بهینه‌سازی محیط کشت صنعتی و فرمولاسیون جدایه *Bacillus subtilis* B2 و ارزیابی آن در کنترل بیولوژیک بیماری سفیدک پودری خیار گلخانه‌ای

لاچین مختارنژاد[1]✉، سمیرا شاملی[2] و محسن فرزانه[3]

۱-استادیار بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش و ترویج کشاورزی آذربایجان غربی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ارومیه، ایران؛ ۲- محقق بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش و ترویج کشاورزی گلستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران؛ ۳- دانشیار گروه کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی، اوین، تهران، ایران.

چکیده

در این تحقیق، امکان تولید انبوه و فرمولاسیون جدایه باکتری *Bacillus subtilis* B2 با قابلیت بیوکنترلی بر روی سفیدک سطحی خیار مورد بررسی قرار گرفته است. برای بهینه‌سازی محیط کشت باکتری *B. subtilis* ، غربالگری منابع کربن و نیتروژن مختلف با استفاده از نرم افزار® (Design Expert) انجام شد. براساس طراحی مرکب مرکزی (central composite) روش رویه پاسخ، غلظت بهینه ملاس چغندر و عصاره ذرت خیسانده (CSL) در محیط کشت برای تولید حداکثر توده سلولی باکتری به ترتیب ٦-٤/٤٥ و ٦-٣/٨٢ گرم در لیتر بود. بر اساس نتایج بهینه‌سازی فاکتورهای محیطی با روش طراحی فاکتوریل کسری، حداکثر توده سلولی باکتری در محیط کشت بهینه در دمای۳۲ درجه سلسیوس، دور همزن ۹۰ دور در دقیقه، درصد زادمایه ۳/۵ و اسیدیته ٦ حاصل شد. پس از بهینه‌سازی محیط کشت، در مجموع ۱۸ فرمولاسیون مختلف پودری خشک با استفاده از مواد حامل و مواد افزودنی مختلف تهیه شد. پس از شش ماه نگهداری در دمای ٤ و ٢٤ درجه سلسیوس، بیشترین جمعیت سلول زنده باکتری در فرمولاسیون شماره ۳ (تالک، سدیم آلجینات و تری‌هالوز) به ترتیب با جمعیت ۷/۹×۱۰^۸ و ٤/۲×۱۰^۷ سلول زنده در هر گرم فرمولاسیون بود. قابلیت ماندگارترین فرمولاسیون حاوی باکتری *B. subtilis* به منظور کنترل سفیدک پودری خیار در گلخانه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد از نظردرصد کنترل کنندگی بین تیمار فرمولاسیون جدایه باکتری با٤٥/٤٢ درصد کنترل کنندگی و قارچ‌کش دومارک با ٤٦/٥٣ درصد کنترل کنندگی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت.

واژه‌های کلیدی: خیار، سفیدک سطحی، کنترل زیستی، فرمولاسیون، تجاری‌سازی

Optimizations of commercial culture medium of *Bacillus subtilis* isolate B2 and its formulation for controlling powdery mildew of cucumber at greenhouse

L. Mokhtarnejad[1]✉, S. Shameli[2], M. Farzaneh[3]

1.Assistant Professor, Plant Protection Research Department, West Azarbaijan Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Urmia, Iran; 2. Researcher, Plant Protection Research Department, Golestan Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Gorgan, Iran; 3. Associate professor, Department of Agriculture, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Evin, Tehran, Iran.

Abstract

In this research, the possibility of mass production and formulation of bacterial isolate *Bacillus subtilis* B2 with antagonistic activity against powdery mildew of cucumber were investigated. In order to optimize the culture medium, screening of different carbon and nitrogen sources was performed using Design Expert® software. Base of the central composite design, optimal concentration of beet molasses and Corn steep liquor (CSL) in the culture medium to produce maximum bacterial cell biomass was 4.45-6 and 3.82-6 g/liter, respectively. Base on the optimization of environment factors, the maximum bacterial biomass was obtained at a temperature of 32 °C, a stirring speed of 90 rpm, 3.5% of inoculums and pH of 6. Subsequent the biomass production, additional research was carried out with the objective of formulation the bacterial isolate. Totally 18 different formulations prepared with different carriers and adjutants. After six months storage at 4 °C and 24°C the highest population of *B. subtilis* B2 was in formulation No. 3 (containing sodium alginate and trihalose) with 7.9×10^8 and 4.2×10^7 CFU per gram of formulation stored at 4 °C and 24 °C respectively. Based on with highest shelf life, the best formulation of *B. subtilis* selected for investigation under greenhouse conditions to evaluate the ability of formulations to control powdery mildew of cucumber. Results showed *B. subtilis* formulation and Dumark fungicide reduces the disease severity by 45.42% and 46.53%, respectively that there is no significant difference between them.

Key words: Cucumber, Powdery mildew, Biological control, Commercialization

[1] L.mokhtarnejad@gmail.com

مقدمه

سفیدک پودری ناشی از قارچ *Podosphaera xanthii* (Castagne) U. Braun یکی از مهم ترین بیماری‌های خیارگلخانه‌ای در سراسر جهان است که موجب کاهش کیفیت و عملکرد محصول می‌شود (Rur *et al.*, 2018). از روش‌های معمول کنترل بیماری‌های گیاهی استفاده از ارقام مقاوم و قارچ‌کش‌های شیمیایی است که در مورد سفیدک پودری خیار معرفی ارقام مقاوم چندان موفقیت-آمیز نبوده و برای کنترل این بیماری عمدتا کاربرد قارچکش‌های شیمیایی توصیه می‌شود. قارچ عامل سفیدک پودری چند چرخه بوده و با تولید مثل جنسی و غیرجنسی به فراوانی تکثیر پیدا می‌کنند و احتمال وقوع جمعیت مقاوم به قارچ‌کش در مدت زمان کوتاه بسیار بالامی‌باشد (Hollomon *et al.*, 2002) و در نتیجه در سال‌های اخیر بسیاری از این سموم شیمیایی بی اثر شده‌اند (Rosslenbroich and Stuebler, 2000). علاوه‌بر این نگرانی‌های مصرف کنندگان از باقیمانده آفت‌کش‌ها در مواد غذایی و خطرات ناشی از آن، روش‌های کنترل بیماری را به سمت یافتن جایگزین ایمن‌تر سوق می‌دهد (Wu *et al.*, 2023). آنتاگونیست‌های قارچی و باکتریایی یکی از مهم‌ترین عوامل جایگزین قارچ‌کش‌های شیمیایی برای کنترل بیماری‌های گیاهی هستند (Bonaterra *et al.*, 2022) که علاوه بر سازگاری بالا با محیط زیست، تاثیر منفی روی سلامتی انسان ندارند و موجب ایجاد مقاومت در بیمارگرها نمی‌شوند (Jaiswa *et al.*, 2022).

با وجود اینکه تعداد زیادی از آنتاگونیست‌های میکروبی برای کنترل بیماری‌های گیاهی معرفی شده‌اند، اما تعداد کمی از این عوامل تجاری شده‌اند. یکی از فاکتورهای کلیدی قابل ملاحظه جهت تجاری کردن یک عامل میکروبی، دست‌یابی به یک محیط کم هزینه قابل دسترس برای تولید زیست توده سلولی است که بتواند در مقیاس صنعتی استفاده شود (Jeyarajan and Nakkeeran, 2000). استفاده از هیدروکربن‌های خالص مثل گلوکز، فروکتوز، سوکروز، لاکتوز و قندهای دیگر در میکروبیولوژی صنعتی باعث بالا رفتن هزینه تمام شده برای تولید محصول می‌شود. محیط رشد مطلوب باید ارزان و از محصولات فرعی کشاورزی (by-product) هر منطقه باشد. برای مثال از منابع ارزان قیمت کربن و نیتروژن می‌توان به ملاس، مخمر آب جو، پنبه دانه، آرد سویا، نشاسته، آب پنیر و عصاره ذرت اشاره کرد (Oh *et al.*, 2005; Wee *et al.*, 2004). از طرفی شرایط انجام تخمیر (هوادهی، pH و دما) همانند نوع محیط کشت می‌تواند روی کیفیت و کمیت میکروارگانیسم تاثیر بگذارد. معمولا" برای تولید مخمرها و باکتری‌ها از روش فرمانتاسیون مایع داخل فرمانتورهای واجد همزن استفاده می‌شود.(Fravel *et al.*, 1999; Glazer *et al.*, 1995)

امروزه در جهان از ملاس جهت تکثیر بسیاری از میکروارگانیسم ها استفاده می‌شود (Bertolin *et al.*, 2003). بر اساس مطالعات صورت گرفته در سال ۲۰۱۵، بیشترین توده باکتری *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) در محیط کشت ملاس چغندر و نیشکر، در دمای ۳۵ درجه و pH هفت مشاهده شد (Maria Florence, 2015). CSL یک منبع حاوی ویتامین‌ها و مواد معدنی است و به طور موفقیت‌آمیزی برای فرمانتاسیون میکروارگانیسم‌ها به کار رفته و مقالات متعددی مبنی بر کارا و مقرون به صرفه بودن این مواد در مراحل فرمانتاسیون وجود دارد (Kim *et al.*, 2007).

هنگامی که تعداد زیادی فاکتوروجود دارند می‌توان از آزمایش‌های غربالگری نرم افزار Design Expert برای حذف فاکتورهای غیر مهم با هدف جلوگیری از اتلاف وقت و هزینه استفاده کرد و از پرطرفدارترین طراحی‌ها برای غربالگری می‌توان به طرح‌های فاکتوریلی کسری 2^{k-p} و طراحی پلاکت برمن (PDB) اشاره کرد (Armstrong, 2006; Lazic, 2004). بعد از غربالگری اولیه، روش رویه-پاسخ می‌تواند برای یافتن شرایط بهینه سیستم، با در نظر گرفتن فاکتورهای مؤثر بر پاسخ، به کار رود. این روش شامل یک سری از طراحی‌های آزمایش، آنالیز و تکنیک‌های بهینه‌سازی است که جهت بهینه‌سازی و یافتن مقادیر فاکتورها در رسیدن به حداکثر پاسخ فرآیند، کاربرد دارد (Armstrong, 2006). به عنوان مثال، به منظور به دست آوردن غظت بهینه ملاس و CSL در محیط

کشت برای تولید حداکثر بیوماس سلولی *Saccharomyces cerevisiae* با استفاده از روش رویه پاسخ، بیشترین بیوماس زمانی حاصل شد که ملاس با غلظت ٦/٤ درصد وCSL با غلظت ١٧ درصد به محیط کشت اضافه شد (Kim *et al.*, 2007).

می‌توان گفت مانع اصلی برای تجاری کردن محصولات بیوکنترلی، ایجاد یک محصول فرموله پایدار است که قابلیت کنترل کنندگی خود را همانند سلول‌های تازه حفظ کرده باشد (Melin *et al.*, 2006). انواع مختلفی از فرمولاسیون‌های مایع و جامد وجود دارد که هرکدام از این فرمولاسیون‌ها در اکوسیستم خاصی استفاده می‌شوند. در میان فرمولاسیون‌های خشک بیشترین توجه به فرمولاسیون نوع پودر وتابل یا رطوبت‌پذیر است، زیرا که زمان نگهداری آن بالا است و قابلیت اختلاط خوبی با آب دارد و به راحتی با استفاده از تجهیزات سمپاشی معمولی به کار می‌رود. این فرمولاسیون شامل ٢٠ تا ٨٠ درصد مادهٔ مؤثره، ٥ تا ٤٥ درصد مادهٔ پرکننده، ١ تا ١٠ درصد مادهٔ پخش کننده و سه تا پنج درصد سورفکتانت است (Arumuganathan *et al.*, 2009; Jones and Burges 1998) انتخاب مواد افزوده به هدف فرموله کردن هر میکروارگانیسم بستگی دارد. در مواقعی کپسوله کردن یا استفاده از مواد با قابلیت پوشش‌دهی می‌تواند موجب افزایش زنده‌مانی و همچنین سهولت کاربرد در شراط محیطی (خارج از آزمایشگاه) شود (Wong *et al.*, 2019; Vassilev *et al.*, 2020). از کائولین برای فرمولاسیون سویه‌ای از *Streptomyces griseus* استفاده شد و نتایج نشان داد فرمولاسیون تهیه شده از کائولین و آلجینات با هم در مقایسه با فرمولاسیون تهیه شده از آلجینات به تنهایی، در کنترل *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* عملکرد بهتری از خود نشان داد (Zacky *et al.*, 2015).

هدف این تحقیق غربالگری و بهینه‌سازی اجزا و شرایط محیط کشت برای حداکثر تولید توده سلولی یک سویه باکتری *B. subtilis* B2 بومی ایران (جداسازی شده از گلخانه‌های خیار ورامین) با کمک نرم افزار®(Design Expert)، بررسی امکان فرمولاسیون باکتری و ارزیابی بهترین فرمولاسیون تهیه شده در کنترل سفیدک سطحی و القای ترکیبات فنولی برگ خیار در شرایط گلخانه بود.

روش بررسی

تهیه باکتری آنتاگونیست

جدایه باکتری *B. subtilis* B2 جداسازی شده از فلور گیاه خیار که با توجه به مطالعات سال ٩٧ (اطلاعات منتشر نشده) در کنترل سفیدک پودری گل محمدی و خیار موثر واقع شده بود، از کلکسیون میکروارگانیسم‌های مفید پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی دریافت شد.

غربالگری و بهینه‌سازی تولید زیست توده باکتری

ابتدا جهت تعیین کینتیک رشد (الگوی رشد) باکتری، از کشت ٢٤ ساعته جدایه باکتری B2، سوسپانسیونی به جمعیت 8×10^{9} سلول باکتری در میلی‌لیتر بافر فسفات ١٠٠ میلی مولار (برابر با جذب نوری یک) تهیه شد. سپس یک میلی‌لیتر از این سوسپانسیون به ١٠٠ میلی‌لیتر محیط کشت NB در فلاسک‌های ارلن ٢٥٠ میلی‌لیتری اضافه شد. فلاسک‌های ارلن به شیکر انکوباتور با دمای ٣٠ درجه سلسیوس و دور rpm ١٥٠ منتقل و هر چهار ساعت یکبار و به مدت ٣٦ ساعت جمعیت باکتری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری (طول موج ٦٠٠ نانومتر) اندازه‌گیری شد.

به منظور تولید حداکثری بیوماس سلولی باکتری جدایه B2، بهینه‌سازی محیط کشت باکمک روش طراحی آزمایش و در دو مرحله، غربالگری اجزائ محیط کشت و بهینه‌سازی مقادیر فاکتورهای موثر بر تولید انجام گرفت.

غربالگری و بهینه‌سازی اجزائ محیط کشت

از ملاس چغندرقند، گلوکز، شکر، ملاس نیشکر، پنتوزان، نشاسته، اوره و عصاره ذرت خیسانده (CSL)، سولفات آمونیوم، عصاره مخمر و نیترات آمونیوم به‌عنوان منابع کربن و نیتروژن به منظور بهینه‌سازی یک محیط کشت صنعتی استفاده شد.

آزمایش‌های متعددی به منظور غربالگری منابع کربن و نیتروژن و انتخاب بهترین منبع کربن و منبع نیتروژن با استفاده از طراحی پلاکت برمن نرم افزار (Design Expert)® طراحی و انجام شد. فاکتورها و محدوده غلظت‌های آن‌ها (غلظت حداقل یا منفی، حداکثر یا مثبت و میانگین یا صفر) در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱.

به‌طور خلاصه در ابتدا ۱۰۰ میلی لیتر از محیط کشت‌های مختلف با نسبت های تعیین شده توسط نرم‌افزار، درون یک ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری تهیه شد و پس از اتوکلاو و خنک شدن (دمای ۵۰ درجه سلسیوس)، با یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون کشت ۲٤ ساعته باکتری (OD= 1) مایه‌زنی شدند. ارلن مایه‌زنی شده، داخل شیکر انکوباتور با دور ۱۵۰ دور در دقیقه و درجه حرارت ۳۰ درجه سلسیوس نگهداری شد. بعد از ۲۸ ساعت میزان رشد باکتری در هر ارلن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ٦۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شدند.

بهینه‌سازی مقادیر اجزای منتخب (ملاس چغندرقند، ملاس نیشکر، CSL و عصاره مخمر) با کمک طراحی فاکتوریل کسری انجام شد (جدول ۲). فزون براین، روش رویه پاسخ برای تخمین و پیش بینی غلظت موثر اجزائ محیط کشت منتخب برتر، به منظور بالا بردن تولید سلول، با استفاده از طراحی Central composite design مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۳). در این روش متغیرها در پنج سطح (-α, -1, 0, 1, +α) مورد مطالعه قرار می‌گیرد. رفتار سیستم را می توان توسط معادله درجه دو زیر توصیف کرد:

$$\mathbf{Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2}$$

در این معادله Y پاسخ پیش‌بینی شده، β_0 عرض از مبدائ، β_1, β_2 ضریب خطی، β_{11}, β_{22} ضریب توان دو، β_{12} ضریب برهمکنش و X_1, X_2 متغیرهای مستقل می‌باشد. برای طراحی آزمایش بهینه‌سازی و آنالیز نتایج آن از نرم‌افزار (Design Expert)® استفاده شد.

جدول ۲.

جدول ۳-

بهینه‌سازی فاکتورهای محیطی بر تولید زیست توده باکتری در محیط کشت بهینه

برای بررسی تاثیر فاکتورهای محیطی روی محیط کشت بهینه‌سازی شده، دو آزمایش فاکتوریل کسری با ۲۰ آزمایش طراحی شد و تاثیر دما، سرعت دور شیکر، درصد مایه تلقیح اولیه و اسیدیته روی افزایش بیوماس سلولی باکتری در محیط بهینه (ملاس چغندر با CSL) مورد مطالعه قرار گرفت و تاثیر فاکتورهای محیطی به طور جداگانه بررسی شد. فاکتورها و دامنه آن‌ها در جدول ٤ آمده است.

جدول ٤-

تهیه فرمولاسیون جدایه باکتری و بررسی ماندگاری آن

برای تهیه فرمولاسیون‌های باکتری از دو ماده پرکننده پودر تالک وکائولین که بر اساس منابع جزو ارزانترین و مقرون به صرفه‌ترین مواد پرکننده در تولید فرمولاسیون‌ها هستند، استفاده شد. برای تهیه هر فرمولاسیون باکتری، مواد پرکننده در دو روز متوالی اتوکلاو شدند (Vidhyasekaran and Muthamilan, 1995). بر اساس منابع از مواد افزودنی مختلفی به منظور بهینه‌سازی فرمولاسیون-ها استفاده شد. این مواد افزودنی شامل سدیم آلجینات و کیتوزان به عنوان تثبیت کننده (پوشاننده)، تری‌هالوز[۲] و شیر بدون

[۲] Trehalose

چربی[۳]، برای افزایش زنده‌مانی (پایدار کننده) هستند. به تمام فرمولاسیون‌ها Tween 80 به میزان سه درصد به عنوان سورفکتانت و کلرید کلسیم[٤] به میزان چهار درصد استفاده شد (Zhang *et al*., 2023; Qi *et al*., 2023).

در ابتدا از کشت ۷۲ ساعته باکتری، سوسپانسیونی با جمعیت حاوی $۸×۱۰^{۱۰}$ سلول باکتری در میلی‌لیتر تهیه شد. به این سوسپانسیون بر اساس جدول ۵ سدیم آلجینات و یا کیتوزان به نسبت دو درصد، تری‌هالوز و شیر خشک نیز به میزان یک درصد اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه با دور rpm٤۰۰ مخلوط و سپس به نسبت ۱ به ٤ به مواد حامل اضافه شد. فرمولاسیون‌های تهیه شده در دمای محیط و زیر هود لامینار خشک شدند. زمانیکه رطوبت به ۱۵ تا ۲۰ درصد رسید، به‌وسیله مخلوط‌کن به طور کامل با هم مخلوط و یکنواخت شدند. جمعیت باکتری در هر گرم فرمولاسیون اندازه‌گیری و داخل بسته‌های پلی‌اتیلنی قرار داده شدند و در دو دمای ٤ و ٢٤ درجه سلسیوس نگهداری شدند. اندازه‌گیری جمعیت باکتری در هر گرم فرمولاسیون با استفاده از روش سریال رقت (Serial dilution) محاسبه شد (Sabaratnam and Traquai, 2002). بدین صورت‌که، یک گرم از هر فرمولاسیون در نه میلی لیتر سرم فیزیولوژیک سترون سوسپانسیون شد. پس از انجام ده سری رقت از سه رقت آخر روی محیط کشت MA پخش شد و و بعد از ٤۸ ساعت نگهداری تعداد کلنی‌ها شمارش شد. جمعیت باکتری بلافاصله بعد از تهیه فرمولاسیون‌ها در حدود $۳/۱×۱۰^{۱۰}$ سلول باکتری در میلی‌لیتر بود. برای برآورد تعداد سلول‌های زنده هر فرمولاسیون از روش سریال رقت استفاده شد. بدین صورت که هر ماه یک گرم از هر فرمولاسیون را برداشته و با روش سریال رقت جمعیت سلول زنده باکتری مورد ارزیابی قرار گرفت (Atanasova-Pancevska and Kungulovski, 2018). آزمایشات در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی انجام شد. ترکیب و اجزا تیمارها در جدول ۵ آمده است.

جدول۵-

بررسی فرمولاسیون برتر میکروبی در مهار سفیدک سطحی خیار در گلخانه

ارزیابی کارایی فرمولاسیون جدایه باکتریایی در گلخانه خیار واقع در استان گلستان در سال ۱٤۰۲ انجام شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی شامل فاکتور A (در چهار سطح: فرمولاسیون حاوی باکتری، مواد فرمولاسیون پایه بدون عامل کنترل بیولوژیک، تیمار قارچکش دومارک و شاهد) و فاکتور B (زمان ارزیابی در سه سطح: روز۵، روز ۱۰، روز ۲۰) و در سه تکرار انجام شد. هر تکرار شامل ده عدد گلدان سطلی شماره ۱۰ به ابعاد ۲۸ در ۲۲.۵ سانتیمتر (ده واحد آزمایشی یا بوته) بود. به‌طور خلاصه، در هفته پنجم (سه تا چهار برگی) بوته‌ها با غلظت دو در هزار فرمولاسیون حاوی باکتری *B. subtilis* تیمار شدند. سوسپانسیون‌های تهیه شده از فرمولاسیون‌ها روی سطح بالا و زیر برگ ها محلول‌پاشی شد. از قارچ‌کش دومارک به نسبت ۰/٤ در هزار و آب مقطر سترون به عنوان تیمارهای شاهد استفاده شد. از تیمار با بستر فرمولاسیون‌ها بدون ماده موثره باکتری نیز برای بررسی تاثیر احتمالی مواد حامل فرمولاسیون استفاده شد. پس از ٢٤ ساعت، مایه‌کوبی بیمارگر در شرایط گلخانه توسط سوسپانسیون اسپورهای تازه *P. xanthi* ($۱۰^{۵}$ کنیدی در میلی‌لیتر) (Kamel, 2003) به روش جمالی زواره و همکاران (۱۳۸۳) انجام شد. به‌طورخلاصه در این روش از بوته‌های خیار واقع در گلخانه‌های تجاری استان گلستان که آلوده به قارچ *P. xanthi* بودند برگ‌هایی را که به تازگی آلوده شده و حامل اسپورهای قارچ بیمارگر بودند جدا شد . قطعاتی از این برگ‌ها در آب مقطرسترون حاوی توئین ۸۰ غوطه‌ور و سپس با استفاده از لام هماسیتومتر[۵] تعداد اسپور در واحد حجم سوسپانسیون شمارش و

---

[۳] Skim milk

[٤] $CaCl_2$

[۵] Haemacytometer

روی 10^5 اسپور در میلی‌لیتر تنظیم شد. بلافاصله با استفاده از یک محلول‌پاش سوسپانسیون روی برگ‌های مورد نظر پاشیده شد، در حدی که سطح برگ خیس شود اما جاری نگردد. بوته‌های مایه‌زنی شده به مدت ٢٤ ساعت در دمای ٢٢ درجه سلسیوس، در شرایط تاریکی در زیر پوشش پلاستیکی مشکی و رطوبت بالای ٩٠ درصد نگه‌داری و سپس به شرایط عادی گلخانه بازگردانده شدند (El- Sharkaway *et al*., 2014). گیاهان به‌صورت دوره‌ای از نظر علائم ظاهری مورد بررسی قرار گرفته و میانگین شدت بیماری براساس شاخص شدت بیماری با استفاده از مقیاس ١-١٢ به روش هورسفال و بارت (١٩٥٤) انجام شد. اندازه‌گیری شدت بیماری در فواصل زمانی ٥، ١٠ و ٢٠ روز پس از اعمال تیمارها ارزیابی شد.

درصد شدت بیماری با استفاده از فرمول زیر تعیین شد.

$$\mathrm{PDI} = \left(\frac{\sum SDI \times DI}{MDI \times N}\right) \times 100$$

PDI= درصد شدت بیماری

SDI= تعداد نمونه‌های با درجه آلودگی مشابه

DI= درجه بیماری مربوط به هر نمونه

MDI= حداکثر درجه آلودگی

N= تعداد کل نمونه مربوط به هر تکرار

نتایج

غربالگری اجزا محیط کشت به روش پلاکت-برمن جهت رشد باکتری *B. subtilis* B2

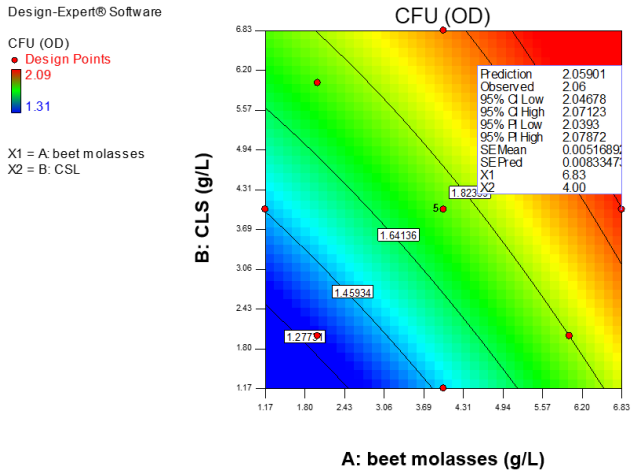
آنالیز داده‌های آزمایش اول بر پایه طراحی با روش پلاکت-برمن (جدول ٣) نشان داد که هر یازده فاکتور استفاده شده (ملاس چغندر قند، گلوکز، شکر، ملاس نیشکر، پنتوزان، نشاسته، اوره، CSL، سولفات آمونیوم، عصاره مخمر و نیترات آمونیوم) تاثیر معنی‌داری در افزایش جمعیت باکتری داشتند. تاثیر هم‌افزایی چهار فاکتور ملاس چغندر، ملاس نیشکر، CSL و عصاره مخمر در رشد باکتری *B. subtilis* B2 بیشتر از بقیه فاکتورها بود. تاثیرهم افزاییملاس چغندر، ملاس نیشکر، CSL و عصاره مخمر به ترتیب ٣٠/٧٨، ١٣/٠٤، ٦/٩٨ و ١٠/٦٢ درصد ارزیابی شد. بر این مبنا چهار فاکتور فوق با جزییات بیشتری به روش طراحی فاکتوریل کسری مورد مطالعه قرار گرفت.

جدول ٦-

بهینه سازی مقادیر اجزای منتخب محیط کشت رشد باکتری *B. subtilis* B2 با کمک طراحی فاکتوریل کسری:

نتایج تاثیرگذاری چهار جز منتخب محیط کشت روی زیست توده باکتری براساس طراحی فاکتوریل کسری نشان داد هر چهار فاکتور ملاس چغندرقند، ملاس نیشکر، CSL و عصاره مخمر دارای تاثیر مثبت قابل توجه بودند. ملاس چغندر قند و CSL به ترتیب با ٢١/٢٦ و ١٩/٦٩درصد، بیشترین اثرگذاری را نشان دادند. اثر متقابل ملاس چغندرقند با هریک از سه فاکتور دیگر نیز درصد هم‌افزایی قابل توجه‌ای داشت (جدول٧). اثر اختلاط در مابقی تعاملات متقابل مشاهده شد.

جدول٧-



شکل ۱- نمودارکانتور روش رویه پاسخ رابطه ملاس چغندرقند و CSL روی رشد و تولید زیست توده باکتری *Bacillus. subtilis* B2 پس از ۲۸ ساعت نگهداری روی شیکر انکوباتور با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه، در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی.

Fig 1. The contour (plot of response surface method about the effect of beet molasses and CSL on biomass production of *Bacillus suntilis* B2 after 28 h incubation on an incubator shaker at 150 rpm, 30 °C and darkness.

طبق نتایج شکل ۱، بیشترین زیست توده در محیط کشت حاوی مخلوط حداقل ۵/٦۵ گرم در لیتر ملاس چغندرقند و٦/۷۵گرم در لیتر CSL و همچنین ٦/۷۵ گرم در لیتر ملاس چغندرقند و حداقل ٤/۷۵ گرم در لیتر CSL و با جذب نوری بیش از ۲/۰۹ مشاهده شد. از طرفی در محیط کشت حاوی غلظت حد واسط CSL (چهار گرم در لیتر) در صورتیکه غلظت ملاس چغندر٦/۸۳ گرم در لیتر استفاده شود نیز بیشترین زیست توده (با OD برابر با ۲/۰٦) حاصل خواهد شد (شکل ۱).

مدل رابطه ملاس چغندرقند و تولید زیست توده باکتری و همچنین رابطه CSL و تولید زیست توده باکتری از توان دوم است. بر این اساس مدل ریاضی رابطه بین متغیرها (A, B) و پاسخ (Y) را می‌توان با معادله زیر توصیف کرد:

$$Y= 1.77 + 0.21A + 0.18B - 0.043A\times B - 0.0023A^2- 0.0017B^2$$

با حل معادله و آنالیز نمودار رویه و پاسخ، اپتیمم غلظت CSL و غلظت ملاس چغندرقند در محیط کشت برای رسیدن به محدوده ماکزیمم رشد، به ترتیب ٦-۳/۸۲ گرم در لیتر و ٦-٤/٤۵ گرم در لیتر بود. در نهایت طبق پیشنهاد نرم افزار، محیط کشت حاوی ملاس چغندر برابر با ۵/۹۱ گرم در لیتر + CSL برابر با ٤/٤۲ گرم در لیتر به عنوان محیط کشت بهینه انتخاب شد.

بهینه‌سازی فاکتورهای محیطی بر تولید بیوماس باکتری *B.subtilis* B2 در محیط کشت بهینه

میانگین جذب نوری زیست توده سلولی باکتری تولید شده در محیط کشت بهینه تحت تاثیر فاکتورهای محیطی در جدول ۸ آمده است.

جدول ۸-

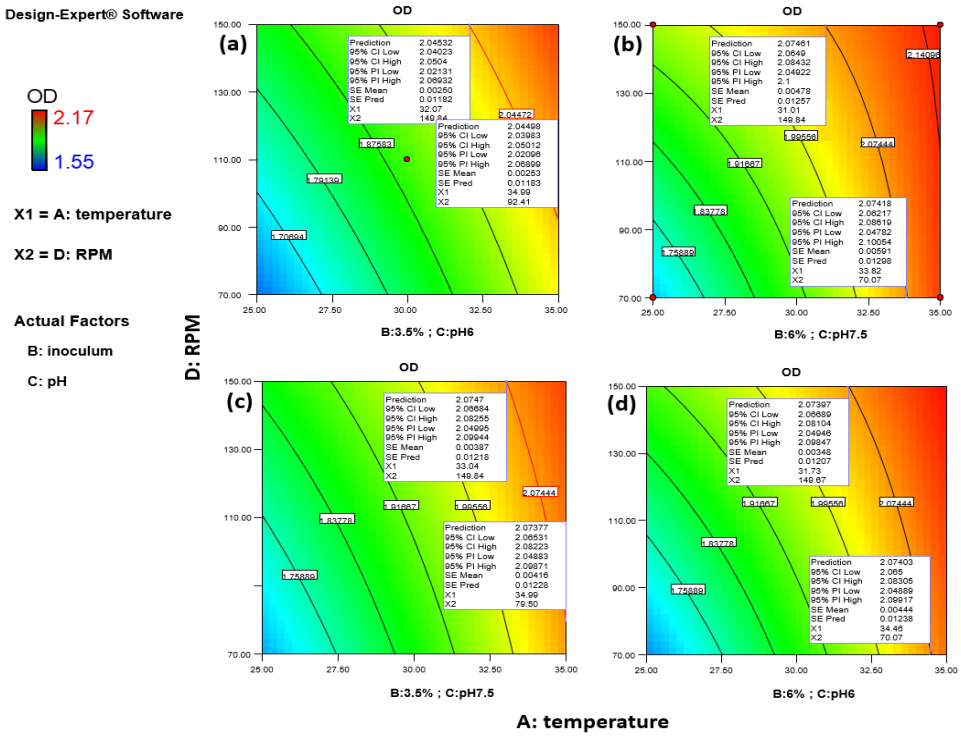
اثرات ساده دما، میزان زادمایه، میزان pH و سرعت دور شیکر همزن روی تولید زیست توده باکتری در محیط کشت بهینه معنی‌دار بود. برای اغلب اثرات متقابل، تاثیر معنی‌داری وجود داشت و عدم معنی‌داری فقط در اثرات متقابل دو عاملی دما× اسیدیته و زادمایه× اسیدیته مشاهده شد (جدول ۲).

جدول ۹-

طبق منحنی کانتور (شکل ۲a)، در محیط کشت بهینه با شرایط حد وسط میزان زادمایه (۳/۵ درصد) و pH (٦)، بیشترین تولید زیست توده باکتری (OD بیش از ۲/۰٤) در دمای شیکر ۳۲ تا ۳۵ سلسیوس حداقل سرعت هم‌زدن ۹۲ دور در دقیقه حاصل شد.

از طرفی در محیط کشت بهینه با شرایط حد بالای میزان زادمایه (٦ درصد) و pH (٧/٥)، حداکثر تولید زیست توده باکتری B2 *B. subtilis* (OD بیش از ٢/٠٧) در دمای شیکر ٣١ تا ٣٥ سلسیوس و حداقل سرعت هم‌زدن ٧٠ دور در دقیقه حاصل شد (شکل ٢b). در محیط کشت بهینه با شرایط حد وسط میزان زادمایه (٣/٥درصد) و حد بالایpH (٧/٥)، حداکثر تولید زیست توده باکتری جدایه B2 (OD بیش از ٢/٠٧) در دمای شیکر ٣٣ تا ٣٥ سلسیوس وحداقل سرعت هم‌زدن ٨٠ دور در دقیقه حاصل می‌شود (شکل ٢c). در نهایت در محیط کشت بهینه با شرایط حد بالای میزان زادمایه (٦ درصد) و حدوسط pH (٦)، حداکثر تولید زیست توده باکتری جدایه B2 (OD بیش از ٢/٠٧) در دمای شیکر ٣٢ تا ٣٥ سلسیوس و حداقل سرعت هم‌زدن ٧٠ دور در دقیقه حاصل می‌شود (شکل ٢d).

به طور کلی بالاترین پیشنهاد نرم افزار شامل ١) دمای ٣٤ درجه سلسیوس، میزان زادمایه ٣/٧٦ درصد، pH برابر با ٧/١٤ و سرعت همزدن شیکر ١٤٤ دور در دقیقه (OD برابر با ٢/٠٩٥)؛ ٢) دمای ٣٣/٥ درجه سلسیوس، میزان زادمایه ٥/٣٨ درصد، pH برابر با ٥/٨٦ و سرعت همزدن شیکر ١٢٣ دور در دقیقه (OD برابر با ٢/٠٧٠)؛ ٣) و دمای ٣٢ درجه سلسیوس، میزان زادمایه ٥/٨٥ درصد، pH برابر با ٦/٢٤ و سرعت همزدن شیکر ١٣٦ دور در دقیقه (OD برابر با ٢/٠٦٧) بود.



شکل٢- منحنی کانتور تاثیر همزمان دما و سرعت دور شیکر در محیط کشت بهینه بر میزان زیست توده باکتری B2 *B Bacillus subtilis* پس از ٢٨ ساعت نگهداری در(a)، pH برابر با ٦ با میزان زادمایه اولیه ٣/٥ درصد؛ (b)، pH برابر با ٧/٥ با میزان زادمایه اولیه ٦ درصد؛ (c)، pH برابر با ٧/٥ با میزان زادمایه اولیه ٣/٥ درصد؛ (d)، pH برابر با ٦ با میزان زادمایه اولیه ٦ درصد.

Fig 2. Contour factorial plots for simultaneous effect of temperature and shaker agitation of the optimal culture medium on the biomass production of *B Bacillus suntilis* B2 after 28 h incubation on (a) pH 6, inoculant 3.5%; (b) pH 7.5, inoculant 6%.

پایداری فرمولاسیون‌های مختلف باکتری B2 *B.subtilis* پس از شش ماه نگهداری در دو دمای ٤ و ٢٤ درجه سلسیوس

باتوجه به نتایج بدست آمده (جدول۱۰) پس از نگهداری به مدت ۱۸۰ روز در دماهای ٤ و ٢٤ درجه سلسیوس، از نظر لگاریتم تعداد سلول زنده در گرم فرمولاسیون‌ها، بین اثرات ساده سطوح مختلف مواد حامل، پوشاننده‌ها و مواد افزودنی در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. همچنین اثر متقابل کاربرد دو عاملی مواد حامل × پایدارکنندها و پوشاننده‌ها × پایدارکننده‌ها نیز در سطح ۵٪ معنی‌دار می‌باشد. اثر متقابل سه عاملی حامل ×پوشاننده‌ها×پایدارکننده‌ها نیز معنی‌دار می‌باشد.

به‌طور کلی از بین ماده حامل یا پرکننده (تالک و کائولین)، تالک بیشترین تاثیر را در حفظ زنده‌مانی سلول‌های باکتری داشت. بین عدم استفاده از مواد پوشاننده، استفاده از سدیم آلجینات و کیتوزان اختلاف معنی‌داری وجود داشت و استفاده از آلجینات در حفظ زنده‌مانی سلول‌های باکتری موثرتر بود. بین سطوح مختلف پایدارکننده (عدم استفاده از پایدار کننده، استفاده از شیر خشک، استفاده از تری‌هالوز) اختلاف معنی‌داری وجود داشت و استفاده از تری‌هالوزبیشترین تاثیر را در زنده‌مانی سلول‌های باکتری پس از شش ماه نگهداری داشت.

بر اساس جدول ۱۱ بین فرمولاسیون نگهداری شده در هر دو دمای ٤ و ٢٤ درجه سلسیوس، بیشترین تعداد سلول زنده جدایه باکتری *B.subtilis* B2 پس از شش ماه نگهداری در فرمولاسیون شماره۳ (تالک+ سدیم آلجینات+ تری‌هالوز) مشاهده شد که جمعیت سلول زنده باکتری *B.subtilis* B2 در فرمولاسیون‌ها در دمای ٤ و ٢٤ درجه سلسیوس به ترتیب $۷/۹\times۱۰^{۸}$ و $٤/۲\times۱۰^{۷}$ سلول زنده در گرم فرمولاسیون بود که با شاهد (پودر تالک بدون هیچ ماده افزوده‌ای) و سایر فرمولاسیون‌ها اختلاف معنی‌داری از خود نشان داد. کمترین جمعت سلول زنده باکتری *B.subtilis* B2 مربوط به فرمولاسیون‌های شاهد (۹ و ۱۸) و با جمعیت $۱/٤\times۱۰^{۳}$ و ۱×۱۰^{۲} سلول زنده در فرمولاسیون پس از شش ماه نگهداری در دمای ٤ و ٢٤ درجه سلسیوس بود.

جدول ۱۰-

جدول ۱۱-

بررسی تاثیر فرمولاسیون‌های باکتری *B.subtilis* B2 در مهار سفیدک سطحی خیار در گلخانه

نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از ارزیابی فرمولاسیون باکتری در گلخانه نشان داد که اثر فرمولاسیون باکتری بر کاهش شدت بیماری در مقایسه با شاهد آلوده معنی‌دار است. بر اساس نتایج، بعد از ۲۰ روز از تیمار بوته‌ها مربوط به فرمولاسون حاوی جدایه باکتری *B.subtilis* B2 و قارچ‌کش دومارک با دوز ۰/٤در هزار به ترتیب با درصد شدت بیماری معادل ۳۰/۸٤ و ۳۱/٤۹ درصد در یک گروه آماری قرار گرفتند. مواد حامل فرمولاسیون باکتری (بدون ماده موثره) از نظر کاهش شدت بیماری با شاهد اختلاف معنی‌داری نداشتند و در یک گروه آماری قرار گرفتند (جدول ۱۲). نتایج در هر سه بازه زمانی ۵، ۱۰ و ۲۰ روز مشابه بود و فرمولاسیون حاوی باکتری *B.subtilis* B2 و قارچ‌کش بیشترین از نظر کاهش شدت بیماری اختلاف معنی‌داری نداشتند.

جدول۱۲-

بحث

سفیدک سطحی خیار به دلیل رطوبت بالا و تهویه پایین در گلخانه نسبت به مزرعه خسارت بیشتری وارد می‌کند و در صورت مناسب بودن شرایط گلخانه ممکن است موجب از دست رفتن ۵۰ درصد محصول شود (Martínez-Cruz *et al.*, 2014). برای مبارزه با بیماری سفیدک سطحی نیاز به سم‌پاشی در فواصل زمانی مشخص است که همین امر موجب بروز مقاوت بالا به سموم استروبیلورین[٦] مانند آزوکسی استروبین شده است (McGrath and Shishkoff, 2003). یافتن جایگزین‌های مناسب مانند استفاده از

[٦] strobilurin

عوامل بیولوژیک به عنوان جایگزین آفت‌کش‌های شیمیایی برای مدیریت با مقاومت بیمارگر ضروری به نظر می‌رسد. قارچ‌کش‌های بیولوژیکی ممکن است باعث کاهش شدت بیماری سفیدک سطی خیار شوند، اما مساله مهم مقرون به صرفه بودن استفاده آن در مقایسه با افزایش عملکرد است(Keinath and DuBose, 2012).

در تحقیق حاضر به منظور بهینه کردن محیط کشت برای تولید حداکثر توده باکتری *B. subtilis* B2، در غربالگری اولیه با استفاده از طراحی پلاکت برمن، از میان منابع کربن و نیتروژن مورد بررسی، چهار ماده ملاس چغندرقند، ملاس نیشکر، عصاره مخمر و CSL بیشترین هم‌افزایی و تاثیر را در رشد جدایه باکتری *B. subtilis* B2 در مقایسه با سایر منابع داشتند که نشان دهنده اهمیت نوع منبع کربن و نیتروژن بر میزان رشد سلولی است. در غربالگری که با استفاده از روش طراحی فاکتوریل کسری بر روی این چهار ماده که بیشترین تاثیر را در افزایش رشد جدایه باکتری *B. subtilis* B2 داشتند انجام شد، ملاس چغندر قند و CSL بیشترین تاثیر را در افزایش زادمایه در مقایسه با ملاس نیشکر و عصاره مخمر داشتند. در نقاط مختلف جهان نیز ملاس چغندرقند و CSL به‌طور موفقیت‌آمیزی برای فرمانتاسیون میکروارگانیسم‌ها به کار رفته‌اند و مقالات متعددی مبنی بر کارا و مقرون به صرفه بودن این مواد در مراحل فرمانتاسیون وجود دارد (Kim *et al.*, 2007; Bertolin *et al.*, 2003). تولید بیشترین زیست توده سلولی جدایه CPA-8 از باکتری *Bacillus amyloliquefaciens* که یکی از عوامل بیوکنترل پوسیدگی قهوه‌ای در میوه‌جات است، در محیط حاوی ملاس چغندرقند که به عنوان منبع کربن استفاده شده بود، گزارش شده است. ملاس چغندرقند حاوی غلظت بالای ۵۰ درصد قند مانند سوکروز، گلوکوز و فروکتوز است که موجب افزایش رشد میکروارگانیسم می‌شود (Gotor-Vila *et al*., 2017).

بعد از تولید انبوه زیست توده عامل بیوکنترل، کلیدی‌ترین مرحله فرموله کردن آن می‌باشد. توسعه فرمولاسیون زیستی موثر و کارآمد عمدتاً به مواد تشکیل‌دهنده مورد استفاده برای تهیه آن که شامل سویه بالقوه بیوکنترلی، یک حامل مناسب و مواد افزوده دارد. در این بین انتخاب و نوع مواد افزوده به مواد حامل برای افزایش پایداری فرمولاسیون فاکتور بسیار کلیدی به شمار می‌آید (Aamir *et al.*, 2020). بر اساس نتایج این بررسی کمترین جمعیت سلول زنده در فرمولاسیون‌هایی که فقط بر پایه مواد حامل بدون هیچ ماده افزوده‌ای تهیه شدند، دیده شد. نتایج این تحقیق نشان داد که اضافه کردن یکی از مواد پوشاننده (کیتوزان و سدیم-آلجینات) به مواد حامل به طور معنی‌داری جمعیت سلول زنده باکتری *B. subtilis* B2 را در هر گرم فرمولاسیون افزایش می‌دهد. در واقع پلیمرهای زیستی مانند کیتوزان و سدیم‌آلجینات برای تنظیم آزادسازی BCA در فرمولاسیون‌ها استفاده می‌شود و همچنین آن‌ها را از تأثیرات محیطی محافظت می‌کند (Saberi Risehe *et al.*, 2022). اضافه کردن سدیم‌آلجینات به پودر تالک موجب افزایش جمعیت سلول زنده باکتری در فرمولاسیون از $۱/٤×۱۰^{۳}$ به $۱/۳×۱۰^{٦}$ سلول زنده در گرم فرمولاسیون بعد از شش ماه نگهداری شد. نتایج نشان داد ما بین استفاده از سدیم‌آلجینات و یا استفاده از کیتوزان نیز از نظر تعداد سلول زنده باکتری بعد از شش ماه نگهداری در هر دو دمای ٤ و ٢٤ درجه سلسیوس اختلاف معنی‌داری وجود داشت و در مجموع در فرمولاسیون‌هایی که سدیم-آلجینات به عنوان ماده پوشاننده استفاده شده بود، جمعیت زنده سلول باکتری در سطح بالاتری قرار داشت. سدیم آلجینات به عنوان ماده افزوده به آسانی در آب محلول شده و باعث افزایش گران‌روی (ویسکوزیته) آب می‌شود. در واقع سدیم آلجینات عامل پایداری، چسبندگی و دوام فرمولاسیون می‌باشد (Kinay and Yildiz, 2008). بر اساس گزارشات سدیم‌آلجینات باعث پایداری *Fusarium oxysporum* f. sp. *orthoceras* در فرمولاسیون‌های خشک نگهداری شده به مدت شش ماه شد (Muller-Stover *et al.*, 2004).

اضافه کردن تری‌هالوز و یا شیر بدون چربی موجب افزایش جمعیت سلول زنده در فرمولاسیون پودر تالک به ترتیب به $۱×۱۰^{٥}$ و $۱/۲×۱۰^{٥}$ سلول زنده در گرم فرمولاسیون پس از شش ماه نگهداری در دمای چهار درجه سلسیوس شد. همچنین نتایج مشابه در

فرمولاسیون‌های نگهداری شده در دمای ٢٤ درجه سلسیوس نیز مشاهده شد. تری‌هالوز یکی دیگر از مواد افزوده می‌باشد که به‌طور گسترده در تهیه فرمولاسیون‌های میکروبی مورد استفاده قرار می‌گیرد. تری‌هالوز یکی از رایج‌ترین دی‌ساکارید محافظت از خشکی و حفظ رطوبت و زنده‌مانی سلول‌ها می‌باشد (Garcıa, 2011). در حال حاضر معمولا از سدیم‌آلجینات و یا تری‌هالوز به تنهایی درتهیه فرمولاسیون‌ها استفاده می‌شود و نتایج مطالعات نشان داده است که استفاده از ترکیب‌های مختلف مواد افزوده به‌طور قابل توجهی موجب بهبود خواص فرمولاسیون‌ها می‌شود (Klose and Tabatabai, 1999). بر اساس نتایج، بیشترین جمعیت زنده‌مانی سلول‌های باکتری *B. subtilis* B2 در فرمولاسیون‌هایی مشاهده شد که یکی از مواد پوشاننده (سدیم‌آلجینات یا کیتوزان) به طور همزمان با یکی از مواد پایدار کننده (تری‌هالوز و شیر بدون چربی) در تهیه فرمولاسیون مورد استفاده قرار گرفت.

بر اساس نتایج بیشترین سلول زنده باکتری در فرمولاسیونی بر پایه تالک که در آن از سدیم‌آلجینات و تری‌هالوز به عنوان مواد افزوده مورد استفاده قرار گرفته بود، دیده شد. بررسی لگاریتم جمعیت سلول زنده باکتری در گرم فرمولاسیونبعد از شش ماه نگهداری در دمای ٤ و ٢٤ درجه سلسیوس به ترتیب برابر با ٧٩/٣٢ و ٦٦/٧٣ درصد لگاریتم جمعیت اولیه فرمولاسیون بود و جمعیت آن 8×10^{8} و $1/1\times10^{7}$ سلول زنده در گرم فرمولاسیون بود. به طور مشابهی برای فرمولاسیون *Azospirillum brasilense* و *Raoultella terrigena* به منظور استفاده در مصارف کشاورزی از تری‌هالوز و آلجینات استفاده شده است (Joe *et al.*, 2012).

در حالت کلی پایداری یا جمعیت سلول زنده باکتری *B subtilis* در فرمولاسیون‌های نگهداری شده در دمای ٤ درجه سلسیوس نسبت به جمعیت‌های نگهداری شده در دمای ٢٤ درجه سلسیوس بیشتر بود. بررسی‌ها در مورد ماندگاری فرمولاسیون *Pantoea agglomerans* نشان داده که عامل کلیدی در میزان زنده‌مانی دما است. دمای دوره نگهداری بر روی محتوای رطوبت و فعالیت آبی فرمولاسیون تاثیرگذار است. نگهداری در دمای پایین به طور قابل توجهی موجب افزایش زنده‌مانی در دوره نگهداری می‌شود (Gotor-Vila *et al.*, 2019). مطالعات آینده باید با هدف افزایش پایداری فرمولاسیون‌ها در دمای محیط صورت پذیرد.

پس از تهیه فرمولاسیون‌ها و ارزیابی جمعیت سلول زنده باکتری*B. subtilis* B2 در فرمولاسیون‌ها، بهترین فرمولاسیون بر پایه باکتری *B. subtilis* B2 برای ارزیابی قابلیت کنترل سفیدک پودری خیار در گلخانه انتخاب شد. نتایج کاربرد بهترین فرمولاسیون با بیشترین جمعیت زنده باکتری *B. subtilis* نشان داد که کاربرد فرمولاسیون تهیه شده از جدایه باکتری*B. subtilis* B2 پس از آلودگی بوته‌های خیار به سفیدک سطحی قادر به کاهش شدت بیماری به میزان قابل توجهی می‌باشد به‌طوریکه بین فرمولاسیون حاوی باکتری *B. subtilis* B2 و دوز دو در هزار سم دورماک از نظر میزان کنترل‌کنندگی در فواصل زمانی ٥، ١٠ و ٢٠ روز اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. بر اساس نتایج یک بررسی، کاربرد قارچ‌کش مانکوزب و فرم تجاری باکتری *B. subtilis* (محصول شرکت Bazram) به ترتیب موجب ٢٦ و ٢١ درصد کاهش شدت بیماری سفیدک پودری خیار در مقایسه با شاهد آلوده شد (Safaei *et al.*, 2023). در این بررسی نیز بین فرمولاسیون باکتری *B. subtilis* B2 و قارچ‌کش دومارک از نظر کنترل‌کنندگی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

در حالت کلی تاثیرگذاری و میزان کنترل‌کنندگی بالای فرمولاسیون‌های میکروبی در صورتی می‌تواند مورد توجه قرار گیرد که تولید آن محصول دارای صرفه اقتصادی بوده و از نظر قیمت تولید نیز قابل رقابت با آفت‌کش‌های شیمیایی باشند. محیط کشت‌های بهینه شده در این بررسی از بین محصولات جانبی کشاورزی انتخاب شدند و استفاده از آن‌ها در مقیاس صنعتی و نیمه‌صنعتی کاملا مقرون به صرفه و قابل توصیه می‌باشد. بر اساس نتایج مطالعه حاضر فرمولاسیون تهیه شده از باکتری*B. subtilis* B2 توانست به طور قابل توجهی شدت سفیدک پودری خیار را در شرایط گلخانه کاهش دهند. بر اساس نتایج این مطالعه باکتری *B. subtilis* B2برای تولید یک فرمولاسیون تجاری برای کنترل بیماری‌های گیاهی قابل توصیه می‌باشد.

سپاسگزاری

این پژوهش مستخرج از نتایج پروژه تحقیقاتی با شماره مصوب ۰۰۰۸٤٤-۰۰۰۳٤-۰۸۱-۱٦۰۵-۳٦-۰۱۳ می‌باشد. نویسندگان از پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی به‌دلیل در اختیار قراردادن برخی امکانات پژوهشی و همچنین از تمام دست‌اندرکاران به خاطر همکاری‌های ارزشمندشان تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع مورد استفاده:

ABADIAS, M., N.J. TEIXIDO, A. USALL, J. BENABARRE, and I. VINAS, 2001. Viability, efficacy and stability of freeze-dried biocontrol agent *Candida sake* using different protective and rehydration media, Journal of Food Protection, No. 64: 856-861. doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00513-4.

ARUMUGANATHAN, T., M.R. MANIKANTAN, R.D., RAI, S. ANANDAKUMAR, and V. KHARE, 2009. Mathematical modeling of drying kinetics of milky mushroom in a fluidized bed dryer. International Agrophysics, No. 23: 1–7.

ARMSTRONG, N.A., 2006. Pharmaceutical Experimental Design and Interpretation, 2th ed. Boca Raton: Talor & Francis. Pp. 1-4, 19-20. doi.org/10.1201/9781420021455

ATANASOVA-PANCEVSKA, N. and D. KUNGULOVSKI, 2018. Isolation, characterization and formulation of antagonistic bacteria agent fungal plant pathogen, Agrofor International Journal, No. 3: 129-137. doi.org/10.7251/AGRENG1803080A.

BERTOLIN, T.E., W. SCHMIDELL, A.E. MARIORANO, J. CASARA, and J.A.V. COSTA, 2003. Influence of carbon, nitrogen and phosphorous sources on glucoamylase production by *Aspergillus awamori* in solid state fermentation, Zeitschrift fur Naturforschung, No. 58: 708-712. doi.org/10.1515/znc-2003-9-1020.

BONATERRA, A., E. BADOSA, J. CABREFIGA, J. FRANCES, and R. Montesinos, 2012. Prospect and limitations of microbial pesticides for control of bacterial and fungal pome fruit tree diseases, Trees, No. 26: 215-226. doi.org/10.1007/s00468-011-0626-y.

FRAVEL, D.R., J.A. LEWIS, and J.C. CHITTAMS, 1995. Alginate prill formulations of *Talaromyces flavues* with organic carriers for biocontrol of *verticillium dahlia*, Phytopathology, No. 85: 165-8.

GARCIA, A.H., 2011, Anhydrobiosis in bacteria: from physiology to applications, Journal of Bioscience, No. 36: 939–950.

GLAZER, A.N. and H. Nikaido, 1995 Microbial biotechnology, Freeman, New York, doi.org/10.1007/0-387-30741-9_12.

GOTORr-VILA, A., J. USALL, R. TORRES, C. SOLSONA, and N. TEIXIDO, 2017. Biocontrol products based on *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 using fluid-bed spray-drying process to control postharvest brown rot in stone fruit, LWT-Food Science and Technology, No. 82: 274–282. doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.034.

GOTORr-VILA, A., J. USALL, R. TORRES, C. SOLSONA, and N. TEIXIDO, Enhanced shelf-life of the formulated biocontrol agent Bacillus amyloliquefaciens CPA-8 combining diverse packaging strategies and storage conditions, International Journal of Food Microbiology, No. 290: 205–213. doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.013.

HOLLOMON, D., I. WHEELER, R. BELANGER, W. BUSHNELL, A. DIK, and T. CARVER, 2002. Controlling powdery mildews with chemistry, American Phytopathology Society Press, Pp. 231-239. https://doi.org/10.1007/BF02765797.

JAMBHULKAR, P.P., P. SHARMA, and R. YADAV, 2016. Delivery systems for introduction of microbial inoculants in the field," in Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity (New Delhi: Springer), Pp. 199–218. doi.org/10.1007/978-81-322-2647-5.

JOE, M.M., B. KARTHIKEYAN, P.S. CHAUHAN, C. SHAGOL, M.R. ISLAM, M. DEIVEEKASUNDARAM, and T. SA, 2012. Survival of *Azospirillum brasilense* flocculated cells in alginate and its inoculation effect on growth and yield of maize under water deficit conditions, European Journal of Soil Biology, No. 50: 198–206. doi.org/10.1016/j.ejsobi.2012.03.002.

JONES, K.A. and H.D. BURGES, 1998. Technology of formulation and application. In: Burges HD (ed) Formulation of microbial biopesticides: beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments, Springer, Netherlands, Dordrecht, Pp 7–30.

KEINATH, A.P. and V.B. DU BOSE, 2012. Controlling powdery mildew on cucurbit rootstock seedlings in the greenhouse with fungicides and biofungicides, Crop Protection, No.42: 338–344. doi.org/10.1016/j.cropro.2012.06.009.

KIM, Y.H., S.W. Kang, J.H. Lee, H. Chang, Ch. Yun, H.D. Paik, CH.W. Kang, and S.W. Kim, 2007. High cell density fermentation of Saccharomyces cerevisiae JUL3 in fed-batch culture for the production of β-Glucan, Journal of Industrial and Engineering Chemistry, No. 13: 153-158.

KLOSE, S. and Tabatabai, M.A. 1999. Urease activity of microbial biomass in soils. Soil Biology and Biochemistry. No. 31: 205–211.

LAZIC, Z. R., 2004. Design of Experiments in Chemical Engineering, Morristown: Wiley- VCH, pp. 164-165.

MARTINEZ-CRUZ, J., D. ROMERO, J. DAVILA, C. and A. PEREZE-GARCIA, 2014. The *Podosphaera xanthii* haustorium, the fungal Trojan horse of cucurbit-powdery mildew interactions, Fungal Genetics and Biology, No. 71: 21–31. doi.org/10.1016/j.fgb.2014.08.006.

MCGRATH, M.T. and N. SHISHKOFF, 2003. First report of the cucurbit powdery mildew fungus (Podosphaera xanthii) resistant to strobilurin fungicides in the United States, Plant Disease, No. 87: 1007. doi.org/10.1094/PDIS-02-14-0210-PDN.

MELIN, P., S. HAKANSSON, T.H. EBERHAD, and S. SCHNURER, 2006. Survival of the biocontrol yeast *Pichia anomala* after long-term storage in liquid formulations and different temperatures, assessed by flow cytometry, Journal of Applied Microbiology, No. 100: 264-271. doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02778.x.

OH, S.E., B. MIN, and B.E. LOGAN, 2004. Cathode performance as a factor in electricity generation in microbial fuel cells, Environmental Science and Technology, No. 38: 4900-4904. https://doi.org/10.1007/978-3-030-04474-9_8.

PEDRINI, S., D. J. MERRITTt, J. STEVENS, and K. DIXON, 2017. Seed coating: science or marketing spin?, Trends Plant Science, No: 22, 106–116. doi.org/10.1016/j.tplants.2016.11.002.

QI, Q., C. FAN, H. WU, L. SUN, and C. CAOA, 2023. Preparation of *Trichoderma asperellum* Microcapsules and Biocontrol of Cucumber Powdery Mildew, Microbiology spectrum, No. 11: 321-332. doi.org/10.1128/spectrum.05084-22.

ROSSELENBROICH, H.J. and D. STUEBLER, 2008. *Botrytis cinerea*-history of chemical control and novel fungicides for its management, Crop Protection, No. 19: 557-561. doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00072-7.

RUR, M., B. RAMERT, M. HOKEBERG, R.R. VETUKURI, L. GRENVILLE-RENVILLE-BRIGGS, and E. LILJEROTH, 2018. Screening of alternative products for integrated pestmanagement of cucurbit powdery mildew in Sweden, European Journal of Plant Pathology, No. 150: 127-138. doi.org/10.1007/s10658-017-1258-x.

SABERI RISEH, R., M. HASSANISAADI, M. VATANKHAH, and S. RAJENDRr, 2022. Nano/microencapsulation of plant biocontrol agents by chitosan, alginate, and other important biopolymers as a novel strategy for alleviating plant biotic stresses. International Journal of Biological Macromolecules. No. 222: 1589–1604. doi.org/ 10.1016/j.ijbiomac.2022.09.278.

SAFAEIi, M., A. JORKESH, and J. OLAFATI, 2023. Chemical and biological products for control of powdery mildew on cucumber, International journal of vegetable science, No. 28: 233–238. doi.org/10.3390/agriculture13081558.

VERMA, M., S.K. BRAR, R.D. TYAGIi, SURAMPALLI, R.Y. and J.R. VALERO, 2007. Antagonistic fungi, Trichoderma spp.: panoply of biological control, Biochemistry Engineering Journal, No. 37: 1–20. doi.org/10.1016/j.bej.2007.05.012.

VIDHYASEKARAN, P. and M. MUTHAMILAN, 1995. Development of formulations of *Pseudomonas fluorescens* for control of chickpea wilt, Plant Disease, No. 79: 782–786. doi.org/10.1094/PD-79-0782.

WEE, Y.J., J.N. KIM, and H.W. RYU, 2006. Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications, Food Technology and Biotechnology, No. 44: 163-172. doi.org/ 09e415089c07a1f9c7000000.

WU, L., Y. ZHANG, J. TIAN, G. ZHANG, and W. ZHANG, 2022. Nitrogen rate for cotton should be adjusted according to water availability in arid regions, Field Crop Research, No. 285: 108606. doi.org/10.1016/j.fcr.2022.108606.

ZHANG, Y., J. XIAO, K. YANG, Y. WANG, Y. TIAN, and Z. LIANG, 2022. Transcriptomic and metabonomic insights into the biocontrol mechanism of *Trichoderma asperellum* M45a against watermelon *Fusarium* wilt, Plos One, 17:e0272702. doi.org/10.1371/journal.pone.0272702.