کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دوره۹، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۹ (۱۰۱-۹۳) DOI: 10.22059/jbioc.2021.321458.302

استفاده از پسماندهای ارزان قیمت جهت تکثیر باکتری *Paenibacillus polymyxa* سویه N179

سیما دلخواه‌نیا[۱]، وحید فلاح‌زاده ممقانی*[۲]، اکبر شیرزاد[۳]
۱. فارغ التحصیل کارشناسی ارشد بیماری‌های گیاهی از گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران
۲ و۳. استادیار ودانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

چکیده

در تحقیق حاضر باکتری *Paenibacillus polymyxa* سویه N179 که قبلا توانایی بیوکنترل آن در شرایط گلخانه‌ای و مزرعه به اثبات رسیده بود، انتخاب و تلاش شد تا با استفاده از پسماند صنایع غذایی محیط کشتی جهت تکثیر با کیفیت و ارزان قیمت این سویه معرفی شود. میزان تکثیر این باکتری در محیط‌های کشت مختلف به صورت معنی‌داری متفاوت بود به طوری که تکثیر آن در محیط کشت M1 (حاوی ملاس چندرقند و سولفات آمونیوم) به میزان ۱۷/۳ درصد بالاتر از محیط کشت M5 بود. همچنین خاصیت آنتاگونیستی *P. polymyxa* تکثیر شده در محیط‌های کشت مختلف هم در شرایط درون شیشه و هم در شرایط گلخانه متفاوت بود. سلولهای بدست آمده از محیط‌های کشت M4 (حاوی تفاله خرما و کنجاله کنجد) و M10 (نشاسته و کنجاله کنجد) در شرایط درون شیشه بیشترین خاصیت بازدارندگی را نسبت به قارچ *Rhizoctonia solani*، از خود نشان دادند. مقاومت سلولهای بدست آمده از محیط‌های کشت بدست آمده نسبت به فرآیند فرمولاسیون و زنده مانی در طول مدت انبارداری نیز بررسی و مشخص شد سلولهای بدست آمده از محیط‌های کشت M2، M7، M9، و LB بیشترین مقاومت را در در طول دوره انبارداری از خود نشان دادند به طوری که اختلاف جمعیت فرمولاسیون حاصل از محیط کشت M7 با محیط کشت M1 (با بدترین عملکرد) به میزان ۲۶ درصد بالاتر بود. علاوه بر این کارایی فرمولاسیون‌های تهیه شده بعد از گذشت سه ماه در شرایط گلخانه‌ای مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که فرمولاسیون تهیه شده از محیط‌های کشت M5 و LB بیشترین کارآیی را داشتند و شاخص آلودگی در این دو تیمار به ترتیب به میزان ۴۰ و ۵۰ درصد کمتر ثبت شد. با این وجود با در نظر گرفتن مجموع نتایج حاصل از بررسی میزان رشد، خاصیت بازدارندگی و ماندگاری، محیط کشت M9 بهترین عملکرد را از خود نشان داد.

واژه های کلیدی: کنترل بیولوژیک، ریزوکتونیا، فرمولاسیون، محیط کشت.

Using cheap by-products of food industry for cultivation of *Paenibacillus polymyxa* strain N179

Sima Delkhahnia[1], Vahid Fallahzadeh Mamaghani[2], Akbar Shirzad[3]
[1] Master of science graduated of Plant pathology from Plant protection department, College of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran
[2]Assistant professor and [3]Associate professor at Plant protection department, College of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

Abstract

In current research *Paenibacillus polymyxa* strain N179 was selected based on its previous performance in greenhouse and field condition, and cheap by-products of food industry was used to introduce a best medium for its high quality and low-cost cultivation. The growth rate of this bacterium in various media was significantly different as the proliferation of it in medium M1 (with beet molasses and ammonium sulfate) was 17.3 percent grater than the medium M5. addition, antagonistic activity of cells from various media either in-vitro or in greenhouse condition was significantly different. The cells from M4 (10 g date pomace, 4 g sesame press cake) and M10 (4 g sesame press cake, 5 g starch) have shown highest inhibition against *Rhizoctonia solani* fungus. The resistance of cells from media against formulation process and viability during preservation period was assessed and it was found that cells from LB, M9, M7, and M2 media were the most resistant ones during preservation period as the difference of population of formulation made from M7 medium was 26 percent greater than the one from medium M1 (worst performance). Moreover, efficacy of prepared formulations was assessed after three months in greenhouse condition and it was found that formulations made from M5 and LB were the most effective ones in controlling the disease and the disease index was 40 and 50 percent, respectively, lower than the infected control. However, considering all of the results from growth rate, shelf life, inhibitory effect, M9 was shown the best performance.

Key words: biocontrol, *Rhizoctonia solani*, formulation, culture media.

E-mail: vfm128@gmail.com

مقدمه

استفاده از سموم شیمیایی برای کنترل بیماریهای گیاهی از گذشته‌های دور روشی معمول بوده است. اما هزینه های اقتصادی بالا، ظهور نژادهای مقاوم به سموم شیمیایی، نگرانی‌های زیست محیطی و آلودگی در چرخه غذایی سبب ممانعت از کاربرد روشهای شیمیایی در کنترل بیماریهای گیاهی شده است. دلایل فوق دستیابی به روش‌های سالم و ارزانتر را به عنوان یک چالش جدی فراروی محققان قرار داده است (Agrios 2005). در پنج دهه اخیر استراتژی کنترل بیولوژیک به عنوان یکی از روش‌های مهم مدیریت بیماری‌های گیاهی مطرح بوده است (Heydari and Pessarakli 2010). علی‌رغم اهمیت این استراتژی و تحقیقات وسیعی که در دهه‌های اخیر در این زمینه صورت گرفته است، به دلیل بالا بودن قیمت آفتکش‌های زیستی و نیز پایین بود کارآیی آنها، استقبال کمی از این محصولات شده است (Barratt *et al*. 2018). یکی از مهمترین مسائلی که در فرایند فرمانتاسیون عوامل بیوکنترل تاثیری مستقیمی روی کیفیت و قیمت تمام شده آن دارد، نوع محیط کشت مورد استفاده است (Fallahzadeh and Ahmadzadeh 2011). معمولا در مقیاس آزمایشگاهی از مواد و ترکیبات خالص و غنی برای طراحی محیط کشت‌های میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌شود اما به دلیل بالا بودن قیمت اینگونه از ترکیبات امکان استفاده از آنها برای تولید عوامل بیوکنترل در مقیاس صنعتی وجود ندارد (Stanbury *et al*. 2013). در فرآیند تولید مواد مختلف از میکروارگانیسم ها (مثل آنتی بیوتیکها، اسیدهای آمینه، اسیدهای آلی و ...) ، هدف از بهینه سازیافزایش حداکثری تولید متابولیت هدف با کمترین و ارزان‌ترین نوع سوبسترا است. در تولید عوامل کنترل بیولوژیک تولید متابولیت خاصی مد نظر نمی باشد و در اینجا هدف تولید حداکثر بیوماس با بالاترین کیفیت (قدرت بیوکنترلی بالاتر، حداکثر مقاومت نسبت به مراحل فرمولاسیون و ماندگاری طولانی) می‌باشد. در تحقیقی که به هدف انتخاب منابع کربن و ازت ارزان برای تولید باکتری *Pantoea agglomerans* انجام گردید مشخص شد که باکتریهای بدست آمده از محیط کشت ترکیبی ملاس و عصاره خشک شده جو(dry beer extract) بیشترین خاصیت بیوکنترلی را در کنترل بیماریهای پس از برداشت از خود نشان دادند (Costa *et al*, 2001). البته باید توجه داشت که بعضی میکروارگانسم ها قادر به مصرف برخی قندها نیستند. برای مثال *Pseudomonas fluorescens* 2-79 قادر به مصرف دی ساکاریدهای سوکروز، مالتوز و لاکتوز نمی باشد (Slininger and Shea-Wilbur 1995). بنابراین با توجه به اینکه بخش اعظم کربوهیدرات تشکیل دهنده ملاس، سوکروز می باشد این ماده نمی تواند در تولید تجاری این باکتری به کار گرفته شود.

تحقیقات در زمینه استفاده از پسماندهای صنایع غذایی جهت تولید عوامل بیوکنترل در کشور بسیار محدود است. در یک بررسی ملاس چغندر قند و نیشکر جهت کشت باکتری *Pseudomonas fluorescens* مورد استفاده قرار گرفت و مشخص شد که تفاوت معنی‌داری در میزان رشد یا کارایی باکتری کشت یافته در این دو نوع محیط کشت وجود ندارد (Heidari *et al*. 2011). در بررسی دیگری ملاس چغندرقند، ملاس نیشکر، پساب سیب‌زمینی و سرم شیر جهت کشت باکتری *Bacillus subtilis* UTB96 مورد استفاده قرار گرفت و مشخص شد که رشد این باکتری به صورت قابل توجهی در محیط کشت حاوی ملاس چغندرقند بیشتر صورت می-گیرد (Ghasemi et al. 2013).

یکی از باکتریهای با کارآیی قابل توجه باکتری *Paenibacillus polymyxa* سویه N179 است که بر اساس بازدارندگی آن نسبت به بیمارگرهای گیاهی مختلف، قابلیت افزایش دهندگی رشد گیاه و خصوصیات دیگر غربالگری شده و بدست آمد (Fallahzadeh-Mamaghani *et al*. 2021). این سویه علاوه بر شرایط آزمایشگاه و گلخانه، در شرایط مزرعه ای نیز عملکرد قابل قبولی از خود نشان داد و کاندید بسیار مناسبی برای تولید تجاری محسوب می‌شود (Fallahzadeh-Mamaghani *et al*. 2021). هدف اصلی این پژوهش، طراحی یک محیط‌کشت ارزان قیمت برای رشد بهینه سویه N179 است که در عین حال ماندگاری بالا و کارایی قابل قبولی داشته باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه و نگهداری عامل بیمارگر و عامل بیوکنترل

در این بررسی از قارچ بیمارگر *Rhizoctonia solani* AG4 و گیاه لوبیا به عنوان پاتوسیستم استفاده شد. قارچ بیمارگر از کلکسیون میکروبی آزمایشگاه بیماری شناسی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان دریافت شد. برای نگهداری طولانی مدت این بیمارگر از روش کاغذ صافی استفاده شد.

برای این منظور قارچ روی محیط کشت PDA کشت شد و روی محیط کشت تکه‌های کاغذ صافی استریل قرار داده شد تا توسط ریسه‌های قارچ کلنیزه شوند. سپس کاغذ صافی‌ها در شرایط استریل خشک سازی شده و در داخل لوله‌های ۱/۵ میلی لیتری در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند. عامل بیوکنترل مورد استفاده باکتری *Paenibacillus polymyxa* سویه N179 بود که از کلکسیون میکروبی آزمایشگاه شهید مدنی آذربایجان دریافت شد (Fallahzadeh-Mamaghani *et al.* 2021). برای نگهداری بلند مدت این باکتری نیز از کشت ۴۸ ساعت باکتری سوسپانسیونی با جمعیت تقریبی 10^9 سلول در میلی‌لیتر در محلول ۰/۱ مولار سولفات منیزیم تهیه شد و در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد.

محیط کشت‌های مورد استفاده

برای تهیه محیط‌های کشت مورد استفاده در این بررسی از پسماند کارخانجات صنایع غذایی شهرک شهید سلیمی استفاده شد. ترکیبات پایه تمامی محیط‌های کشت عبارت بودند از: ۰/۴ گرم سولفات منیزیم، ۰/۹۸ گرم فسفات هیدروژن پتاسیم، ۰/۴ گرم کربنات کلسیم (به ازای هر لیتر). منابع کربن و ازت محیط‌های کشت مختلف در جدول شماره ۱ آورده شده است. از محیط کشت LB نیز به عنوان شاهد استفاده شد که ترکیبات آن نیز عبارت بودند از: پپتون ۱۰ گرم، کلرید سدیم ۱۰ گرم و عصاره مخمر ۵ گرم. قبل از اتوکلاو کردن محیط‌های کشت pH آنها بر روی ۷ تنظیم شد. ملاس چغندرقند از کارخانه قند میاندوآب، تفاله خرما از شرکت گل بهان، کنجاله کنجد از مراکز روغن‌گیری در تبریز، آب پنیر از کارگاه تولید پنیر سنتی و نشاسته درجه سه از شرکت گلوکوزان شهرک صنعتی شهید سلیمی آذرشهر تهیه شد.

جدول ۱. منابع کربن و ازت محیط‌های کشت مورد استفاده در این مطالعه (به ازای هر لیتر)

Table 1. Carbon and nitrogen sources of the media used in this study (per liter)

M1*	10 ml Beet molasses, 0.2 g $(NH_4)_2SO_4$
M2	4 g sesame press cake, 10 ml beet molasses
M3	10g date pomace, 0.2 g $(NH_4)_2SO_4$
M4	10 g date pomace, 4 g sesame press cake
M5	10 ml cheese whey, 0.2 $(NH_4)_2SO_4$
M6	10 ml cheese whey, 4 g sesame press cake
M7	10 g apple pomace, 0.2 $(NH_4)_2SO_4$
M8	10 g apple pomace, 4 g sesame press cake
M9	5 g starch (grade 3), 0.2 $(NH_4)_2SO_4$
M10	4 g sesame press cake, 5 g starch (grade 3)

*ترکیبات پایه تمامی محیط‌های کشت عبارت بودند از: ۰/۴ گرم سولفات منیزیم، ۰/۹۸ گرم فسفات هیدروژن پتاسیم، ۰/۴ گرم کربنات کلسیم (به ازای هر لیتر)

* The basal components of all media were as follow: 0.4 g $MgSO_4$, 0.98 g K_2HPO_4, 0.4 $CaCO_3$ (per liter)

کشت سویه N179 در محیط‌های کشت طراحی شده و تعیین جمعیت آنها

در ابتدا باکتری از استوک آن به محیط کشت آگار غذایی (NA) منتقل شد و به صورت خطی کشت شد و بعد از گذشت ۴۸ ساعت یک کلنی از آن به محیط کشت LB منتقل شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۶ درجه سلسیوس و دور ۱۷۰ دور در دقیقه نگهداری شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون به دست آمده به ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت‌های مختلف در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری منتقل شد و محیط کشت‌ها در شرایط مشابه به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند. برای تعیین جمعیت باکتری رشد یافته در این محیط‌های کشت از روش سری رقت استفاده شد.

بررسی خاصیت بازدارندگی باکتری حاصل از کشت در شرایط درون شیشه

برای بررسی خاصیت بازدارندگی باکتری حاصل از محیط‌کشت‌های طراحی شده از روش کشت متقابل استفاده شد. دیسک‌های کاغذی استریل به فاصله یک سانتی‌متر از دیواره پتری و به فواصل مساوی از مرکز تشتک پتری که حاوی محیط‌کشت PDA بود، قرار گرفتند. از سپانسیون باکتری رشد کرده در هر یک از محیط‌های کشت، ۱۰ میکرولیتر برداشته و روی دیسک‌های کاغذی چکانده شد. سپس از حاشیه کشت پنج روزه قارچ *R. solani* حلقه میسلیومی به قطر هفت میلی‌متر به مرکز تشتک‌های پتری منتقل شدند. در هر تشتک پتری یک دیسک کاغذ صافی آغشته به آب مقطر استریل به عنوان شاهد استفاده شد. این تشتک‌های پتری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در انکوباتور نگهداری شدند. پس از برخورد حاشیه پرگنه قارچ به دیواره تشتک پتری در قسمتی که کاغذ صافی شاهد قرار داشت، درصد بازدارندگی با روشی که قبلا توضیح داده شده است محاسبه شد (Shirzad *et al.* 2012).

فرمولاسیون باکتری حاصل از کشت در محیط کشت‌های مختلف و بررسی ماندگاری آن

فرمولاسیون باکتری با روشی تغییر یافته به انجام رسید به طوری که از کاه گندم پودر شده به عنوان حامل استفاده شد (Ashofteh *et al.* 2009). بعد از اتمام زمان کشت باکتری در محیط‌های کشت مختلف، مقداری از سوسپانسیون بدست آمده (۲۰ میلی‌لیتر) سانتریفیوژ شد و سلولهای رسوب یافته در محلول ۰/۱ میلی‌مولار سولفات منیزیم معلق شدند و جمعیت سوسپانسیون حاصل روی 10^8 سلول بر میلی‌لیتر تنظیم شد. سپس به ۹ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون‌ها ۲ میلی‌لیتر گلیسرول ۸۰ درصد اضافه شد و با محلول دو درصد CMC (Samchun, South Korea) با نسبت ۵۰:۵۰ (v/v) مخلوط شده و به مدت ۵ دقیقه بر روی شیکر قرار داده شدند. در نهایت سوسپانسیون حاصل با کاه پودر شده به نسبت ۴:۱ مخلوط شد و فرمولاسیون حاصل در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. برای بررسی زنده مانی باکتری در فرمولاسیون بدست آمده از روش سری رقت استفاده شد.

بررسی کارآیی فرمولاسیون‌های تهیه شده از محیط‌های کشت مختلف در شرایط گلخانه‌ای

این آزمون بر اساس روش‌هایی که قبلا شرح داده شده بود به انجام رسید (Sharifi *et al.* 2008; Ashofteh *et al.* 2009). از لیوان‌های پلی‌اتیلنی به عنوان گلدان استفاده شد و به یک سوم میانی در هر گلدان ۵۰ گرم خاک مخلوط شده با اینوکلوم قارچ *R. solani* (به نسبت ۲ در هزار) اضافه شد. یک سوم فوقانی و تحتانی گلدان با مخلوط خاک زراعی و پرلیت و پیت‌ماس پر گردید. سپس گلدان‌ها در حد اشباع آبیاری شدند و ۰/۳ گرم از باکتری فرموله شده به هر گلدان اضافه شد و بذور جوانه زده لوبیا چیتی رقم محلی، در عمق ۱/۵ سانتی‌متری خاک کشت شد. در این آزمون برای گلدان‌های شاهد آلوده در کنار هر بذر لوبیا از کاه گندم مخلوط شده با گلیسرول و CMC بدون باکتری استفاده شد. گلدان‌ها به اتاقک رشد با دمای ۲۸ درجه سلسیوس و ۱۶ ساعت روشنایی منتقل شدند. این آزمون در غالب طرح بلوک-های کاملا تصادفی با سه تکرار برای هر تیمار انجام گرفت و آبیاری هر دور یک بار به مدت ۱۰ روز انجام شد. نتایج آزمون بعد از ۱۰ روز مورد بررسی قرار گرفت. شاخص آلودگی در هر گلدان از فعالیت قارچ *R. solani* و باکتری فرموله شده در مقیاس ۵-۰ بررسی شد (Sharifi *et al.* 2008). مقیاس ارزیابی بدین صورت بود:

۰= گیاهان سالم بدون هیچگونه علائم آلودگی

۱= کمتر از ۲۰٪ ریشه آلوده شده و حداقل یک شانکر قهوه ای درشت داشته باشد

۲= حدود ۵۰٪ ریشه دارای شانکرهای تیپیک باشد.

۳= بیش از ۷۰-۶۰٪ ریشه دارای شانکر باشد

۴= مرگ گیاهچه پس از درآمدن از خاک (Postemergence)، طول گیاهچه کمتر از پنج سانتی متر باشد.

۵= مرگ گیاهچه قبل از در آمدن از خاک (Preemergence) یا پوسیدگی بذر

شاخص بیماری بر حسب درصد و با استفاده از فرمول زیر محاسبه

$$\%DI = \frac{\sum_{i=1}^{n}(\text{مقیاس آلودگی} \times \text{گیاهچه های تیمار})}{5 \times \text{تعداد کل گیاهچه ها}} \times 100$$ شد.

علاوه بر این وزن تر کل اندام گیاهی، طول اندام هوایی و طول ریشه برای هر تیمار اندازه‌گیری شد.

نتایج

میزان رشد سویه N179 در محیط کشت‌های مختلف و قدرت بازدارندگی آن

مقایسه میانگین داده‌های مربوط به اندازه‌گیری میزان رشد سویه N179 در محیط کشت‌های مختلف (بعد از ۷۲ ساعت) نشان داد که نوع محیط کشت مورد استفاده تاثیر معنی‌داری در میزان رشد این باکتری دارد به طوری که بیشترین رشد این باکتری در محیط کشت-های M1، M7، M2 و M9 به ثبت رسید (جدول ۲). کمترین رشد این باکتری نیز در محیط کشت M5 به ثبت رسید. بعد از رشد باکتری در محیط‌های کشت مختلف، خاصیت بازدارندگی سلول‌های بدست آمده نسبت به *R. solani* مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی مشخص شد که سلولهای بدست آمده از محیط-های کشت M4 و M10 بیشترین خاصیت بازدارندگی را دارند و در گروه آماری a قرار گرفتند با این حال میزان رشد باکتری در این محیط‌های کشت کمتر بود (جدول ۲). کمترین خاصیت بازدارندگی نیز مربوط به سلول-هایی بود که در محیط‌های کشت M8 و M9 رشد یافته بودند.

جدول ۲. رشد سویه N179 در محیط‌های کشت مختلف و فعالیت آنتاگونیستی سلولهای حاصل علیه قارچ *R. solani*

Table 1. Growth of strain N179 in different media and antagonistic activity of resulted cells against *R. solani*.

Media	Log_{10} cfu/ ml	Inhibition*
M1	7.25a** ± 0.41	61.67ab ± 7.64
M7	7.20a ± 0.19	45.83bcd ± 7.22
M2	7.16a ± 0.12	56.67abc ± 5.77
M9	7.15a ± 0.08	33d ± 17
M8	7.11ab ± 0.05	15e ± 8.66
LB	7.10ab ± 0.05	44cd ± 11
M4	6.59bc ± 0.65	66.67a ± 5.77
M3	6.58bc ± 0.51	41.67cd ± 14.43
M6	6.53cd ± 0.18	56.67abc ± 5.77
M10	6.44cd ± 0.04	63.33a ± 5.77
M5	5.99d ± 0.38	56.33abc ± 4.53

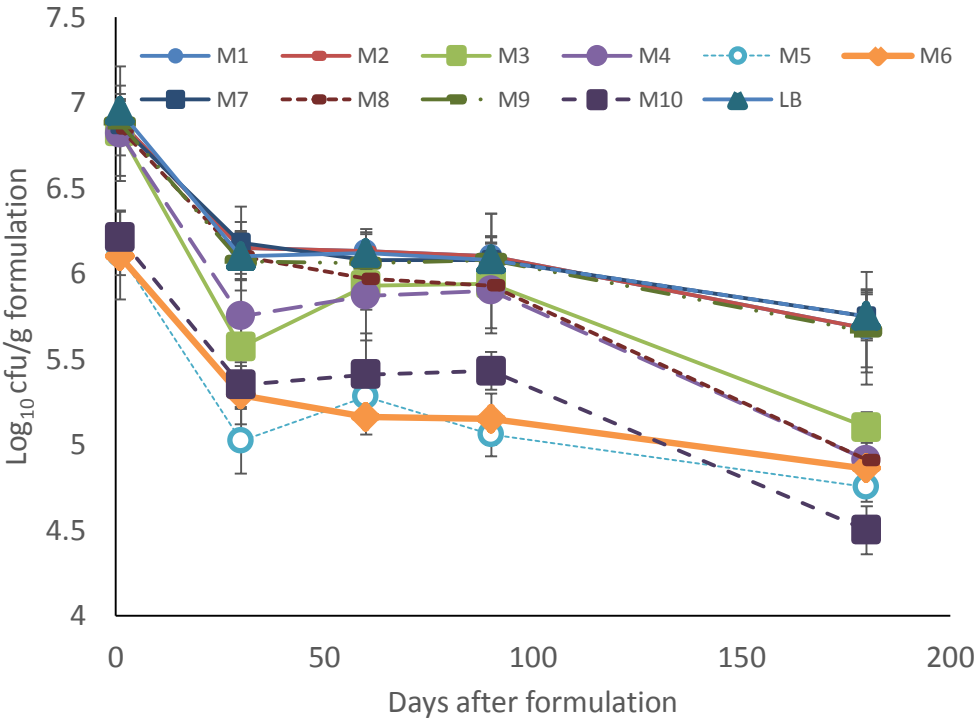
درصد بازداری از رشد میسلیومی با فرمول $100 * (R - r)/R$ محاسبه شد که در آن R بیشترین رشد میسلیومی از مرکز تشتک پتری و r رشد میسلیومی از مرکز تشتک پتری به سمت کلنی باکتری می‌باشد. مقادیر ارائه شده میانگین‌های سه تکرار است. بر اساس آزمون دامنه چندگانه فیشر (LSD) میانگین‌های با حروف مشابه در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند. منابع کربن و ازت مورد استفاده و مقادیر آنها در متن انگلیسی ذکر شده است.

*% Mycelial inhibition was calculated as $(R - r)/R \times 100$, where R is mycelial growth away from the bacterial colony (the maximum growth of the fungal mycelia) and r is mycelial growth towards the bacteria. ** Values are the means of three replicates. Means with same letters are not significantly different according to fisher's multiple range test (LSD) at $P < 0.05$. Carbon and nitrogen source in different media were as follow respectively: M1: 10 ml Beet molasses, 0.2 g $(NH_4)_2SO_4$, M2: 4 g sesame press cake, 10 ml beet molasses, M3: 10g date pomace, 0.2 g $(NH_4)_2SO_4$, M4: 10 g date pomace, 4 g sesame press cake, M5: 10 ml cheese whey, 0.2 $(NH_4)_2SO_4$, M6: 10 ml cheese whey, 4 g sesame press cake, M7: 10 g apple pomace, 0.2 $(NH_4)_2SO_4$, M8: 10 g apple pomace, 4 g sesame press cake. M9: 5 g starch (grade 3), 0.2 $(NH_4)_2SO_4$, M10: 4 g sesame press cake, 5 g starch (grade 3).

ماندگاری باکتری حاصل از محیط کشتهای مختلف در فرمولاسیون

بعد از کشت سویه N179 در محیط کشت‌های مختلف سلولهای بدست آمده به صورت پودری فرموله شد و سپس جمعیت باکتری در زمانهای مختلف به مدت ۶ ماه مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه میانگین جمعیت-های محاسبه شده نشان داد که نوع محیط کشت مورد استفاده برای کشت این باکتری تاثیر قابل توجهی روی ماندگاری این باکتری در فرآیند فرمولاسیون و دوره انبارداری آن دارد به طوری که سلولهای بدست آمده از

محیط‌های کشت M2، M7، M9 و LB بیشترین مقاومت را در مقابل فرآیند خشک سازی و در طول دوره انبارداری از خود نشان دادند (شکل ۱). جمعیت سلولهای بدست آمده از سایر محیط‌های کشت بلافاصله بعد از فرآیند خشک سازی کاهش پیدا کرد به طوری که بیشترین کاهش جمعیت در سلولهای بدست آمده از محیط کشت M6 اتفاق افتاد که در حدود ۱۲ درصد کاهش مشاهده شد. جمعیت سلولهای بدست آمده از تمام محیط‌های کشت یک ماه بعد از فرمولاسیون کاهش پیدا کرد اما این کاهش در مورد محیط‌های کشت M2، M7، M9 و LB کمتر بود و جمعیت فرمولاسیون‌های تهیه شده از این محیط‌های کشت به صورت معنی‌داری بیشتر از سایر محیط‌های کشت بود. جمعیت باکتری در تمام فرمولاسیون‌ها بعد از اولین ماه به مدت سه ماه تقریبا ثابت بود و کاهش چندانی مشاهده نشد (شکل ۱). جمعیت سلولهای موجود در فرمولاسیون‌ها در ششمین ماه نیز مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که جمعیت سلولهای بدست آمده از محیط‌های ذکر شده در بالا در این بازه زمانی نیز تغییر چندانی نداشتند. جمعیت باکتری در فرمولاسیون‌هایی که از سایر محیط‌های کشت تهیه شده بودند به صورت قابل توجهی کاهش یافته بودند (شکل ۱). شدیدترین کاهش جمعیت در مورد فرمولاسیونی اتفاق افتاده بود که از محیط کشت M10 بدست آمده بود به طوری که جمعیت آن به $۱/۳ \times ۱۰^{۴}$ سلول به ازای هر گرم فرمولاسیون خشک رسیده بود.



شکل ۱. بقاء سویه N179 رشد یافته در محیط‌های کشت مختلف در طول ۱۸۰ روز به صورت فرمولاسیون خشک در دمای ۴ درجه سلسیوس. مقادیر ارائه شده میانگین سه نمونه‌گیری و انجام سری رقت مختلف از فرمولاسیون‌ها است. نوارهای خطا نشان دهنده انحراف معیار است.

Figure 1. Survival of strain N179 grown in various media during maintenance of its powder formulation for 180 days in vials at 4ºC. Each value is the mean of three different sampling and serial dilutions from formulations. The error bars represent standard deviation.

بررسی کارایی فرمولاسیون‌های تهیه شده از محیط‌های کشت مختلف

کارآیی فرمولاسیونهای مختلف در کنترل مرگ گیاهچه ریزوکتونیایی لوبیا در شرایط گلخانه‌ای بعد از گذشت سه ماه از فرمولاسیون مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی نیز مشخص شد که نوع محیط کشت مورد استفاده برای کشت سویه N179 بر روی کارآیی آن تاثیر معنی‌داری دارد. بیشترین کارآیی مربوط به فرمولاسیون

بدست آمده از محیط کشت M5 بود که شاخص بیماری در آن ۵۴/۶۷ درصد و میانگین وزن تر محاسبه شده برای بوته‌های حاصل ۴/۱۱ اندازه‌گیری شد. پایین‌ترین شاخص بیماری در مورد محیط کشت LB مشاهده شد اما زیست توده بوته‌های حاصل در این تیمار کمتر بود (جدول ۳).

جدول ۳. اثر نوع محیط کشت بر روی کارآیی سویه N179 علیه قارچ *R. solani* در گیاه لوبیا بعد از فرمولاسیون و نگهداری آن به مدت سه ماه.

Table 2. The effect of medium culture type on efficacy of strain N179 against *R. solani* on bean after formulation and maintenance for three months

Media	Disease index	Biomass
M8	93.33a** ± 6.2	1.43ab
Infected control	92.00ab ± 4	1.68b
M3	76.00abc ± 4	2.63b
M7	73.3bcd ± 22	1.83ab
M2	72.00cd ± 10.58	1.44b
M6	68.00cd ± 10.58	2.97ab
M9	66.67cd ± 12.86	1.54b
M1	65.33cd ± 6.11	1.54b
M4	58.67cde ± 9.24	1.92ab
M10	56.00de ± 14.42	1.82ab
M5	54.67de ± 12.22	4.11a
LB	44.00e ± 1.42	2.02ab
Non-infected control	0.00f	2.4ab

** مقادیر ارائه شده میانگین‌های سه تکرار است. بر اساس آزمون دامنه چندگانه فیشر (LSD) میانگین‌های با حروف مشابه در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند. منابع کربن و ازت مورد استفاده و مقادیر آنها در متن انگلیسی ذکر شده است.

** Values are the means of three replicates. Means with same letters are not significantly different according to fisher's multiple range test (LSD) at $P < 0.05$. Carbon and nitrogen source in different media were as follow respectively: M1: 10 ml Beet molasses, 0.2 g $(NH_4)_2SO_4$, M2: 4 g sesame press cake, 10 ml beet molasses, M3: 10g date pomace, 0.2 g $(NH_4)_2SO_4$, M4: 10 g date pomace, 4 g sesame press cake, M5: 10 ml cheese whey, 0.2 $(NH_4)_2SO_4$, M6: 10 ml cheese whey, 4 g sesame press cake, M7: 10 g apple pomace, 0.2 $(NH_4)_2SO_4$, M8: 10 g apple pomace, 4 g sesame press cake. M9: 5 g starch (grade 3), 0.2 $(NH_4)_2SO_4$, M10: 4 g sesame press cake, 5 g starch (grade 3).

بحث

در دهه‌های اخیر تحقیقات در زمینه کنترل بیولوژیک آفات و بیماریهای گیاهی در کشور به طور فزاینده‌ای افزایش پیدا کرده است و بسیاری از محققین حوزه گیاهپزشکی، زراعت، خاکشناسی و حتی زیست شناسی در دانشگاه‌ها و موسسات تحقیقاتی مختلف در کشور تحقیقات خود را به سوی این حوزه سوق داده‌اند. در بسیاری از موارد با وجود معرفی سویه‌هایی با کارآیی قابل توجه هیچگونه تحقیقات تکمیلی روی آنها صورت نگرفته و تنها خروجی این تحقیقات انتشار مقالات علمی است (Alizadeh *et al*. 2020).

بنابراین لازم است برای جلوگیری از هدر رفت منابع کشور و تبدیل دانش کنترل بیولوژیک به دست آمده به ثروت و ارزش افزوده، تحقیقات به سمت بررسی‌های مزرعه‌ای، تولید انبوه و فرمولاسیون این عوامل میکروبی سوق پیدا کند. هدف از انجام تحقیق حاضر نیز در این راستا بوده است که در آن سویه N179 که قبلا کارآیی آن در شرایط گلخانه و مزرعه به اثبات رسیده بود انتخاب و تلاش شد تا محیط کشت ارزان قیمتی جهت تولید این سویه با ارزش معرفی شود.

برای تهیه محیط‌های کشت از پسماند ارزان قیمت صنایع غذایی استفاده شد. انتخاب این مواد به گونه‌ای بود که مهمترین اجزای محیط کشت یعنی منبع کربن و ازت آنها تامین شود. بررسی‌ها نشان داد که نوع مواد مورد استفاده در این محیط‌های کشت بر روی میزان رشد باکتری تاثیر معنی‌داری دارد. میزان رشد باکتری در بیشتر محیط‌های مورد استفاده به اندازه محیط کشت غنی LB بود (جدول ۲).

هر چند کارایی سلولهای بدست آمده از بعضی از محیط‌های کشت که رشد قابل توجهی در آنها صورت گرفته بود بسیار پایین بود. برای مثال رشد باکتری در محیط کشت M8 (حاوی تفاله سیب و کنجاله کنجد)

تفاوت معنی‌داری با محیط کشت LB نداشت اما کارایی سلولهای بدست آمده از این محیط هم در شرایط درون شیشه و هم در شرایط گلخانه‌ای بسیار پایین بود (جدول ۲ و ۳). علاوه بر این نتیجه جالب توجه دیگر در این بررسی در خصوص محیط کشت M5 (حاوی آب پنیر و سولفات آمونیوم) است که با وجود رشد پایین باکتری در این محیط کشت بهترین کارآیی را در شرایط گلخانه‌ای از خود نشان داد.

این نتایج با یافته‌های پیشین همخوانی دارد که در آنها نیز به اهمیت نوع منابع کربن و ازت محیط کشت و نوع و نسبت عناصر غذایی آن در میزان رشد باکتری و کارایی سلولهای حاصل از آنها اشاره شده است (Ashofteh *et al*. 2009; Liu *et al*. 2017). ضمن اینکه تحقیقات پیشین نیز نشان می‌دهد که بعضی از عوامل بیوکنترل در محیط‌های کشت خاصی به خوبی رشد می‌کنند و زیست توده قابل توجهی تولید می‌کنند اما کارآیی سلولهای بدست آمده در چنین محیط‌هایی ممکن است بسیار پایین باشد (Fallahzadeh and Ahmadzadeh 2011). برای مثال در عامل بیوکنترل *Colletotrichum truncatum* نشان داده شده است که در محیط کشت غنی از منبع کربن اسپورزایی زیاد رخ می‌دهد اما چنین اسپورهایی کارایی بسیار پایینی در مقایسه با اسپورهایی داشتند که در محیط کشتی با نسبت منبع کربن پایین‌تر تولید شده بودند (Schisler *et al*. 1991).

پارامتر دیگری که در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت، توانایی سلولهای حاصل از محیط‌های کشت مختلف در تحمل فرآیند خشک سازی فرمولاسیون و زنده مانی آن در طول انباری داری فرمولاسیون بود. تحمل سلولهای بدست آمده از محیط‌های کشت مختلف نسبت به فرآیند خشک سازی و زنده مانی آنها در مدت شش ماه متفاوت بود. سلول‌های که از محیط‌های کشت M2 (ملاس چغندر قند و کنجاله کنجد)، M7 (تفاله سیب و سولفات آمونیوم)، M9 (نشاسته و سولفات آمونیوم) و LB بدست آمده بودند بیشترین مقاومت را از خود نشان دادند و جمعت فرمولاسیون خشک آنها کمترین کاهش را نشان داد (شکل ۱).

تحقیقات مختلفی نشان می‌دهند که شرایط محیط کشت و ترکیب آن اثر قابل توجهی در کیفیت و کمیت اندواسپورهای تولید شده توسط عوامل بیوکنترل دارد و بنابراین با به استفاده از محیط‌های کشت مشخصی می‌توان فرمولاسیونهایی از باکتریها تهیه کرد که کیفیت خود را در طول مدت انبارداری از دست ندهند (Nicholson *et al.* 2000; Schisler *et al.* 2004). بنابراین به نظر می‌رسد که محیط کشت‌های اشاره شده در بالا در بهبود اسپوردهی این باکتری و کیفیت اسپورهای تولید شده توسط آن اثر قابل توجهی داشتند.

نتیجه‌گیری کلی

در تحقیق حاضر با استفاده از پسماند صنایع غذایی محیط‌های کشت مختلفی جهت تکثیر باکتری *Paenibacillus polymyxa* سویه N179 تهیه و مورد بررسی قرار گرفت. برای ارزیابی محیط‌های کشت نرخ تکثیر باکتری، خاصیت بازدارندگی سلولهای بدست آمده، قابلیت ماندگاری در فرمولاسیون و کارآیی فرمولاسیون تهیه شده مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج نشان داد که هر کدام از محیط‌های کشت مختلف از لحاظ پارامترهای مختلف مزایا و معایبی دارند. با این حال با توجه به نرخ تکثیر بالای باکتری در محیط کشت M9 (حاوی نشاسته درجه سه و سولفات آمونیوم) و ماندگاری قابل توجه سلولهای بدست آمده از این محیط کشت و همچنین کارآیی قابل قبول فرمولاسیون حاصل از آن، به نظر می‌رسد که این محیط کشت بهترین گزینه برای تکثیر و تولید انبوه سویه N179 است. علاوه بر این نشاسته درجه سه که در این محیط کشت به کار گرفته شد یکی از پسماند ارزان قیمت است که در حجم انبوهی در کارخانجات محلی قابل تهیه است.

REFERENCES

Agrios GN. (2005). Plant pathology. 5th edition. Elsevier academic press. Amesterdam.

Alizadeh M, Vasebi Y, Safaie N (2020) Microbial antagonists against plant pathogens in Iran: A review. Open Agriculture 5: 404–440.

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 607–613.

Barratt BIP, Moran VC, Bigler F, Van Lenteren JC (2018) The status of biological control and recommendations for improving uptake for the future. BioControl 63: 155–167.

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.

Fallahzadeh-Mamaghani V, Golchin S, Shirzad A, Mohammadi H, Mohamadivand F (2021) Characterization of *Paenibacillus polymixa* N179 as a robust and multifunctional biocontrol agent. Biological Control 154: 104505.

Fallahzadeh V, Ahmadzadeh M. (2011) Fermentation thechnology of biological control agents. 2011, Tehran.

Ghasemi S, Ahmadzadeh M, Khodaian Cheghini F (2013) Culture medium designing for semi-industrial production of *Bacillus subtilis* UTB96. Biological control of pests and plant diseases 2: 149–160.

Heidari TF, Ahmadzadeh M, Moeinzadeh A (2011) Comparison of sugar beet and sugar cane molasses regarding their influence on production and efficiency of *Pseudomonas fluorescens*, the biocontrol agent of *Sclerotinia sclerotiorum*. Journal of sugar beet. 27(1): 39-52. (In persian)

Heydari A, Pessarakli M (2010) A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. Journal of biological sciences 10: 273–290.

Liu J, Li G, Sui Y (2017) Optimization of culture medium enhances viable biomass production and biocontrol efficacy of the antagonistic yeast, *Candida diversa*. Frontiers in microbiology 8: 2021.

Nicholson WL, Munakata N, Horneck G, Melosh HJ, Setlow P (2000) Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. Microbiology and molecular biology reviews 64: 548–572.

Schisler DA, Jackson MA, Bothast RJ (1991) Influence of nutrition during conidiation of *Colletotrichum truncatum* on conidial germination and efficacy in inciting disease in *Sesbania exaltata*. Phytopathology 81: 458–461.

Schisler DA, Slininger PJ, Behle RW, Jackson MA (2004) Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. Phytopathology 94: 1267–1271.

Sharifi R, Ahmadzadeh M, Sharifi-Tehrani A, Fallahzadeh-Mamaghani V, Talebi-jahromi K (2008) 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(2); 183-195. (In perisan).

Shirzad A, Fallahzadeh-Mamaghani V, Pazhouhandeh M (2012) Antagonistic potential of fluorescent pseudomonads and control of crown and root rot of cucumber caused by *Phythophtora drechsleri*. The Plant Pathology Journal 28: 1–9.

Slininger PJ, Shea-Wilbur MA (1995) Liquid-culture pH, temperature, and carbon (not nitrogen) source regulate phenazine productivity of the take-all biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2-79. Applied microbiology and biotechnology 43: 794–800.

Stanbury PF, Whitaker A, Hall SJ (2013) Principles of fermentation technology. Elsevier. United Kingdom.