Journal of Microbial World
Volume 16, No. 2, September 2023

Original Article

Effect of antagonistic bacterial agents isolated from the pistachio orchards on *Aspergilus* flavus

Saeedeh Dehghanpour Farashah[1], **Mehrdad Salehzadeh**[2]

[1]Assistant professor, Department of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran.
[2]Ph.D student of plant pathology, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

Abstract

Background &Objectives: Aflatoxin in pistachios and some other foods and feeeds causes diseases in human and animals. *Aspergillus* flavus has been reported as an important producer of aflatoxin. In this research, antagonistic bacterial agents were isolated from pistachio orchards in Yazd province, Iran, and their antagonistic properties were investigated on *A. flavus* isolates.

Materials & Methods: Different isolates of Bacillus sp. and *Aspergillus* sp. were isolated from different pistachio orchards in Yazd. *A. flavus* species were identified and various biochemical and molecular characteristics of bacterial isolates were investigated. Also, the antibiosis properties and production of antibiotics and effect of extracellular secretion, antifungal volatile substances and siderophore of the isolates were evaluated on *A. flavus*.

Results: According to the results of biochemical and molecular tests, all isolates were identified as *Bacillus*. Strain Pr3 had the most effect with 95% and strains Pr5 and Pr7 had the least effect on *A. flavus* with 50%. The results of the antibiotic production test using chloroform method showed that isolates Pr3 and Pr7 had the highest and lowest antibiotic production with 84.35 and 38%, respectively. In this study, isolates Pr1, Pr2, Pr3 and Pr9 significantly produced extracellular secretion, siderophore and antifungal volatile substances and showed different amounts of effect on *A. flavus*.

Conclusion: According to the results obtained from this research and the findings of other related researches, different *Bacillus* species and their metabolites have high antagonistic properties against *A. flavus*, which can be used as an effective and promising method to inhibit the growth of the fungus and to prevent the production of aflatoxin.

Keywords: Aflatoxin, Antibiosis, *Bacillus*, Metabolite, Siderophore.

Received: 27 February 2023 Revised: 11 July 2023 Accepted: 1 September 2023

Correspondence to: Saeedeh Dehghanpour Farashah
Tel: +98 9132590842
E-mail: sdfarashah@pnu.ac.ir
Journal of Microbial World 2023, 16 (2): 143 - 155
DOI:10.30495/jmw.2023.1968442.2038

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال شانزدهم شماره دوم (پیاپی ۵۵) تابستان ۱۴۰۲
صفحات ۱۵۵-۱۴۳

Original Article

تاثیر عوامل باکتریایی آنتاگونیست جداشده از باغات پسته روی قارچ *آسپرژیلوس فلاووس*

سعیده دهقانپور فراشاه[1*]، مهرداد صالح‌زاده[2]

[1]استادیار، گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.
[2]دانشجو دکتری، گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: آفلاتوکسین در پسته و انواع مواد غذایی سبب بروز مشکلات و بیماری در افراد می‌شود. گونه *آسپرژیلوس فلاووس* به‌عنوان تولید کننده مهم آفلاتوکسین گزارش شده است. در این پژوهش عوامل باکتریایی آنتاگونیست از باغات پسته استان یزد جداسازی و میزان خاصیت آنتاگونیستی آن‌ها روی قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* بررسی شد.

مواد و روش‌ها: جدایه‌های مختلف *باسیلوس* و *آسپرژیلوس* از باغات پسته استان یزد جداسازی و گونه‌های *آسپرژیلوس فلاووس* شناسایی شدند. خصوصیات مختلف بیوشیمیایی و مولکولی جدایه‌های باکتریایی مورد بررسی قرار گرفت. همچنین خاصیت آنتی‌بیوزی و تولید آنتی‌بیوتیک و تاثیر عصاره خارج‌سلولی، مواد فرار ضدقارچی و سیدروفور جدایه‌ها روی *آسپرژیلوس فلاووس* ارزیابی شد.

یافته‌ها: بر اساس نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی، همه جدایه‌ها از جنس باسیلوس تشخیص داده شدند. سویه Pr 3 با ۹۵ درصد بیشترین تأثیر و سویه‌های Pr 5 و Pr 7 با ۵۰ درصد کمترین تأثیر را روی *آسپرژیلوس فلاووس* داشتند. نتایج حاصل از آزمون تولید آنتی‌بیوتیک به‌روش کلروفرم نشان داد که جدایه‌های Pr3 و Pr7 به‌ترتیب با ۸۴/۳۵ درصد و ۳۸ درصد بیشترین و کمترین میزان تولید آنتی‌بیوتیک را داشتند. در این پژوهش، جدایه‌های Pr1، Pr2، Pr3و Pr9 به‌صورت معناداری مایع خارج‌سلولی، سیدروفور و مواد فرار ضدقارچی تولید کردند و سطوح متفاوتی از تأثیر را روی *آسپرژیلوس فلاووس* نشان دادند.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش و یافته‌های سایر محققان، گونه‌های مختلف *باسیلوس* و متابولیت‌های آن‌ها دارای خاصیت آنتاگونیستی بالایی روی قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* پسته هستند که می‌توانند به‌عنوان روشی با آینده روشن و موثر برای بازدارندگی رشد این قارچ و جلوگیری از تولید آفلاتوکسین به‌کار روند.

واژگان کلیدی: آفلاتوکسین، آنتی‌بیوز، *باسیلوس*، متابولیت، سیدروفور.

دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۱۲/۸ ویرایش مقاله: ۱۴۰۲/۴/۲۰ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۶/۱۰

مقدمه

پسته با نام علمی *پیستاسیا ورا* گیاهی نیمه‌گرمسیری از خانواده پسته یا کازو (آناکاردیاسه) از راسته افرا است که در سال ۱۷۳۷ میلادی توسط لینه نام‌گذاری شد. پسته‌های آلوده به آفلاتوکسین باعث بروز مشکلات و بیماری در انسان می‌شود. عمده‌ترین آفلاتوکسین‌ها شامل آفلاتوکسین‌های B_1 ، B_2، G_1 و G_2، می‌باشند (۱). تاکنون جدایه‌های متعددی از قارچ‌های *پنیسیلیوم*، *آسپرژیلوس*، *رایزوپوس*، *کلادوسپوریوم* و *کاتومیوم* به‌عنوان تولیدکننده اصلی آفلاتوکسین گزارش شده‌اند. گونه‌های مختلف *آسپرژیلوس* قادر به تولید میکوتوکسین‌های

*) آدرس برای مکاتبه: گروه کشاورزی دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.
تلفن: ۰۹۱۳۲۵۹۰۸۴۲ پست الکترونیک: sdfarashah@pnu.ac.ir

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

متعددی هستند که گونه‌های *آسپرژیلوس فلاووس*، *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* (*A. parasiticus*)، *آسپرژیلوس نومیوس* (*A. nomius*)، *آسپرژیلوس سودوتاماری* (*A. pseudotamari*)، *آسپرژیلوس بامبیسیس* (*A. bombycis*) و *آسپرژیلوس اکراسئوس* (*A. ochraceus*) به‌عنوان تولیدکننده‌های مهم آفلاتوکسین گزارش شده‌اند (۲و۳). از سال ۱۹۷۱ که آمریکا بخشی از پسته‌های صادراتی ایران و ترکیه را به‌دلیل آلودگی به آفلاتوکسین توقیف نمود، موضوع آفلاتوکسین و اهمیت آن در صنایع غذایی به‌خصوص محصولات خشکباری بیشتر مورد توجه قرار گرفت. مجتهدی و همکاران (۱۹۷۸) گزارش کردند که آلودگی میوه‌های پسته به قارچ‌های تولیدکننده آفلاتوکسین (*آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس پارازیتیکوس*) از باغ شروع می‌شود و پس از برداشت و در موقع درجه‌بندی پسته‌ها با آب، میزان آلودگی به اسپور قارچ‌های مزبور به‌ویژه *آسپرژیلوس فلاووس* به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابند (٤). واژه آنتاگونیسم نخستین بار توسط روبرت در سال ۱۷۸٤ بیان گردید. وی در بررسی‌های خود اثر آنتاگونیستی برخی از میکروارگانیزم‌ها را در محیط کشت مایع بین پنیسیلیوم *گلوکانوم* (*Penicillium glucanum*) و باکتری‌ها نشان داده بود. سانفورد در سال ۱۹۲٦ اولین کسی بود که به رقابت غذایی بین عوامل پوسیده‌خوار و عوامل بیماری‌زا در آغاز آلودگی پی برد. او مشاهده کرد که افزودن مواد آلی(کاه) به خاک موجب کاهش آلودگی سیب زمینی به بیماری اسکب سیب‌زمینی ناشی از *استرپتومایسز اسکبیس* (*Streptomyces scabies*) می‌شود. او در یافت که این پدیده به سبب اثرات آنتاگونیستی عوامل پوسیده خوار است. آنتاگونیست‌ها با تولید آنتی‌بیوتیک باعث کشتن عوامل بیماری‌زا و حذف آن‌ها می‌شوند. پاره‌ای از آنتاگونیست‌ها با اشغال فضای لازم بیمارگر را از صحنه خارج نموده و از استقرار آن بر گیاه میزبان جلوگیری نموده و به این صورت گیاه را در مقابل آلودگی محافظت می‌کنند. در روش‌های بیولوژیکی از میکروارگانیسم‌های مفید یا آنزیم‌ها برای تجزیه یا غیرفعال کردن آفلاتوکسین‌ها یا در برخی موارد برای جذب مایکوتوکسین‌ها استفاده می‌شود. با این‌حال، باکتری‌ها به دلیل مزایایی مانند حذف بیشتر در مدت زمان کوتاه‌تر و عدم تولید رنگدانه، کاربرد بیشتری برای حذف آفلاتوکسین‌ها دارند (۷). باکتری‌های اسیدلاکتیک مانند لاکتوباسیلوس و *ساکارومایسس سرویزیه* (*Saccharomyces cerevisiae*) از جمله بیشترین موارد مطالعه شده برای بررسی این فرآیند به‌ویژه در محصولات و نوشیدنی‌های تخمیری، هستند (۱). بررسی‌ها نشان داده است که سویه *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (*Lactobacillus rhamnosus* GG) و LC-705 به‌ترتیب ۷۸/۹۰ درصد و ۷٦/۵۰ درصد با AFB1 باندشده و پس از پنج‌بار شست‌وشو تا ۷۲ درصد از آفلاتوکسین B1، باندشده به دیواره باکتری باقی مانده است (٦). در پژوهش دیگری مشخص شد که باکتری‌های *نوکاردیا کورینه باکتریویدز* (*Nocardia corynebacterioides* DSM12.676)، *رودوکوکوس اریتروپلیس* (*Rhodococcus erythropolis*،DSM20.151)، *مایکوباکتریوم فلورانتنیورنس* (*Mycobacteriumfluoranthenivorans* DSM 44.556) و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* (*Bifidobacterium lactis*) به‌طور مؤثری قادر به تجزیه آفلاتوکسین هستند (۷). بررسی اثر عصاره خارج‌سلولی *N. corynebacterioides* DSM12.676 روی آفلاتوکسین B1 نشان داد که این عصاره پس از ٢٤ ساعت، ٦۰ درصد آفلاتوکسین را تجزیه کرده درحالی‌که عصاره خارج‌سلولی *نوکاردیا کورینه باکتریویدز* (*N.corynebacterioides* DSM20.151) حدود ۹۰ درصد آفلاتوکسین B_1 را تجزیه نموده بود. عصاره خارج‌سلولی *مایکوباکتریوم فلورانتنیورنس* (*M. fluoranthenivorans*) بیش از ۹۰ درصد آفلاتوکسین را در طی ٤ ساعت تجزیه کرد و پس از ۸ ساعت آفلاتوکسینی در محیط وجود نداشت (۸). آلبرتز و همکاران (۲۰۰٦) گزارش کردند که در حضور *رودوکوکوس اریتروپلیس* (*R. erythropolis*) به‌مدت ۷۲ ساعت، ٦٦ درصد آفلاتوکسین B_1 تجزیه شد (۹). نتایج بررسی‌ها نشان داده است که باکتری‌های *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا* (*Stenotrophomonas maltophilia*) و جدایه باسیلوس به‌ترتیب با ۸۲ درصد و ۸۰ درصد کاهش کومارین در تجزیه

کومارین و آفلاتوکسین B_1 نقش دارند. در میان باکتری‌ها، باسیلوس‌ها به دلیل تحمل بالا به تنش‌های محیطی مختلف و کاربرد آن‌ها به‌عنوان نوعی پروبیوتیک بالقوه، مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند (۱۰). سومارتیا (۱۹۹۷) نشان داد که استفاده از *باسیلوس سوبتیلیس باعث* کاهش میزان آفلاتوکسین در بادام زمینی‌های آلوده به *آسپرژیلوس فلاووس* می‌شود (۱۱). یافته‌ها مشخص کرد که یک‌سری ترکیبات ضدقارچی توسط سویه *باسیلوس سوبتیلیس* (*B. subtilis* B-FS06) تولید می‌شود که از رشد *آسپرژیلوس فلاووس* جلوگیری می‌کند. احتمال داده شده است که ترکیباتی از قبیل Bacillomycin D باعث این فعالیت می‌شود (۱۲). موین و همکاران (۲۰۰۱) دو آنالوگ Bacillomycin D تولیدشده توسط جدایه *باسیلوس سوبتیلیس* (*B. subtilis* AU195) را خالص و مشاهده نمودند که این دو ترکیب فعالیت بازدارندگی از رشد *آسپرژیلوس فلاووس* را دارند (٦). اونو و کیمورا (۱۹۹۱) گزارش کردند که Iturin تولیدشده توسط *باسیلوس سوبتیلیس* قادر به جلوگیری از تولید آفلاتوکسین حاصل از *آسپرژیلوس فلاووس* است (۱۳). چودهاری (۱۹۹۲) مشاهده کرد که آنتی‌بیوتیک ایتورین تولیدشده به‌وسیله سویه *باسیلوس پومیلوس* (*B. pumilus* HY1) از رشد قارچ‌های تولیدکننده آفلاتوکسین جلوگیری می‌کند (١٤). همچنین کاربرد *باسیلوس سوبتیلیس* روی ذرت ٤٨ ساعت قبل از آلودگی به *آسپرژیلوس فلاووس* در شرایط مزرعه، از آلوده شدن ذرت به آفلاتوکسین جلوگیری کرد (١٥). در پژوهشی دیگر سویه‌ای از *سودوموناس پوتیدا* (*Pseudomonas putida*) شدت بیماری‌زایی *آسپرژیلوس فلاووس* و میزان آغشتگی به آفلاتوکسین روی بادام‌زمینی را کاهش داد (١٦). در بررسی دیگر اثر سویه‌های باکتریایی *باسیلوس سوبتیلیس* (RCB 3,RCB 6)، *رالستونیا سولاناسه آروم* (*Ralstonia solanacearum* RCB 5) و *آمفی باسیلوس گزیلانوس* (*Amphibacillus xylanus* RCB27) را روی جدایه‌های *آسپرژیلوس* بخش فلاوی (*Aspergillus* section Flavi) بررسی نمودند. نتایج آن‌ها نشان داد که هر کدام از سویه‌های باکتریایی تحت شرایط محیطی خاصی قادر به کنترل *آسپرژیلوس* و کاهش آفلاتوکسین هستند (۱۷). با توجه به تاثیر باکتری‌ها بر کاهش رشد و تولید آفلاتوکسین توسط *آسپرژیلوس فلاووس*، در این پژوهش عوامل باکتریایی آنتاگونیست از باغات پسته استان یزد جداسازی شدند و میزان خاصیت آنتاگونیستی آن‌ها روی جدایه *آسپرژیلوس فلاووس* مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

الف) جداسازی قارچ‌های *آسپرژیلوس* و جدایه‌های باکتری: برای جداسازی قارچ‌های *آسپرژیلوس* و جدایه‌های باکتری از باغات پسته از دو روش زیر استفاده گردید:

۱- در این روش نمونه‌های جمع‌آوری شده شامل پسته‌های خشک ریخته شده پای درخت، پسته‌های روی درخت با پوست شکاف خورده، بدشکل، دارای لکه در پوست و ضایعات ترمینال‌های ضبط پسته، به‌طور مستقیم روی PDA (Potato Dextrose Agar) کشت شدند.

۲- در روش دوم برای به‌دست آوردن اسپورهای قارچ‌ها و جدایه‌های باکتری از سطح باغ، پلیت‌ها حاوی محیط کشت PDA در قسمت‌های مختلف باغ و در ارتفاعات متفاوت درخت حدود ۳۰ دقیقه قرار گرفت. نمونه‌ها در اواخر تابستان به‌هنگام رسیدگی کامل میوه‌ها جمع‌آوری شدند. سپس با بستن درب پلیت‌ها به آزمایشگاه منتقل و در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. جدایه‌های انتخاب شده به‌منظور انجام آزمایش‌های بعدی در آب مقطر استریل و در دمای یخچال (٤ درجه سلسیوس) نگهداری شدند. نمونه‌برداری از شهرستان‌های یزد، میبد، اشکذر، خاتم و مهریز صورت گرفت (جدول۱).

ب) شناسایی گونه‌های آسپرژیلوس: برای شناسایی گونه‌های *آسپرژیلوس* از سه محیط کشت MEA (Malt Extract Agar) (حاوی ۲۰ گرم عصاره مالت، یک گرم پپتون، ۲۰ گرم گلوکز و ۲۰ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر)، CYA (Czapek Yeast Extract Agar) (حاوی یک گرم دی پتاسیم هیدروکسی فسفات، ۱۰ میلی‌لیتر زاپکس غلیظ، پنج گرم

عصاره مخمر، ۳۰ گرم سوکروز و ۱۵ گرم آگار در یک‌لیتر آب مقطر) و CY20S (مانند محیط کشت CYA به استثنای این که در این محیط ۲۰۰ گرم سوکروز اضافه گردید) استفاده شد. در بررسی ماکروسکوپی قارچ‌ها، رنگ کنیدیوم‌ها، عمق، ساختار، نحوه چین‌خوردگی پرگنه و حضور یا عدم حضور قطراتی روی پرگنه و رنگ آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای شناسایی جدایه‌های *آسپرژیلوس* از کلیدهای شناسایی و منابع علمی استفاده شد (۱۸و۱۹).

جدول۱: نام جدایه‌های باکتری و محل جمع‌آوری.

ردیف	نام جدایه	محل جمع‌آوری
۱	Pr1	اشکذر- چرخاب
۲	Pr2	میبد- حسن آباد
۳	Pr3	خاتم- شهریاری
٤	Pr4	یزد(۱)
٥	Pr5	دهشیر- گاریزات
٦	Pr6	مهریز- منگاباد
۷	Pr7	اردکان- احمداباد
۸	Pr9	یزد(۲)

ج) بررسی خصوصیات بیوشیمیایی جدایه‌های باکتری: پس از ۲٤ ساعت رشد، از هر جدایه باکتری روی محیط کشت آگار مغذی برای رنگ‌آمیزی گرم استفاده شد. برای مشاهده تولید لوان محیط آگار مغذی به اضافه ٥ درصد ساکارز به‌کار رفت. پس از ۳ الی ٥ روز نگهداری در دمای ۲۸ درجه سلسیوس، تشکیل کلونی‌های لعاب‌دار و گنبدی شکل به‌عنوان تولید لوان تلقی گردید. هیدرولیز نشاسته توسط جدایه‌ها با افزودن ۰/۲ درصد نشاسته به محیط آگار مغذی بررسی شد. بعد از کشت باکتری، محیط‌ها به مدت پنج روز در دمای ۲۵ الی ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس محلول لوگل (ید در یدور پتاسیم) روی محیط کشت به اندازه‌ای ریخته شد که تمام سطح محیط کشت را فرا بگیرد. پیدایش هاله‌ای روشن در اطراف کلونی‌ها به‌عنوان نتیجه مثبت تلقی شد. از محیط کشت سیمون سیترات آگار (Simmons Citrate Agar) برای تعیین قدرت باکتری به‌عنوان تنها عامل کربن‌دار موجود در محیط استفاده شد. باکتری‌هایی که قادر به رشد در این محیط باشند در حقیقت می‌توانند از سیترات که تنها عامل کربن‌دار محیط است، استفاده کنند و در مجاورت معرف رنگی برومو‌تیمول‌بلو (Bromo Thymol Blue) به رنگ آبی درآیند. در غیر این‌صورت به‌علت عدم رشد باکتری و عدم تغییر رنگ محیط آزمایش سیترات منفی است.

د) بررسی خصوصیات مولکولی جدایه‌های باکتری: باکتری‌ها به‌مدت ۲٤ ساعت روی محیط کشت تکثیر شدند و سوسپانسیونی با غلظت حدود 10^{7}cfu/ml از هر باکتری در آب مقطر تهیه گردید. استخراج DNA ژنومی جدایه‌ها بر اساس روش پالو و همکاران (۲۰۰٦) انجام شد (۲۰). برای تعیین جایگاه فیلوژنتیکی از آغازگرهای مربوط به ناحیه 16srRNA شامل Fd2 (5`- AGA GTTTGA TCA TGG CTC AG-3`) و RP1 (5`- ACG GTT ACCTTG TTA CGA CTT -3`) استفاده شد و در طی انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز قطعه‌ای به طول ۱۵۰۰ جفت باز تکثیر شد (۲۱). قطعات حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای توالی‌یابی به شرکت سینوهه ارسال و قطعات حاصل از توالی‌یابی با نرم‌افزار Seqman (DNASTAR Inc., Madison, Wis.) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

ه) آنتی‌بیوز: پتانسیل مهار رشد قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* توسط باکتری‌های جداشده با آزمایش کشت همزمان در محیط کشت PDA با سه تکرار انجام شد. از پتری دیش‌های کشت شده با قارچ بدون باکتری به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. درصد ممانعت رشد توسط فرمول ۱ به‌دست آمد:

۱۰۰ * ((رشد قارچ بدون حضور باکتری/ رشدقارچ در حضور باکتری) - ۱) = درصد ممانعت رشد

و) بررسی تولید آنتی‌بیوتیک: این آزمون با استفاده از بخار کلروفرم مطابق روش والر و کوک (۱۹۸۳) با سه تکرار انجام شد (۲۲). در این روش، از محیط کشت (PDA+NA به نسبت ۱:۱) استفاده شد. شاهد در این آزمون پلیت‌های حاوی محیط کشت بدون کشت باکتری بود. میانگین رشد ریسه‌های قارچ عامل بیماری با شاهد براساس فرمول ۱ مقایسه گردید.

ز) بررسی تأثیر ترشحات مایع خارج‌سلولی: این آزمون مطابق روش سینگ و دورال (۱۹۸٤) و در محیط کشت NB انجام شد (۲۳). برای بررسی تأثیر این عصاره، از غلظت‌های متفاوت ۵، ۱۵ و ۲۵ درصد استفاده گردید. در این آزمون، شاهد شامل محیط کشت مایع بدون باکتری بود که از صافی‌های میکروبیولوژیک ۰/۲ میکرونی عبور داده شد. درصد بازدارندگی از رشد قارچ عامل بیماری بر اساس فرمول ۱ محاسبه شد.

ح) بررسی تولید مواد فرار ضدقارچی: این آزمون مطابق روش فیدامن و روزال (۱۹۹۳) انجام شد (۲٤). پلیت‌های شاهد حاوی NA بدون کشت باکتری بودند که پلیت‌های حاوی قارچ روی آن‌ها قرار گرفتند و با پارافیلم کاملا مسدود شدند. درصد بازدارندگی از رشد قارچ طبق فرمول ۱ محاسبه گردید.

ط) بررسی تولید سیدروفور: این آزمون به‌روش گیلز و شیپرز (۱۹۸۳) انجام شد (۲۵). در این روش، به محیط کشت کینگز بی (King's B) غلظت‌های مختلف آهن (۵، ۱۵ و ۲۵ میکرومولار کلرید آهن ۳ ظرفیتی) اضافه شد. جدایه‌های باکتریایی در سه نقطه، به فاصله یک سانتی‌متری از حاشیه پلیت‌ها به‌صورت نقطه‌ای و به‌طور همزمان یک قرص ۵ میلی‌متری از حاشیه کشت تازه قارچ در مرکز پلیت‌ها کشت داده شد. پس از گذشت حدود ٤۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۲۸ درجه سلسیوس، اندازه منطقه بازدارندگی در غلظت‌های مختلف آهن با همدیگر مقایسه شدند.

یافته‌ها

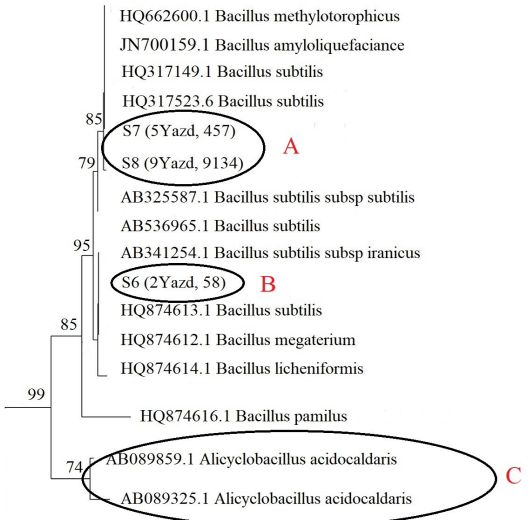
الف) شناسایی گونه‌های آسپرژیلوس فلاووس: در این پژوهش تعداد زیادی سویه قارچ و باکتری جداسازی و سپس گونه *آسپرژیلوس فلاووس* شناسایی گردید.

ب) نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی برای باکتری‌ها: از مجموع ۷۵ نمونه گرفته شده از باغات پسته شهرستان‌های مختلف استان یزد، تعداد ۳۷ جدایه باکتریایی به‌دست آمد که در آزمون کشت متقابل، اثر بازدارندگی آن‌ها روی قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی، همه جدایه‌ها از جنس *باسیلوس* تشخیص داده شدند که نتایج آن در جدول ۲ آورده شده است.

جدول۲: نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی جدایه‌های باکتری.

ردیف	نام جدایه	آزمون گرم	آزمون لوان	آزمون نشاسته	آزمون سیترات
۱	Pr_1	+	−	+	+
۲	Pr_2	+	+	+	+
۳	Pr_3	+	+	+	+
٤	Pr_4	+	+	+	+
۵	Pr_5	+	−	+	+
٦	Pr_6	+	+	+	+
۷	Pr_7	+	+	+	+
۸	Pr_9	+	+	+	+

ج) واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و توالی‌یابی: با توجه به آغازگرهای به‌کار رفته که برای جنس باسیلوس عمومی هستند، برای تمام جدایه‌های باکتریایی مورد آزمایش قطعه ۱۵۰۰ جفت باز تکثیر شد که با نتایج حاصل از آزمون‌های بیوشیمیایی مطابقت داشت. پس از انجام PCR، سه جدایه برای توالی‌یابی انتخاب شدند و براساس نتایج حاصل از توالی‌یابی، درخت فیلوژنی رسم شد (شکل ۱).

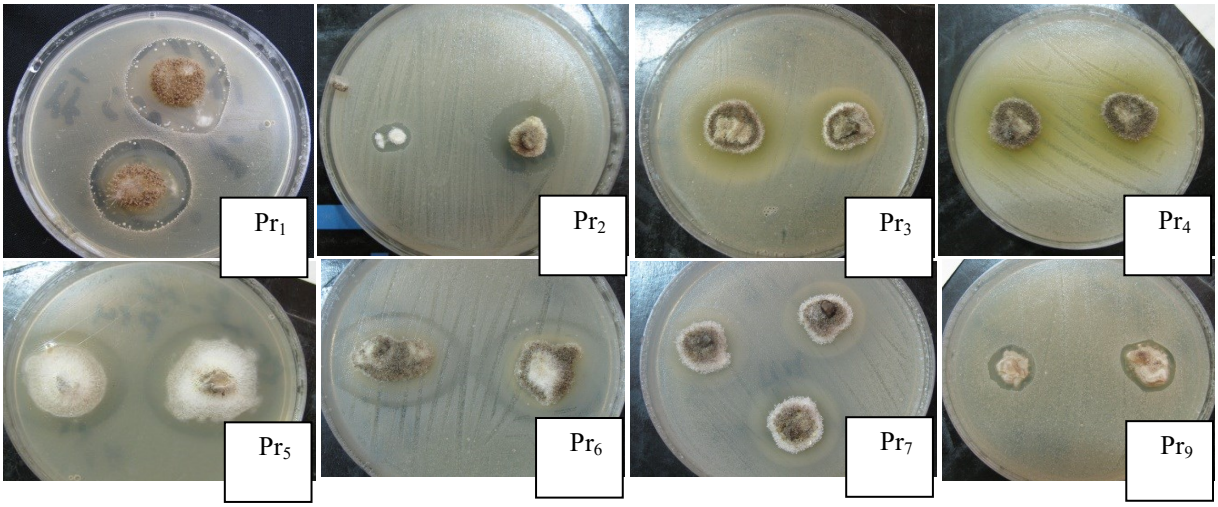


شکل ۱: درخت فیلوژنی حاصل از توالی‌یابی قطعات مرتبط با بخشی از ناحیه 16srRNA باکتری و مقایسه با جدایه‌های موجود در بانک ژن، روش Maximum likelihood.

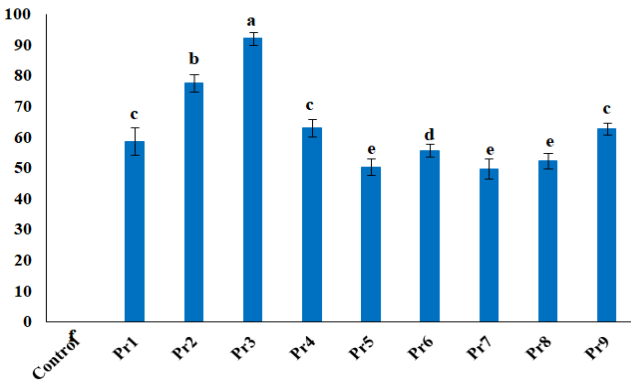
با بررسی درخت فیلوژنی جدایه Pr2 (S7) (A در بالا) شباهت بسیار بالایی به گونه *باسیلوس سوبتیلیس* و *باسیلوس*

آمیلولیکوفسینس (B. amyloliquefacians) داشت و جدایه‌های Pr5 (S8) (حلقه‌ی A) و Pr9 (S6) (B در بالا) با گونه‌های *B. subtilis subsp. subtilis*، و *B. subtilis subsp. iranicus* دارای تشابه نوکلئوتیدی بالایی بودند. جدایه‌های مربوط به گونه *الیسیکلوباسیلوس اسیدوکالداریوس* (Alicyclobacillus acidocaldarius) به‌عنوان out group انتخاب شدند (C در بالا) درخت فیلوژنی با نرم افزار mega-5 با بوت‌استرپ ۵۰۰ رسم گردید.

د) *آزمون آنتی‌بیوز:* پس از جداسازی باکتری‌ها و خالص‌سازی آن‌ها آزمون آنتی‌بیوز با قارچ‌های *آسپرژیلوس فلاووس* جداسازی شده صورت گرفت و میزان منطقه بازدارندگی جدایه‌ها روی محیط کشت اندازه‌گیری شد (شکل ۲). نتایج به‌دست آمده از مقایسه میانگین‌ها نشان داد که سویه Pr3 با ۹۵ درصد بیشترین تأثیر و سویه‌های Pr5 و Pr7 با ۵۰ درصد، کمترین تأثیر را روی *آسپرژیلوس فلاووس* داشتند (نمودار ۱ و۲).

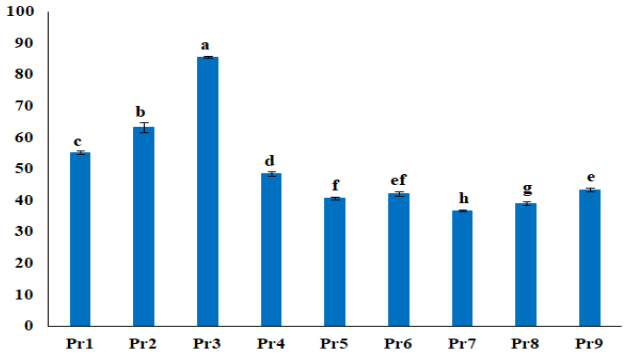


شکل ۲: آزمون آنتی‌بیوز جدایه‌های مختلف باکتری روی *آسپرژیلوس فلاووس*.



نمودار ۱: نمودار تأثیر جدایه‌های باکتریایی در بازدارندگی از رشد *آسپرژیلوس فلاووس* در آزمون آنتی‌بیوز. ستون‌های دارای حروف مشترک تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین جدایه‌ها در سطح ۱ درصد تفاوت معنی‌دار وجود دارد و تمامی جدایه‌ها نسبت به شاهد تفاوت معنی‌دار دارند.



نمودار ۲: نمودار میزان تولید آنتی‌بیوتیک توسط جدایه‌های آنتاگونیست روی *آسپرژیلوس فلاووس* به روش کلروفرم. ستون‌های دارای حروف مشترک تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

ه) *تولید آنتی‌بیوتیک:* نتایج آزمون تولید آنتی‌بیوتیک به‌روش کلروفرم نشان داد که جدایه Pr3 و Pr7 به‌ترتیب با ۸۴/۳۵ و ۳۸ درصد بیشترین و کمترین میزان را داشتند (نمودار ۲).

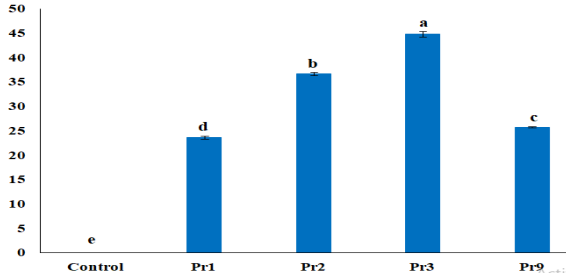
در آزمون تجزیه واریانس نیز بر اساس نتایج به‌دست آمده تمامی جدایه‌ها در سطح ۱ درصد با شاهد تفاوت معنی‌دار داشتند.

و) ترشحات خارج‌سلولی آنتاگونیست‌ها روی آسپرژیلوس فلاووس: در این آزمون جدایه‌های Pr1، Pr2، Pr3 و Pr9 مایع خارج‌سلولی تولید کردند و درصدهای متفاوتی از تأثیر را روی *آسپرژیلوس فلاووس* نشان دادند (جدول۳ و نمودار ۳و٤). نتایج به‌دست آمده نشان داد که جدایه‌های تولیدکننده ترشحات خارج‌سلولی نسبت‌به شاهد در سطح ۱ درصد دارای تفاوت معنی‌دار بودند.

جدول ۳: میانگین تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره خارج‌سلولی هر جدایه روی *آسپرژیلوس فلاووس*.

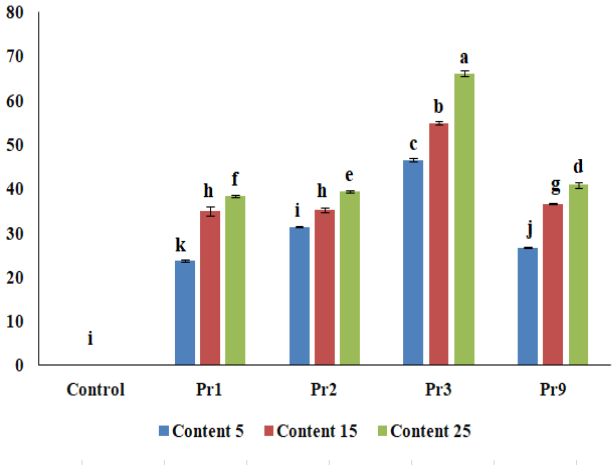
جدایه‌ها	تولید عصاره خارج سلولی
شاهد	00.00
Pr1	23.39
Pr2	36.7
Pr3	45.39
Pr4	00.00
Pr5	00.00
Pr6	00.00
Pr7	00.00
Pr8	00.00
Pr9	26.18

سویه‌هایی که با عدد صفر مشخص شده‌اند در حین انجام آزمایش‌ها با مشکل مواجه شدند و اطلاعاتی از آن‌ها به‌دست نیامد اما این مطلب، به‌منزله عدم تولید عصاره خارج‌سلولی نیست. همان‌گونه که در نمودار ۳ نیز نشان داده شده است جدایه Pr3 با بیشترین درصد بازدارندگی بهترین جدایه از نظر تولید عصاره خارج‌سلولی ارزیابی شد.



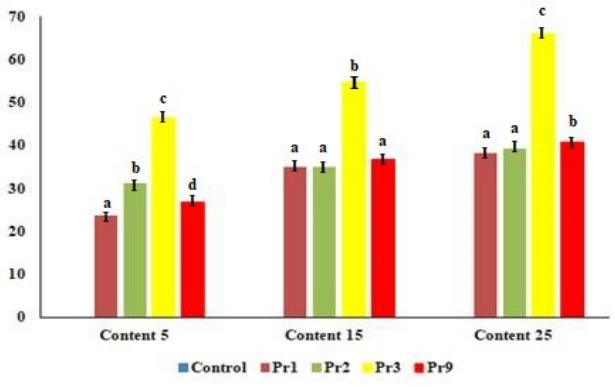
نمودار ۳: نمودار مقایسه میزان تولید عصاره خارج‌سلولی بین جدایه‌های آنتاگونیست.

به‌منظور تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره خارج‌سلولی چهار جدایه آنتاگونیست روی *آسپرژیلوس فلاووس* (به محیط کشت کینگز بی (King's B) غلظت‌های مختلف آهن (۵، ۱۵ و ۲۵ میکرومولار کلرید آهن ۳ ظرفیتی) اضافه شد)، نتایج نشان داد که همه غلظت‌های جدایه‌ها در حد مشابهی روی قارچ مورد بررسی تاثیر گذاشتند و در میان غلظت‌های مختلف این جدایه‌ها بیشترین تاثیر مربوط به جدایه Pr3 بود (نمودار ٤).



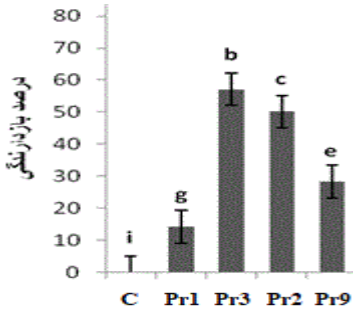
نمودار ٤: نمودار مقایسه میزان تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره خارج‌سلولی جدایه‌های آنتاگونیست روی *آسپرژیلوس فلاووس*.

ز) نتایج بررسی تولید سیدروفور: در این آزمون جدایه‌های Pr1، Pr2، Pr3و Pr9 به‌صورت معناداری در سطح احتمال یک درصد سیدروفور تولید کردند. نمودار مقایسه‌ای میانگین درصد تاثیر سیدروفور هر یک از جدایه‌ها روی *آسپرژیلوس فلاووس* در نمودار ۵ آمده است.



نمودار ۵: نمودار مقایسه‌ای میانگین تاثیر سیدروفور هر یک از جدایه‌ها روی *آسپرژیلوس فلاووس*.

ح) *نتایج بررسی تولید مواد فرار ضدقارچی:* در این آزمون جدایه‌هایی که تولید عصاره خارج‌سلولی کرده بودند، مواد فرار ضدقارچی نیز تولید نمودند که بیشترین میزان تولید این مواد توسط جدایه Pr9 صورت گرفت. بر اساس نتایج به‌دست آمده فقط جدایه‌های Pr1، Pr2، Pr3و Pr9 تولید مواد فرار ضدقارچی کردند که تاثیر هر چهار جدایه روی *آسپرژیلوس فلاووس* نسبت به شاهد دارای تفاوت معنی‌دار بود (نمودار ٦).



نمودار ٦: نمودار مقایسه‌ای میانگین تاثیر مواد ضدفرار قارچی هر یک از جدایه‌ها روی *آسپرژیلوس فلاووس*.

بحث

مطالعه و ردیابی باکتری‌های جداشده از پسته و ضایعات باغات پسته در مناطق مختلف استان یزد نشان داد که تنوع گونه‌های باکتریایی در این باغات بسیار بالا می‌باشد و بسیاری از این باکتری‌ها پتانسیل بازدارندگی از رشد قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* پسته را دارند و در ماه‌های گرم سال دمای بالای خاک را به‌راحتی تحمل می‌کنند. تاکنون تحقیقات زیادی روی فرمولاسیون عوامل بیوکنترل و معرفی آن‌ها در اکوسیستم‌های کشاورزی انجام شده است ولی هنوز موفقیت زیادی در این زمینه به‌دست نیامده است زیرا بیوکنترل تحت تأثیر عوامل مختلف زنده و غیرزنده قرار می‌گیرد و هنوز خیلی از برهم‌کنش‌های آن‌ها با عوامل میکروبی ناشناخته است. امرت و هندلزمن (۱۹۹۹) گزارش کردند که اسپور *باسیلوس*‌ها بخصوص *باسیلوس سوبتیلیس* درطول میلیاردها سال به تکامل رسیده و مقاومت و طول عمر آن‌ها تضمین شده است (۲٦). این موضوع، همچنین با نتایج حاصل از تحقیقات برادبنت و همکاران (۱۹۷۱) نیز مطابقت داشت. آن‌ها دریافتند که جمعیت گونه‌های *باسیلوس* حتی در دمای ۸۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۰ دقیقه زنده می‌مانند و جمعیت گونه *باسیلوس سوبتیلیس* بعد از بخاردهی خاک به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای کمتر از ۱۰۰ درجه سلسیوس بعد از چند روز به‌سرعت به‌حالت اولیه برمی‌گردند (۲۷). نتایج این بررسی نشان داد که برخی از جدایه‌های *باسیلوس* مانند جدایه Pr3 با میزان بازدارندگی ۹۵ درصد تاثیر آنتی‌بیوز بالایی روی پرگنه *آسپرژیلوس فلاووس* داشتند که این نتایج با یافته‌های محققان دیگر مطابقت داشت. مونیمبازی و بولرمن (۱۹۹۷) نیز اثر ٦ سویه *باسیلوس پومیلوس* را در جلوگیری از تولید آفلاتوکسین مورد ارزیابی قرار دادند و مشاهده کردند که در مجموع درصد بازدارندگی از تولید آفلاتوکسین ۹۹-۹۸/۲ درصد بود (۲۸). همچنین بوتون و پلوسو (۲۰۰۳) گزارش کردند که ترکیبات خاصی از *باسیلوس پومیلوس* از رشد گونه‌های *آسپرژیلوس* جلوگیری می‌کند و مانع از طویل شدن میسلیوم و جوانه‌زنی اسپور می‌شود (۲۹). چانگ و هو (۲۰۰۷) نشان دادند جدایه *باسیلوس سوبتیلیس* (NK-330) از رشد قارچ و تولید آفلاتوکسین در شرایط آزمایشگاه ممانعت می‌کند (۳۰). گزارش‌هایی از تأثیر *باسیلوس سوبتیلیس* در جلوگیری از رشد میسلیومی *آسپرژیلوس نیجر* (*A. niger*) و *آسپرژیلوس فلاووس* وجود دارد. طبق تحقیقات ردی و همکاران (۲۰۰۹)، ترشحات مایع برون‌سلول باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* به‌طور مؤثری از رشد قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* (٦۸ درصد) و تولید آفلاتوکسین B_1 (۵۸ درصد) ممانعت کرد که این گزارش با نتایج پژوهش حاضر همخوانی دارد. (۳۱). همچنین مطالعات فرزانه و همکاران (۲۰۱۱) نشان داد سویه *باسیلوس سوبتیلیس* UTBSP1 توانایی کاهش ۹۵ درصدی AFB1 را دارد. آن‌ها گزارش کردند که فعالیت تخریبی این سویه احتمالا به‌دلیل آنزیم‌های خارج‌سلولی باشد. نتایج پژوهش دیگری مشخص کرد که سویه‌های *باسیلوس سوبتیلیس* BSP1، BSP4، BSP5 و BSP38 جداسازی‌شده از میوه پسته، تأثیر چشمگیری بر کاهش میزان آفلاتوکسین میوه پسته داشتند (۳۲). همچنین یافته‌های

دیگر نشان داد جدایه BSP_1 باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* با جلوگیری کامل از تولید بیومس قارچ در محیط کشت مایع PDB، بیشترین تاثیر را داشت. جدایه‌های BSP_4، BSP_5 و BSP_{38} به‌ترتیب باعث کاهش ۵۸/۸۸، ۲۷/۴۱ و ۲۹/۰۳ درصد بیومس قارچ و کاهش ۸۶/۸۵، ۲۱/۸۰ و ۲۶/۱۶ درصدی میزان آفلاتوکسین B_1 نسبت به شاهد بدون باکتری شدند و همبستگی منفی معنی‌داری بین میزان کاهش بیومس قارچ با مقدار آفلاتوکسین B_1تولیدی وجود داشت (۳۳). بررسی‌های دیگر نشان داد که سویه *باسیلوس آمیلولیکوفسینس* WF2020 قادر است به‌طور موثر AFB1 را بین ۱ تا ۸ میکروگرم در میلی‌لیتر تجزیه کند و دما و pH بهینه برای فعالیت آن به‌ترتیب ۳۷ الی ۴۵ درجه سلسیوس گزارش شد. آن‌ها همچنین نشان دادند که این سویه قادر است در رشد قارچ اختلال ایجاد کند و علاوه‌براین ترشحات مایع برون‌سلول باکتری نیز دارای پتانسیل امیدوارکننده‌ای در حفاظت مواد غذایی از آلودگی به آفلاتوکسین است (۳۴).

در پژوهش حاضر مشخص شد که گونه‌های باکتریایی آنتاگونیست با تولید آنتی‌بیوتیک، مواد فرار ضدقارچی و سیدروفور دارای اثر بازدارندگی بالایی روی *آسپرژیلوس فلاووس* بودند. یافته‌های مختلف نیز نشان داده‌اند که سویه‌های مختلف *باسیلوس سوبتیلیس* دارای پتانسیل کنترل زیستی بر اساس توانایی تولید ترکیبات آنتی‌بیوتیکی مانند لیپوپپتیدهایی نظیر خانواده فنجایسین، ایتورین و سورفکتین هستند. این ترکیبات دارای فعالیت ضدقارچی قوی در برابر طیف وسیعی از پاتوژن‌های گیاهی هستند. گزارش‌ها نشان داده است که تولید ایتورین به گونه‌های *باسیلوس سوبتیلیس* و *باسیلوس آمیلولیکوفسینس* محدود شده است. سورفکتین و مشتقات نزدیک به آن از *باسیلوس سوبتیلیس*، *باسیلوس کواگولانس* (*B. coagulans*)، *باسیلوس پومیلوس* و *باسیلوس لیکنی فورمیس* (*B. licheniformis*) جداسازی شده‌اند و تولید فنجایسین از گونه‌های *باسیلوس سرئوس* (*B. cereus*)، *باسیلوس تورینجینسیس* (*B. thuringiensis*)، *باسیلوس سوبتیلیس* و *باسیلوس آمیلولیکوفسینس* گزارش شده است.

همچنین تاثیر خانواده پلی‌پپتیدهای ایتورین تولیدشده توسط گونه‌های مختلف باسیلوس در ممانعت از رشد قارچ‌های مولد آفلاتوکسین در مطالعات مختلف گزارش شده است (۶و۳۵و۳۶).

نتیجه‌گیری

آنتاگونیست‌های میکروبی به‌دلیل ویژگی، کارایی، سازگاری با محیط زیست، حفاظت از کیفیت و طعم غذا و امکان‌پذیر بودن فرآیندها در هنگام کاربرد در صنایع، به‌عنوان روشی جذاب برای محققان در نظر گرفته شده است. با توجه به نتایج به‌دست آمده از این پژوهش و یافته‌های سایر محققان، گونه‌های مختلف *باسیلوس* و متابولیت‌های آن‌ها دارای خاصیت آنتاگونیستی بالایی روی قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* پسته هستند که می‌توانند به‌عنوان یک روش امیدوارکننده و موثر برای بازدارندگی رشد این قارچ و جلوگیری از تولید آفلاتوکسین به‌کار روند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از تمام کسانی که در انجام مراحل مختلف این مقاله یاری رسانده‌اند قدردانی می‌شود.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تعارض منافع

وجود ندارد.

References

1. Bagheri Marzooni B, Jahed Khaniki G, Shariatifar N, Molaee-Aghaee E. Assessment of aflatoxins in some pistachio cultivars supplied in bulk in Tehran food stores. Int J Environ Anal Chem. 2022; 17:1-10.
2. Cho HJ, Son SH, Chen W, Son YE, Lee I, Yu JH, Park HS. Regulation of Conidiogenesis in *Aspergillus flavus*. Cells. 2022;11(18):2796.
3. Sayadi M, Tajik H. Detoxification of aflatoxin b1 by Lactobacillus rhamnosus in a simulated model of the human digestive system. JMW. 2019; 11(4): 380-391.
4. Mojtahedi H, Danesh D, Haghighi B, Barnett R. Postharvest pathology and mycotoxin contamination of Iranian pistachio nuts. Phytopathology. 1978; 68(12): 1800-1804.
5. Younesi S, Salehzadeh M, Soleymani Pari MJ. Control of strawberry gray mold fungus with combined application of different species of Trichoderma and salicylic acid. JMW. 2023;16 (1): 72-88.
6. Moyne AL, Shelby R, Cleveland TE, Tuzun SA. Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. J appl microbiol. 2001; 90(4): 622-629.
7. Pakizeh M, Nouri L, Azizi MH. Probiotic-Based Optimization of Pistachio Paste Production and Detoxification of Aflatoxin B1 Using *Bifidobacterium lactis*. J Food Qual. 2022: 1-31.
8. Koumoutsi A, Chen XH, Henne A, Liesegang H, Hitzeroth G, Franke P, Vater J, Borriss R. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. J Bacteriol. 2004; 186(4): 1084-1096.
9. Alberts JF, Engelbrecht Y, Steyn PS, Holzapfel WH, Van Zyl WH. Biological degradation of aflatoxin B1 by *Rhodococcus erythropolis* cultures. Int j food microbiol. 2006; 109(1-2): 121-126.
10. Zhu Y, Hassan YI, Lepp D, Shao S, Zhou T. Strategies and methodologies for developing microbial detoxification systems to mitigate mycotoxins. Toxins. 2017; 9(4): 130.
11. Sommartya, T . 1997. Peanut disease. Bangkok: kasetsart University publishing.
12. Liang-bin HU, Fei WA, Luo-gen CH, Zhi-qi SH. Identification of B-FS06 and the antagonistic activity of its cultural productions against *Aspergillus flavus*. Chin J Biol Control. 2007; 23(2): 160.
13. ONo M, KIMURA N. Antifungal peptides produced by *Bacillus subtilis* for the biological control of aflatoxin contamination. JSM Mycotoxins. 1991; 1991(34): 23-28.
14. 14. Choudhary AK. Influence of microbial co-inhabitants on aflatoxin synthesis of *Aspergillus flavus* on maize kernels. Lett appl microbiol. 1992; 14(4): 143-147.
15. Cotty PJ. Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. Phytopathology. 1989; 79(7):808-814.

16. Diener UL, Davis ND. Aflatoxin production by isolates of *Aspcrgillus flavus*. Phytopathology. 1966;56(12):1390-3.

17. Dorner JW, Cole RJ, Connick WJ, Daigle DJ, McGuire MR, Shasha BS. Evaluation of biological control formulations to reduce aflatoxin contamination in peanuts. Biol Control. 2003; 26(3): 318-324.

18. McClenny N. Laboratory detection and identification of *Aspergillus* species by microscopic observation and culture: the traditional approach. Med mycol J. 2005; 43(Supplement_1): S125 -128.

19. Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CH, Perrone G, Seifert KA, Susca A, Tanney JB, Varga J. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. Stud mycol. 2005; 53(1): 1-27.

20. Palu AP, Gomes LM, Miguel MA, Balassiano IT, Queiroz ML, Freitas-Almeida AC, de Oliveira SS. Antimicrobial resistance in food and clinical Aeromonas isolates. Food microbiol. 2006; 23(5): 504-509.

21. Kiu R, Caim S, Alcon-Giner C, Belteki G, Clarke P, Pickard D, Dougan G, Hall LJ. Preterm infant-associated *Clostridium tertium*, *Clostridium cadaveris*, and *Clostridium paraputrificum* strains: genomic and evolutionary insights. Genome Biol Evol. 2017; 9(10): 2707-2714.

22. Weller DM, Cook RJ. Suppression of take-all of wheat by seed treatment with *Pseudomonas fluorescent*. Phytopathology. 1983; 73: 463-469.

23. Singh V, Deverall BJ. *Bacillus subtilis* as a control agent against fungal pathogens of citrus fruit. Trans Br Mycolo Soc. 1984; 83(3): 487-490.

24. Fiddaman PJ, Rossall S. The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. J Appl Bacteriol. 1993; 74(2): 119-126.

25. Geels FP, Schippers B. Selection of antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. and their root colonization and persistence following treatment of seed potatoes. J Phytopathol. 1983; 108(3-4): 193-206.

26. Emmert EA, Handelsman J. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. FEMS Microbiol lett. 1999; 171(1): 1-9.

27. Broadbent P, Baker KF, Waterworth Y. Bacteria and actinomycetes antogonistic to fungal root pathogens in Australian soils. Aust J Biol Sci. 1971; 24(4): 925-944.

28. Munimbazi C, Bullerman LB. Inhibition of aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 by Bacillus pumilus. Mycopathologia. 1997; 140(3): 163-169.

29. Bottone EJ, Peluso RW. Production by Bacillus pumilus (MSH) of an antifungal compound that is active against Mucoraceae and *Aspergillus* species: preliminary report. J Med Microbiol. 2003; 52(1): 69-74.

30. Chang PK, Hua SS. Nonaflatoxigenic *Aspergillus flavus* TX9-8 competitively prevents aflatoxin accumulation by *A. flavus* isolates of large and small sclerotial morphotypes. Int J Food Microbiol. 2007; 114(3): 275-279.

31. Reddy KR, Reddy CS, Muralidharan K. Potential of botanicals and biocontrol agents on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* infecting rice grains. Food control. 2009; 20(2): 173-178.

32. Farzaneh M, Ahmadzadeh M, Ghasempour A, Mir-Abolfathi M, Javan Nikkhah M, Sharifi-Tehrani A. Mode of Action of Bacillus subtilis on Aflatoxin Control of *Aspergillus flavus*. Iran J Plant Prot Sci. 2011; 42(2): 191-198.

33. Farzaneh M, Shi ZQ, Ghassempour A, Sedaghat N, Ahmadzadeh M, Mirabolfathy M, Javan-Nikkhah M. Aflatoxin B1 degradation by *Bacillus subtilis* UTBSP1 isolated from pistachio nuts of Iran. Food control. 2012; 23(1): 100-106.

34. Chen G, Liao Z, Xu C, Liang Z, Liu T, Zhong Q, Wang L, Fang X, Wang J. Detoxification of Aflatoxin B1 by a Potential Probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* WF2020. Front microbiol. 2022; 13.

35. Mohammadi A, Akhavan SA, Hosseinidoost R. Evaluation of antifungal activity of iturin producing *Bacillus subtilis* strains. JMW. 2016; 8(4): 299-307.

36. Ashrafi A, Salehzadeh M, Khezrinezhad N. Detection and identification of tomato wilt disease in East Azerbaijan province and controlling it using antagonist bacteria. Genetic Engineering and Biosafety Journal. 2020; 10 9(1): 28-39.