کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دورهٔ ۸، شمارهٔ ۲،پاییز و زمستان ۱۳۹۸ (۱۳۶-۱۲۷)
DOI: 10.22059/jbioc.2020.289337.276

افزایش تولید زیست‌توده و بهبود کارایی بیوکنترلی سویه *Bacillus pumilus* INR7 با تغییر منابع کربن محیط کشت

سارا معتضدی، سعید عباسی و روح‌الله شریفی*
گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۸/۱۹- تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۳/۱۷)

چکیده

باکتری‌های افزایش‌دهنده رشد گیاه، نه‌تنها قادرند رشد و تولید محصول گیاهان را افزایش دهند، بلکه باعث افزایش مقاومت گیاه به تنش‌های زنده و غیرزنده می‌شوند. طراحی و بهینه‌سازی فرایند تولید نقش مهمی در افزایش زیست‌توده و کارایی این باکتری‌ها دارد. در این مطالعه، نقش برخی منابع کربن در تولید زیست‌توده و کارایی باکتری ***Bacillus pumilus*** در مهار بیمارگر ***Rhizoctonia solani*** عامل بیماری مرگ گیاه‌چه لوبیا مورد ارزیابی قرار گرفت. اثر سه غلظت از منابع کربنی گلوکز، ملاس چغندرقند، شکر قهوه‌ای، پودر ذرت و پودر برنج روی تولید زیست‌توده سویه ***B. pumilus*** **INR7** و کارایی آن در افزایش رشد گیاه و مهار مرگ گیاه‌چه لوبیا در شرایط گلخانه بررسی شد. بیشترین تولید زیست‌توده به مقدار $۲/۹۰\times۱۰^{۹}$ و $۲/۳٤\times۱۰^{۹}$ واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی‌لیتر به ترتیب در غلظت ۲۰ گرم در لیتر گلوکز و شکر قهوه‌ای به دست آمد. با افزایش غلظت گلوکز تولید زیست‌توده کاهش یافت ولی کارایی باکتری در افزایش صفات رشدی گیاه بهبود پیدا کرد به‌طوری‌که بیشترین طول اندام‌های هوایی به میزان ۱۷/۸۳ سانتی‌متر و وزن خشک اندام‌های هوایی به میزان ۷/۱٦ گرم در غلظت ٤۰ گرم در لیتر گلوکز حاصل شد. ملاس چغندرقند نیز در غلظت ۲۰ میلی‌لیتر در لیتر به‌صورت معنی‌داری باعث افزایش کارایی باکتری در افزایش صفات رشدی گیاه شد. بررسی اثر منابع کربن در افزایش کارایی کنترل بیولوژیکی نشان داد، باکتری رشد یافته در محیط حاوی گلوکز در غلظت ٤۰ گرم در لیتر باعث کاهش ۱۳ درصدی بیماری در مقایسه با محیط پایه شد. ملاس نیز در غلظت‌های ۲۰ و ٤۰ میلی‌لیتر در لیتر نقش قابل توجهی در افزایش کارایی کنترل بیولوژیکی سویه ***B. pumilus*** **INR7** ایفا کرد. در مجموع، گلوکز و ملاس چغندرقند بیشترین اثر را در تولید زیست‌توده و کارایی سویه ***B. pumilus*** **INR7** در گلخانه دارا بودند.

واژه‌های کلیدی: باسیلوس، کنترل بیولوژیک، لوبیا، منابع کربن، مرگ گیاه‌چه، ***Rhizoctonia solani***.

Enhancement of *Bacillus pumilus* INR7 biocontrol efficiency by selection of suitable carbon source

Sara Motazedi, Saeed Abbasi and Rouhallah Sharifi
Department of Plant Protection, College of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran
(Received: November 10, 2019 - Accepted: June 6, 2020)

ABSTRACT

Plant growth promoting (PGP) bacteria not only improve plant growth and yield but also increase plant resistance to biotic and abiotic stresses. Culture design in fermentation process has critical effects on biomass production and efficacy of these bacteria. In this work, Influence of some carbon sources have been investigated on biomass production and efficacy of *Bacillus pumilus* against *Rhizoctonia solani*, the causal agent of bean damping-off. Effect of carbon sources including glucose, molasses, brown sugar, corn meal and rice meal, in three concentrations have been examined on *B. pumilus* INR7 biomass production and suppression of bean damping-off in greenhouse. The highest biomass production achieved using 20 g/L of glucose and brown sugar in the culture media, respectively. Although, increasing glucose concentration decreased biomass production, but it enhanced plant growth factors. The highest plant height (17.83 cm) and shoot dry weight (7.16 g) have been recorded in 40 g/L as the highest concentration of glucose. Molasses also increased PGP efficiency at its mid concentration, 20 ml/l. Effect of carbon sources on biocontrol efficacy of *B. pumilus* INR7 revealed that glucose at 40 g/L led to the lowest root and crown infection. Molasses in 20 and 40 ml/l showed noticeable effect on biocontrol efficacy of *B. pumilus* INR7. In conclusion, glucose and molasses had highest effect on biomass production and biocontrol efficacy of *B. pumilus* INR7.

Key words: *Bacillus*, Bean, Biological control, Carbon sources, Damping-off, *Rhizoctonia solani*.

* Corresponding author E-mail: sharifi.rohallah@gmail.com

مقدمه

در سال‌های اخیر، با افزایش آگاهی از مشکلات زیست‌محیطی استفاده بی‌رویه از آفت‌کش‌های شیمیایی، تقاضا برای استفاده از روش‌های جایگزین افزایش یافته است. یکی از بهترین روش‌های جایگزین، مهار بیمارگرها به‌وسیله‌ی سایر میکروارگانیسم‌های آن زیست‌بوم است (Duffy and Défago 1999a). در میان عوامل بیوکنترل، گونه‌های *Bacillus* spp. به دلیل ترشح آنتی‌بیوتیک‌های متعدد و همچنین توانایی القای مقاومت در گیاه و تولید هورمون‌های گیاهی دارای موقعیت مناسبی جهت کنترل بیماری‌های خاک‌زاد می‌باشند (Kilian *et al.* 2000, Sharifi and Ryu 2017). تولید اسپور مقاوم این باکتری باعث سهولت تولید تجاری و افزایش عمر انبارداری آن‌ها می‌شود. سویه‌های این جنس به‌تنهایی ۸۵ درصد از کل بازار فراورده‌های کنترل بیولوژیک را به خود اختصاص داده‌اند (Ongena and Jacques 2008, Singh and Arora 2016).

جهت تکثیر عوامل مهار زیستی به‌صورت انبوه و در حجم زیاد، محیط کشت باید به‌گونه‌ای طراحی شود که با حداقل هزینه، میزان زیست‌توده و متابولیت‌های آنتی‌بیوتیکی بالائی تولید شود (Costa *et al.* 2001, Kilian *et al.* 2000, Lewis 1991). گزارش شده است که حدود ۴۸٪ هزینه‌های تولید عوامل بیوکنترل مربوط به مواد اولیه مورد نیاز فرمنتاسیون و فرمولاسیون باکتری است که در مورد سویه *Pseudomonas fluorescens* BRG 100 معادل ۷ از ۱۴/۷۶ میلیون دلار در سال است (Mupondwa *et al.* 2015). از این رو طراحی محیط کشت برای یافتن منابعی که ضمن کاهش هزینه، باعث تولید بیشتر عوامل بیوکنترل شود می‌تواند مؤثر باشد. علاوه بر افزایش زیست‌توده، گزارش‌هایی وجود دارد که اجزای محیط کشت و شرایط محیطی استفاده شده برای رشد عوامل بیوکنترلی، خواص بعدی آن را نیز تحت تأثیر قرار داده‌اند (Duffy and Défago 1999a). از این بین، منابع کربن و نیتروژن بیشترین هزینه تولید عوامل میکروبی را شامل می‌شوند و برای بهبود فرایند تولید کشت‌های میکروبی مورد توجه ویژه‌ای قرار می‌گیرند (Anderson and Jayaraman 2003, Safari Asl *et al.* 2010). کربوهیدرات‌های خالص نظیر گلوکز، فروکتوز، ساکاروز و فراورده‌های جانبی صنعت و کشاورزی همچون ملاس چغندرقند و نیشکر، پودر ذرت و برنج، محصولات جانبی لبنیات و ضایعات سیب‌زمینی برای تولید انبوه عوامل آنتاگونیست به‌کار برده می‌شوند (Vazquez *et al.* 1997). از این میان، ملاس چغندرقند یکی از باصرفه‌ترین و رایج‌ترین منابع برای تولید انبوه عوامل آنتاگونیست می‌باشد (McNeil and Harvey 2008). طبق نتایج بررسی‌های انجام شده محیط‌های کشت حاوی ملاس چغندرقند هم برای رشد سلول و هم در کارایی و خاصیت آنتاگونیستی سویه‌های مختلف سودوموناس و باسیلوس روی کپک خاکستری سیب و ریزوکتونیای لوبیا مؤثر بوده است (Peighamy-Ashnaei *et al.* 2007a, Peighamy-Ashnaei *et al.* 2007b). کربوهیدرات‌های ارزان قیمتی مثل ساکارز و ملاس باعث تولید حداکثر زیست‌توده در سویه CPA-2 *Pantoea agglomerans* شده‌اند (Costa *et al.* 2001). در مناطق با کشت وسیع ذرت، پودر ذرت یکی از ارزان‌ترین منابع پیچیده کربوهیدرات است. این فرآورده در اصل نشاسته است اما حدود ۵٪ پروتئین دارد. علاوه بر قندهای پیچیده، کربوهیدرات‌های ساده مثل گلوکز و ساکاروز نیز در تولید زیست‌توده باکتری‌ها به‌ویژه در مقیاس آزمایشگاهی مورد استفاده قرار می‌گیرند. گلوکز در *Actinosynnema pretiosum* موجب افزایش رشد شده و بیوسنتز آنتی‌بیوتیک آنسامیتوسین[1] را نیز افزایش داده است (Gao *et al.* 2014)؛ همچنین غلظت ۲۰ گرم ساکاروز در لیتر باعث افزایش تولید آنتی‌بیوتیک‌های لیپوپپتیدی در سویه *Bacillus subtilis* MO-01 شده است (Gu *et al.* 2005) و رشد *Streptomyces parvullus* را به‌صورت قابل توجهی افزایش داده است (Moges *et al.* 2012). البته مصرف منوساکاریدها و دی‌ساکاریدها توسط باکتری‌ها باعث اسیدی شدن محیط کشت

1 Ansamitocin

باکتری می‌شود که در مقادیر پایین با استفاده از بافرها و تنظیم pH مهار می‌شود؛ ولی اگر غلظت بالای منابع کربن مدنظر باشد بهتر است از پلی‌ساکاریدها استفاده شود (Ooijkaas *et al.* 1998). هدف از این پژوهش، معرفی بهترین منبع کربن در افزایش زیست‌توده باکتری، در بهبود کارایی باکتری در مهار بیماری مرگ گیاهچه لوبیا و افزایش صفات رشدی لوبیا از بین چند منبع پیچیده و ساده کربن بود. در نهایت از برآیند صفات افزایش زیست‌توده و کارایی باکتری، بهترین منابع کربن و بهترین غلظت آن‌ها معرفی می‌شود.

مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم‌های مورد استفاده

سویه *B. pumilus* INR7 از پروفسور کلوپر از دانشگاه اوبورن ایالات متحده امریکا دریافت شد. این سویه اندوفیت، اولین بار از خیار جداسازی گردید و روی بیمارگرهای خاک‌زاد متعددی مؤثر بوده است (Jeong *et al.* 2014). در پژوهش پیشین مشخص شد این سویه، بهترین سویه مورد استفاده در مهار بیماری مرگ گیاهچه لوبیا بوده است (Ardalan *et al.* 2015). برای نگهداری میان مدت و طولانی مدت باکتری به ترتیب از دو روش نگهداری زیر پارافین مایع و نگهداری در گلیسرول ۲۰٪ و در دمای ۸۰- درجه سلسیوس استفاده شد (Sharifi *et al.* 2010). جدایه *R. solani* AG4 از آزمایشگاه بیماری‌شناسی دانشگاه رازی تهیه شد. بیماری‌زایی این جدایه قبلاً به اثبات رسیده بود.

تأثیر منابع کربن بر تولید زیست‌توده باکتری

محیط کشت M1 شامل عصاره مخمر، ۳ گرم در لیتر، ساکاروز ۱۰ گرم در لیتر، کربنات کلسیم ۰/۴ گرم در لیتر، سولفات منیزیوم ۰/۴ گرم در لیتر و دی پتاسیم فسفات سه آبه ۰/۹۸ گرم در لیتر به‌عنوان محیط کشت پایه در نظر گرفته شد. پس از تهیه‌ی محیط پایه و سترون کردن آن به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد، منابع کربن در سه غلظت بر اساس جدول (۱) به لوله‌های حاوی محیط پایه اضافه شد و حجم آن به ۲۰ میلی‌لیتر رسانده شد. غلظت بهینه منابع کربن، بر اساس منابع موجود انتخاب شد و بر اساس آن غلظت کم و زیاد هر عنصر به‌صورت نصف و دو برابر غلظت بهینه در نظر گرفته شد (Ashofteh *et al.* 2009, Duffy and Défago 1999a, Gu *et al.* 2005, Milner *et al.* 1995, Posada-Uribe *et al.* 2015, Slininger and Jackson 1992).

جدول ۱- منابع کربن و غلظت مورد استفاده آن‌ها در این پژوهش

Table 1- Carbon sources and their concentrations used in this research

Carbon source	Glucose (g/L)	Brown sugar (g/L)	Rice meal (g/L)	Corn meal (g/L)	Molasses (ml/L)
Level 1	10	5	5	5	10
Level 2	20	10	10	10	20
Level 3	40	20	20	20	40

برای مایه‌زنی باکتری آنتاگونیست، یک میلی‌لیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط کشت آب‌گوشت غذایی[2] به هر یک از لوله‌های فالکون ذکر شده در بالا اضافه شد. این لوله‌ها به مدت ۴۸ ساعت روی شیکر با سرعت ۲۴۰ دور در دقیقه در دمای ۲±۲۵ قرار گرفتند. پس از این مدت، سوسپانسیون باکتری با استفاده از سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۰۰۰ دور در دقیقه رسوب داده شدند و بعد از دور ریختن مایع رویی به‌منظور برطرف شدن باقی‌مانده‌ی محیط غذایی، یک مرحله دیگر با محلول سرم فیزیولوژیک (۸ گرم در لیتر NaCl) شستشو و سانتریفوژ شدند. از هر سه تکرار هر تیمار، سری رقت تهیه شد و روی محیط غذایی NA جهت شمارش تعداد کلنی کشت داده شد.

ارزیابی نقش منابع کربن بر کارایی بیوکنترلی باکتری *B. pumilus* INR7 در گلخانه

در این آزمون باکتری‌ها در لوله‌های فالکون حاوی

2 Nutrient Broth

محیط پایه و منابع کربن با غلظت‌های ذکر شده در جدول ۱ کشت داده شدند. منابع کربن این آزمایش، جایگزین منبع کربن ذکر شده در محیط پایه شدند. شرایط کشت و تهیه سوسپانسیون باکتری مشابه آزمون بالا انجام شد. جمعیت باکتری با استفاده از محلول ۸ گرم در لیتر NaCl (سرم فیزیولوژیک) و ۰/۵ درصد متیل سلولز به 1×10^{9} CFU[۳]/ml رسانده شد. از این سوسپانسیون جهت مایه‌زنی بذور لوبیا استفاده گردید. به‌منظور ضدعفونی سطحی، بذور لوبیا به ترتیب به مدت ۲ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد و سپس ۲ دقیقه در هیپوکلریت سدیم یک درصد ضدعفونی و بعد از آن چندین بار با آب مقطر سترون شستشو داده شد و خشک گردید. در نهایت بذرهای لوبیا به مدت نیم ساعت در سوسپانسیون باکتری قرار داده شد و سپس در زیر هود سترون بذرها خشک شدند (Qessaoui *et al.* 2019, Uekusa *et al.* 2005).

برای تهیه زادمایه‌ی بیمارگر، ابتدا در بطری‌های یک لیتری ورمی‌کولایت ریخته شد و نصف بطری (حدود ۵۰۰ میلی‌لیتر) با ورمی‌کولایت پر شد. سپس در حد مرطوب شدن ورمی‌کولایت در بطری‌ها محیط مایع عصاره سیب‌زمینی و دکستروز اضافه شد و دو بار به فاصله‌ی ۲۴ ساعت سترون گردید. پس از آن قرص-هایی از کشت تازه قارچ *R. solani* روی محیط عصاره سیب‌زمینی، دکستروز و آگار توسط اسکالپل برش داده شد و در هر بطری اضافه شد و هر ۳ روز یک بار به مدت ۱۴ روز بطری‌ها تکان داده شدند تا قارچ به‌صورت کامل ورمی‌کولایت را تسخیر کند.

برای کشت از گلدان‌های پلاستیکی به قطر دهانه ۸ سانتی‌متر و ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر استفاده شد. ابتدا تا نصف گلدان با خاک سترون (شامل خاک مزرعه، پرلیت و ورمی‌کمپوست به نسبت ۱:۱:۳) پر شد و سپس به هر گلدان به میزان یک گرم زادمایه‌ی بیمارگر اضافه گردید. بذور لوبیای کلونیزه شده با باکتری در سطح زادمایه قارچ قرار گرفت و روی بذرهای لوبیا با دو سانتی‌متر خاک سترون پوشانده شد. آبیاری گلدان‌ها به‌صورت یک روز در میان و از طریق زیرگلدانی‌ها صورت می‌گرفت. گلدان‌ها تا زمان ظهور نشانه‌های بیماری در گلخانه با ۱۸ ساعت روشنایی و دمای ۴±۲۵ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. برای بررسی شدت آلودگی روی ریشه و طوقه از روش امتیازدهی (۰-۵) استفاده گردید، امتیازهای مذکور سپس به درصد تبدیل شد (Sharifi *et al.* 2006).

تجزیه داده‌ها

تجزیه واریانس و مقایسه میانگین صفات به روش حداقل تفاوت معنی‌دار[۴] (LSD, $P < 0/05$) و با استفاده از روش مدل خطی[۵] توسط نرم‌افزار SAS (SAS 9.1 SAS institute, Cary, NC) انجام گرفت. در همه آزمایش‌ها از طرح کرت‌های کاملاً تصادفی با چهار تکرار استفاده شد.

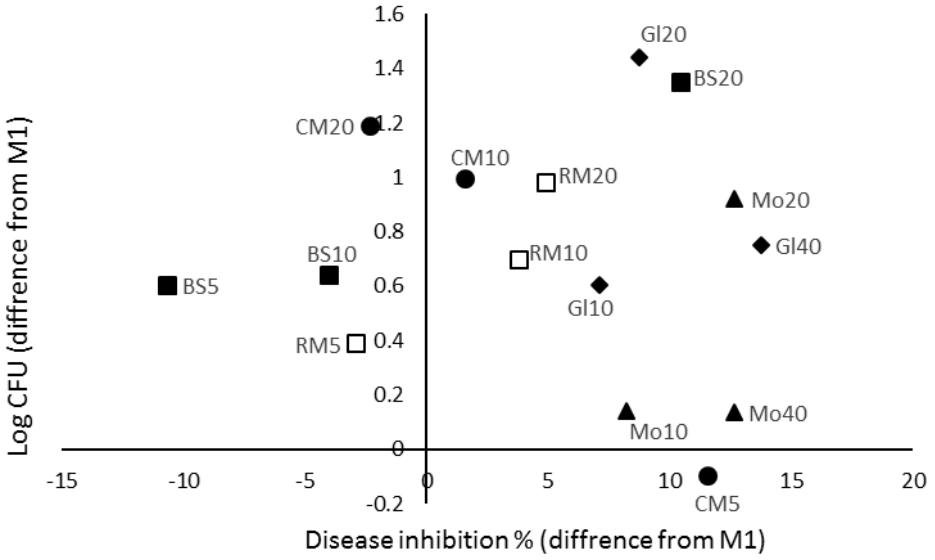
نتایج

در این پژوهش سویه *B. pumilus* INR7 در محیط کشت‌های حاوی منابع مختلف کربن رشد داده شد و اثر این منابع روی جمعیت باکتری و کارایی آن در گلخانه ارزیابی گردید. با توجه به شکل ۱، بیشترین جمعیت باکتری در حضور گلوکز با غلظت ۲۰ گرم و شکر قهوه‌ای با غلظت ۲۰ گرم در لیتر مشاهده شده است. در تیمار شکر قهوه‌ای، تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های اول و دوم وجود نداشت؛ با این‌حال، غلظت حداکثر (۲۰ گرم در لیتر) این منبع کربنی در مقایسه با شاهد جمعیت باکتری را از $1/3\times10^{8}$ به $2/34\times10^{9}$ افزایش داد. در مقابل، گلوکز فقط تا غلظت ۲۰ گرم در لیتر رشد باکتری را افزایش داد و در غلظت حداکثر (۴۰ گرم در لیتر)، جمعیت باکتری به‌شدت کاهش پیدا کرد. در تیمار ملاس چغندرقند نیز، بیشترین تولید زیست‌توده در غلظت ۲۰ میلی‌لیتر در لیتر به دست آمد که همان غلظت میانه‌ی آن بود و با افزایش غلظت، تولید زیست‌توده به‌صورت قابل توجهی کاهش یافت و با محیط پایه در یک گروه آماری قرار گرفت.

3 Clony forming unit

4 Least significance difference (LSD)
5 General linear model procedure (GLM)

افزایش غلظت پودر برنج، با نرخ ثابت و کند باعث افزایش زیست‌توده باکتری شد. در این تیمار با افزایش غلظت پودر برنج، جمعیت باکتری ابتدا از $۲/۷۶\times۱۰^{۸}$ به $۵/۲۳\times۱۰^{۸}$ و سپس به $۱/۰۱\times۱۰^{۹}$ رسید. در تیمار پودر ذرت نیز با افزایش غلظت، میزان زیست‌توده افزایش یافت. افزایش غلظت از ۵ به ۱۰ گرم در لیتر به‌شدت میزان زیست‌توده را افزایش داد و جمعیت باکتری از $۸/۳\times۱۰^{۷}$ به $۱/۰۵\times۱۰^{۹}$ واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی‌لیتر محیط کشت رسید. افزایش بیشتر غلظت پودر ذرت از آهنگ رشد کمتری برخوردار بود و جمعیت باکتری را به $۱/۶۳\times۱۰^{۹}$ واحد تشکیل‌دهنده کلنی در میلی‌لیتر محیط کشت رساند. پودر ذرت ۵ گرم در لیتر ضعیف‌ترین تیمار آزمایش در جمعیت باکتری بود (شکل ۱). درمجموع اکثر عناصر در مقایسه با محیط پایه باعث افزایش تولید زیست-توده باکتری شدند.



شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف منابع کربن در تولید زیست‌توده (محور عمودی) و کارایی کنترل بیولوژیکی سویه *Bacillus pumilus* INR7 علیه مرگ گیاهچه لوبیا. داده‌ها نتیجه اختلاف هر تیمار با محیط کشت پایه M1 است. Gl: گلوکز، BS: شکر قهوه‌ای، Mo: ملاس، RM: آرد برنج، CM: آرد ذرت. اعداد جلوی اسم تیمار غلظت آن بر حسب گرم یا میلی لیتر بر لیتر است.

Figure 1- Effect of different concentration of carbon sources on biomass production (vertical axis) and biocontrol efficiency (horizontal axis) of *Bacillus pumilus* INR7 against bean damping-off. Data were obtained from difference of each treatment (Gl: Glucose, BS: Brown Sugar, Mo: Molasses, RM: Rice Meal, CM: Corn Meal) with the basal medium M1. Numbers in front of each treatment represent it concentration in g or ml/L.

علاوه بر جمعیت، کارایی باکتری در افزایش رشد گیاه و مهار بیماری نیز تحت تأثیر منابع کربن محیط کشت قرار گرفت (جدول ۲). بیشترین وزن خشک ریشه مربوط به باکتری به دست آمده از محیط کشت حاوی گلوکز ۴۰ گرم در لیتر و ملاس ۲۰ میلی‌لیتر در لیتر است. وزن خشک ریشه از ۰/۹۶۱۸ گرم در غلظت ۱۰ گرم گلوکز به ۱/۴۱۹۲ گرم در غلظت ۴۰ گرم گلوکز در لیتر رسید. سوسپانسیون حاصل از تیمارهای پودر برنج ۲۰ گرم، پودر ذرت ۱۰ گرم، شکر قهوه‌ای ۱۰ گرم در لیتر و در نهایت شکر قهوه‌ای ۲۰ گرم در لیتر کمترین وزن خشک ریشه را به دنبال داشتند.

بیشترین وزن خشک اندام هوایی نیز مربوط به باکتری به دست آمده از محیط کشت حاوی گلوکز ۴۰ گرم در لیتر و ملاس ۲۰ میلی‌لیتر در لیتر بود، در رتبه بعد گلوکز ۲۰ گرم در لیتر و شاهد بدون قارچ و باکتری قرار گرفتند. همان‌طورکه مشاهده می‌شود صرف اضافه کردن گلوکز به محیط کشت باکتری، وزن خشک اندام هوایی در مقایسه با محیط پایه از

۵/۲۹۵۳ گرم به ۶/۰۳۱۴ گرم افزایش داشت و با افزایش غلظت این تیمار تا ۴۰ گرم در لیتر، وزن خشک اندام هوایی نیز همانند وزن خشک ریشه افزایش یافته است. کمترین وزن خشک اندام هوایی نیز مربوط به پودر برنج ۵، شکر قهوه‌ای ۲۰، پودر ذرت ۲۰، پودر ذرت ۱۰ و شکر قهوه‌ای ۵ گرم در لیتر بود.

بیشترین طول اندام هوایی به ترتیب مربوط به ملاس ۲۰ میلی‌لیتر و گلوکز ۴۰ گرم در لیتر بود که این عناصر در افزایش وزن خشک ریشه و وزن خشک اندام هوایی نیز بالاترین رتبه را به خود اختصاص داده بودند. پس از آن شاهد با باکتری، شاهد بدون قارچ و باکتری و گلوکز ۱۰ گرم با حروف آماری مشترک بیشترین طول اندام هوایی را داشتند. کمترین طول اندام هوایی نیز مربوط به تیمار پودر ذرت بود که در هر ۳ غلظت کمترین طول اندام هوایی را از خود نشان داد.

جدول ۲- اثر غلظت‌های مختلف منابع کربن در تولید زیست‌توده، افزایش کارایی سویه *Bacillus pumilus* INR7 در افزایش رشد گیاه و مهار بیمارگر.

Table 2- Effect of different concentration of carbon sources on biomass production, plant growth promotion and biocontrol efficiency of *Bacillus pumilus* INR7.

Carbon sources	Concentration (g/L or ml/L)*	Log CFU	Disease Index (%)	Root Dry weight (g)	Shoot Dry Weight (g)	Shoot Length (cm)
Corn Meal (g/L)	5	7.9260	10.23	0.692	5.109	12.56
	10	9.0195	20.13	0.570	4.587	12.89
	20	9.2117	23.88	0.653	4.736	11.21
Rice Meal (g/L)	5	8.4110	24.45	0.751	4.820	14.35
	10	8.7184	17.78	0.715	5.313	13.57
	20	9.0012	16.67	0.629	5.552	14.89
Molasses (ml/L)	10	8.1602	13.34	0.931	5.357	14.79
	20	8.9398	8.89	1.221	7.058	18.68
	40	8.1576	8.91	0.685	5.494	15.24
Brown Sugar (g/L)	5	8.6254	32.24	0.729	4.228	13.78
	10	8.6648	25.56	0.537	5.333	14.89
	20	9.3696	11.23	0.365	4.799	12.91
Glucose (g/L)	10	8.6230	14.45	0.961	6.031	15.89
	20	9.4622	12.78	1.165	6.706	15.58
	40	8.7717	7.78	1.419	7.156	17.83
M1		8.1231	21.57	0.408	5.295	13.65
No Antagonist			74.35	0.050	0.250	1.24
No Pathogen			0.00	0.574	6.544	16.14
$LSD_{0.05}$		0.57	2.4	0.24	0.93	2.8
CV (%)		4	14.3	20.2	10.7	12.1

- داده‌های هر تیمار میانگین سه تکرار هستند و مقایسه میانگین‌ها با روش LSD حفاظت شده در سطح آماری پنج درصد انجام شده است.

Data are average of three replication. Mean comparison were performed by least significance difference (LSD) ($P < 0.05$).

با افزایش غلظت گلوکز درصد آلودگی ریشه با شیب ملایمی کاهش یافت و در بیشترین غلظت (۴۰ گرم در لیتر) کمترین درصد آلودگی بین همه تیمارها مشاهده شد. ملاس چغندرقند نیز کارایی بیوکنترلی سویه مورد استفاده را به‌صورت قابل توجهی افزایش داد و در غلظت میانه (۲۰ میلی‌لیتر در لیتر) کمترین درصد آلودگی ریشه ثبت شد. در تیمار پودر ذرت، درصد آلودگی ریشه در ابتدا و در پایین‌ترین غلظت کمترین میزان را داشت که معادل ۱۰٪ آلودگی بود ولی با افزایش غلظت در ۱۰ و پس از آن در ۲۰ گرم در لیتر، درصد آلودگی ریشه به میزان قابل توجهی افزایش یافت و در بیشترین غلظت (۲۰ گرم در لیتر) به ۲۳٪ آلودگی رسید. در تیمار پودر برنج درصد آلودگی ریشه در غلظت ۵ گرم در لیتر معادل ۲۴٪ بود ولی با افزایش غلظت درصد آلودگی ریشه کاهش یافت. البته در غلظت ۱۰ و ۲۰ گرم در لیتر اختلاف معنی‌داری حاصل نشد. بیشترین درصد آلودگی ریشه مربوط به سوسپانسیون حاصل از تیمارهای شکر قهوه-ای ۵ و ۱۰ گرم و پودر برنج ۵ گرم در لیتر بود. با توجه به شکل (۱)، در تیمار شکر قهوه‌ای در غلظت ۵

گرم در لیتر، درصد آلودگی ریشه بیشترین میزان را در میان سایر تیمارها داشت و معادل ۳۲٪ آلودگی ریشه گیاه بود و پس از افزایش غلظت شکر قهوه‌ای از ۵ به ۱۰ گرم در لیتر و از ۱۰ به ۲۰ گرم در لیتر درصد آلودگی ریشه به‌شدت کاهش یافت و در بیشترین غلظت به ۱۱/۲٪ رسید. در مجموع گلوکز در غلظت ۴۰ گرم در لیتر و ملاس چغندرقند در غلظت-های ۲۰ و ۴۰ میلی‌لیتر در لیتر بهترین تیمارهای این آزمایش در افزایش کارایی بیوکنترلی باکتری بودند (جدول ۲).

بحث

در این پژوهش گلوکز در غلظت متوسط بیشترین تولید زیست‌توده را داشت ولی بیشترین کارایی در گلخانه در حداکثر غلظت آن یعنی ۴۰ گرم در لیتر به دست آمد. گزارش‌های متعدد نشان می‌دهند که گلوکز با افزایش تولید آنتی‌بیوتیک‌ها باعث افزایش کارایی بیوکنترلی آن‌ها می‌شود. گالو و کاتز نشان دادند که سنتز آنتی‌بیوتیک آنسامیتوسین[6] پی-۳ در حضور گلوکز در محیط کشت افزایش می‌یابند (Gao *et al.* 2014) و نیشانت و همکاران (Nishanth *et al.* 2013) مالتوز و گلوکز را به عنوان افزایش دهنده‌ی بیوسنتز متابولیت‌های ضدقارچی در *Bacillus* sp. معرفی نموده است. گلوکز یک قند شش کربنه است در نتیجه راحت‌تر از منابع دیگر توسط میکروب‌ها جذب می‌شود و باعث افزایش رشد آن‌ها می‌گردد. البته استفاده از این منبع کربن باعث اسیدی شدن محیط کشت می‌شود که خود می‌تواند عامل بازدارنده-ای در افزایش تولید زیست‌توده باکتری باشد. این منبع کربن توانسته است pH محیط کشت را از pH اولیه ۸ تا ۴ کاهش دهد. گزارش‌های متعددی نشان داده‌اند که غلظت زیاد گلوکز می‌تواند بازدارنده رشد میکروب باشند. غلظت بهینه گلوکز برای تولید اسپور باسیلوس بین ۲ تا ۱۰ گرم گزارش شده است (Posada-Uribe *et al.* 2015). البته، اثرگذاری گلوکز وابسته به غلظت سولفات منیزیوم بود و با بهینه کردن سولفات منیزیوم قادر بودند گلوکز بیشتری اضافه کنند و محصول بیشتری به دست آورد. اندرسون و جایارامان نشان دادند که بیشترین جمعیت باکتری *Bacillus thuringiensis* در غلظت ۲۸ گرم در لیتر گلوکز حاصل شد (Anderson and Jayaraman 2003). غلظت بالای گلوکز باعث کاهش تولید اسپور قارچ *Coniothyrium minitans*، عامل مهار زیستی برخی بیمارگرهای گیاهی شده است. توصیه شده است اگر غلظت بالای منبع کربن مدنظر است از پلی ساکاریدها مثل نشاسته به‌جای گلوکز استفاده شود (Ooijkaas *et al.* 1998). در پژوهش دیگر، مشخص شد که پلی‌ساکاریدها بیشتر از مونوساکاریدها باعث افزایش تولید اسپور *B. subtilis* می‌شوند (Chen *et al.* 2010). بررسی pH محیط کشت نشان داده است که از میان ۳۷ منبع کربن مورد استفاده، اسپورهای به دست آمده از محیط حاوی گلوکز نصف محیط‌های کشت حاوی لاکتوز و مالتوز خاصیت بیوکنترلی علیه پژمردگی ورتیسیلیومی داشته است (Engelkes *et al.* 1997). ملاس، محصول فرعی تولید قند از چغندر یا نیشکر است و ارزان‌ترین و متداول‌ترین منبع ساکاروز می‌باشد (Heidari-Tajabadi *et al.* 2010). در مقایسه با ملاس نیشکر، محیط کشت حاوی ملاس چغندرقند موجب افزایش بیشتر زیست‌توده باکتری *P. fluorescens* سویه UTPF61 گردید که این می-تواند به دلیل وجود درصد بالایی از ساکاروز، روی و ویتامینی مانند بیوتین در ملاس چغندرقند نسبت به ملاس نیشکر باشد (Heidari-Tajabadi *et al.* 2010). در پژوهش حاضر و در آزمون تعیین زیست‌توده باکتری، ملاس در غلظت ۲۰ میلی‌لیتر در لیتر بیشترین تعداد کلنی باکتری را در میان سایر غلظت-های خود نشان داد، همچنین بیشترین وزن خشک ریشه و اندام هوایی پس از گلوکز ۴۰ گرم در لیتر مربوط به غلظت ۲۰ میلی‌لیتر در لیتر ملاس بود. ملاس ۲۰ و ۴۰ میلی‌لیتر کمترین درصد آلودگی ریشه پس از گلوکز ۴۰ گرم را موجب شدند؛ در مجموع می‌توان گفت که ملاس ۲۰ میلی‌لیتر در لیتر پس از گلوکز ۴۰ گرم در لیتر، بهترین منبع کربنی در

6 Ansamitocin

میان سایر تیمارها از لحاظ افزایش کارایی مهار زیستی باکتری و افزایش فعالیت ضد قارچی آن بود. سارتوری و همکاران (Sartori *et al.* 2012) نشان دادند که از بین چهار محیط مورد استفاده، محیط حاوی ۲۰ گرم بر لیتر ملاس موجب تولید بیشترین جمعیت *Bacillus amyloliquefaciens* گردید و از طرف دیگر دوام باکتری در فرایند یخ خشک کردن[۷] را نیز افزایش داد. ملاس ترکیبی از مونو، دی و پلی‌ساکاریدها است که حاوی مقادیری عناصر ریز مغذی نیز است. عناصر ریزمغذی می‌توانند به‌عنوان کوفاکتور در تولید آنتی‌بیوتیک‌ها مؤثر باشند (Duffy and Défago 1999b). گزارش شده است که وجود ملاس به غلظت ۱۰-۲۰ گرم در لیتر در محیط کشت بر خاصیت آنتاگونیستی سودوموناس‌ها نیز مؤثر است (Costa *et al.* 2001, Peighamy-Ashnaei *et al.* 2007a). همچنین، ملاس در غلظت ۲۰ گرم در لیتر باعث افزایش زیست‌توده و تولید دلتاتوکسین در *B. thuringiensis* شده است (Moreira *et al.* 2007). از طرفی میزان بالای ساکاروز موجود در ملاس چغندرقند می‌تواند تا حدود زیادی تکثیر سلول‌های باکتری را در یک زمان مشخص به حداکثر ممکن برساند. امروزه در جهان از ملاس جهت تکثیر بسیاری از میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌شود (Costa *et al.* 2001). شکر قهوه‌ای محصولی از کارخانه‌های تولید شکر است که در آن کریستال‌های ساکاروز را با لایه‌ای از ملاس پوشش‌دار می‌کنند. اضافه کردن نسبتی بین ۳-۲۰ درصد ملاس باعث کاهش قیمت و افزایش مواد غذایی آن می‌شود. در پژوهش حاضر شکر قهوه‌ای در حداکثر غلظت خود (۲۰ گرم در لیتر) تولید زیست‌توده و کارایی بیوکنترلی را به صورت قابل توجهی افزایش داد (شکل ۱) ولی غلظت‌های پایین به‌ویژه در کارایی گلخانه‌ای باکتری در زمره ضعیف‌ترین منابع کربنی قرار گرفتند. در پژوهش مویس در مقایسه با پودر کاساوا، پودر ذرت و پودر برنج، بهترین رشد باکتری *B. subtilis* در شکر قهوه‌ای به اضافه۰/۲۵٪ عصاره مخمر مشاهده شد (Muis 2016). به نظر می‌رسد غلظت‌های بالای شکر قهوه‌ای می‌توانند در تولید انبوه باسیلوس مورد توجه قرار گیرد.

در این پژوهش، محیط‌های حاوی پودر برنج و پودر ذرت در هر ۳ غلظت، تأثیر چندانی بر کارایی سویه باکتری در گلخانه نداشتند. کمترین طول اندام هوایی در میان همه تیمارها مربوط به هر ۳ غلظت پودر ذرت بود. البته این منابع کربن با افزایش غلظت باعث افزایش تولید زیست‌توده باکتری شدند. میزان مصرف ۱۱ گرم در لیتر پودر ذرت بهتر از گلوکز باعث افزایش تولید اسپور در باسیلوس شده است (Chen *et al.* 2010). پژوهش حاضر نیز نشان داد در غلظت ۱۰ گرم پودر ذرت بهتر از گلوکز عمل می‌کند ولی با افزایش غلظت به ۲۰ گرم در لیتر، گلوکز به‌صورت معنی‌داری تولید زیست‌توده را افزایش داد. محیط‌های حاوی سبوس برنج و گندم در تحقیق صفری اصل و همکاران (۲۰۱۰) با وجود دارا بودن کربوهیدرات و ازت در هیچ‌یک از موارد اثر خوبی روی رشد و فعالیت ضد قارچی باکتری نشان ندادند. بتیول و همکاران آرد برنج را جزو منابع ضعیف در افزایش کارایی عامل بیوکنترل معرفی کرده‌اند (Bettiol *et al.* 2005).

درنهایت همان‌گونه که در شکل ۱ نشان داده شده است، گلوکز از قندهای ساده و شکر قهوه‌ای و ملاس به‌عنوان فراورده‌ها و پسماندهای کارخانه‌های قند به‌عنوان بهترین منابع کربن معرفی می‌شوند. لازم است با استفاده از روش‌های آماری همچون منحنی پاسخ، غلظت بهینه این عناصر در تولید زیست‌توده و کارایی باکتری را محاسبه نمود. در پژوهش حاضر مشخص شد علاوه بر گلوکز و ملاس، سایر منابع کربن نیز در غلظت‌های خاص موجب افزایش رشد و کارایی باکتری می‌شوند. لذا توصیه می‌شود که ترکیب دوگانه و چندگانه این منابع مورد آزمون قرار گیرد. البته در این مورد لازم است هم غلظت نهایی کربن و هم هزینه صرف شده مورد توجه قرار گیرد. علاوه بر این، با توجه به اینکه تغییرات pH روی امکان مصرف غلظت‌های بالای منابع کربن ساده مؤثر است توصیه می‌شود از بافرهای مناسب و یا فرم‌های پلیمری منابع کربن استفاده شود.

7 Freez drying

REFERENCES

Anderson R, Jayaraman K (2003) Influence of carbon and nitrogen sources on the growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* var *galleriae* for biopesticide production. Chemical and biochemical engineering quarterly 17: 225-232.

Ardalan A, Abbasi S, Sharifi R (2015) Comparison of some commercial Bacillus strains on biological control of Bean damping- off caused by *Rhizoctonia solani*, Proceedings of the 8th Congress in Advances in Agricultural Research, University of Kurdestan, Sanandaj. (In Persian).

Ashofteh F, Ahmadzadeh M, Fallahzadeh-Mamaghani V (2009) Effect of mineral components of the medium used to grow biocontrol strain UTPF61 of *Pseudomonas fluorescens* on its antagonistic activity against *Sclerotinia* wilt of sunflower and its survival during and after the formulation process. Journal of Plant Pathology 91: 607-613.

Bettiol W, Kupper KC, Goes A, Moretto C, Correa EB (2005) Mass production of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma viride* for the control of *Phyllosticta citricarpa* (teleomorph: *Guignardia citricarpa*). Summa Phytopathologica 31: 276-278.

Chen Z-M, Li Q, Liu H-M, Yu N, Xie T-J, Yang M-Y, Shen P, Chen X-D (2010) Greater enhancement of *Bacillus subtilis* spore yields in submerged cultures by optimization of medium composition through statistical experimental designs. Applied Microbiology and Biotechnology 85: 1353-1360.

Costa E, Teixidó N, Usall J, Atarés E, Viñas I (2001) Production of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 using commercial products and by-products. Applied Microbiology and Biotechnology 56: 367-371.

Duffy BK, Défago G (1999a) Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. Applied and Environmental Microbiology 65: 2429-2438.

Duffy BK, Défago G (1999b) Trace mineral amendments in agriculture for optimizing the biocontrol activity of plant-associated bacteria, *In*: (ed.), Effect of Mineral-Organic-Microorganism Interactions on Soil and Freshwater Environments. Springer, pp. 295-304.

Engelkes C, Nuclo R, Fravel D (1997) Effect of carbon, nitrogen, and C: N ratio on growth, sporulation, and biocontrol efficacy of *Talaromyces flavus*. Phytopathology 87: 500-505.

Gao Y, Fan Y, Nambou K, Wei L, Liu Z, Imanaka T, Hua Q (2014) Enhancement of ansamitocin P-3 production in *Actinosynnema pretiosum* by a synergistic effect of glycerol and glucose. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 41: 143-152.

Gu X-B, Zheng Z-M, Yu H-Q, Wang J, Liang F-L, Liu R-L (2005) Optimization of medium constituents for a novel lipopeptide production by *Bacillus subtilis* MO-01 by a response surface method. Process Biochemistry 40: 3196-3201.

Heidari-Tajabadi F, ahmadzade M, Moeinzadeh A (2010) Comparison of sugar beet and sugar cane molasses regarding their influence on production and efficiency of *Pseudomonas fluorescens*, the biocontrol agent of *Sclerotinia sclerotiorum*. Sugerbeet Journal 27: 39-52. (In Persian).

Jeong H, Choi S-K, Kloepper JW, Ryu C-M (2014) Genome sequence of the plant endophyte *Bacillus pumilus* INR7, triggering induced systemic resistance in field crops. Genome Announcements 2: e01093-01014.

Kilian M, Steiner U, Krebs B, Junge H, Schmiedeknecht G, Hain R (2000) FZB24® *Bacillus subtilis*–mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer 1: 1.

Lewis JA (1991) Formulation and delivery systems of biocontrol agents with emphasis on fungi, *In*: (ed.), The Rhizosphere and Plant Growth. Springer Nature, pp. 279-287.

McNeil B, Harvey L (2008) Practical fermentation technology. John Wiley & Sons.

Milner J, Raffel S, Lethbridge B, Handelsman J (1995) Culture conditions that influence accumulation of zwittermicin A by *Bacillus cereus* UW85. Applied Microbiology and Biotechnology 43: 685-691.

Moges F, Prabhakar T, Sankar G, Latha S, Ramana T (2012) Optimization of media for production of bioactive compounds by *Streptomyces parvullus* SS23/2 isolated from marine algae in the Bay of Bengal, India. Ethiopian Journal of Biological Sciences 11: 1-11.

Moreira GA, Micheloud GA, Beccaria AJ, Goicoechea HC (2007) Optimization of the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 δ-endotoxins production by using experimental mixture design and artificial neural networks. Biochemical Engineering Journal 35: 48-55.

Muis A (2016) Biomass production and formulation of *Bacillus subtilis* for biological control. Indonesian Journal of Agricultural Science 7: 51-56.

Mupondwa E, Li X, Boyetchko S, Hynes R, Geissler J (2015) Technoeconomic analysis of large scale production of pre-emergent *Pseudomonas fluorescens* microbial bioherbicide in Canada. Bioresource Technology 175: 517-528.

Nishanth SK, Nambisan B, Mohandas C (2013) Impact of beef extract and six carbon source on antifungal metabolites production by bacterium associated with entomopathogenic nematode against *Fusarium oxysporum*. Archives of Phytopathology and Plant Protection 46: 962-970.

Ongena M, Jacques P (2008) *Bacillus* lipopeptides versatile weapon for plant disease control. Trends in Microbiology 16: 115-125.

Ooijkaas L, Ifoeng C, Tramper J, Buitelaar R (1998) Spore production of *Coniothyrium minitans* during solid-state fermentation on different nitrogen sources with glucose or starch as carbon source. Biotechnology Letters 20: 785-788.

Peighamy-Ashnaei S, Sharifi-Tehrani A, Ahmadzadeh M, Behboudi K (2007a) Effect of carbon and nitrogen sources on growth and biological efficacy of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* against *Rhizoctonia solani*, the causal agent of bean damping-off. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences 72: 951-956.

Peighamy-Ashnaei S, Sharifi-Tehrani A, Ahmadzadeh M, Behboudi K (2007b) Interaction of media on production and biocontrol efficacy of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* against grey mould of apple. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences 73: 249-255.

Posada-Uribe LF, Romero-Tabarez M, Villegas-Escobar V (2015) Effect of medium components and culture conditions in *Bacillus subtilis* EA-CB0575 spore production. Bioprocess and Biosystems Engineering 38: 1879-1888.

Qessaoui R, Bouharroud R, Furze JN, El Aalaoui M, Akroud H, Amarraque A, Vaerenbergh JV, Tahzima R, Mayad EH, Chebli B (2019) Applications of new rhizobacteria *Pseudomonas* isolates in agroecology via fundamental processes complementing plant growth. Scientific Reports 9: 12832.

Safari Asl F, Rouhani H, Falahati Rastegar M, Jahanbakhsh V (2010) effect of C and N source on the growth and antifungal activity of *Bacillus subtilis* bs against *Pythium aphanidermatum*. Journal of Plant Protection 24: 53-61. (In Persian).

Sartori M, Nesci A, Etcheverry M (2012) Production of *Fusarium verticillioides* biocontrol agents, *Bacillus amyloliquefaciens* and *Microbacterium oleovorans*, using different growth media: evaluation of biomass and viability after freeze-drying. Food Additives and Contaminants: Part A 29: 287-292.

Sharifi R, Ahmadzadeh M, Sharifi-Tehrani A, K. T-J (2010) Pyoverdine production in *Pseudomonas fluorescens* UTPF5 and its association with suppression of common bean damping off caused by *Rhizoctonia solani* (Kuhn). Journal of Plant Protection Research 50: 72-78.

Sharifi R, Ahmadzadeh M, Sharifi Tehrani A, Fallahzadeh V (2006) Competition for iron uptake by fluorescent pseudomonads to control of *Rhizoctonia solani* kuhn causing agent of bean damping-off disease. Journal of Plant Protection 22: 183-195. (In Persian).

Sharifi R, Ryu CM (2017) Chatting With a Tiny Belowground Member of the Holobiome: Communication Between Plants and Growth-Promoting Rhizobacteria, *In*: Guillaume B (ed.), Advances in Botanical Research. Academic Press, pp. 135-160.

Singh R, Arora NK (2016) Bacterial Formulations and Delivery Systems against Pests in Sustainable Agro-Food Production, *In*: (ed.), Reference Module in Food Science. Elsevier, pp.

Slininger P, Jackson M (1992) Nutritional factors regulating growth and accumulation of phenazine 1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. Applied Microbiology and Biotechnology 37: 388-392.

Uekusa H, Nomura K, Manago M, Shoda M (2005) Biological control of damping-off of tomato seedlings and cucumber Phomopsis root rot by *Bacillus subtilis* RB14-C. Japan Agricultural Research Quarterly 39: 109-114.

Vazquez M, Santos V, Parajo J (1997) Effect of the carbon source on the carotenoid profiles of *Phaffia rhodozyma* strains. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 19: 263-268.