalabhochai S. 2007. Control of anthracnose caused by *Colletotrichum musae* on *Curcuma alismatifolia* Gagnep using antagonistic *Bacillus* spp.. *Amer. J. Agric. Biol. Sci.*, 2 (2) : 54-61.
  - 24- Manjula K. and Podile A.R. 2001. Chitin supplemented formulations improve biocontrol and plant growth promoting efficiency of *Bacillus subtilis* AF 1. *Cana. J. Microbiol.*, 47 : 618-625.
  - 25- Mizumoto S., Hirai M. and Shoda M. 2006. Production of lipopeptide antibiotic iturin A using soybean curd residue cultivated with *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72 : 869–875.
  - 26- Pepler H.J. 1982. Yeast extract. In: Rose AH (Ed) *Fermented foods*. Academic Press, London. : 293-312.
  - 27- Pusey, P.L., Hotchkiss, M.W., Dulmage, H.T., Baumgardner, R.A., Zehr, E.I., Reilly, C.C. and Wilson, C.L. 1988. Pilot tests for commercial production and application of *Bacillus subtilis* (*Bacillus subtilis*-3) for postharvest control of peach brown rot. *Plant Dis.*, 72 (7) : 622-626.
  - 28- Roitman J., Mahoney N. and Janisiewicz W. 1990. Production and composition of phenylpyrrole metabolites produced by *Pseudomonas cepacia*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34 : 381-386.
  - 29- Schaad N.W. and Jones J.B. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3 th



- ed. The Americ. Phytopathol., Soc. St. Paul. MN. USA., 373pp.
- 30- Slininger P. and Shea-Wilbur M. 1995. Liquid-culture pH, temperature, and carbon (not nitrogen) source regulate phenazine productivity of take all biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2-79. Appl. Microbiol Biotechnol., 43 : 794-800.
- 31- Smith T.J., Hillier A.j. and Lee G.J. 1975. The nature of stimulation of the growth of *Streptococcus lactis* by yeast extract. J. Dairy Res., 42 : 123-138.
- 32- Shimei Wu., Zhong J. and Huan L. 2006. Genetics of subpeptin JM4-A and subpeptin JM4-B production by *Bacillus subtilis* JM4. Biochemic. Biophysic. Res. Com., 344 : 1147-1154.
- 33- Yoshii H., Furuta T., Maeda H. and Mori H. 1996. Hydrolysis kinetics of okara and characterization of its water-soluble polysaccharides. Biosci. Biotechnol. Biochem., 60 : 1406-1409.
- 34- Niknejad K.M. 2004. Biological control of *Rhizoctonia solani*, the causal agent of rice sheath blight by antagonistics bacteria in greenhouse and field conditions. Plant Pathol. J. 3 (2) : 88-96.
- 35- <http://www.tnau.ac.in/notesbscag/notestry/aen/PAT421.doc>.