



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

LACHIN MOKHTARNEJAD<sup>1</sup>✉ , SAMIRA SHAMELI<sup>2</sup>, MOHSEN FARZANEH<sup>3</sup>

1. Assistant Professor, Plant Protection Research Department, West Azarbaijan Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Urmia, Iran; 2. Assistant Professor, 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

(Received: December 2024; Accepted: February 2025)

### 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<sup>®</sup> software. Based on 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. Based 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 adjuvants. The highest population of *B. subtilis* B2 produced after six months storage at 4 °C and 24°C in formulation No. 3, containing sodium alginate and trihalose, with 7.9×10<sup>8</sup> and 4.2×10<sup>7</sup> CFU per gram of formulation respectively. The best formulation of *B. subtilis* selected based on the highest shelf life to evaluate the ability of formulations for controlling powdery mildew of cucumber under greenhouse conditions. The results showed that the *B. subtilis* formulation and Dumark fungicide reduces the disease severity by 45.42% and 46.53%, respectively which express no significant difference between them.

**Keywords:** Biological control, commercialization, cucumber, powdery mildew



## مقاله پژوهشی

بهینه سازی محیط کشت صنعتی و فرمولاسیون جدایه *Bacillus subtilis* B2 و

## مهار سفیدک پودری خیار در گلخانه توسط آن

لاچین مختارنژاد<sup>۱</sup> , سمیرا شاملی<sup>۲</sup>، محسن فرزانه<sup>۳</sup>

۱-استادیار، بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش و ترویج کشاورزی آذربایجان غربی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ارومیه، ایران؛ ۲- استادیار، 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

(تاریخ دریافت: آذر ۱۴۰۳؛ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۴۰۳)

## چکیده

در این تحقیق، امکان تولید انبوه و فرمولاسیون جدایه باکتری *Bacillus subtilis* B2 با قابلیت بیوکنترلی بر روی سفیدک سطحی خیار بررسی شد. برای بهینه سازی محیط کشت باکتری *B. subtilis*، غربالگری منابع کربن و نیتروژن مختلف از نرم افزار (Design Expert)® استفاده شد. براساس نتایج طراحی مرکب مرکزی (central composite) و روش رویه-پاسخ، غلظت بهینه ملاس چغندر و عصاره ذرت خیسانده (CSL) در محیط کشت برای تولید حداکثر توده سلولی باکتری به ترتیب ۶-۴/۵ و ۶-۳/۸۲ گرم در لیتر بود. بر اساس نتایج بهینه سازی فاکتورهای محیطی با روش طراحی فاکتوریل کسری، حداکثر توده سلولی باکتری در محیط کشت بهینه با دمای ۳۲ درجه سلسیوس، هم زن ۹۰ دور در دقیقه، درصد زادمایه ۳/۵ و اسیدیته ۶ حاصل شد. پس از بهینه سازی محیط کشت، در مجموع ۱۸ فرمولاسیون مختلف پودری خشک با استفاده از مواد حامل و مواد افزودنی مختلف تهیه شد. بیشترین جمعیت سلول زنده باکتری پس از شش ماه نگهداری در دمای ۴ و ۲۴ درجه سلسیوس، در فرمولاسیون شماره ۳ حاوی تالک، سدیم آلجینات و تری هالوز، به ترتیب با جمعیت  $7/9 \times 10^8$  و  $4/2 \times 10^7$  سلول زنده در هر گرم فرمولاسیون حاصل شد. ماندگارترین فرمولاسیون حاوی باکتری *B. subtilis* برای کنترل سفیدک پودری خیار در گلخانه انتخاب و مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد بین درصد کنترل بیماری در تیمار فرمولاسیون جدایه باکتری (۴۵/۴۲ درصد) و قارچ کش دومارک (۴۶/۵۳ درصد) اختلاف معنی داری وجود نداشت.

واژه های کلیدی: تجاری سازی، سفیدک سطحی خیار، فرمولاسیون، مهار زیستی

## مقدمه

سفیدک پودری ناشی از قارچ *Podosphaera xanthii* (Castagne) یکی از مهم‌ترین بیماری‌های خیارگلخانه‌ای در U. Braun 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 موفقیت‌آمیز نبوده و برای کنترل این بیماری عمده‌تاً کاربرد قارچ‌کش‌های شیمیایی توصیه می‌شود. قارچ عامل سفیدک پودری چند چرخه‌ای است و با تولید مثل جنسی و غیرجنسی به فراوانی تکثیر می‌شود و احتمال وقوع جمعیت مقاوم به قارچ‌کش در مدت زمان کوتاه بسیار بالا می‌باشد (Hollomon et al., 2002) و در نتیجه در سال‌های اخیر بسیاری از این سموم شیمیایی بی اثر شده‌اند (Rosslenbroich and Stuebler, 2000). علاوه بر این نگرانی‌های مصرف‌کنندگان 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 (Bonaterre et al., 2022) که علاوه بر سازگاری بالا با محیط زیست، تأثیر منفی روی سلامتی انسان ندارند و موجب ایجاد مقاومت در بیمارگرها نمی‌شوند (Jaiswa et al., 2022).

با وجود این که 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 تخمیر (هوادهی، pH و دما) همانند نوع محیط کشت می‌تواند روی کیفیت و کمیت میکروارگانیسم تأثیر بگذارد. معمولاً 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 میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌شود (Bertolin et al., 2003). براساس مطالعات صورت گرفته در سال ۲۰۱۵، بیشترین توده باکتری (Ehrenberg) *Bacillus subtilis* در محیط کشت ملاس چغندر و نیشکر، در دمای ۳۵ درجه سلسیوس و pH هفت مشاهده شده است (Maria Florence, 2015). CSL یک منبع حاوی ویتامین‌ها و مواد معدنی است و به‌طور موفقیت‌آمیزی برای فرمانتاسیون میکروارگانیسم‌ها به کار رفته و مقالات متعددی مبنی بر کارا و مقرون به‌صرفه بودن این مواد در مراحل فرمانتاسیون وجود دارد (Kim et al., 2007).

هنگامی که تعداد زیادی فاکتور وجود 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 پرتعدادترین 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). به‌عنوان مثال، به‌منظور به‌دست آوردن

فرمولاسیون باکتری و ارزیابی بهترین فرمولاسیون تهیه شده در کنترل سفیدک سطحی و القای تولید 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 ۹۷ (اطلاعات منتشر نشده) در کنترل سفیدک پودری گل محمدی و خیار مؤثر واقع شده بود، از کلکسیون میکروارگانیسم‌های مفید پژوهشگاه گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی دریافت شد.

#### غربالگری و بهینه‌سازی تولید زیست توده باکتری

ابتدا جهت تعیین کیتیک رشد (الگوی رشد) باکتری، از کشت ۲۴ ساعته جدایه باکتری B2، سوسپانسیونی به جمعیت  $8 \times 10^9$  سلول باکتری در میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی مولار (برابر با جذب نوری یک) تهیه شد. سپس یک میلی‌لیتر از این سوسپانسیون به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت NB در فلاسک‌های ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری اضافه شد. فلاسک‌های ارلن به شیکر انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سلسیوس و دور ۱۵۰ rpm منتقل و هر چهار ساعت یک‌بار و به مدت ۳۶ ساعت جمعیت باکتری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری (طول موج ۶۰۰ نانومتر) اندازه‌گیری شد.

به‌منظور تولید حداکثر بیوماس سلولی باکتری جدایه B2، بهینه‌سازی محیط کشت با کمک روش طراحی آزمایش و در دو مرحله، غربالگری اجزای محیط کشت و بهینه‌سازی مقادیر فاکتورهای مؤثر بر تولید انجام گرفت.

#### غربالگری و بهینه‌سازی اجزای محیط کشت

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

آزمایش‌های متعددی به‌منظور غربالگری منابع کربن و نیتروژن و انتخاب بهترین منبع کربن و منبع نیتروژن با استفاده

غلظت 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 ۶/۴ درصد و CSL با غلظت ۱۷ 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 هر کدام از این فرمولاسیون‌ها در اکوسیستم خاصی استفاده می‌شوند. در میان فرمولاسیون‌های خشک بیشترین توجه به فرمولاسیون نوع پودر و تابل 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 ۲۰ تا ۸۰ درصد ماده مؤثره، ۵ تا ۴۵ درصد ماده پرکننده، ۱ تا ۱۰ درصد ماده 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 شرایط 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 به‌تنهایی، 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 <sup>®</sup>(Design Expert)، بررسی امکان

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 مؤثر اجزای محیط کشت منتخب برتر، به‌منظور بالا بردن تولید سلول، با استفاده از طراحی Central composite design استفاده شد (جدول ۳). در این روش متغیرها در پنج سطح  $(-\alpha, -1, 0, 1, +\alpha)$  مطالعه شد. رفتار سیستم را می‌توان توسط معادله درجه دو زیر توصیف کرد:

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

در این معادله  $Y$  پاسخ پیش‌بینی شده،  $\beta_0$  عرض از مبداء،  $\beta_1$ ، ضریب خطی،  $\beta_{11}$ ،  $\beta_{22}$ ،  $\beta_{12}$  ضریب توان دو،  $\beta_{12}$  ضریب برهم‌کنش و  $X_1$ ،  $X_2$  متغیرهای مستقل می‌باشد. برای طراحی آزمایش بهینه‌سازی و آنالیز نتایج آن از نرم‌افزار  $^{(R)}$  (Design Expert) استفاده شد.

از طراحی پلاکت برمن نرم افزار  $^{(R)}$  (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. به‌طور خلاصه در ابتدا ۱۰۰ میلی لیتر از محیط کشت‌های مختلف با نسبت‌های 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 ۲۴ 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 ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شدند. بهینه‌سازی مقادیر اجزای منتخب (ملاس چغندر قند،

جدول ۱- طراحی آزمایشی برای بهینه‌سازی اجزاء محیط کشت و غلظت‌های آن‌ها (گرم در لیتر) با استفاده از طراحی پلاکت برمن

Table 1. Experimental plan for optimizing the culture medium components and their concentrations (g/L) using the Plackett-Burman design

| Sources | Medium ingredients  | Concentration (g/L) |         |        |
|---------|---------------------|---------------------|---------|--------|
|         |                     | level -             | Level 0 | level+ |
| X1      | Sugar beet molasses | 2                   | 4       | 6      |
| X2      | Glucose             | 0                   | 3       | 6      |
| X3      | Sugar               | 0                   | 3       | 6      |
| X4      | Sugarcane molasses  | 0                   | 3       | 6      |
| X5      | Starch              | 0                   | 3       | 6      |
| X6      | Pentosan            | 0                   | 3       | 6      |
| X7      | Urea                | 1                   | 3.5     | 6      |
| X8      | CSL                 | 0                   | 3       | 6      |
| X9      | Ammonium sulfate    | 0                   | 1.5     | 3      |
| X10     | Yeast extract       | 0                   | 3       | 6      |
| X11     | Ammonium nitrate    | 0                   | 3       | 6      |

جدول ۲- طراحی آزمایشی بهینه‌کردن اجزاء منتخب محیط کشت و غلظت‌های آن‌ها (گرم در لیتر) با استفاده از طراحی فاکتوریل کسری

Table 2. Experimental plan for optimizing the selected culture medium components and their concentrations (g/L) using the fractional factorial design

| Sources | Medium ingredients  | Concentration (g/L) |         |        |
|---------|---------------------|---------------------|---------|--------|
|         |                     | level -             | Level 0 | level+ |
| X1      | Sugar beet molasses | 2                   | 4       | 6      |
| X2      | Sugarcane molasses  | 2                   | 4       | 6      |
| X3      | CSL                 | 2                   | 4       | 6      |
| X4      | Yeast extract       | 1                   | 3.5     | 6      |

جدول ۳- اجزاء محیط کشت منتخب برتر و غلظت‌های آن‌ها در مطالعه سطح پاسخ براساس طراحی Central composite

Table 3. Experimental plan for optimization of superior selected culture medium components and their concentrations (g/L) using response surface methodology based on central composite design (CCD)

| Sources                | Unit | Concentration (g/L) |        |         |         |            |
|------------------------|------|---------------------|--------|---------|---------|------------|
|                        |      | + $\alpha$          | level+ | Level 0 | level - | - $\alpha$ |
| A: Sugar beet molasses | gr/l | 6.83                | 6      | 4       | 2       | 1.17       |
| B: CSL                 | gr/l | 6.83                | 6      | 4       | 2       | 1.17       |

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

برای بررسی تأثیر فاکتورهای محیطی روی محیط کشت بهینه‌سازی شده، دو آزمایش فاکتوریل کسری با ۲۰ آزمایش طراحی شد و تأثیر دما، سرعت دور شیکر، درصد زادمایه اولیه و اسیدیته روی افزایش بیوماس سلولی باکتری در محیط بهینه (ملاس چغندر با CSL) مورد مطالعه قرار گرفت و تأثیر فاکتورهای محیطی به‌طور جداگانه بررسی شد. فاکتورها و دامنه آن‌ها در جدول ۴ آمده است.

جدول ۴- طراحی آزمایشی بهینه‌سازی فاکتورهای محیطی و دامنه آن‌ها با استفاده از طراحی فاکتوریل کسری

Table 4. Experimental plan for optimizing the environmental factors and their levels using the fractional factorial design

| Sources           | Medium ingredients | Concentration (g/L) |         |        |
|-------------------|--------------------|---------------------|---------|--------|
|                   |                    | Level -             | Level 0 | level+ |
| A: Temperature    | °C                 | 35                  | 30      | 25     |
| B: Inoculant      | %                  | 6                   | 3.5     | 1      |
| C: pH             | pH                 | 7.5                 | 6       | 4.5    |
| D: Agitation rate | rpm                | 150                 | 110     | 70     |

### تهیه فرمولاسیون جدایه باکتری و بررسی ماندگاری آن

برای تهیه فرمولاسیون‌های باکتری از دو ماده پرکننده پودر تالک و کائولین که بر اساس منابع جزو ارزانه‌ترین و مقرون به‌صرفه‌ترین 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 به‌منظور بهینه‌سازی فرمولاسیون‌ها استفاده شد. این مواد افزودنی شامل سدیم آلجینات و کیتوزان به‌عنوان تثبیت کننده (پوشاننده)، تری‌هالوز (Trehalose) و شیر بدون چربی (Skim milk)، برای افزایش زنده‌مانی (پایدار کننده) هستند. به تمام فرمولاسیون‌ها Tween 80 به‌میزان سه درصد به‌عنوان سورفکتانت و کلرید کلسیم (CaCl<sub>2</sub>) به‌میزان چهار درصد استفاده شد (Zhang et al., 2023; Qi et al., 2023).

در ابتدا از کشت ۷۲ ساعته باکتری، سوسپانسیونی با جمعیت حاوی  $8 \times 10^{10}$  سلول باکتری در میلی‌لیتر تهیه شد. به این سوسپانسیون بر اساس جدول ۵ سدیم آلجینات و یا کیتوزان به‌نسبت دو درصد، تری‌هالوز و شیر خشک نیز به‌میزان یک درصد اضافه شد. مخلوط حاصل به‌مدت ۱۵ دقیقه با دور rpm ۴۰۰ مخلوط و سپس به نسبت ۱ به ۴ 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 به‌طور 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 ۴ و ۲۴ 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).

بدین‌صورت که، یک گرم از هر فرمولاسیون در نه میلی‌لیتر 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 ۴۸ ساعت نگهداری تعداد کلنی‌ها شمارش شد. جمعیت باکتری بلافاصله بعد از تهیه فرمولاسیون‌ها در حدود  $3/1 \times 10^{10}$  سلول باکتری در میلی‌لیتر بود. برای برآورد تعداد سلول‌های زنده هر فرمولاسیون از روش سریال رقت استفاده شد. بدین‌صورت 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 کاملاً تصادفی انجام شد. ترکیب و اجزا تیمارها در جدول ۵ آمده است.

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 ۱۴۰۲ انجام شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی شامل فاکتور A (در چهار سطح: فرمولاسیون حاوی باکتری، مواد

هماسیتومتر (Haemocytometer) تعداد اسپور در واحد حجم سوسپانسیون شمارش و روی  $10^5$  اسپور در میلی‌لیتر تنظیم شد. بلافاصله با استفاده از یک محلول پاش سوسپانسیون روی برگ‌های مورد نظر پاشیده شد، در حدی که سطح برگ خیس شود اما جاری نگردد. بوته‌های مایه‌زنی شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۲ درجه سلسیوس، در شرایط تاریکی در زیر پوشش پلاستیکی مشکی و رطوبت بالای ۹۰ درصد نگهداری و سپس به شرایط عادی گلخانه بازگردانده شدند (El-Sharkaway et al., 2014). گیاهان به صورت دوره‌ای از نظر علائم ظاهری مورد بررسی قرار گرفته و میانگین شدت بیماری براساس شاخص شدت بیماری با استفاده از مقیاس ۱-۱۲ به روش هورسفال و بارت (۱۹۵۴) انجام شد. اندازه‌گیری شدت بیماری در فواصل زمانی ۵، ۱۰ و ۲۰ روز پس از اعمال تیمارها ارزیابی شد.

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

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

فرمولاسیون پایه بدون عامل کنترل بیولوژیک، تیمار قارچ‌کش دومارک و شاهد) و فاکتور B (زمان ارزیابی در سه سطح: روز ۵، 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 برگ‌ها محلول‌پاشی شد. از قارچ‌کش دومارک به نسبت ۰/۴ در هزار و آب مقطر سترون به‌عنوان تیمارهای شاهد استفاده شد. از تیمار با بستر فرمولاسیون‌ها بدون ماده مؤثره باکتری نیز برای بررسی تأثیر احتمالی مواد حامل فرمولاسیون استفاده شد. پس از ۲۴ ساعت، مایه‌کوبی بیمارگر در شرایط گلخانه توسط سوسپانسیون اسپورهای تازه *P. xanthi* ( $10^5$  کنیدی در میلی‌لیتر) (Kamel, 2003) به‌روش جمالی زواره و همکاران (۱۳۸۳) انجام شد. به‌طور خلاصه 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 مقطر سترون حاوی توئین ۸۰ غوطه‌ور و سپس با استفاده از لام

جدول ۵- فرمولاسیون‌های پودری تهیه شده از باکتری *Bacillus subtilis* B2

Table 5. Powder formulations from *Bacillus subtilis* B2

| Number of formulation | Formulation compounds              | Number of formulations | Formulation compounds                |
|-----------------------|------------------------------------|------------------------|--------------------------------------|
| 1                     | Talk + sodium alginate             | 10                     | Kaolin + sodium alginate             |
| 2                     | Talk + sodium alginate + skim milk | 11                     | Kaolin + sodium alginate + skim milk |
| 3                     | Talk + sodium alginate + Trehalose | 12                     | Kaolin + sodium alginate + Trehalose |
| 4                     | Talk + chitosan                    | 13                     | Kaolin + chitosan                    |
| 5                     | Talk + chitosan + skim milk        | 14                     | Kaolin + chitosan + skim milk        |
| 6                     | Talk + chitosan + trehalose        | 15                     | Kaolin + chitosan + trehalose        |
| 7                     | Talk + skim milk                   | 16                     | Kaolin + skim milk                   |
| 8                     | Talk + trehalose                   | 17                     | Kaolin + trehalose                   |
| 9                     | Talk                               | 18                     | Kaolin                               |

## نتایج

غربال‌گری اجزا محیط کشت به‌روش پلاکت-برمن جهت رشد

*B. subtilis* B2 باکتری

آنالیز داده‌های آزمایش اول بر پایه طراحی با روش پلاکت-برمن (جدول ۳) 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) تأثیر معنی‌داری در افزایش جمعیت باکتری داشتند. تأثیر هم‌افزایی چهار فاکتور ملاس چغندر، ملاس نیشکر، CSL و عصاره مخمر در رشد باکتری *B. subtilis* B2 بیشتر از بقیه فاکتورها بود. تأثیر هم‌افزایی ملاس چغندر، ملاس نیشکر، CSL و عصاره مخمر به‌ترتیب ۳۰/۷۸، ۱۳/۰۴، ۶/۹۸ و ۱۰/۶۲ درصد

ارزیابی شد. بر این مبنا چهار فاکتور فوق با جزییات بیشتری به‌روش طراحی فاکتوریل کسری مورد مطالعه قرار گرفت.

## بهینه‌سازی مقادیر اجزای منتخب محیط کشت رشد باکتری B2

*B. subtilis* با کمک طراحی فاکتوریل کسری

نتایج تأثیرگذاری چهار جز منتخب محیط کشت روی زیست توده باکتری براساس طراحی فاکتوریل کسری نشان داد هر چهار فاکتور ملاس چغندر قند، ملاس نیشکر، CSL و عصاره مخمر دارای تأثیر مثبت قابل توجه بودند. ملاس چغندر قند و CSL به‌ترتیب با ۲۱/۲۶ و ۱۹/۶۹ درصد، بیشترین اثرگذاری را نشان دادند. اثر متقابل ملاس چغندر قند با هریک از سه فاکتور دیگر نیز درصد هم‌افزایی قابل توجهی داشت (جدول ۷). اثر اختلاط در مابقی تعاملات متقابل مشاهده شد.

جدول ۶- آنالیز فهرست تأثیرات اجزای محیط کشت در رشد باکتری *Bacillus subtilis* B2 پس از ۲۸ ساعت نگهداری روی شیکر انکوباتور

با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه، در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و تاریکی

Table 1. Analysis of effects list of culture medium components on the growth of *Bacillus subtilis*

B2 after 28 hours incubation on an incubator shaker at 150 rpm, 30 °C and darkness

| Term                | standardized effects | Sum of squares | Contribution% |
|---------------------|----------------------|----------------|---------------|
| Sugar beet molasses | 0.21                 | 0.13**         | 30.78         |
| Glucose             | 0.063                | 0.012**        | 2.80          |
| Sugar               | 0.047                | 0.0065**       | 1.52          |
| Sugarcane molasses  | 0.14                 | 0.056**        | 13.04         |
| Pentosan            | 0.043                | 0.0056**       | 1.31          |
| Starch              | 0.013                | 0.00053**      | 0.12          |
| Urea                | 0.043                | 0.0056**       | 1.31          |
| CSL                 | 0.10                 | 0.030**        | 6.98          |
| Ammonium sulfate    | 0.083                | 0.021**        | 4.85          |
| Yeast extract       | 0.12                 | 0.046**        | 10.62         |
| Ammonium nitrate    | 0.020                | 0.0012**       | 0.28          |

\*\* a statistically significant difference ( $P < 0.01$ )

\*\* تفاوت معنی‌دار در سطح  $P < 0.01$

جدول ۷- آنالیز تأثیرات اجزای منتخب محیط کشت در 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

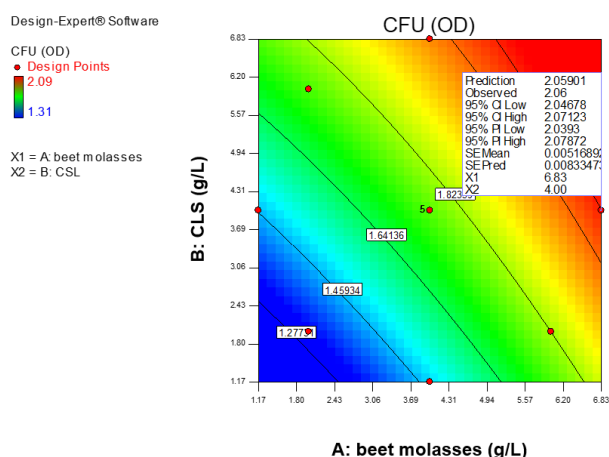
Table 7. Analysis of effects of selected culture medium components on the growth of *B. subtilis* B2 after 28 hours incubation on an

incubator shaker at 150 rpm, 30 °C and darkness

| Term                                   | standardized effects | Sum of squares | Contribution% |
|----------------------------------------|----------------------|----------------|---------------|
| Sugar beet molasses                    | 0.26                 | 0.14**         | 21.26         |
| Sugarcane molasses                     | 0.19                 | 0.072**        | 10.39         |
| CSL                                    | 0.25                 | 0.13**         | 19.69         |
| Yeast extract                          | 0.12                 | 0.029**        | 4.36          |
| Sugar beet molasses Sugarcane molasses | -0.13                | 0.036**        | 5.52          |
| Beet molasses × CSL                    | -0.15                | 0.048**        | 7.27          |
| Sugar beet molasses × yeast extract    | -0.11                | 0.024**        | 3.66          |
| Other interactions                     | Aliased              |                |               |

\*\* a statistically significant difference ( $P < 0.01$ )

\*\* تفاوت معنی‌دار در سطح  $P < 0.01$



شکل ۱- نمودار کانتور روش رویه پاسخ رابطه ملاس چغندر قند 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 subtilis* B2 after 28 hours incubation on an incubator shaker at 150 rpm, 30 °C and darkness

### بهینه‌سازی فاکتورهای محیطی بر تولید بیوماس باکتری B2

#### *B. subtilis* در محیط کشت بهینه

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

جدول ۸- میانگین جذب نوری زیست توده سلولی باکتری جدایه باکتری *Bacillus subtilis* B2 تولید شده در محیط کشت بهینه تحت تأثیر چهار فاکتور محیطی پس از ۲۸ ساعت نگهداری روی شیکر انکوباتور و شرایط تاریکی

| Treatment | FLevels of Factors  |                  |       |                         | (OD)   |
|-----------|---------------------|------------------|-------|-------------------------|--------|
|           | A: temperature (°C) | B: inoculant (%) | C: pH | D: agitation rate (rpm) |        |
| 1         | 25                  | 1                | 4.5   | 70                      | 1.55gh |
| 2         | 35                  | 1                | 4.5   | 70                      | 1.85d  |
| 3         | 25                  | 6                | 4.5   | 70                      | 1.6g   |
| 4         | 35                  | 6                | 4.5   | 70                      | 2.06b  |
| 5         | 25                  | 1                | 7.5   | 70                      | 1.63fg |
| 6         | 35                  | 1                | 7.5   | 70                      | 2c     |
| 7         | 25                  | 6                | 7.5   | 70                      | 1.68f  |
| 8         | 35                  | 6                | 7.5   | 70                      | 2.14a  |
| 9         | 25                  | 1                | 4.5   | 150                     | 1.83d  |
| 10        | 35                  | 1                | 4.5   | 150                     | 2.09b  |
| 11        | 25                  | 6                | 4.5   | 150                     | 1.85d  |
| 12        | 35                  | 6                | 4.5   | 150                     | 2.17a  |
| 13        | 25                  | 1                | 7.5   | 150                     | 1.76e  |
| 14        | 35                  | 1                | 7.5   | 150                     | 2.11ab |
| 15        | 25                  | 6                | 7.5   | 150                     | 1.97c  |
| 16        | 35                  | 6                | 7.5   | 150                     | 2.14a  |
| 17        | 30                  | 3.5              | 6     | 110                     | 2.06b  |
| 18        | 30                  | 3.5              | 6     | 110                     | 2.06b  |
| 19        | 30                  | 3.5              | 6     | 110                     | 2.08b  |
| 20        | 30                  | 3.5              | 6     | 110                     | 2.07b  |

\* میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند، اختلاف معنی‌داری ندارند.

Means with the same letter, are not statistically significant different ( $P < 0.05$ )

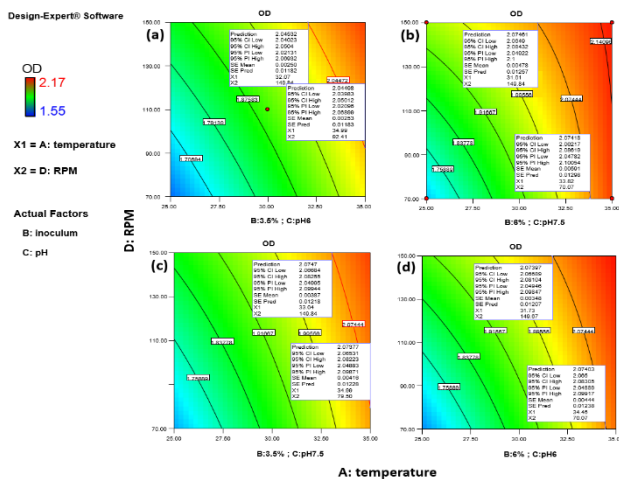
طبق نتایج شکل ۱، بیشترین زیست توده در محیط کشت حاوی مخلوط حداقل ۵/۶۵ گرم در لیتر ملاس چغندر قند و ۶/۷۵ گرم در لیتر CSL و همچنین ۶/۷۵ گرم در لیتر ملاس چغندر قند و حداقل ۴/۷۵ گرم در لیتر CSL و با جذب نوری بیش از ۲/۰۹ مشاهده شد. از طرفی در محیط کشت حاوی غلظت حد واسط CSL (چهار گرم در لیتر) در صورتیکه غلظت ملاس چغندر ۶/۸۳ گرم در لیتر استفاده شود نیز بیشترین زیست توده (با OD برابر با ۲/۰۶) حاصل خواهد شد (شکل ۱).

مدل رابطه ملاس چغندر قند 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 چغندر قند در محیط کشت برای رسیدن به محدوده ماکزیمم رشد، به ترتیب ۶-۳/۸۲ گرم در لیتر و ۴۵-۴/۶ 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 ۴/۴۲ گرم در لیتر به عنوان محیط کشت بهینه انتخاب شد.

وسط میزان زادمایه (۳/۵ درصد) و حد بالای pH (۷/۵)، حداکثر تولید زیست توده باکتری جدایه B2 (OD بیش از ۲/۰۷) در دمای شیکر ۳۳ تا ۳۵ سلسیوس و حداقل سرعت هم‌زدن ۸۰ دور در دقیقه حاصل می‌شود (شکل ۲c). در نهایت در محیط کشت بهینه با شرایط حد بالای میزان زادمایه (۶ درصد) و حد وسط pH (۶)، حداکثر تولید زیست توده باکتری جدایه B2 (OD بیش از ۲/۰۷) در دمای شیکر ۳۲ تا ۳۵ سلسیوس و حداقل سرعت هم‌زدن ۷۰ دور در دقیقه حاصل می‌شود (شکل ۲d). به‌طور کلی بالاترین پیشنهاد نرم افزار شامل (۱) دمای ۳۴ درجه سلسیوس، میزان زادمایه ۳/۷۶ درصد، pH برابر با ۷/۱۴ و سرعت هم‌زدن شیکر ۱۴۴ دور در دقیقه (OD برابر با ۲/۰۹۵)؛ (۲) دمای ۳۳/۵ درجه سلسیوس، میزان زادمایه ۵/۳۸ درصد، pH برابر با ۵/۸۶ و سرعت هم‌زدن شیکر ۱۲۳ دور در دقیقه (OD برابر با ۲/۰۷۰)؛ (۳) دمای ۳۲ درجه سلسیوس، میزان زادمایه ۵/۸۵ درصد، pH برابر با ۶/۲۴ و سرعت هم‌زدن شیکر ۱۳۶ دور در دقیقه (OD برابر با ۲/۰۶۷) بود.



شکل ۲- منحنی کانتور تأثیر هم‌زمان دما و سرعت دور شیکر در محیط کشت بهینه بر میزان زیست توده باکتری B2 *Bacillus subtilis* پس از ۲۸ ساعت نگهداری در (a)، pH برابر با ۶ با میزان زادمایه اولیه ۳/۵ درصد؛ (b)، pH برابر با ۷/۵ با میزان زادمایه اولیه ۶ درصد؛ (c)، pH برابر با ۷/۵ با میزان زادمایه اولیه ۳/۵ درصد؛ (d)، pH برابر با ۶ با میزان زادمایه اولیه ۶ 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 subtilis* B2 after 28 hours incubation on (a) pH 6, inoculant 3.5%; (b) pH 7.5, inoculant 6%

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، تأثیر معنی‌داری وجود داشت و عدم معنی‌داری فقط در اثرات متقابل دو عاملی دما × اسیدیته و زادمایه × اسیدیته مشاهده شد (جدول ۹).

جدول ۹- آنالیز فهرست تأثیرات چهار فاکتور محیطی و اثرات متقابل

آن‌ها بر میزان تولید زیست توده سلولی باکتری جدایه

در محیط کشت بهینه پس از ۲۸ ساعت نگهداری *Bacillus subtilis* B2

روی شیکر انکوباتور و شرایط تاریکی

**Table 9.** Analysis of effects list of for environmental factors and their interaction on the biomass production of *Bacillus subtilis* B2 after 28 hours incubation on an incubator shaker and darkness

| Source                | Contribution%         | Sum of squares |
|-----------------------|-----------------------|----------------|
| <b>A: Temperature</b> | 1.37**                | 65.79          |
| <b>B: Inoculant</b>   | 0.11**                | 5.40           |
| <b>C: pH</b>          | 0.031**               | 1.49           |
| <b>D: agitation</b>   | 0.34**                | 16.53          |
| <b>AB</b>             | 0.00403**             | 0.19           |
| <b>AC</b>             | 0.00007 <sup>ns</sup> | 0.0036         |
| <b>AD</b>             | 0.033**               | 1.59           |
| <b>BC</b>             | 0.00053 <sup>ns</sup> | 0.026          |
| <b>BD</b>             | 0.0012**              | 0.058          |
| <b>CD</b>             | 0.020**               | 0.96           |
| <b>ABC</b>            | 0.016**               | 0.78           |
| <b>ABD</b>            | 0.026**               | 1.26           |
| <b>ACD</b>            | 0.0024**              | 0.12           |
| <b>BCD</b>            | 0.013**               | 0.64           |
| <b>ABCD</b>           | 0.0016**              | 0.079          |

\*\* تفاوت معنی‌دار در سطح  $P < 0.01$ ، ns عدم اختلاف معنی‌داری

\*\* A statistically significant difference ( $P < 0.01$ ); ns, there was no statistically significant difference

طبق منحنی کانتور (شکل ۲a)، در محیط کشت بهینه با شرایط حد وسط میزان زادمایه (۳/۵ درصد) و pH (۶)، بیشترین تولید زیست توده باکتری (OD بیش از ۲/۰۴) 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 (۶ درصد) و pH (۷/۵)، حداکثر تولید زیست توده باکتری B2 *B. subtilis* (OD بیش از ۲/۰۷) در دمای شیکر ۳۱ تا ۳۵ سلسیوس و حداقل سرعت هم‌زدن ۷۰ دور در دقیقه حاصل شد (شکل ۲b). در محیط کشت بهینه با شرایط حد

پایداری فرمولاسیون‌های مختلف باکتری *B. subtilis* B2 پس از شش ماه نگهداری در دو دمای ۴ و ۲۴ درجه سلسیوس

باتوجه به نتایج به دست آمده (جدول ۱۰) پس از نگهداری به مدت ۱۸۰ روز در دماهای ۴ و ۲۴ 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 درصد اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. همچنین اثر متقابل کاربرد دو عاملی مواد حامل × پایداریکننده‌ها و پوشاننده‌ها × پایداریکننده‌ها نیز در سطح ۵ درصد معنی‌دار می‌باشد. اثر متقابل سه عاملی حامل × پوشاننده‌ها × پایداریکننده‌ها نیز معنی‌دار می‌باشد. به طور کلی از بین ماده حامل یا پرکننده (تالک و کائولین)، تالک بیشترین تأثیر 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 مؤثرتر بود. بین سطوح مختلف پایداریکننده (عدم استفاده از پایداریکننده، استفاده از شیر خشک، استفاده از تری‌هالوز) اختلاف معنی‌داری وجود داشت و استفاده از تری‌هالوز بیشترین تأثیر را در زنده‌مانی سلول‌های باکتری پس از شش ماه نگهداری داشت. بر اساس جدول ۱۱ بین فرمولاسیون نگهداری شده در هر دو دمای ۴ و ۲۴ درجه سلسیوس، بیشترین تعداد سلول زنده جدایه باکتری *B. subtilis* B2 پس از شش ماه نگهداری در فرمولاسیون شماره ۳ (تالک + سدیم آلجینات + تری‌هالوز)

مشاهده شد که جمعیت سلول زنده باکتری *B. subtilis* B2 در فرمولاسیون‌ها در دمای ۴ و ۲۴ درجه سلسیوس به ترتیب  $7/9 \times 10^8$  و  $4/2 \times 10^7$  سلول زنده در گرم فرمولاسیون بود که با شاهد (پودر تالک بدون هیچ ماده افزودنی) و سایر فرمولاسیون‌ها اختلاف معنی‌داری از خود نشان داد. کمترین جمعیت سلول زنده باکتری *B. subtilis* B2 مربوط به فرمولاسیون‌های شاهد (۹ و ۱۸) و با جمعیت  $1/4 \times 10^3$  و  $1 \times 10^2$  سلول زنده در فرمولاسیون پس از شش ماه نگهداری در دمای ۴ و ۲۴ درجه سلسیوس بود.

بررسی تأثیر 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 فرمولاسیون حاوی جدایه باکتری *B. subtilis* B2 و قارچ‌کش دومارک با دوز ۰/۴ در هزار به ترتیب با درصد شدت بیماری معادل ۳۰/۸۴ و ۳۱/۴۹ درصد در یک گروه آماری قرار گرفتند. مواد حامل فرمولاسیون باکتری (بدون ماده مؤثره) 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.

جدول ۱۰- تجزیه واریانس ماندگاری لگاریتم جمعیت زنده باکتری *Bacillus subtilis* B2 در فرمولاسیون‌های مختلف پس از ۱۸۰ روز انبارداری

در دماهای ۴ و ۲۴ درجه سلسیوس

Table 10. Variance analysis of viability of *Bacillus subtilis* B2 spores log<sub>10</sub> (CFU) at different formulations after 180 days of storage at 4° C and 24° C

| Source of variation | Degree of freedom | Shelf life at 4° C |          | Shelf life at 24° C |          |
|---------------------|-------------------|--------------------|----------|---------------------|----------|
|                     |                   | Mean of square     | F value  | Mean of square      | F value  |
| Carrier (A)         | 1                 | 0.13               | 46.17*   | 0.73                | 741.79*  |
| Filler (B)          | 2                 | 64.13              | 21476.3* | 62.07               | 39992.3* |
| Adjutants (C)       | 2                 | 2/03               | 682.39*  | 5.37                | 3461.4*  |
| A*B                 | 2                 | 0.065              | 21.95*   | 0.34                | 228.57*  |
| A*C                 | 2                 | 0.06               | 20.14*   | 0.69                | 449.13*  |
| B*C                 | 4                 | 5.34               | 1791.35* | 4.99                | 3215.8*  |
| A*B*C               | 4                 | 0.11               | 37.63*   | 0.21                | 135.69*  |
| Error               | 36                | 0.002              |          | 0.001               |          |
| CV                  |                   | 0.75               |          | 0.82                |          |

\* a statistically significant difference ( $P < 0.05$ );

\* میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند، اختلاف معنی‌داری ندارند

جدول ۱۱- مقایسه میانگین لگاریتم ماندگاری جمعیت زنده باکتری *Bacillus subtilis* B2 در فرمولاسیون‌های مختلف پس از نگهداری به مدت ۱۸۰ روز در دمای ۴ و ۲۴ درجه سلسیوس

**Table 11.** Comparison of the mean of viability of *Bacillus subtilis* B2 spores log<sub>10</sub> (CFU) at different formulations after 180 days of storage at 4° C and 24° C

| Formulations                             | Shelf life (log CFU per g formulation) |       |
|------------------------------------------|----------------------------------------|-------|
|                                          | 4 c                                    | 24 c  |
| 1. Talk + sodium alginate                | 7.02e                                  | 5.52e |
| 2. Talk + sodium alginate + skim milk    | 8.25b                                  | 6.96b |
| 3. Talk + sodium alginate + trihalose    | 8.9a                                   | 7.63a |
| 4. Talk + chitosan                       | 6.85f                                  | 4.69f |
| 5. Talk + chitosan + skim milk           | 7.71c                                  | 6.48d |
| 6. Talk + chitosan + trihalose           | 7.72c                                  | 6.48d |
| 7. Talk + skim milk                      | 5.04g                                  | 3.52i |
| 8. Talk + trihalose                      | 5.07g                                  | 3.52i |
| 9. Talk                                  | 3.14h                                  | 2.1j  |
| 10. Kaolin + sodium alginate             | 7.04e                                  | 4.56g |
| 11. Kaolin + sodium alginate + skim milk | 8.27b                                  | 6.9b  |
| 12. Kaolin + sodium alginate + trihalose | 8.25b                                  | 6.88b |
| 13. Kaolin + chitosan                    | 3.84f                                  | 3.56h |
| 14. Kaolin + chitosan + skim milk        | 7.35d                                  | 6.7c  |
| 15. Kaolin + chitosan + trihalose        | 7.71c                                  | 6.73c |
| 16. Kaolin + skim milk                   | 5.05g                                  | 3.53i |
| 17. Kaolin + trihalose                   | 5.11g                                  | 3.53i |
| 18. Kaolin                               | 3.15h                                  | 2.1j  |

\* میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند، اختلاف معنی‌داری ندارند.

Means with the same letter are not statistically significant different ( $P < 0.05$ )

جدول ۱۲- مقایسه میانگین درصد شدت بیماری سفیدک سطحی خیار و درصد کاهش درصد شدت بیماری سفیدک سطحی خیار در شرایط گلخانه

**Table 12.** Comparison of the mean percentage of Powdery mildew disease severity and the percentage of reduction of powdery mildew disease severity in different treatments

| Treatments           | After 5 days       |            | After 10 days      |            | After 20 days      |            |
|----------------------|--------------------|------------|--------------------|------------|--------------------|------------|
|                      | Disease severity % | Efficacy % | Disease severity % | Efficacy % | Disease severity % | Efficacy % |
| Bacteria formulation | 16.4d              | 60.39      | 25.94c             | 48.44      | 32.44c             | 45.42      |
| Fungicide (Dumark)   | 16.39d             | 50.42      | 25.4c              | 48.62      | 31.78c             | 46.53      |
| Formulation carriers | 39.71b             | 4.09       | 48.68a             | 5.57       | 58.63a             | 1.35       |
| control              | 41.4a              | -          | 49.43a             | -          | 59.43              | -          |

\* میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند، اختلاف معنی‌داری ندارند.

\* Means with the same letter are not statistically significant different ( $P < 0.05$ )

## 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 (strobilurin) مانند آزوکسی استروبین شده است (McGrath and Shishkoff, 2003). یافتن جایگزین‌های مناسب مانند استفاده از 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 سطحی 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 چغندر قند، ملاس نیشکر، عصاره مخمر و CSL بیشترین هم‌افزایی و تأثیر 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 تأثیر را در افزایش رشد جدایه باکتری *B. subtilis* B2 داشتند انجام شد، ملاس چغندر قند و CSL بیشترین تأثیر را در افزایش زادمایه در مقایسه با ملاس نیشکر و عصاره مخمر داشتند. در نقاط مختلف جهان نیز ملاس چغندر قند و CSL به طور 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 بیوکترل پوسیدگی قهوه‌ای در میوه‌جات است، در محیط حاوی ملاس چغندر قند که به عنوان منبع کربن استفاده شده بود، گزارش شده است. ملاس چغندر قند 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 بیوکترل، کلیدی‌ترین مرحله فرموله کردن آن می‌باشد. توسعه فرمولاسیون زیستی مؤثر و کارآمد عمدتاً به مواد تشکیل‌دهنده مورد استفاده برای تهیه آن که شامل سویه بالقوه بیوکترلی، 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 سدیم آلجینات برای تنظیم آزادسازی BCA در فرمولاسیون‌ها استفاده می‌شود و همچنین آن‌ها را از تأثیرات محیطی محافظت می‌کند (Saber Rische et al., 2022). اضافه کردن سدیم آلجینات به پودر تالک موجب افزایش جمعیت سلول زنده باکتری در فرمولاسیون از  $1/4 \times 10^3$  به  $1/3 \times 10^6$  سلول زنده در هر گرم فرمولاسیون بعد از شش ماه نگهداری شد. نتایج نشان داد ما بین استفاده از سدیم آلجینات و یا استفاده از کیتوزان نیز از نظر تعداد سلول زنده باکتری بعد از شش ماه نگهداری در هر دو دمای ۴ و ۲۴ 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

بود. به‌طور مشابهی برای فرمولاسیون *Azospirillum brasilense* و *Raoultella terrigena* به‌منظور 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 ۴ درجه سلسیوس نسبت به جمعیت‌های نگهداری شده در دمای ۲۴ 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 تأثیرگذار است. نگهداری در دمای پایین به‌طور 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 به‌میزان 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 ۵، ۱۰ و ۲۰ روز اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. بر اساس نتایج یک بررسی، کاربرد قارچ‌کش مانکوزب و فرم تجاری باکتری *B. subtilis* (محصول شرکت Bazram) به‌ترتیب موجب ۲۶ و ۲۱ 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.

افزایش گرانروی (ویسکوزیته) آب می‌شود. در واقع سدیم آلجینات عامل پایداری، چسبندگی و دوام فرمولاسیون می‌باشد (Kinay and Yildiz, 2008). بر اساس گزارشات سدیم آلجینات باعث پایداری *Fusarium oxysporum* f. sp. *orthoceras* در فرمولاسیون‌های خشک نگهداری شده به‌مدت 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 به‌ترتیب به  $1 \times 10^6$  و  $1/2 \times 10^6$  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 ۲۴ 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 (Garcia, 2011). در حال حاضر معمولاً از سدیم آلجینات و یا تری‌هالوز به تنهایی در تهیه 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 (سدیم آلجینات یا کیتوزان) به‌طور 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 سدیم آلجینات و تری‌هالوز به‌عنوان مواد افزوده مورد استفاده قرار گرفته بود، دیده شد. بررسی لگاریتم جمعیت سلول زنده باکتری در گرم فرمولاسیون بعد از شش ماه نگهداری در دمای ۴ و ۲۴ درجه سلسیوس به‌ترتیب برابر با  $7.9/32$  و  $6.6/73$  درصد لگاریتم جمعیت اولیه فرمولاسیون بود و جمعیت آن  $8 \times 10^8$  و  $1/1 \times 10^6$  سلول زنده در گرم فرمولاسیون

این مطالعه باکتری *B. subtilis* B2 برای تولید یک فرمولاسیون تجاری برای کنترل بیماری‌های گیاهی قابل توصیه می‌باشد.

### سپاسگزاری

این پژوهش مستخرج از نتایج پروژه تحقیقاتی با شماره مصوب ۰۰۰۸۴۴-۰۰۰۳۴-۰۸۱-۱۶۰۵-۳۶-۱۳ می‌باشد. نویسندگان از پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی به دلیل در اختیار قرار دادن برخی امکانات پژوهشی و همچنین از تمام دست‌اندرکاران به‌خاطر همکاری‌های ارزشمندشان تشکر و قدردانی می‌نمایند.

در حالت کلی تأثیرگذاری 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 کاملاً مقرون به‌صرفه و قابل توصیه می‌باشد. بر اساس نتایج مطالعه حاضر فرمولاسیون تهیه شده از باکتری *B. subtilis* B2 توانست به‌طور قابل توجهی شدت سفیدک پودری خیار را در شرایط گلخانه کاهش دهند. بر اساس نتایج

### References

- 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: [doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00513-4](https://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*, 2<sup>th</sup> ed. Boca Raton: Talor & Francis. Pp. 1-4, 19-20.  
DOI: [doi.org/10.1201/9781420021455](https://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: <https://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: [doi.org/10.1515/znc-2003-9-1020](https://doi.org/10.1515/znc-2003-9-1020)
- BONATERA, 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: <http://doi.org/10.1007/s00468011-0626-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.  
DOI: <http://doi.org/10.1094/Phyto-85-165>
- 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: [doi.org/10.1007/0-387-30741-9\\_12](https://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: <http://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: <http://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. DOI: <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: <http://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: [doi.org/10.1016/j.ejsobi.2012.03.002](https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2012.03.002)
- JONES, K.A. and H.D. BURGESS, 1998. Technology of formulation and application. In: Burgess 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: [doi.org/10.1016/j.cropro.2012.06.009](https://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  $\beta$ -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: [doi.org/10.1016/j.fgb.2014.08.006](https://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: [doi.org/10.1094/PDIS-02-14-0210-PDN](https://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: [doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02778.x](https://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. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-04474-9\\_8](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: [doi.org/10.1016/j.tplants.2016.11.002](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.11.002).

- QI, Q., C. FAN, H. WU, L. SUN, and C. CAO, 2023. Preparation of *Trichoderma asperellum* Microcapsules and Biocontrol of Cucumber Powdery Mildew, *Microbiology spectrum*, No. 11: 321-332. DOI: [doi.org/10.1128/spectrum.05084-22](https://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: [doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00072-7](https://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: [doi.org/10.1007/s10658-017-1258-x](https://doi.org/10.1007/s10658-017-1258-x).
- SABERI RISEH, R., M. HASSANISAADI, M. VATANKHAH, and S. RAJENDR, 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: [http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.09.278](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.09.278)
- SAFAEI, 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: [doi.org/10.3390/agriculture13081558](https://doi.org/10.3390/agriculture13081558).
- VERMA, M., S.K. BRAR, R.D. TYAGI, SURAMPALLI, R.Y. and J.R. VALERO, 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control, *Biochemistry Engineering Journal*, No. 37: 1–20. DOI: [doi.org/10.1016/j.bej.2007.05.012](https://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: [http://doi.org/10.1094/PD-79-0782](https://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: [http://doi.org/09e415089c07a1f9c7000000](https://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: [doi.org/10.1016/j.fcr.2022.108606](https://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: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0272702>