DOI: 10.22059/ijbse.2019.271507.665131 مهندسی بیوسیستم ایران، دوره ۵۰، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۸ (ص ۴۹۷-۴۸۹)

Potential Use of Some Liquid Natural Media for the Production of Blastospores of Entomopathogenic Fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*

MARZIEH RASHID[1], REZA TALAEI-HASSANLOUI[2*], FARAMARZ KHODAIYAN[3], MARK GOETTEL[4]

1. Ph.D. student, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
2. Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
3. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agricultural Engineering and Technology, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
4. Research Scientist, Lethbridge Research Center, Lethbridge, Alberta, Canada.

(Received: Jan. 16, 2019- Revised: Feb. 10, 2019- Accepted: Feb. 23, 2019)

ABSTRACT

In the present study, the potential of natural ingredients such as extract of pug, carrot pulp, permeate and fish waste were investigated to produce blastospores of two fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. SDB and PDB culture media were considered as control. In the case of absence of the initial pH for culture media, the highest production of blastospores was recorded in SDB medium and permeate extract for *B. bassiana* and *M. anisopliae* respectively, in three days. In the second case, with the same initial pH (5.6) for culture media, the maximum production of blastospores was observed in the extract of fish waste (3×10^7 blastospore /ml medium) and in the carrot pulp extract (6×10^6 blastospore /ml medium) for *B. bassiana* and *M. anisopliae* respectively. In the next step, wheat bran and permeate (4% and 8%) extracts were added to selected medium fish waste and carrot pulp. Addition of extract of permeate (8%) had the greatest effect on increasing blastospor production. In the last step, mixed different salts were added and reduced blastospore production in fungus *B. bassiana* while increased in *M. anisopliae* compared to the control medium. Finally, two optimum media were introduced for the production of two entomopathogenic fungi.

Keywords: Fish waste, Carrot pulp, Apple pug, Permeate, Yield

* Corresponding author's Email: rtalaei@ut.ac.ir

بررسی پتانسیل استفاده از چند محیط کشت طبیعی مایع برای تولید بلاستوسپورهای دو قارچ بیمارگر حشرات *Metarhizium anisopliae* و *Beauveria bassiana*

مرضیه رشید[۱]، رضا طلایی حسنلویی[۲]*، فرامرز خدائیان چگنی[۳] و مارک گوتل[۴]

۱. دانشجوی دکتری گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۲. استاد گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۳. استاد گروه صنایع غذایی، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۴. استاد پژوهش مرکز تحقیقات لتبریج، آلبرتا، کانادا

(تاریخ دریافت: ۲۶/ ۱۰/ ۱۳۹۷- تاریخ بازنگری: ۲۱/ ۱۱/ ۱۳۹۷- تاریخ تصویب: ۴/ ۱۲/ ۱۳۹۷)

چکیده

در پژوهش حاضر، پتانسیل عملکرد مواد طبیعی شامل عصاره‌های تفاله سیب، تفاله هویج، آب پنیر و ضایعات ماهی برای تولید بلاستوسپورهای دو قارچ *Beauveria bassiana* و *Metarhizium anisopliae* مورد بررسی قرار گرفت. محیط کشت‌های SDB و PDB به عنوان تیمار مقایسه ای در نظر گرفته شد. در حالت یکسان نبودن pH اولیه محیط کشت‌ها، بیشترین تولید بلاستوسپور برای قارچ *B. bassiana* در محیط SDB و برای قارچ *M. anisopliae* در محیط عصاره آب پنیر در مدت سه روز مشاهده گردید. در حالت دوم با pH اولیه یکسان (۵/۶) برای محیط کشت‌ها، بیشترین تولید بلاستوسپور برای قارچ *B. bassiana* در محیط عصاره ضایعات ماهی (۳×۱۰^{۷} بلاستوسپور بر میلی‌لیتر محیط) و برای *M. anisopliae* در محیط عصاره تفاله هویج (۶×۱۰^{۶} بلاستوسپور بر میلی‌لیتر محیط) بود. در گام بعدی، عصاره‌های سبوس گندم و آب پنیر(۴٪ و ۸٪) به محیط کشت‌های منتخب ضایعات ماهی و تفاله هویج اضافه شد. افزودن عصاره آب پنیر ۸٪ بیشترین تأثیر در افزایش تولید بلاستوسپور را داشت. در گام آخر، مخلوط نمک‌های مختلف اضافه شد و سبب کاهش تولید بلاستوسپور در قارچ *B. bassiana* و افزایش بلاستوسپور در *M. anisopliae* در مقایسه با محیط کشت شاهد گردید. در نهایت دو محیط کشت بهینه برای تولید دو قارچ بیمارگر حشرات معرفی شد.

واژه‌های کلیدی: ضایعات ماهی، تفاله هویج، تفاله سیب، آب پنیر، عملکرد

مقدمه

استفاده فراوان و بی رویه از آفت‌کش‌های شیمیایی سبب افزایش مخاطرات زیست محیطی و سلامتی انسان شده است. به علاوه مشکلات دیگری از قبیل مقاومت آفات، ظهور آفات ثانویه به علت از بین رفتن دشمنان طبیعی، اثرات سوء بر روی موجودات غیر هدف، آلودگی محیط زیست (خاک، آب، هوا) و وجود باقیمانده مواد شیمیایی در محصولات کشاورزی را نیز باعث شده است. استفاده از عوامل کنترل بیولوژیک، از جمله قارچ‌های بیمارگر حشرات یکی از راهکارهای مناسب و سازگار با محیط زیست است (Singh *et al.*, 2017). قارچ‌های بیمارگر حشرات با داشتن ویژگی‌هایی از قبیل شدت بیمارگری مناسب، قدرت نفوذ کوتیکولی، طیف میزبانی وسیع و در عین حال بی خطر برای انسان و جانوران اهلی، توانایی همه گیری در جمعیت میزبان و توانایی رشد روی محیط‌های غذایی مختلف، جایگاه ویژه‌ای دارند (Kamp, & Bidochka, 2002) همچنین تولید انبوه آن‌ها ارزان و ذخیره‌سازی قارچ‌های بیمارگر آسان می‌باشد و در سطح گسترده ای از درجه حرارت و رطوبت موثر می‌باشند (Sujatha *et al.*, 2016). برای تولید اسپورهای زهرآگین این قارچ‌ها می‌توان از ضایعات کشاورزی و صنعتی که ارزان و مناسب و در دسترس می‌باشند به عنوان محیط کشت جامد یا مایع استفاده نمود. علیرغم مطالعات مختلف جهانی تاکنون، هنوز تحقیق در مورد نیازهای تغذیه‌ای قارچ‌ها و تولید انبوه و تسریع در تجاری سازی آن‌ها ضرورت دارد (بنامولایی و همکاران، ۱۳۸۹؛ Prasad, & Pal, 2014؛ بی‌غم و طلایی‌حسنلویی، ۱۳۹۶). برای

* نویسنده مسئول: rtalaei@ut.ac.ir

بهینه‌سازی محیط کشت، نه تنها کمیت اسپورها، بلکه کیفیت آنها مانند تحمل خشکی، دوام آن‌ها هنگامی که خشک می‌شوند و مؤثر بودن آن‌ها در کنترل بیولوژیک نیز باید در نظر گرفته شود (Jackson, 1997). سه روش مختلف تخمیر مایع، کشت سطحی یا تخمیر جامد و تخمیر دو مرحله‌ایی مایع-جامد برای تولید قارچ‌های بیمارگر حشرات به کار گرفته می شود. در استفاده از محیط جامد، کنیدی‌های هوایی و در محیط مایع بلاستوسپورها حاصل می‌شوند. بلاستوسپورها نسبت به کنیدی‌های هوایی، هم از توانایی مهار زیستی بیشتری علیه آفات برخوردار هستند و هم در مدت زمان کوتاه‌تری به دست می‌آیند که مزیت اقتصادی مهمی محسوب می‌شود. مطالعات نشان داده است که تولید بلاستوسپور *Paecilomyces fumosoroseus* در محیط کشت مایع نسبت به کنیدی در بیمارگری و مرگ *Bemisia argentifolii* موثرتر بوده است (Lacey *et al.*,1999). استفاده از مواد طبیعی ارزان قیمت مانند ضایعات محصولات کشاورزی و صنایع غذایی می‌تواند یکی از روش‌های اقتصادی نمودن تولید قارچ‌های بیمارگر حشرات باشد. لذا تحقیق حاضر به منظور تعیین پتانسیل چند محیط کشت طبیعی مایع بر میزان تولید بلاستوسپور دو قارچ *Beauveria bassiana* و *Metarhizium anisopliae* انجام شده است.

مواد و روش‌ها

کشت جدایه‌های قارچی

در این تحقیق از جدایه‌های *Beauveria bassiana* TV و *Metarhizium anisopliae* CS1که به ترتیب از خاک و لارو ساقه خوار برنج جدا شده و در آزمایشگاه کنترل بیولوژیک گروه گیاهپزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران موجود می‌باشد، استفاده گردید. قارچ *B. bassiana* روی محیط کشت Sabouraud's Dextrose Agar (SDA) و قارچ *M. anisopliae* روی محیط کشت Potato Dextrose Agar (PDA) درون ظروف پتری پلاستیکی (با قطر ۹۰ میلی متر) کشت شد و اطراف آن‌ها با پارافیلم بسته شد و در دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵±۶۵ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی به مدت ۱۴ روز نگهداری شدند تا اسپورزایی کامل انجام شود. بعد از اسپورزایی، قارچ از سطح محیط کشت جمع آوری و داخل لوله فالکون حاوی آب مقطر استریل ریخته شد. سوسپانسیون حاصله از کاغذ صافی (واتمن شماره یک) عبور داده شد و با استفاده از لام گلبول شمار، غلظت کنیدی‌ها در سوسپانسیون تعیین گردید. برای کشت‌های بعدی، از قارچ عبور داده شده از حشره میزبان استفاده گردید.

تهیه محیط کشت طبیعی پایه برای تولید بلاستوسپور

برای تهیه محیط کشت‌های طبیعی مایع از روش Bena-Molaei *et al* (2011) با تغییراتی بر مبنای ضایعات کشاورزی و صنایع غذایی استفاده گردید. برای تهیه بلاستوسپورها در آزمایشگاه ۵۰ گرم از پودر تفاله سیب، پودر تفاله هویج ،پودر آب پنیر (دریافت از شرکت پنیرسازی لیقوان تبریز)، و پودر ضایعات ماهی (دریافت از ایستگاه علوم دامی مزرعه پژوهشی پردیس کشاورزی دانشگاه تهران) استفاده و پس از ۲۴ ساعت خیساندن در یک لیتر آب مقطر از پارچه ململ دو لایه عبور داده و از عصاره آن‌ها استفاده شد. برای تهیه تفاله هویج و سیب، پس از آبگیری آن‌ها، تفاله‌ها در داخل ظروف مناسب قرار گرفته و در برابر نور خورشید به مدت دو روز خشک شدند. آب پنیر تهیه شده از کارخانه نیز در برابر آفتاب خشک شد. پس از آسیاب نمودن آن‌ها از پودر این مواد برای تهیه محیط کشت استفاده گردید.

از محیط کشت‌های SDB و PDB به عنوان تیمارهای مقایسه‌ای به ترتیب برای تولید بلاستوسپور قارچ *B. bassiana* و *M. anisopliae* استفاده گردید. در داخل هر ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری، ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت ریخته و بدون تغییر دادن pH اولیه محیط کشت‌ها، در اتوکلاو (دما ۱۲۱ درجه سلسیوس، فشار یک اتمسفر به مدت ۱۵ دقیقه) استریل شد. پس از سرد شدن محیط کشت‌ها، یک میلی‌لیتر از کنیدی‌های حاصل از محیط‌های کشت جامد با غلظت ۱×۱۰^{۷} کنیدی در میلی‌لیتر داخل هود میکروبیولوژی مایه زنی گردید. ارلن‌ها درون شیکر انکوباتور (Climo – shaker ISF1- X شرکت آرین تجهیز آزما) با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس برای تولید بلاستوسپور به مدت سه روز قرار داده شدند. در روز سوم عصاره ها از پارچه ململ عبور داده شد و با استفاده از لام گلبول‌شمار، غلظت بلاستوسپورها در سوسپانسیون تعیین گردید. در آزمونی دیگر، pH اولیه محیط کشت‌ها با HCL و KOH یکسان شد (۵/۶، pH مطلوب قارچ) و پس از طی مراحل ذکر شده در بالا، در روز سوم غلظت بلاستوسپورها در سوسپانسیون تعیین گردید.

افزودن مکمل‌های غذایی و نمک‌ها به محیط‌های کشت مایع پایه

در این قسمت از تحقیق به محیط کشت‌های پایه که تولید بلاستوسپور بیشتری داشتند مکمل‌هایی از منابع کربوهیدراتی و نیتروژنی اضافه گردید. عصاره ضایعات ماهی به عنوان محیط کشت منتخب برای قارچ *B. bassiana* و عصاره تفاله هویج به عنوان محیط کشت منتخب برای قارچ *M. anisopliae* با مواد

مکمل شامل عصاره آب پنیر و عصاره سبوس گندم هر کدام در دو سطح ۴و ۸ درصد، به نسبت مساوی مخلوط و نقش آن‌ها در تولید بلاستوسپور بررسی گردید. پس از این مرحله هنگامی که نوع مکمل مناسب همراه با محیط کشت پایه برای تولید بلاستوسپور هر قارچ مشخص شد، به آن‌ها از مخلوط نمک‌های KCL، KNO_3، $MgSO_4$، $CaCl_2$ و KH_2PO_4 ۰/۱ مولار اضافه و مجدداً میزان تولید بلاستوسپور ارزیابی گردید.

تجزیه شیمیایی و تعیین اسیدهای آمینه محیط‌های کشت

به منظور تجزیه شیمیایی، مقادیر ماده خشک، خاکستر، چربی، پروتئین خام و الیاف خام محیط‌های تفاله هویج، ضایعات ماهی و آب پنیر (محیط کشت‌های بهینه) طبق روش‌های توصیه شده AOAC (1990) تعیین گردید. برای اندازه‌گیری درصد ماده خشک از آون فن‌دار (شرکت GALLENKAMP آلمان) در دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس استفاده شد. اندازه‌گیری خاکستر با سوزاندن نمونه در کوره با دمای ۶۰۰ درجه سلسیوس صورت گرفت. هدف از خاکستر نمودن نمونه، تعیین عناصر خاصی بود که در مراحل بعد توسط اسپکتروفتومتر یا جذب اتمی تعیین گردید. از تفاوت خاکستر و ماده خشک، ماده آلی به دست آمد. عصاره‌گیری نمونه با حلال‌های اتری در دستگاه عصاره‌گیر (سوکسله)(Soxtec System HT 1043 Extraction Unit) انجام گرفت و درصد چربی مشخص شد. اندازه‌گیری پروتئین خام با استفاده از دستگاه کجلدال (Kjeltec Auto 1030 Analyzer) طی مراحل هضم، تقطیر و تیتراسیون صورت گرفت. اندازه‌گیری الیاف خام با استفاده از دستگاه آنکوم (شرکت گل پونه صفاهان) تعیین گردید. به منظور تعیین اسیدهای آمینه نمونه ها از دستگاه HPLC (مدل S-2600 شرکت KNUER آلمان) استفاده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و هر کدام در سه تکرار انجام گرفتند. برای تجزیه واریانس و تحلیل آماری داده‌ها از نرم‌افزار SAS Ver. 9. استفاده شد و در صورت معنی دار بودن تجزیه واریانس، مقایسه میانگین ها با آزمون Tukey-HSD انجام گرفت. برای مقایسات دو تایی از آزمون t- استیودنت استفاده شد.

نتایج و بحث

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین محیط‌های رشدی برای هر دو قارچ بیمارگر حشرات از نظر تولید بلاستوسپور، اختلاف معنی‌داری وجود دارد (برای *B. bassiana*، $F_{4,10}=153.53$, $p<0.001$؛ برای *M. anisopliae*، $F_{4,10}=15.61$, $P<0.001$) مقایسه میانگین‌ها برای جدایه *B. bassiana* TV در حالت یکسان نبودن pH اولیه محیط کشت‌ها، تیمارها را در پنج سطح آماری گروه بندی نمود (Tukey, $P<0.05$) که در بین محیط‌های طبیعی (یعنی غیر از SDB به عنوان استاندارد)، محیط آب پنیر با میانگین $۱/۹\times۱۰^{۷}$ بلاستوسپور بر میلی‌لیتر و تفاله سیب با میانگین $۱/۷\times۱۰^{۶}$ بلاستوسپور بر میلی‌لیتر به ترتیب بیشترین و کمترین تولید بلاستوسپور را داشتند (جدول ۱). در جدایه‌ی *M. anisopliae* CS1، آب پنیر با میانگین تولید $۵/۸\times۱۰^{۶}$ بلاستوسپور بر میلی‌لیتر محیط کشت، بیشترین تولید بلاستوسپور را داشت. بقیه‌ی تیمارها در یک سطح بوده و تفاله سیب با میانگین عددی $۵/۳\times۱۰^{۵}$ بلاستوسپور بر میلی‌لیتر، کمترین میزان تولید را داشت (جدول ۱). در مرحله دوم با pH اولیه یکسان برای محیط‌ها نیز اختلاف معنی‌داری بین تیمارها ثبت گردید (برای *B. bassiana*، $F_{4,10}=22.02$, $P<0.001$ و برای *M. anisopliae*، $F_{4,10}=243.97$, $P<0.001$). مقایسه میانگین تیمارها در این حالت مشخص کرد که برای قارچ *B. bassiana* ضایعات ماهی با میانگین ۳×۱۰^{۷} بلاستوسپور بر میلی‌لیتر بیشترین تولید بلاستوسپور را داشت. در جدایه‌ی *M. anisopliae* CS1، بیشترین تولید بلاستوسپور مربوط به تفاله هویج با میانگین تولید ۶×۱۰^{۶} بلاستوسپور بر میلی‌لیتر محیط کشت، بود و آب پنیر بعد از تفاله هویج بیشترین تولید بلاستوسپور را داشت. بقیه‌ی تیمارها از نظر تولید بلاستوسپور در یک سطح قرار گرفتند و تفاله سیب با میانگین تولید $۴/۲\times۱۰^{۵}$ بلاستوسپور بر میلی‌لیتر محیط کشت، کمترین میزان تولید بلاستوسپور را داشت (جدول۱).

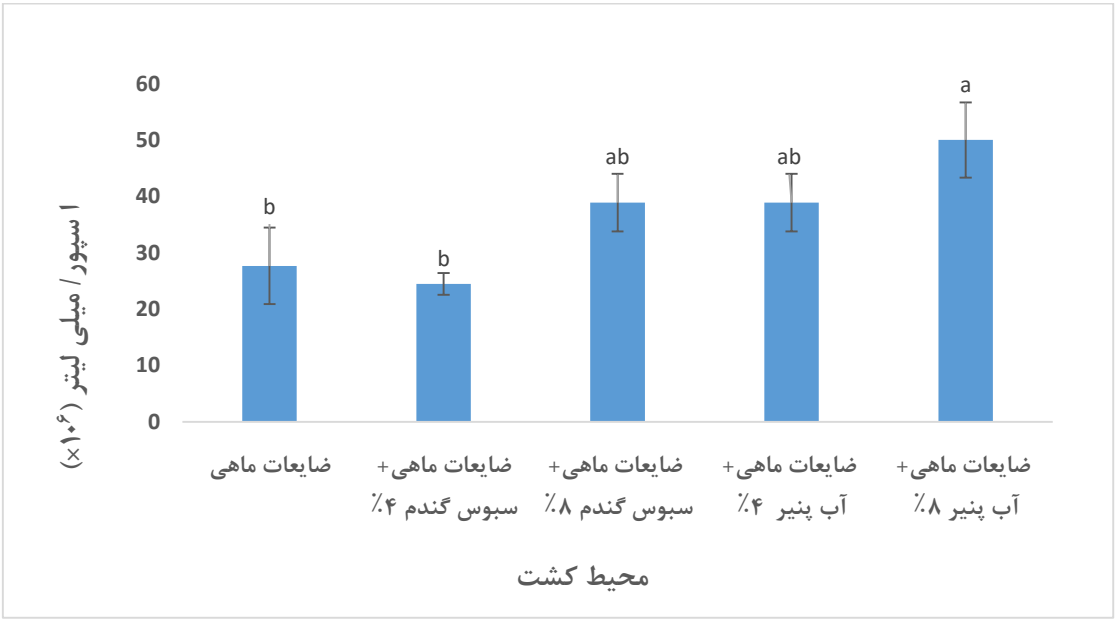
در گام سوم که تاثیر افزودن مکمل‌ها شامل عصاره‌های سبوس گندم و آب پنیر هر کدام در دو سطح چهار و هشت درصد بر میزان تولید بلاستوسپور در محیط‌های کشت بهینه مورد ارزیابی قرار گرفتند، نتایج حاصل از تجزیه واریانس اختلاف معنی‌داری را بین تیمارها برای هر دو قارچ بیمارگر حشرات نشان داد (برای *B. bassiana*، $F4,10=10.65$ $P<0.001$ و برای *M. anisopliae*، $F4,10=60.62$, $P<0.001$). مقایسه میانگین تیمارها مشخص کرد که برای هر دو قارچ، آب پنیر ۸٪ بیشترین تأثیر را در افزایش تولید بلاستوسپور دارد. برای *B. bassiana* محیط پایه ضایعات ماهی حاوی آب پنیر ۸٪ با میانگین تولید ۵×۱۰^{۷} بلاستوسپور بر میلی‌لیتر، بیشترین تولید بلاستوسپور را به خود اختصاص داد. بیشترین میزان تولید بلاستوسپور برای *M. anisopliae* در محیط غذایی تفاله هویج همراه با آب پنیر ۸٪ به میزان $۵/۵\times۱۰^{۶}$ بلاستوسپور بر میلی‌لیتر محیط بود (شکل‌های ۱و ۲).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به اثر مخلوط نمک‌ها بر عملکرد محیط‌های کشت بهینه، اختلاف

جدول ۱. میانگین (± خطای معیار) تولید بلاستوسپور(بلاستوسپور بر میلی‌لیتر محیط)در محیط کشت‌های مختلف با pH اولیه (۵/۶) و pH اولیه غیر یکسان در قارچ‌های *B. bassiana* TV و *M. anisopliae* CS1.

محیط کشت	± میانگین بلاستوسپور/ میلی‌لیتر SE *B. bassiana* TV		± میانگین بلاستوسپور/ میلی‌لیتر SE *M. anisopliae* CS1	
	اولیه غیر یکسانpH	اولیه pH ۵/۶	اولیه غیر یکسانpH	اولیه pH ۵/۶
SDB(شاهد)	۲/۵×۱۰^۷ ± ۱/۱×۱۰^۶ a	۲/۱×۱۰^۷ ± ۱/۹×۱۰^۶ b	-	-
PDB(شاهد)	-	-	۱/۳×۱۰^۶ ± ۱/۹×۱۰^۴ b	۵/۲×۱۰^۵ ± ۵/۹×۱۰^۴ c
تفاله هویج	۱/۱×۱۰^۷ ± ۶/۹×۱۰^۵ c	۱/۳×۱۰^۷ ± ۲/۱×۱۰^۶ c	۱/۵×۱۰^۶ ± ۸/۷×۱۰^۴ b	۶×۱۰^۶ ± ۳/۳×۱۰^۵ a
تفاله سیب	۱/۷×۱۰^۶ ± ۱/۶×۱۰^۵ d	۱/۳۵×۱۰^۷ ± ۵/۹×۱۰^۵ c	۵/۳×۱۰^۵ ± ۱/۹×۱۰^۴ b	۴/۲×۱۰^۵ ± ۲/۲×۱۰^۴ c
آب پنیر	۱/۹×۱۰^۷ ± ۵×۱۰^۵ b	۱/۲×۱۰^۷ ± ۹/۹×۱۰^۵ c	۵/۸×۱۰^۶ ۱±/۲×۱۰^۶ a	۳/۸×۱۰^۶ ± ۱×۱۰^۵ b
ضایعات ماهی	۱/۱۸×۱۰^۷ ± ۶/۲×۱۰^۵ c	۳×۱۰^۷ ± ۱/۹×۱۰^۶ a	۶/۹ ×۱۰^۵ ± ۴×۱۰^۴ b	۵/۷×۱۰^۵ ± ۶/۹×۱۰^۴ c

* حروف کوچک متفاوت نشانگر وجوداختلاف معنی دار بین تیمارها در هر ستون می‌باشد **(Tukey-HSD, P<0.05)**.



شکل۱. میانگین تولید بلاستوسپور (بلاستوسپور بر میلی‌لیتر محیط) (±SE) در محیط کشت بهینه (ضایعات ماهی) همراه با افزودن سطوح مختلف مکمل‌های غذایی در قارچ *B. bassiana* TV

معنی‌داری را بین تیمار و شاهد برای هر دو قارچ بیمارگر حشرات نشان داد (برای *B. bassiana*، t=7.75, df=2.12, P<0.001 و برای *M. anisopliae* t=6.29, df=2.29, P<0.001). مشخص شد که برای قارچ *B. bassiana* در محیط کشت ضایعات ماهی به همراه آب پنیر ۸٪ و نمک‌ها میانگین تولید۹/۷×۱۰^۶ بلاستوسپور بر میلی‌لیتر محیط بود که افزودن نمک برای تولید قارچ *B. bassiana* باعث کاهش تولید شده است (جدول ۲). میزان بلاستوسپور برای *M. anisopliae* در محیط غذایی تفاله هویج همراه با آب پنیر ۸٪ و نمک‌ها به میزان ۲×۱۰^۶ بلاستوسپور بر میلی‌لیتر محیط بود که در مقایسه با محیط غذایی تفاله هویج همراه با آب پنیر ۸٪ (شاهد) تولید بیشتری نشان داد (جدول ۲).

نتایج تجزیه شیمیایی و تعیین اسیدهای آمینه محیط‌های کشت پایه تفاله هویج، آب پنیر و ضایعات ماهی

نتایج تجزیه شیمیایی نشان داد که محیط کشت ضایعات ماهی حاوی بیشترین و تفاله هویج دارای کمترین مقادیر ماده خشک و چربی هستند. میزان پروتئین در محیط کشت آب پنیر ۷۲٪/۴۲ بود و ضایعات ماهی بعد از آب پنیر بیشترین پروتئین را داشت (جدول ۳). بیشترین مقدار منگنز، آهن، مس، روی و کلسیم نیز در ضایعات ماهی ثبت شد. بیشترین مقادیر نیتروژن و کربن نیز برای محیط کشت آب پنیر ثبت گردید. بیشترین نسبت کربن به نیتروژن در تفاله هویج (۳۸/۶۸٪) بود و ضایعات ماهی بعد از تفاله هویج، بیشترین نسبت کربن به نیتروژن را

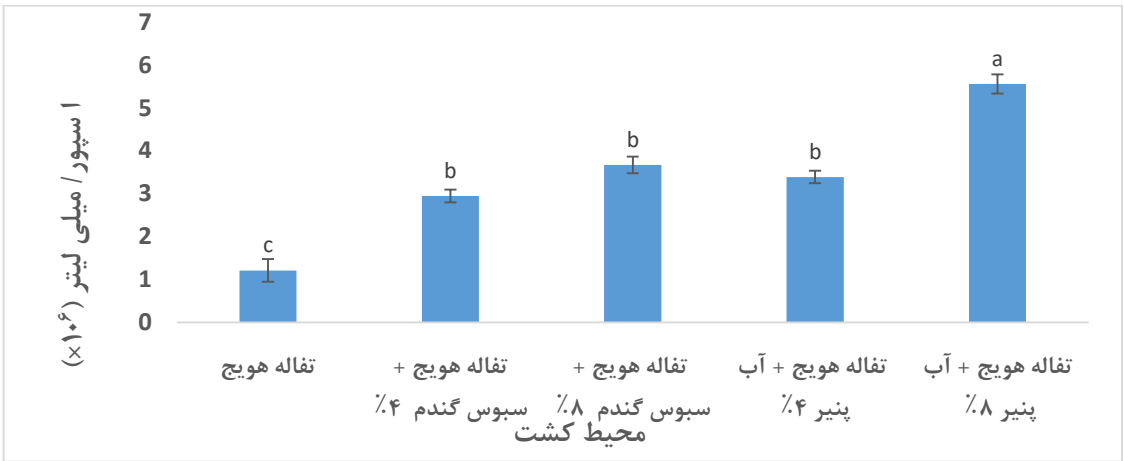
داشت (جدول ۳). مقادیر اسیدهای آمینه محیط کشت‌های بهینه نشان داد که اسیدهای آمینه گلوتامین، آسپارتیک اسید، ترئونین، متیونین، لوسین و لیزین در محیط کشت آب پنیر، بیشتر از دو محیط کشت بهینه دیگر است (جدول ۴).

نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که میزان تولید بر حسب نوع قارچ، محیط کشت و نوع و میزان مکمل و نمک متفاوت است به عبارتی با توجه به نوع محیط رشدی و نوع قارچ، میزان تولید بلاستوسپور متفاوت بود که در مطالعات قبلی هم موثر بودن محیط کشت و شرایط غذایی و فیزیکی سامانه تولید انبوه بر تعداد، نوع، ثبات و زهرآگینی قارچ نشان داده شده است (Ibrahim *et al*., 1993; Feng *et al*., 1994; Fargues *et al*., 2002; Kassa *et al*., 2008). محیط کشتی که حاوی غلظت نیتروژن پایین و غلظت کربن بالا باشد برای تولید بلاستوسپور مناسب می‌باشد (Ottati-de-Lima *et al*., 2014) عناصری چون فسفر، پتاسیم، منیزیم، گوگرد و میکروالمنت‌هایی مثل کلسیم، آهن، مس، منگنز، روی و ویتامین‌های B بخصوص بیوتین و تیامین، مواد غذایی ضروری برای قارچ‌های بیمارگر حشرات هستند (Fransisco *et al*., 2006). میکروارگانیسم‌ها قادرند مقادیر قابل توجهی از اسیدهای آمینه پورین، پیریمیدین و ویتامین ها را که مواد ضروری در رشد آن‌ها می‌باشد، دریافت کنند (Li & Holdom,1995). برای تندش و به دنبال آن رشد قارچ، حضور سه اسید آمینه ضروری است. بهترین ترکیب آلانین، فنیل آلانین و لوسین یا والین است (Smith & Grula, 1981).

نتایج تحقیق ما نشان داد که وقتی pH محیط‌های کشت طبیعی یکسان نباشد، آب پنیر بیشترین مقدار تولید بلاستوسپور برای هر دو قارچ *B. bassiana* و *M. anisopliae* را ارائه می‌نماید. با توجه به این‌که میزان اسیدهای آمینه گلوتامین، آسپارتیک اسید، ترئونین، متیونین، لوسین و لیزین در آب پنیر بیشتر از محیط کشت‌های ضایعات ماهی و تفاله هویج می باشد (جدول ۴). وجود این اسیدهای آمینه برای اسپورزایی قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* موثر می‌باشد و به احتمال زیاد، مقادیر مناسب این اسیدهای آمینه، تولید بلاستوسپور را تحت تاثیر قرار داده است که از این نظر با نتایج Smith & Grula (1981) و Rayati *et al*. (2001) مطابقت دارد.

طبق تحقیقات انجام شده، محیط کشتی که نسبت C/N بالایی دارد برای تولید بلاستوسپور مناسب می‌باشد، با توجه به این که محیط کشت تفاله هویج نسبت C/N بالایی دارد، همچنین میزان منگنز، کلسیم، مس و روی نسبتاً متوسط می‌باشد (جدول ۳)، وقتی pH محیط کشت‌ها یکسان در نظر گرفته شد، بیشترین مقدار تولید بلاستوسپور *M. anisopliae* را نشان داد، که با نتایج Ottati-de-Lima *et al*. (2014) و Rayati *et al*. (2001) مطابقت دارد. بیشترین تولید بلاستوسپور قارچ *B. bassiana* در محیط کشت ضایعات ماهی می باشد که در این محیط، در مقایسه با دو محیط کشت دیگر، بیشترین مقدار عناصر کلسیم، آهن، مس، روی و منگنز وجود دارد (جدول ۳). پژوهش Fransisco *et al*. (2006) نشان داده که وجود این عناصر برای تولید بلاستوسپور قارچ *B. bassiana* موثر می باشد.

در این تحقیق ثابت شد که افزودن مکمل‌های مختلف به محیط‌های غذایی در بیشتر موارد موجب افزایش تولید بلاستوسپور می‌شود، با این حال تعادل بین مواد غذایی از اهمیت خاصی برخوردار است. این عوامل در مجموع محیط آب



شکل۲. میانگین تولید بلاستوسپور (بلاستوسپور بر میلی‌لیتر محیط) (±SE) در محیط کشت بهینه (تفاله هویج) همراه با افزودن سطوح مختلف مکمل‌های غذایی در قارچ M. anisopliae CS1

جدول ۲. میانگین تولید بلاستوسپور (بلاستوسپور بر میلی‌لیتر محیط) (±SE) در محیط کشت بهینه (ضایعات ماهی + آب پنیر۸٪) همراه با افزودن نمک‌های مختلف در قارچ *B. bassiana* TV و در محیط کشت بهینه(تفاله هویج + آب پنیر۸٪) همراه باافزودن نمک‌های مختلف در قارچ *M. anisopliae* CS1

محیط کشت	±SE میانگین بلاستوسپور/ میلی‌لیتر *B. bassiana* TV	±SE میانگین بلاستوسپور/ میلی‌لیتر *M. anisopliae* CS1
ضایعات ماهی + آب پنیر ۸٪(شاهد)	۴/۸×۱۰^{۷} ± ۸/۴×۱۰^{۶}a	-
ضایعات ماهی +آب پنیر۸٪ + مخلوط نمک	۹/۷×۱۰^{۶} ۱±/۴×۱۰^{۶} b	-
تفاله هویج + آب پنیر ۸٪ (شاهد)	-	۸/۲×۱۰^{۵} ± ۴/۸×۱۰^{۴} b
تفاله هویج + آب پنیر۸٪ + + مخلوط نمک	-	۲×۱۰^{۶} ۱±/۸×۱۰^{۵} a

***حروف کوچک متفاوت نشانگر وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها در ستون می‌باشد (Tukey-HSD, P<0.05).**

جدول ۳- نتایج تجزیه شیمیایی محیط‌های کشت پایه شامل تفاله هویج، آب پنیر و ضایعات ماهی

محیط کشت	٪ ماده خشک	٪ خاکستر	٪ چربی	٪ پروتئین خام	٪ الیاف خام	منگنز ppm	آهن ppm	مس ppm	روی ppm	٪ کلسیم	٪ نیتروژن	٪ کربن	نسبت کربن به نیتروژن
تفاله هویج	۸۹/۹	۶/۷	۰/۹۵	۸/۵۸	۹/۸۵	۱۴/۴۸	۲۳/۸۱	۲/۷۱	۳۰/۹	۰/۳۳	۱/۳۷	۵۳	۳۸/۶۸
آب پنیر	۹۰/۹	۲/۱۵	۲/۷۵	۷۲/۴۲	.....	۵/۱۵	۳۱/۰۸	۲/۳۴	۱۲/۰۷	۰/۳	۱۱/۵۸	۵۵/۸	۴/۸۱
ضایعات ماهی	۹۱/۵	۱۶/۲۵	۱۵/۷۵	۵۲/۸۹	.....	۱۵/۱۲	۴۶۹	۳/۴۳	۹۳/۱۹	۳/۶۶	۸/۴۶	۴۷/۷	۵/۶۳

جدول ۴- مقادیر (درصد) اسیدهای آمینه محیط کشت‌های بهینه تفاله هویج، آب پنیر و ضایعات ماهی

محیط کشت	٪ گلوتامین	٪ آسپارتیک اسید	٪ ترئونین	٪ متیونین	٪ ایزولوسین	٪ فنیل آلانین	٪ لوسین	٪ لیزین
تفاله هویج	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۱۳	۰/۱۴	.....	.....	۰/۱۴	۰/۱۲
آب پنیر	۰/۳۹	۰/۵۴	۱/۶۸	۰/۹۲	۰/۲۸	۰/۴۸	۱/۲۵	۰/۳۵
ضایعات ماهی	۰/۳۶	۰/۱۹	۰/۷۸	۰/۲	.....	.....	.....	.....

پنیر را به محیط مناسبی برای رشد و اسپورزایی قارچ تبدیل کرده است (Kim *et al*., 2010). ترکیب مواد موجود در آب پنیر نشان می‌دهد که این ماده از نظر منبع هیدروکربنی بسیار غنی بوده و دارای ماکرومولکول‌ها و میکرو المنت‌های مورد نیاز قارچ می باشد که موجب افزایش ذخیره‌ی غذایی محیط‌های رشدی و تولید کنیدی‌های قارچی می‌شود (Kamyab, 2001). در تحقیق حاضر، آب پنیر به عنوان بهترین مکمل برای تولید بلاستوسپور معرفی گردید که با نتایج Kassa *et al*. (2008) و Bena- molaei *et al*. (2009) مطابقت دارد.

بر اساس نتایج Thomas *et al*. (1987) استفاده از سولفات منیزیوم و نیترات آمونیوم سبب افزایش عملکرد قارچ *B. bassiana* گردید در حالی‌که با نتایج حاصل از این تحقیق مغایرت دارد. در تحقیقی دیگر اضافه نمودن کلرید کلسیم به محیط کشت ملاس سبب افزایش عملکرد قارچ *M. anisopliae* و *B. bassiana* گردید (Balakrishnan *et al*., 2010) در حالی که در این پژوهش مصرف کلرید کلسیم به همراه سایر نمک‌ها موجب کاهش تولید بلاستوسپور قارچ *B. bassiana* و افزایش تولید بلاستوسپور قارچ *M. anisopliae* شده است. طبق نظر Bena- molaei *et al*. (2011) پایین بودن میزان تولید در برخی محیط‌ها می‌تواند به علت ضعف محیط از نظر مواد غذایی، به هم خوردن تعادل بین عناصر غذایی و نسبت کربن به نیتروژن، تغییر pH و نهایتاً نامناسب بودن محیط کشت برای رشد قارچ باشد. همچنین کاهش عملکرد طبق نتایج Shelton *et al*. (1998) ,Powel (1995) و Asgari *et al*. (2009) ممکن است به دلیل کاهش pH محیط کشت و تولید متابولیت‌های ثانویه قارچی باشد که در اثر فعالیت قارچ در محیط‌های غذایی به وجود می‌آید.

با توجه به نتایج این تحقیق ضایعات ماهی برای تولید بلاستوسپور *B. bassiana* و تفاله هویج برای تولید بلاستوسپور *M. anisopliae* مناسب می‌باشد، با این حال، علاوه بر عملکرد تولید بلاستوسپور محیط ها؛ خصوصیات کیفی (زهرآگینی) بلاستوسپورهای تولید شده از هر محیط کشت هم معیار مهمی در معرفی نهایی محیط کشت مناسب برای تولید انبوه قارچها می‌باشد.

نتیجه‌گیری

ضایعات و پساب صنایع غذایی و کشاورزی برای تولید قارچ‌های بیمارگر حشرات، محیط کشت‌های ارزان و دارای قابلیت برگشت به محیط زیست می‌باشند که در تولید تجاری سودمندند، با این هدف در این پژوهش از محیط کشت‌های طبیعی و ارزان برای تولید بلاستوسپور قارچ‌های بیمارگر حشرات استفاده شد. با توجه به نتایج به دست آمده، در حالت یکسان نبودن pH اولیه محیط کشت‌های طبیعی، بیشترین تولید بلاستوسپور برای قارچ *B. bassiana* و *M. anisopliae* در محیط عصاره آب پنیر (دارای بیشترین میزان اسیدهای آمینه گلوتامین، آسپارتیک اسید، ترئونین، متیونین، لوسین و لیزین) در مدت سه روز مشاهده گردید. در حالت دوم با pH اولیه یکسان (۵/۶، pH مطلوب قارچ) برای محیط کشت‌ها، محیط کشت عصاره ضایعات ماهی (دارای بیشترین مقدار عناصر کلسیم، آهن، مس، روی و منگنز) برای قارچ *B. bassiana* و عصاره تفاله هویج (دارای نسبت C/N زیاد و مقادیر نسبتاً متوسط منگنز، کلسیم، مس و روی) برای قارچ *M. anisopliae* به دلیل بالا بودن میزان بلاستوسپور تولیدی به عنوان محیط کشت‌های پایه برای تولید این دو قارچ معرفی شدند. نتایج آزمایش‌ها حاکی از اثر مثبت مکمل‌های غذایی و شیمیایی بر افزایش تولید بلاستوسپورهای هر دو قارچ بیمارگرحشرات در بیشتر موارد بود. از میان مکمل‌ها، آب پنیر ٪۸ به دلیل تأثیری که در افزایش تولید بلاستوسپور داشت و افزودن آن در همه محیط‌ها موجب افزایش تولید بلاستوسپور گردید به عنوان مکملی مناسب برای محیط‌های کشت، برای تولید این دو قارچ معرفی گردید. و در مرحله آخر، مخلوط نمک‌های مختلف (۰/۱ مولار) به محیط کشت ضایعات ماهی + آب پنیر ٪۸ اضافه شد و سبب کاهش تولید بلاستوسپور در قارچ *B. bassiana* شد ولی افزودن نمک‌ها به محیط کشت تفاله هویج + آب پنیر ٪۸ سبب افزایش بلاستوسپور در قارچ *M. anisopliae* در مقایسه با محیط کشت شاهد گردید. در نهایت دو محیط کشت بهینه برای تولید دو قارچ بیمارگر حشرات معرفی شد.

REFERENCES

Asgari, H., Zamani, S.M. and Ashouri, A. 2009. Effect of Some Liquid and Solid Media on Sporulation of *Beauveria bassiana*. *Iranian Journal of Plant Protection Science* 39 (1): 31-43 (In Farsi).

AOAC (1990). Official methods of analysis, 15th Edition. *Association of Official Analytical Chemists*, Washington DC, USA. pp: 554,575,654.

Balakrishnan, S., Srikanth, J., Santhalakshmi, G., Hari, K. & Sankaranarayanan, C. (2011). Response of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to molasses media fortified with supplements. *Journal of Sugarcane Research*, 1(2), 57-65.

Bena-Molaei, P., Talaei-Hassanloui, R., Askary, H. & Kharazi-Pakdel, A. (2009). Study on potential of some solid natural substances in production of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Cordycipitaceae) conidia. *Journal of Entomological Society of Iran*, 30 (2), 1-15. (In Persian).

Bena-Molaei, P., Talaei-Hassanloui, R. & Askary, H. (2011). Effect of culture substrates on virulence of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Cordycipitaceae) conidia against the browntail moth, *Euproctis chrysorrhoea* (Lep.: Lymantriidae). *Journal of Biocontrol Science and Technology*, 21(5), 619- 624.

Bigham, Z. and Talaei-Hassanloui, R. 2017. Effect of Some *Liquid* and Solid Media on Sporulation of *Beauveria bassiana*. *Biological Control pf Pests and Plant Diseases* 6 (1): 103-109 (In Farsi).

Fargues, J., Smits, N., Vidal, C., Vey, A., Vega, F., Mercadier, G. & Quimby, P. (2002). Effect of liquid culture media on morphology, growth, propagule production and pathogenic activity of the hyphomycete, *Metarhizium flavoviride*. *Journal of Mycopathologia*, 154, 127-138.

Feng, M. G., Poprawski, T. J. & Khachatourians, G. G. (1994). Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Journal of Biocontrol Science and Technology*, 4, 3-34.

Fransisco, E. A., Mochi, D. A., Coreia, A. C. B. & Monteiro, A. C. (2006). Influence of culture media in viability test of conidia of entomopathogenic fungi. *Journal of Ciencia Rural*, 36, 1309-1312.

Ibrahim, Y. B., Lim, T. K., Tang, M. K. & Teng, H. M. (1993). Influence of temperature, pH and selected growth media on germination, growth and sporulation of *Aschersonia placenta* and *Hypocrella raciborskii*. *Journal of Biocontrol Science and Technology*, 3, 55-61.

Jackson, M. A. (1997). Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 19, 180-187.

Kamp, A. M. & Bidochka, M. J. (2002). Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agar. *Journal of Letters in Applied Microbiology*, 35, 74-77.

Kamyab, A. (2001). A user guide to the animal nutrition. 218 pp. Hage- Shenas publication.

Kassa, A., Brownbridge, M., Parker, B. L., Skinner, M., Gouli, V., Gouli, S., Gou, M., Lee, F. & Hata, T. (2008). Whey for mass production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Mycological Research*, 112 (5), 583-591.

Kim, J. S., Skinner, M. & Parker, B. L. (2010). Influence

of whey permeate and millet as substrates on thermotolerance of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* conidia during storage. *Journal of Biocontrol Science and Technology*, 20(8), 859-863.

Lacey, L. A., Kirk, A. A., Millar, L., Mercadier, G. & Vidal, C. (1999). Ovicidal and larvicidal activity of conidia and blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: hyphomycetes) against *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) with a description of a bioassay system allowing prolonged survival of control insects. *Journal of Biocontrol Science and Technology*, 9, 9-18.

Li, D. P. & Holdom, D. G. (1995). Effects of nutrients on colony formation, growth, and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Journal of Invertebrate Pathology*, 65, 253–260.

Ottati-de-Lima, E. L., Batista Filho, A., Almeida, J. E., Gassen, M. H., Wenzel, I. M., Almeida, A. M. & Zapellini, L. O. (2014). Liquid production of entomopathogenic fungi and ultraviolet radiation and temperature effects on produced propagules. *Journal of Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, 81(4), 342- 350.

Powel, K. A. (1995). The production of chemicals by biological control agents. *Journal of Pesticide Science*, 44,395-397.

Prasad, C. S. & Pal, R. (2014). Mass production and economics of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Verticillium lecanii* on agricultural and industrial waste. *Scholars Journal of Agriculture and Veterinary Sciences*, 1(1), 28-32.

Rayati, D. J., Nyoman, I., Aryantha, P. & Arbianto, P. (2001). The optimization of nutrient factors in spore production of *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith with submerged – surface fermentation system. The Fifth Symposium on Agri-Bioche, March-11-2001. Tokyo, Japan.

Shelton, A. M., Vandenberg, J. D., Ramos, M. & Wilsey, W. T. (1998). Efficacy and persistence *Beauveria bassiana* and other fungi for control of diamondback moth on cabbage seedlings. *Journal of Entomological Science*, 33, 142-151.

Singh, R., Verma, K. D., Singh, J., Nigam, R., Singh, M. & Kumar, A. (2017). Multiplication of entomopathogenic fungus *Beauberia bassiana* (Balsamo) on solid and liquid media. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*,
SP1: 345-351.

Smith, R. J. & Grula, E. A. (1981). Nutritional requirments for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 37,222-230.

Sujatha, K. Srilakshmi, C. & Lenin, E. A. (2016). Selection of a suitable medium for the mass production of some selected entamopathogenic fungus. *International Journal of Recent Scientific Research*, 7(7),12370-12372.

Thomas, K. C., Khachatourians, G. G. & Ingledew, W. M. (1987). Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. *Journal of Canadian Microbiology*, 33, 12- 20.