نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۴، شماره ۱، بهار ۱۳۸۹، ص ۶۱-۵۳

Journal of Plant Protection
Vol. 24, No. 1, Spring 2010, p. 53-61

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

فاطمه صفری اصل[1*] - حمید روحانی[2] - ماهرخ فلاحتی رستگار[3] - وحید جهانبخش[4]

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، سبوس برنج و گندم، و ازت شامل: پپتون، عصاره مخمر و سویا بود. میزان رشد باکتری بعد از ۴۸ ساعت با شمارش تعداد باکتری توسط لام هموسیتومتر تعیین گردید. اثر ضد قارچی محیطهای کشت حاوی باکتری روی *Pythium aphanidermatum* با اندازه‌گیری رشد کلنی پیتیوم 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 به۴۰ 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 $۲/۴۶\times۱۰^{۹}$ و $۲/۲۷\times۱۰^{۹}$ سلول باکتری در هر میلی‌لیتر به عنوان بهترین محیطها از نظر رشد باکتری شناسائی شدند. از نظر فعالیت ضدقارچی علیه قارچ مذکور نیز همین محیطها، به ترتیب با۹۰/۷۴ 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*، *aphanidermatum* *Pythium*

مقدمه

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 محیط‌کشت 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 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، Fengymycin، Surfactin، Mycobacilin، Bacilysin، 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، ۲۳و۳۰). 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،

۱، ۲، ۳ و۴- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استاد، استاد و مربی گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(* - نویسنده مسئول: Email: f.safariasl@gmail.com)

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 آبجو (Dry Beer Yeast)، پودر سویا، ساکارز و ملاس چغندرقند را به ترتیب بهترین منابع ازت و کربن جهت تکثیر انبوه *Pantoea agglomerans* CPA-2 معرفی کردند، بیشترین میزان رشد سلولی در این منابع ۲×۱۰^{۹} و ۴×۱۰^{۹} سلول باکتری در هر میلی‌لیتر (cfu) گزارش شده است. در محیط NYDB (Nutrient Yeast Extract Dextrose Broth) میزان رشد سلولی *B. subtilis* B-3 به میزان ۲×۱۰^{۹}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، ترپیتون 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 تائید 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 به‌کار 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. aphanidermathum* از بانک ژن بیماری شناسی گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه گردید و در محیطهای PDA و CMA کشت و نگهداری گردید.

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 برگیرنده عناصر معدنی برای تمام محیطهای کشت به طور یکسان بود (به‌جز 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 ازعبور از پارچه ململ حجم عصاره آنها با آب مقطر به یک لیتر رسانده شد.

تعیین جمعیت باکتری در محیط‌های کشت

برای این منظور۱۰۰ میلی‌لیتر ا 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 $۲/۱\times۱۰^{۶}$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 هموسیتومتر 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* BS 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 تشتک‌پتری 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. aphanidermathum* 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 و۳۴). آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴۰ تیمار (محیط‌کشت) و ۳ تکرار اجرا گردید.

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

کد محیط	علامت اختصاری	منابع (میزان مصرف در لیتر)	
		کربن	ازت
۱	شاهد	محیط آماده آگار مغذی مایع(NB) ۸ g	
۲	GS_1PY	گلوکز۲۵g	عصاره سویا۱۵ml، پپتون ۵g، مخمر۶g
۳	$M_1S_3N_1Y$	ملاس۱۰g، نشاسته۵g،	عصاره سویا۵۰ml، مخمر۶g
۴	$M_1S_4N_1$	ملاس۱۰g، نشاسته۵g،	عصاره سویا۱۰۰ml
۵	PDBY	عصاره سیب‌زمینی، دکستروز۲۰g	مخمر۶g
۶	$PDBPS_2$	عصاره سیب‌زمینی، دکستروز۲۰g	پپتون۵g، عصاره سویا۳۰ml
۷	$R_1M_2N_1$	عصاره سبوس برنج۱۰۰۰ml، ملاس۲۵g، نشاسته۵g	
۸***	TSB	محیط آماده تریپتون سویا	
۹**	$W_1M_2N_1$	عصاره سبوس گندم۱۰۰۰ml، ملاس۲۵g، نشاسته۵g	
۱۰	$W_2M_2N_1Y$	عصاره سبوس گندم۵۰۰ml، ملاس۲۵g، نشاسته۵g	مخمر ۶g
۱۱	GS_1	گلوکز ۲۵ g	عصاره سویا ۱۵ ml
۱۲	GS_2	گلوکز ۲۵g	عصاره سویا ۳۰ml
۱۳	$M_1S_3N_1P$	ملاس ۱۰g	عصاره سویا۵۰ml، نشاسته ۵g، پپتون ۵ g
۱۴	$M_1S_4N_2$	ملاس ۱۰g	عصاره سویا۱۰۰ml، نشاسته ۱۰ g
۱۵	WhM_2N_1	تفاله سبوس گندم ۵۰ g، ملاس ۲۵ g	
۱۶	$PDBS_2$	عصاره سیب‌زمینی، دکتروز۲۰g	عصاره سویا ۳۰ ml
۱۷	$R_1M_2N_1Y$	عصاره سبوس برنج۱۰۰۰ml، ملاس ۲۵ g، نشاسته۵g	مخمر ۶ g
۱۸***	TSBD	دکستروز ۲۰ g	محیط آماده تریپتون سویا
۱۹	$W_1M_2N_1Y$	عصاره سبوس گندم۱۰۰۰ml، ملاس ۲۵، g نشاسته g	مخمر ۶ g
۲۰	WhM_2	تفاله سبوس گندم ۵۰ g، ملاس ۲۵ g	
۲۱	GS_1Y	گلوکز ۲۵ g	سویا ۱۵ ml، مخمر ۶ g
۲۲	M_1Y	ملاس ۲۵ g	مخمر ۶ g
۲۳	$M_1S_3N_1PY$	ملاس ۲۵ g، نشاسته۵g	عصاره سویا۵۰ml، ، پپتون۵g، مخمر۶ g
۲۴	N_2S_2	شاسته۱۰ g	عصاره سویا ۳۰ ml
۲۵	PDBP	عصاره سیب‌زمینی، دکستروز۲۰g	پپتون ۵g
۲۶***	PSB	عصاره سیب‌زمینی	عصاره سویا ۱۵ ml
۲۷	$R_2M_2N_1$	عصاره سبوس برنج۵۰۰ml، ملاس ۲۵g، نشاسته۵g	
۲۸*	TSBZ	محیط آماده تریپتون سویا	
۲۹	$W_2M_2N_1$	عصاره سبوس گندم۵۰۰ml، ملاس ۲۵ g، نشاسته۵g	
۳۰	PDBPY	عصاره سیب‌زمینی، دکستروز۲۰g	پپتون ۵g، مخمر ۶ g
۳۱	GS_1P	گلوکز ۲۵ g	عصاره سویا ۱۵ ml، پپتون ۵ g
۳۲	$M_1S_3N_1$	ملاس ۲۵g، نشاسته ۵ g	عصاره سویا ۵۰ ml،
۳۳	$M_1S_3N_2$	ملاس ۲۵g، نشاسته ۱۰ g	عصاره سویا ۵۰ ml
۳۴	PDB	عصاره سیب‌زمینی، دکتروز۲۰g	
۳۵	$PDBPYS_2$	عصاره سیب‌زمینی، دکتروز۲۰g	پپتون۵ g، مخمر ۶ g عصاره سویا ۳۰ ml
۳۶*	PSBZ	عصاره سیب‌زمینی	عصاره سویا ۱۵ ml
۳۷	$R_2M_2N_1Y$	عصاره سبوس برنج۵۰۰ml، ملاس ۲۵ g، نشاسته ۵ g	مخمر ۶ g
۳۸	$W_1M_2N_1$	عصاره سبوس گندم۱۰۰۰ml، ملاس ۲۵ g، نشاسته ۵ g	
۳۹**	$W_2M_2N_1$	عصاره سبوس گندم۵۰۰ml ملاس ۲۵ g، نشاسته ۵ g	
۴۰	$PDBYS_2$	عصاره سیب‌زمینی، دکستروز۲۰g	مخمر ۶ g عصاره سویا ۳۰ ml

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

۱۰۰ × [(قطر کلنی قارچ در تشتک پتری شاهد/ قطر کلنی قارچ در تشتک پتری تیمار)-۱] = درصد کاهش قطر کلنی قارچ

محاسبات آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها بوسیله ۲ نـرم افـزار MINITAB13 و MSTATC. و مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمـون LSD در سطح ۱ و ۵ درصد صورت گرفت.

نتایج و بحث

اثر ترکیب محیط کشت روی جمعیت باکتری

با توجه به نتایج حاصل از آزمون F، در میان محیط‌های غـذایی مختلف اختلاف معنی‌داری در سـطح یـک درصـد مشـاهده گردیـد.

محیط‌های عصاره سیب‌زمینی سویا همرا و یا بدون سولفات منگنز (کد۳۶ و ۲۶)، عصاره سیب‌زمینی دکستروز پپتون مخمر (کد۳۰)، عصاره سیب‌زمینی دکستروز مخمر سویا (کد۴۰)، عصاره سیب‌زمینی دکستروز مخمر(کد۵) و عصاره سبوس برنج ملاس نشاسته و مخمر (کد۳۷) به ترتیب با $۲/۴۶\times۱۰^{۹}$، $۲/۲۷\times۱۰^{۹}$، ۲×۱۰^{۹}، $۱/۹۵\times۱۰^{۹}$، $۱/۹۰\times۱۰^{۹}$ و $۱/۸۶\times۱۰^{۹}$ 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).

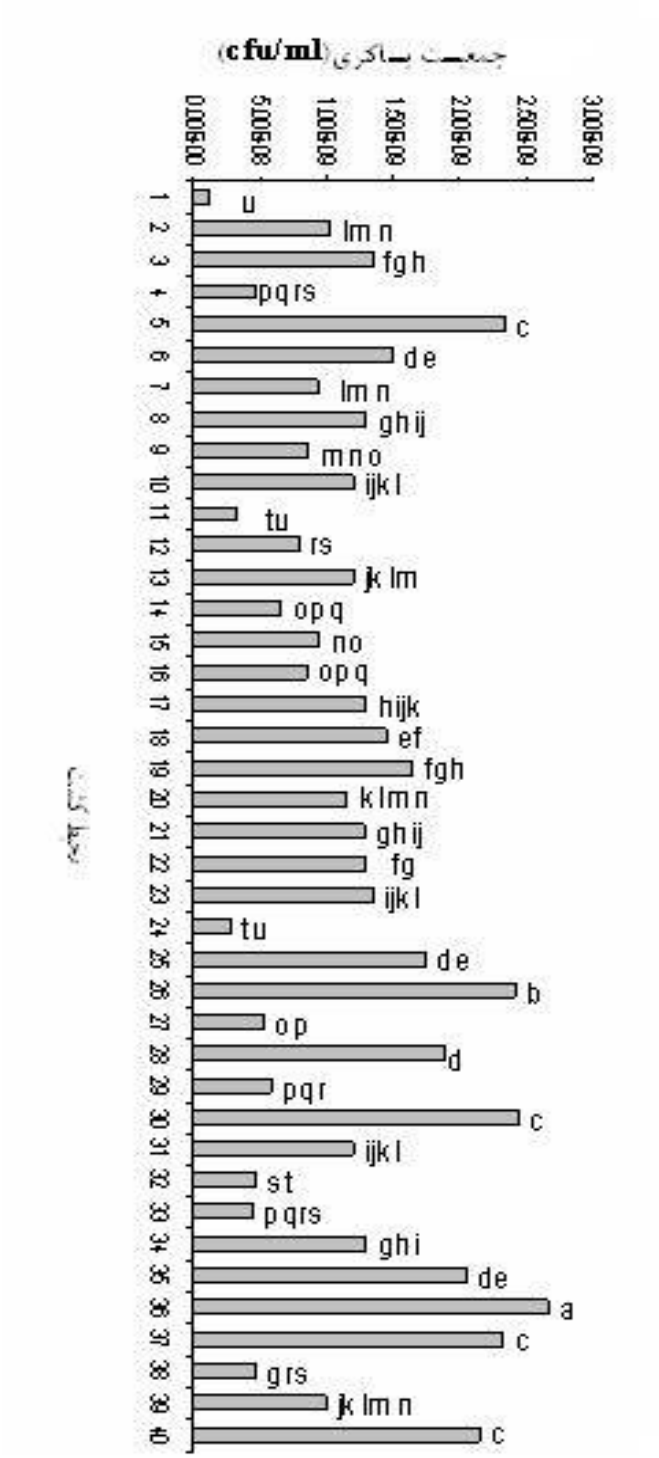
اثر ترکیب محیط کشت روی فعالیت ضد قارچی *B. subtilis* BS علیه *P . aphanidermatum*

نتایج حاصل از آزمون F نشان داد که فعالیت ضد قارچی استرین *B. subtilis* BS در محیط‌های کشت مختلف علیه *P. aphanidermathum* در مقایسه با شاهد در سطح یک درصد اختلاف معنی‌داری را نشان می دهد (شکل ۲). در تیمارهای حاوی محیط‌های‌کشت عصاره سیب‌زمینی سویا همراه و بدون سولفات منگنز (کد۳۶ و ۲۶)، گلوکز سویا مخمر(کد ۲۱) گلوکز سویا مخمر پپتون (کد ۲) و تریپتون سویا همراه و بدون سولفات منگنز(کد ۲۸ و ۸) به ترتیب با ۹۰/۷۴، ۸۲/۵۹، ۸۲/۲۲، ۷۹/۶۳، ۷۸/۸۹و ۷۸/۱۴ درصد کاهش در رشد کلنی *P. aphanidermathum* نسبت به شاهد بیشترین فعالیت ضد قارچی را نشان دادند.

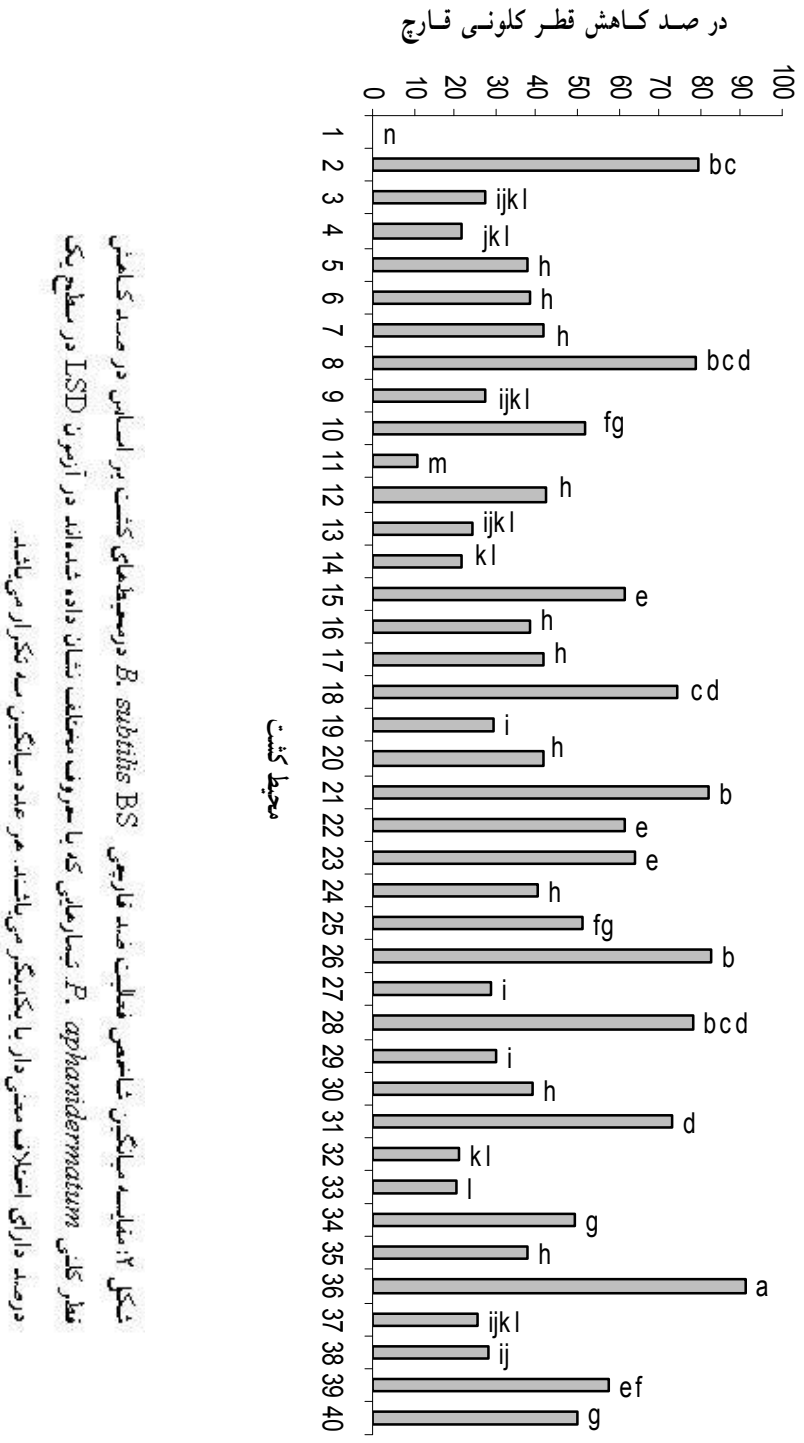
بحث

با توجه به بررسی‌های به عمل آمده در این تحقیق از میان ۴۰ محیط‌غذایی بررسی شده، محیط سیب زمینی سویا همراه و بدون سولفات منگنز (PSBZ و PSB 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* BS علیه *P. aphanidermatum* نتایج بهتری را نسبت به سایر محیط‌های‌کشت نشان داد. تاثیر سیب‌زمینی در میزان رشد سلولی و فعالیت ضد قارچی را می‌توان به نوع کربوهیدارت‌های 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 بویژه پتاسیم، فسفر، منگنز، کلسیم و سدیم محسوب می‌شود (۳) عصاره پودر سویا (Soy Meal) نیز حاوی ۲۷درصد پروتئین و ۵۳ درصد کربوهیدرات می‌باشد (۶ و ۲۲). کاستا و همکاران (۴) نیز مصرف پودر 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 *Penicilium 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 (۹۲۰mg/l) حالتی که از پودر سویا استفاده شده بود (۳۰۰–۳۵۰mg/l) رسانده است (۱۲). سولفات منگنز نیز روی رشد و فعالیت ضد میکربی *B. subtilis* BS اثر مثبت نشان داد، به‌طوری‌که تیمارهای حاوی این ماده معدنی ازنظر میزان رشد و فعالیت آنتی‌بیوتیکی در گروه a و آنهایی که فاقد آن بودند در گروه b قرار گرفتند. سولفات‌منگنز نیز در کارهای دیگران به عنوان محرک تولید آنتی‌بیوتیک و افزایش جمعیت در میکروارگانیسم‌ها معرفی شده است (سایت DSMZ). این ترکیب احتمالا در فعالیت آنزیمی باکتری ها 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 به‌جز محیط ۱۶ بیش از $۱/۱۱\times۱۰^{۹}$ 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 پپتون، و مخمر و سویا به عنوان منبع ازت بوده‌اند، در نتیجه نسبت کربن به ازت آنها نسبت به محیط‌های غذایی سیب زمینی سویا (کدهای ۳۶و 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* BS می‌باشد.

محیط‌های ۴۰ و ۵ نیز از نظر میزان رشد سلولی و محیط ۲۱ از نظر فعالیت ضدقارچی نتایج خوبی نشان دادند. در این محیط‌ها ازعصاره 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 ضدقارچی علیه *Penicilium italicum* و *P. digitatum* به ترتیب با ۷۷ و ۶۶ درصد بازدارندگی از رشد آنها مؤثر بوده است (۵).



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



شکل ۲: مقایسه میانگین خاصیت فعالیت ضد قارچی *B. subtilis* BS درمحیط‌های کشت بر اساس درصد کاهش قطر کلنی *P. aphanidermatum* بیمارگرهایی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند در آزمون LSD در سطح یک درصد دارای اختلاف معنی دار با یکدیگر می‌باشند. هر عدد میانگین سه تکرار می‌باشد.

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 مخمر را بهترین منبع ازت در افزایش رشد سلولی *Bacillus circulans* MAS2 معرفی نمودند (۱۶). لونا و همکاران (۲۱) رشد بهتر *B. subtilis* R14 در محیط کشت حاوی عصاره مخمر نسبت

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 به‌دلیل 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 میکروارگانسم‌ها باعث می‌شود، درغالب موارد از آن استفاده می‌شود (۵ و۲۱). 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 تاثیر 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 تاثیر مخمر و پپتون در فعالیت ضد قارچی استرین *B. subtilis* پی برد. نتایج حاصل از نظر تاثیر 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* و *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 چغندرقند 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 ضعیف‌تربوده 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 g/l تا ۲۵ 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 هماهنگی دارد.

در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که میزان رشد و فعالیت ضد قارچی *B. subtilis* BS به میزان زیادی تحت تاثیر 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.

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- Bhattachryya 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., Teixido N., Usall J., Atares 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. Biotecnol., 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- Lecle`re V., Be´chetM., 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- Mahadtanapuk S., Sanguansermsri M., Cutler R.W., Sardsud 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- Peppler 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.