فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال چهارم، شماره ۱۵، پاییز ۱۳۹۴، صفحه ۱۰۹- ۱۲۲
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۲/۰۹ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۶/۰۴

مطالعه شرایط بهینه رشد و طراحی فرمولاسیون برای افزایش ماندگاری *Streptomyces rimosus* strain C-2012 به عنوان عامل بیوکنترل

ابراهیم کریمی: کارشناس ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، ekarimi@abrii.ac.ir
اکرم صادقی *: استادیار ژنتیک مولکولی، پژوهشکده پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، aksadeghi@abrii.ac.ir

چکیده

مقدمه: از موضوعات مهم در زیست‌فناوری میکروبی، برقراری پیوند میان سویه‌های سودمند غربال شده در آزمایشگاه با عرصه صنعت و مصرف کننده است. از این روی در توسعه عوامل سودمندی چون عوامل کنترل زیستی میکروبی، مطالعه بهینه‌سازی شرایط تغذیه‌ای و فیزیولوژیکی برای تکثیر انبوه و انتخاب حامل مناسب برای فرمولاسیون نهایی ضروری است. در پژوهش حاضر، کوشش شد تا بهترین شرایط رشد و فرمولاسیون مناسب برای سویه کنترل زیستی *استرپتومایسس رایموسوس* (C-2012) ارایه شود.

مواد و روش‌ها: برای بهینه سازی شرایط رشدی سویه C-2012، توان رشد بر روی منابع کربن، انواع محیط غذایی، اثر دما، اسیدیته اولیه و کلرید سدیم ارزیابی شد. همچنین، اثر انواع حامل و افزودنی ها در فرمولاسیون نهایی و میزان ماندگاری جمعیت میکروبی بررسی شد.

نتایج: بررسی اثر منابع کربنی نشان داد گلوکز، فروکتوز و مانیتول از منابع کربنی مناسب برای رشد بوده و بهترین اسیدیته اولیه و دما برای این سویه به ترتیب ۷ و ۲۸ درجه سانتی‌گراد است. بهترین محیط غذایی حاوی گلوکز، عصاره مخمر و عصاره جو بود. بررسی اثر کلرید سدیم نشان داد که با افزایش غلظت از صفر تا ۳۰۰ میلی‌مولار میزان جمعیت میکروبی افزایش و پس از آن جمعیت کاسته شد. بر پایه نتایج به دست آمده بهترین حامل میکروبی، ماسه بادی ارزیابی شد؛ در حالی که پلی مر هیدروژل شرایط بهینه نگهداری را نداشت. بررسی ۳۶ ماهه زنده‌مانی نشان داد جمعیت باکتری در نمونه حاوی نمک ۲۰۰ برابر (8×10^{6} cfu/g) بیش از نمونه فاقد آن در ماه پایانی بود.

بحث و نتیجه‌گیری: استفاده از منابع کربنی مانند گلوکز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و اسیدیته اولیه ۷ در رشد این سویه اهمیت داشته و می‌تواند در تهیه فرمول نهایی با جمعیت ایده‌آل مؤثر باشد. توان تولید متابولیت‌های فرار و مایع در حضور کلرید سدیم و کنترل بیمارگرهای قارچی توسط *استرپتومایسس رایموسوس* نشان می‌دهد این سویه دارای پتانسیل بالایی برای بهره‌برداری هم در مناطق نرمال و هم دارای تنش شوری است. ماندگاری بالا (۳ سال) در فرمولاسیون نهایی از دید اقتصادی برای تولیدکنندگان عوامل بیوکنترل و کشاورزان بسیار مهم است.

واژه‌های کلیدی: *استرپتومایسس*، کنترل زیستی، لیوفیلیزاسیون، فرمولاسیون، ماندگاری

---

* نویسنده مسؤول مکاتبات

Copyright © 2015, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

با وجود مطالعات متعدد در زمینه موفقیت کنترل زیستی بیمارگرهای گیاهی، تنها تعداد معدودی محصول تجاری در بازار موجود است. افزون بر این، بیشتر این محصولات برای کنترل بیماری‌های گیاهان گلخانه‌ای و تنها تعداد انگشت شماری برای استفاده در مزرعه معرفی شده‌اند (۱ و ۲). کوشش زیادی برای توسعه گونه‌های *استرپتومایسس* به عنوان عوامل کنترل کننده بیماری‌های قارچی انجام شده است (۳- ۵). یکی از علت‌های اصلی فعالیت بر روی این باکتری‌ها چند عملکردی بودن آن‌ها بر علیه بیمارگرهای گوناگون گیاهی که به کاهش سلامت گیاه در طول دوره رشد منجر می‌شوند، است. ویژگی‌های آنتاگونیستی یک سویه بومی *استرپتومایسس رایموسوس* (C-2012)[1] بر علیه *رایزوکتونیا سولانی* AG-4[2] (عامل ایجاد مرگ گیاهچه چغندرقند) در شرایط آزمایشگاه، گلخانه و مزرعه بررسی شده است. نتایج نشان داده است که تیمار بذر با این جدایه باکتری علاوه بر کنترل بیماری مرگ گیاهچه رایزوکتونیایی و کاهش پوسیدگی های قارچی، موجب افزایش جوانه‌زنی و عملکرد گیاه در گلخانه و مزرعه می‌شود (۶ و ۷).

علاوه بر کارایی، عامل کنترل زیستی باید قابلیت تبدیل به یکی از فرمولاسیون‌های[3] رایج را داشته باشد تا بتوان آن را در حجم انبوه تولید و در سطح وسیع استفاده کرد. پس از بهینه‌سازی محیط کشت، فرمولاسیون محصول نهایی تولید شده نقطه اوج دانش در فناوری تولید کودها و عوامل کنترل زیستی به حساب می‌آید. بنابراین، بقای میکروارگانیسم‌ها در محصول نهایی اهمیت ویژه‌ای دارد (۱). در فرمولاسیون، انواع متفاوتی از اجزای فعال استفاده می‌شود. در مرحله تهیه توده فرموله شده میکروبی، سه مورد حفظ توانایی توده زیستی در خلال تثبیت، خشک کردن و مرطوب‌سازی مجدد آن باید در نظر گرفته شود. نوع محیط کشت و سن آن در اثربخشی، پایداری و تحمل خشک شدگی بسیاری از عوامل کنترل زیستی مؤثر است. شرایط تخمیر[4] و مراحل پس از آن مانند لیوفیلیزاسیون[5] اهمیت زیادی در فرمولاسیون کودها و عوامل کنترل زیستی دارند (۸).

ترکیبات شیمیایی و یا زیستی فعال مختلفی (افزودنی‌ها) وجود دارند که می‌توانند فرمولاسیون را در برای اهداف مورد نظر تغییر دهند. افزودنی‌های مهمی چون قارچکش ها می تواند از طریق هم‌افزایی، کارایی فرمول نهایی را با هدف کنترل بیمارگرها بالا ببرد. اما نکته بسیار مهم در زمینه افزودنی ها در فرمولاسیون‌های میکروبی، ارزیابی سمیت چنین ترکیباتی بر روی عامل کنترل زیستی است (۱ و ۹). در فرمولاسیون‌های میکروبی از حامل‌های گوناگونی چون کائولن[6]، تالک[7]، خاک، ماسه و بذر استفاده می شود. مواد پلیمری[8] چون هیدروژل (سوپر جاذب)[9] نیز در کشاورزی استفاده‌های گوناگونی دارند. هیدروژل ها پلیمرهایی با ساختار سه بعدی مناسب هستند که می توانند به میزان زیاد آب و فرآورده‌های زیستی را در خود نگهداری کنند. همین ویژگی هیدروژل‌ها سبب بهره‌برداری آن‌ها در عرصه‌های گوناگونی چون کشاورزی، صنعت غذا و پزشکی شده است. از این مواد می توان به عنوان حامل‌های زیستی بهره گرفت (۱۰).

نتایج پژوهش حاضر بهترین شرایط غذایی و فیزیولوژیک برای رشد، حامل مناسب و افزودنی های مناسب برای نگهداری بلند مدت سویه بومی *استرپتومایسس رایموسوس* (C-2012) در انبار را معرفی می‌کند. همچنین، در این مطالعه قابلیت کنترل زیستی

سویه C-2012 پس از فرمولاسیون نهایی ارزیابی شده تا از کارایی فرمولاسیون نهایی در طول زمان اطمینان حاصل شود.

مواد و روش‌ها

سویه باکتریایی: سویه باکتریایی مورد استفاده، سویه بومی *استرپتومایسس رایموسوس* (C-2012)، از خاک مزرعه گندمی واقع در کرمان جداسازی و شناسایی شد. این سویه پس از تأیید توان بیوکنترلی (۷) برای طراحی فرمولاسیون با ماندگاری بالا در این بررسی، ارزیابی شد. لازم به یادآوری است که در آزمون‌های انجام شده در محیط‌های کشت مایع برای بررسی جمعیت سویه باکتریایی، یک میلی‌لیتر از باکتری با جمعیت اولیه 1×10^{7} cfu/ml برای تلقیح در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع استفاده شد.

بررسی توان رشد سویه C-2012 بر روی منابع کربن: در این مطالعه، قندهای فروکتوز[۱۰]، رافینوز[۱۱]، مانیتول[۱۲]، ساکارز[۱۳]، گلوکز[۱۴] و زایلوز[۱۵] با غلظت نهایی ۱ درصد به عنوان منبع کربن محیط کشت حداقل[۱۶] (آب آگار حاوی عناصر معدنی) اضافه شد (۱۱ و ۱۲). محیط کشت حداقل بدون قند به عنوان شاهد منفی و محیط کشت غنی حاوی گلوکز به عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد. پلیت های کشت شده به مدت ۷ روز در انکوباتور ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای نمایش رشد یا عدم رشد باکتری از چهار دامنه ++ (همانند یا بیشتر از شاهد مثبت)، + (بیشتر از شاهد منفی ولی کمی کمتر از شاهد مثبت)، +- (کمی بیشتر از شاهد منفی و لی به طور معنی دار کمتر از شاهد مثبت) و - (همانند شاهد منفی) استفاده شد.

بررسی اثر محیط غذایی بر رشد سویه C-2012: رشد باکتری در چهار نوع محیط غذایی مایع شامل: GYM، PDB، NB و LB بررسی شد. ارلن های تلقیح شده با باکتری به مدت چهار روز داخل انکوباتور متحرک با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد با ۱۵۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. به منظور ارزیابی تعداد باکتری از روش شمارش کلونی[۱۷] سری رقت میکروبی در سرم فیزیولوژی (کلرید سدیم ۰/۹ درصد) تهیه و جمعیت میکروبی موجود در یک میلی‌لیتر محیط کشت محاسبه شد (۱۳).

بررسی اثر دما، اسیدیته اولیه و کلرید سدیم بر رشد و جمعیت باکتری: رشد باکتری در محیط GYM مایع با اسیدیته اولیه ۵، ۶، ۷ و ۸ و در سه دمای ۲۸، ۳۷ و ۴۶ درجه سانتی‌گراد بررسی شد (۱۳). پس از تعیین دما و اسیدیته اولیه بهینه، باکتری در محیط GYM مایع حاوی غلظت های متوالی کلرید سدیم (صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌مولار) کشت شد. ارلن های تلقیح شده با باکتری به مدت ۴ روز داخل انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۵۰ در دقیقه نگهداری شدند. برای محاسبه جمعیت باکتری نیز سری رقت در سرم فیزیولوژیک[۱۸] تهیه و شمارش انجام شد.

بررسی میکروسکوپی اثر کلرید سدیم بر میسلیوم و توده زیستی باکتری: از سوسپانسیون های[۱۹] میکروبی به دست آمده از آزمون پیشین، لام میکروسکوپی تهیه و تصویربرداری میکروسکوپی برای بررسی بیشتر انجام شد (۱۴).

بررسی اثر کلرید سدیم بر تولید متابولیت های فرار[۲۰] ضد قارچی: ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون با غلظت 1×10^{7} باکتری در هر میلی لیتر سرم فیزیولوژی بر روی محیط کشت GYM آگاردار حاوی غلظت های

صفر، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم پخش شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (در تیمار شاهد آب مقطر سترون تلقیح شد). سپس، یک حلقه ۵ میلی متری از حاشیه کشت ۷ روزه سویه‌های قارچ‌های بیمارگر در وسط پلیت حاوی محیط کشت PDA تلقیح شد. دو پلیت حاوی قارچ و باکتری بر روی یکدیگر قرار داده و با استفاده از نوار پارافیلم، منفذ میانی پلیت ها مسدود شد. پلیت ها به مدت ۵ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد نگهداری و درصد بازداری از رشد میسلیومی قارچ بیمارگر محاسبه شد. قارچ‌های بیمارگر *رایزوکتونیا سولانی*[21]، *فوزاریوم سولانی*[22] و *فیتوفتورا*[23] بودند (۱۵).

بررسی اثر کلرید سدیم بر تولید متابولیت‌های مایع ضد قارچی: در این آزمون سویه C-2012 در وسط پتری دیش حاوی محیط PDA (با غلظت‌های صفر، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم) به شکل نقطه‌ای کشت شد. یک قرص ۵ میلی‌متری از کشت ۵ روزه قارچ بیمارگر در دو طرف پلیت تلقیح شد. در پلیت شاهد نیز آب مقطر سترون تلقیح شد. کشت های یاد شده به مدت ۵ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد نگهداری شدند (۱۶).

بررسی اثر کاربرد همزمان قارچکش ویتاواکس[24] بر سویه C-2012: مقدار ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ گرم در لیتر از پودر ویتاواکس به محیط کشت GYM آگاردار (پس از اتوکلاو) افزوده شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تازه کشت سویه میکروبی با استفاده از پیپت پاستور بر روی پلیت حاوی محیط دارای قارچ‌کش پخش شد. کشت‌ها در دمای ۲۸ درجه به مدت ۷۲ ساعت نگهداری و سپس، نتایج بررسی شد (۱۳).

بررسی اثر پلی مر هیدروژل (به عنوان حامل) بر باکتری: غلظت های مختلف پلی مر سوپر جاذب (صفر، ۵، ۱۰، ۲۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی گرم در لیتر) به محیط کشت GYM مایع افزوده شد. سپس، یک میلی‌لیتر سوسپانسیون سویه C-2012 با غلظت 1×10^{7} باکتری در هر میلی‌لیتر در سرم فیزیولوژی سترون به هر ارلن اضافه شد. کشت های یاد شده به مدت ۴ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد نگهداری شدند (۱۳).

بررسی جذب و بازپس دهی متابولیت‌های تولیدی باکتری به پلی‌مر هیدروژل: یک گرم پلی‌مر سوپرجاذب به مایع رویی کشت باکتری اضافه شده و به مدت یک ساعت در دمای اتاق بر روی شیکر رومیزی با شدت ۷۰ دور در دقیقه قرار گرفت. پس از این مرحله، دانه های پلی مر سوپر جاذب از مخلوط بالا جداشده و بر روی فویل آلومینیومی گسترده و خشک شدند. به منظور بررسی باز پس دهی متابولیت های جذبی، پلی مرها در ۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل شسته شدند.

پوشش‌دهی باکتری بر سطح پلی مر هیدروژل: مقادیر صفر، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم از پلی‌مر به محیط کشت GYM مایع افزوده شد. پس از تلقیح باکتری ارلن ها به مدت ۵ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. از سانتریفیوژ[25] برای رسوب توده زیستی حاصل استفاده شد. توده زیستی به همراه پلی مر به مدت ۴۸ ساعت وکیوم شد. در نهایت، پلی مرها به گرانول‌های خشک آغشته به باکتری تبدیل شدند.

بررسی اثر لیوفیلیز بر جمعیت سویه C-2012: رسوب حاصل از سانتریفیوژ باکتری کشت شده در محیط مایع GYM با استفاده از ازت مایع منجمد و سپس، به مدت ۳ و ۶ ساعت با فشار ۰/۸ اتمسفر لیوفیلیز (دستگاه لیوفیلیزاسیون Operon، کره جنوبی)

شد. یک گرم از توده آبگیری شده با ۱۰۰ گرم ماسه اسیدشوی شده مخلوط شده و به مدت یک ماه در دمای اتاق نگهداری شد. پس از این مدت جمعیت باکتری موجود در هر گرم مخلوط حاصل (فرمولاسیون اولیه) در سرم فیزیولوژیک به دست آمد. همچنین، اثر افزودن ۳۰۰ میلی مولار نمک به بستر ماسه و استفاده از دو روش مخلوط‌سازی (همزن دستی و آسیاب برقی) بر روی جمعیت باکتری موجود در فرمولاسیون اولیه پس از یک ماه بررسی شد (۱۷).

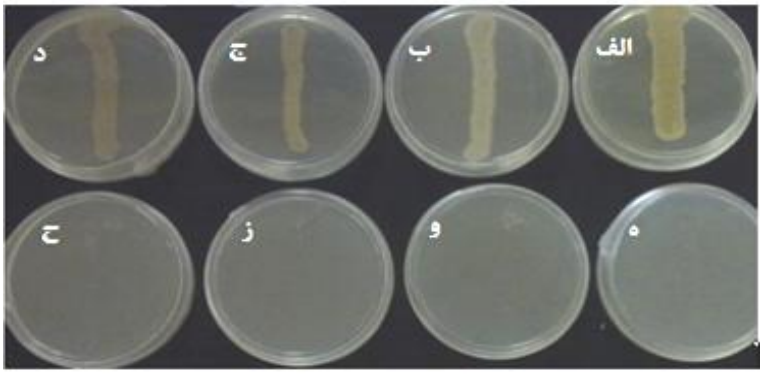
بررسی زنده مانی سویه C-2012 در طول زمان: میزان جمعیت باکتری زنده موجود در فرمولاسیون اولیه (تهیه شده بر اساس بهترین روش) در بازه زمانی ۳۶ ماه در سرم فیزیولوژیک محاسبه شد (۱۷).

تحلیل آماری: آزمون‌های بالا در قالب طرح کاملا تصادفی و در سه تکرار اجرا شد. برای تحلیل آماری داده‌های به دست آمده از نرم‌افزار SPSS استفاده شد. همچنین، میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱ درصد مقایسه شد.

نتایج

بررسی توان رشد *استرپتومایسس رایموسوس* سویه C-2012 بر روی انواع منبع کربن: نتایج نشان داد که میزان رشد سویه C-2012 بر روی محیط‌های حاوی گلوکز، فروکتوز و مانیتول در دامنه ++ بوده و در سایر قندها باکتری نتوانست رشد کند. همچنین، در پلیت‌های دارای رشد مثبت توانست همانند محیط شاهد مثبت اسپور تولید کند (شکل ۱).

بررسی اثر محیط غذایی بر رشد *استرپتومایسس رایموسوس* سویه C-2012: نتایج این مطالعه نشان داد محیط کشت GYM حاوی گلوکز (برگزیده شده از بین قندهای ارزیابی شده بر اساس تأثیر بر روی رشد و میزان دسترسی در صنعت)، عصاره مخمر و عصاره جو در مقایسه با سایر محیط‌های کشت توانست جمعیت بیشتری از باکتری (1×10^{8} cfu/ml) را تولید کند. همچنین، سویه C-2012 در این محیط توانست اسپوردهی خود را حفظ کند در صورتی که در دو محیط LB و PDA این ویژگی دیده نشد. البته در محیط Nutrient Broth نیز ویژگی اسپوردهی دیده شد اما نتوانست جمعیت بالایی نسبت به محیط GYM فراهم کند (جدول ۱).



شکل ۱- توان رشدی سویه *استرپتومایسس رایموسوس* C-2012 بر روی انواع منبع کربن. الف: محیط غنی (شاهد مثبت) ؛ ب: D-Fructose؛ ج: D-Glucose؛ د: D-Mannitol؛ ه: محیط حداقل (شاهد منفی) ؛ و: Raffinose؛ ز: Sucrose؛ح: Xylose

جدول ۱- ویژگی‌های رشد، اسپوردهی و رنگ میسلیوم‌های رویشی و هوایی سویه *استرپتومایسس رایموسوس* C-2012 بر روی محیط‌های کشت مختلف

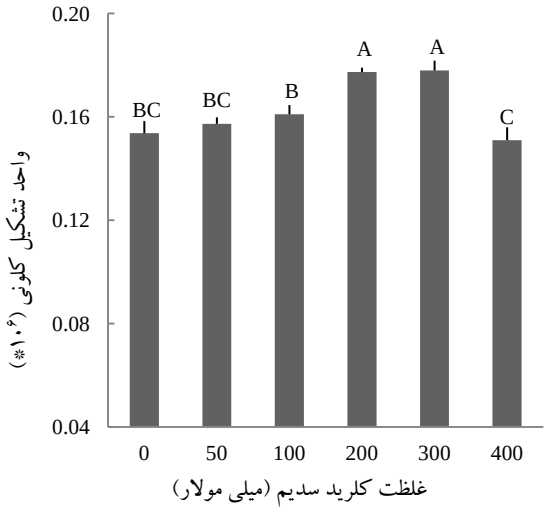
محیط کشت	میزان رشد (cfu/ml) پس از ۴ روز	اسپوردهی	رنگ میسلیوم	میسلیوم هوایی
GYM	۱×۱۰^۸	+	زرد پررنگ	سفید
LB	۶×۱۰^۵	–	زرد پررنگ	–
PDA	۱/۲×۱۰^۷	–	زرد پررنگ	–
Nutrient Broth	۳/۷×۱۰^۶	+	سفید متمایل به سبز	سفید

بررسی اثر دما، اسیدیته اولیه و کلرید سدیم بر رشد و جمعیت باکتری: نتایج پژوهش حاضر نشان داد که اسیدیته اولیه و دمای رشد بهینه برای این سویه به ترتیب ۷ و ۲۸ درجه سانتی‌گراد است. با افزایش اسیدیته از دامنه ۵ تا ۷ جمعیت میکروبی افزایش یافته و پس از آن کاهش یافت. همچنین، با افزایش دما از میزان جمعیت کاسته شد و در دمای ۴۶ درجه سانتی‌گراد هیچ رشدی دیده نشد (جدول ۲).

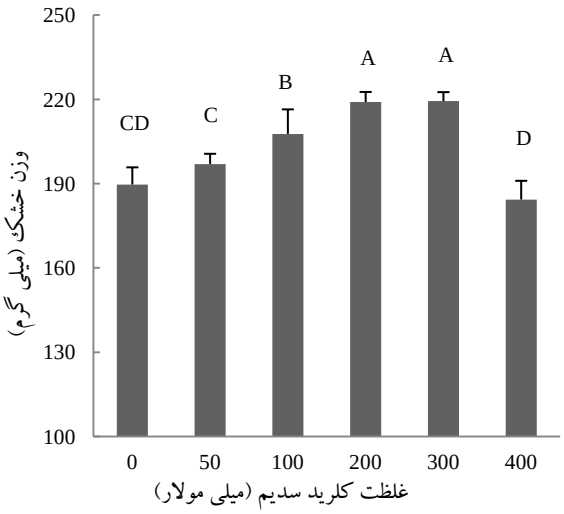
جدول ۲- اثر دما و اسیدیته اولیه محیط غذایی بر جمعیت (cfu/ml) *استرپتومایسس رایموسوس* سویه C-2012

اسیدیته	دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد	دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد
۵	۲×۱۰^۵	۱×۱۰^۵
۶	۲×۱۰^۶	۸×۱۰^۵
۷	۳/۳×۱۰^۷	۱×۱۰^۷
۸	۴/۲×۱۰^۶	۳/۷×۱۰^۶

نتایج بررسی اثر کلرید سدیم بر جمعیت میکروبی نشان داد که بهترین غلظت کلرید سدیم ۳۰۰ میلی‌مولار است به طوری که از غلظت صفر تا ۳۰۰ میلی‌مولار میزان جمعیت میکروبی افزایش یافته و پس از آن میزان جمعیت کاسته شد (شکل‌های ۲ و ۳).



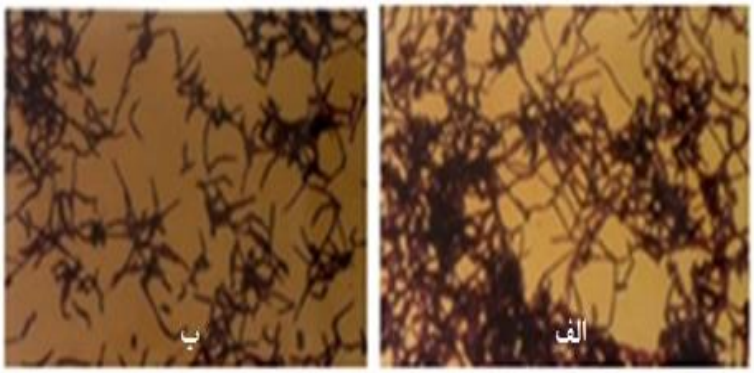
شکل ۲- اثر غلظت‌های صفر تا ۴۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم بر رشد سلول در میلی‌لیتر سویه *استرپتومایسس رایموسوس* C-2012



شکل ۳- اثر غلظت‌های صفر تا ۴۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم بر وزن خشک توده زیستی *استرپتومایسس رایموسوس* سویه C-2012

بررسی میکروسکوپی اثر کلرید سدیم بر میسلیوم و توده زیستی باکتری: نتایج رنگ آمیزی گرم توده میسلسومی باکتری در محیط حاوی غلظت های متوالی نمک نشان داد که نمک موجب کاهش طول میسلیوم‌های باکتری و کوتاه و کلفت شدن آن‌ها می‌شود (شکل ۴).

بررسی اثر کلرید سدیم بر تولید متابولیت‌های فرار ضد قارچی: نتایج این آزمون نشان داد که در تمامی موارد با افزایش میزان شوری، اثر بازدارندگی سویه C-2012 بر قارچ های بیمارگر گیاهی افزایش یافت. همچنین، مشخص شد نمک اثر بازدارندگی بر تولید متابولیت‌های فرار ندارد (جدول ۳).



شکل ۴- اثر نمک بر میسلیوم‌های *استرپتومایسس رایموسوس* سویه C-2012. الف: محیط فاقد نمک: میسیلیوم‌های بلند و منشعب؛ ب: محیط حاوی ۳۰۰ میلی‌مولار نمک: میسیلیوم‌های کوتاه و غیرمنشعب

جدول ۳- تولید و اثر بازدارندگی متابولیت‌های فرار ضد قارچی در غلظت‌های مختلف کلرید سدیم توسط سویه *استرپتومایسس رایموسوس* سویه C-2012

بیمارگر قارچی	درصد بازدارندگی رشد در غلظت‌های مختلف کلرید سدیم			
	صفر میلی‌مولار	۱۰۰ میلی‌مولار	۲۰۰ میلی‌مولار	۳۰۰ میلی‌مولار
R. solani	۳۳ c	۳۷ c	۴۷ b	۶۴ a
F. solani	۲۲ c	۲۷ c	۴۵ b	۶۱ a
Phytophthora sp .	۲۰ c	۲۶ b	۴۱ a	۴۳ a

جدول ۴- تولید و اثر بازدارندگی متابولیت‌های مایع ضد قارچی در غلظت‌های مختلف کلرید سدیم توسط سویه *استرپتومایسس رایموسوس* سویه C-2012

بیمارگر قارچی	درصد بازدارندگی رشد در غلظت‌های مختلف کلرید سدیم			
	صفر میلی‌مولار	۱۰۰ میلی‌مولار	۲۰۰ میلی‌مولار	۳۰۰ میلی‌مولار
R. solani	۴۵ b	۶۰ a	۲۳ c	۲۸ c
F. solani	۵۳ b	۷۰ a	۲۱ c	۲۱ c
Phytophthora sp .	۲۶ d	۶۷ c	۷۹ a	۷۰ b

بررسی اثر کلرید سدیم بر تولید متابولیت های مایع ضد قارچی: نتایج نشان داد که در تقابل با *Rhizoctonia* solani و *Fusarium solani* با افزایش میزان شوری، توان بیوکنترلی سویه C-2012 کاهش یافت. اما در تقابل با *Phytophthora* sp. با افزایش میزان شوری، توان بیوکنترلی آن افزایش یافت (جدول ۴).

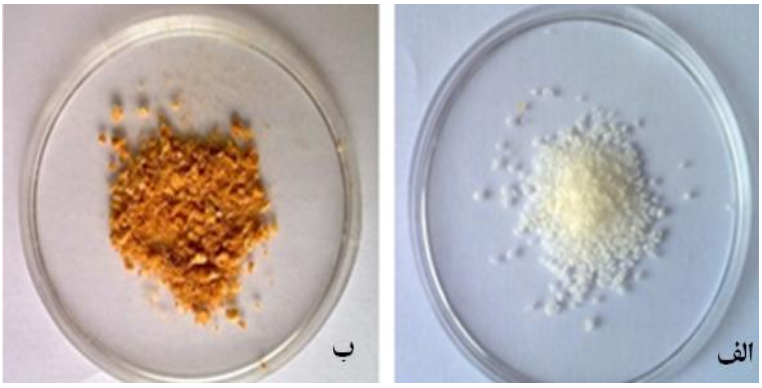
بررسی اثر کاربرد همزمان قارچکش ویتاواکس بر سویه *استرپتومایسس رایموسوس* C-2012: بررسی ها نشان داد که سویه C-2012 قادر به رشد در هیچ یک از غلظت‌های ویتاواکس نیست.

بررسی اثر پلی مر هیدروژل (به عنوان حامل) بر باکتری: نتایج نشان دادند که سویه C-2012 در همه غلظت های پلی مر سوپر جاذب رشد کرده (cfu/ml $۱/۲×۱۰^{۸}$) و تفاوت جمعیتی با غلظت صفر به عنوان شاهد از خود نشان نداد.

بررسی جذب و بازپس دهی متابولیت‌های تولیدی باکتری به پلی مر هیدروژل: نتایج نشان داد که طی انبساط و انتقباض پلی مر در این آزمون بازپس دهی آرام متابولیت های مایع میکروبی بر سطح فویل آلومینیوم به طور کامل رخ داده و دوباره بافت روشن پلی‌مر در انتهای آزمون مشاهده شد. این موضوع نشان دهنده توان مناسب بازپس بدهی متابولیت‌های جذب شده در پلی‌مر سوپر جاذب است.

پوشش‌دهی باکتری بر سطح پلی‌مر هیدروژل: شکل نهایی پلی مر سوپر جاذب پس از استقرار باکتری بر آن دچار تغییر شد و توان جذب و نگهداری آب (با ظرفیت قبل از استقرار باکتری) را از دست داد. بنابراین، در ترکیب فرمولاسیون از آن استفاده نشد و بستر ماسه برای دستیابی به فرمول نهایی انتخاب و سایر آزمایش‌ها بر روی آن انجام شد (شکل ۵).

بررسی اثر لیوفیلیز بر جمعیت سویه *استرپتومایسس رایموسوس* C-2012: نتایج نشان داد که آب‌گیری کامل در میزان ماندگاری جمعیت میکروبی اثر دارد و افزایش طول آبگیری به ماندگاری جمعیت کمک می‌کند. یک ماه پس از نگهداری فرمولاسیون اولیه، جمعیت میکروبی در نمونه هایی که ۳ و ۶ ساعت لیوفیلیز شده بود به ترتیب cfu/g $۳×۱۰^{۷}$ و cfu/g $۲×۱۰^{۹}$ بود (شکل ۶). جمعیت باکتری بلافاصله پس از تهیه فرمولاسیون (روز اول) cfu/g $۲×۱۰^{۹}$ بود.



شکل ۵- پوشش‌دهی باکتری بر روی پلی‌مر هیدروژل. الف: هیدروژل پیش از پوشش با باکتری که دارای رنگ سفید با دانه‌بندی یک دست است؛ ب: هیدروژل پس از پوشش با باکتری و تغییر رنگ و اندازه پلی‌مر بر اثر پوشش با سلول‌های باکتری

استفاده از نمونه آب‌گیری شده (لیوفیلیزه) و مخلوط کردن آن با آسیاب برقی، جمعیت میکروبی در فرمولاسیون نهایی را در مقایسه با نمونه آبگیری نشده و مخلوط شده با همزن دستی افزایش داد و موجب ماندگاری بیشتر باکتری در طول زمان شد. (جدول ۵).

جدول ۵- اثر آسیاب برقی و آبگیری توده زیستی بر ماندگاری جمعیت *استرپتومایسس رایموسوس* سویه C-2012

نوع تیمار توده زیستی	جمعیت (cfu/g)
آبگیری نشده –همزن دستی	$۱/۳\times۱۰^{۵}$
آبگیری نشده -آسیاب برقی	۶×۱۰^{۵}
آبگیری شده –همزن دستی	۲×۱۰^{۶}
آبگیری شده – آسیاب برقی	$۳/۵\times۱۰^{۶}$

بررسی زنده مانی سویه C-2012 در طول زمان: بررسی جمعیت باکتری در فرمولاسیون اولیه نشان داد که تعداد باکتری زنده موجود در نمونه با طول زمان کاهش می‌یابد. این جمعیت سنجی به مدت ۶ ماه با فاصله هر یک ماه یک بار تکرار شد (جدول ۶).

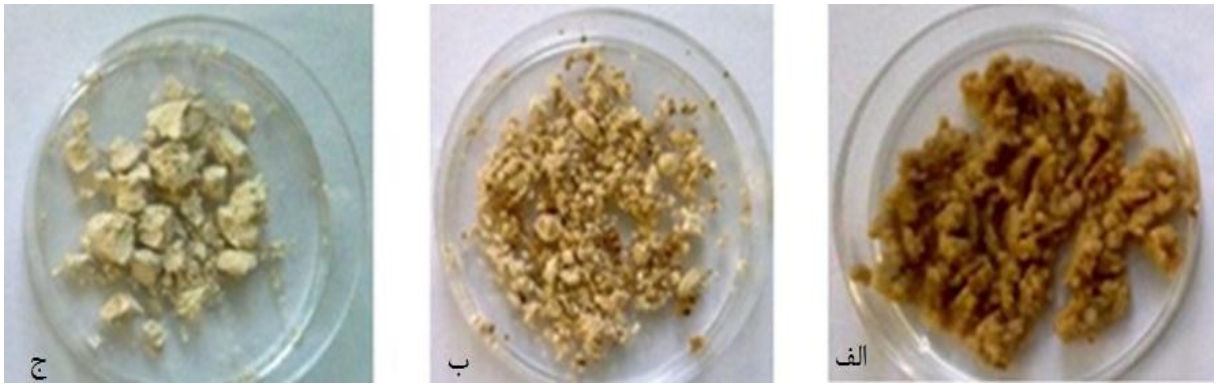
اثر کلرید سدیم بر زنده‌مانی سویه C-2012 در فرمولاسیون نهایی: نتایج نشان داد که جمعیت باکتری در فرمولاسیون نهایی حاوی ۳۰۰ میلی‌مولار نمک پس از سه سال در حدود ۸×۱۰^{۶} cfu/g و در فرمولاسیون بدون نمک در حدود ۴×۱۰^{۴} cfu/g بود. همچنین، در نمونه‌های بدون نمک آلودگی‌های قارچی و باکتریایی ناخواسته مشاهده شد (جدول ۷).

جدول ۶- زنده مانی جمعیت (cfu/g) *استرپتومایسس رایموسوس* سویه C-2012 در طول زمان

ماه نخست	ماه دوم	ماه سوم	ماه چهارم	ماه پنجم	ماه ششم
۷×۱۰^{۷}	۶×۱۰^{۷}	۴×۱۰^{۷}	$۳/۲\times ۱۰^{۷}$	$۲/۳\times ۱۰^{۷}$	$۱/۸\times ۱۰^{۷}$

جدول ۷- اثر کلرید سدیم افزوده شده به فرمولاسیون بر میزان زنده‌مانی جمعیت (cfu/g) سویه *استرپتومایسس رایموسوس* C-2012

زمان (ماه)	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۱۸	۲۴	۳۶
فاقد نمک	۳×۱۰^{۹}	$۲/۷\times۱۰^{۹}$	$۲/۱\times۱۰^{۹}$	$۱/۵\times۱۰^{۹}$	۱×۱۰^{۹}	۵×۱۰^{۷}	۳×۱۰^{۶}	$۱/۲\times۱۰^{۶}$	۴×۱۰^{۴}
حاوی نمک	۴۰×۱۰^{۹}	۳۶×۱۰^{۹}	۳۱×۱۰^{۹}	۲۴×۱۰^{۹}	۱۷×۱۰^{۹}	۱۰×۱۰^{۹}	$۰/۵\times۱۰^{۸}$	۲۲×۱۰^{۶}	۸×۱۰^{۶}



شکل ۶- نمای ظاهری توده میکروبی در اثر دستگاه لیوفیلیز

الف) توده زیستی پیش از آبگیری (لیوفیلیز) ب) ۳ ساعت پس از لیوفیلیز (عدم آبگیری کامل) ج) ۶ ساعت پس از لیوفیلیز (آبگیری کامل). نمونه‌های الف و ب بر خلاف نمونه ج، به علت وجود رطوبت در متن توده میکروبی، هنوز دارای فعالیت زیستی بوده و برای فرمولاسیون مناسب نیستند.

بحث و نتیجه‌گیری

استرپتومایسس از میکروارگانیسم‌های بسیار با ارزش در عرصه های گوناگون زندگی بشر از جمله کشاورزی و پزشکی به شمار می‌آیند. این باکتری‌ها در عرصه کشاورزی با عنوان باکتری‌های کلونیزه کننده ریزوسفر، عوامل کنترل قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی و همچنین، تحریک کننده رشد گیاهان معرفی می‌شوند (۱۸). بررسی ویژگی‌های عوامل کنترل زیستی، مطالعه زنده‌مانی و حفظ ویژگی های زیستی این گروه میکروبی از عوامل مهم در زمینه توسعه آن ها برای استفاده در مدیریت پاتوژن‌ها به شمار می‌آید. این موضوع در تولید انبوه و فرمولاسیون اهمیت ویژه‌ای دارد (۹). بیشتر بررسی‌های انجام شده بر روی کاربرد عوامل بیوکنترل به شکل سوسپانسیون سلولی بوده است و این نوع از کاربرد نمی‌تواند در شرایط مزرعه عملی باشد. فناوری‌ای که نتواند در مزرعه کاربر داشته باشد نیز نمی‌تواند سبب توسعه عملی عوامل بیوکنترل در صنعت شود (۱۹). در این مطالعه، شرایط بهینه رشد و فرمول نهایی قابل استفاده در شرایط مزرعه و همچنین دارای زنده‌مانی بالای یک سویه بومی از *استرپتومایسس رایموسوس* با نام C-2012 (۱۷) گزارش شده است.

مطالعات گوناگون نشان می‌دهند دستیابی به شرایط بهینه کشت یک سویه میکروبی نقش بالایی در موفقیت آن در عرصه صنعت و بازار دارد. برای این منظور باید متغیرهای مؤثر در این فرآیند شامل: انتخاب نوع محیط کشت مناسب با عامل‌های غذایی مناسب و طراحی و توسعه کشت با تراکم سلولی بالا با حفظ فیزیولوژی سلول ارزیابی شوند (۲۰- ۲۲). بررسی ها نشان داد که سویه C-2012 در مخلوط گلوکز، عصاره مخمر و جو به ترتیب به میزان ۴، ۴ و ۱۰ گرم در لیتر دارای بالاترین مقدار رشد بود. همچنین، مشخص شد بهترین رشد در اسیدیته ۷ انجام می‌شود. نتایج مطالعه اثر منابع کربنی نشان داد که فروکتوز، گلوکز و مانیتول از منابع کربنی مناسب برای رشد این سویه هستند. استفاده از این منابع در رشد این سویه اهمیت داشته و می‌تواند در تولید فرمول نهایی و رسیدن به جمعیت ایده‌آل مؤثر باشد. در بررسی اثر افزودنی کلرید سدیم به کشت غذایی برای بهینه‌سازی رشد میکروبی مشخص شد این سویه *استرپتومایسس* توان زیستی خود مانند تولید متابولیت‌های ثانویه گوناگون به ویژه متابولیت‌های مؤثر در کنترل زیستی را حفظ نموده و همانند شرایط نرمال توانایی کنترل بیمارگرهای گیاهی را دارد.

پایداری کودها و عوامل کنترل زیستی، در طی انبارداری و پس از استفاده یکی از مشکلاتی است که بر سر راه تولید قرار دارد. در ایران بررسی چندانی در این زمینه انجام نشده است. بیشتر بررسی‌های انجام شده مربوط به مسائل آزمایشگاهی سویه‌های بیوکنترلی بوده است تا فرمولاسیون مناسب با پایداری و ماندگاری بالا (۱ و ۷). مطالعه در زمینه افزودنی هایی که بتواند زمینه پایداری عوامل بیوکنترلی را فراهم کند کمک شایسته‌ای در توسعه آن‌ها خواهد داشت. در این رابطه، نقش فرمولاسیون کلیدی است (۹). افزودن کلرید سدیم به فرمولاسیون نهایی موجب حفظ جمعیت باکتری در محدوده 10^6 cfu/g (۲۲ میلیون سلول در هر گرم) تا سه سال پس از تولید شد. این نتایج نشان می دهد که افزودن کلرید سدیم موجب حفظ جمعیت به میزان ۲۰۰ برابر بیشتر در مقایسه با محیط بدون کلرید سدیم می‌شود. همچنین، کلرید سدیم موجود در فرمولاسیون موجب کاهش آلودگی های مربوط به اسپورها و یاخته‌های خارجی ساپروفیتی شد. از آنجا که این باکتری یک

استرپتومایسس هالوفیل (نمک دوست ملایم) (۱۷) است، افزودن کلرید سدیم به محیط کشت و فرمولاسیون نهایی نه تنها جمعیت آن را به طور معناداری افزایش داد، بلکه با اثر منفی بر زنده‌مانی سایر میکروارگانیسم‌ها خلوص محصول را افزایش داد. بررسی‌های دیگر نیز نشان می‌دهند یافتن ماده‌ای که بتواند بر روی پایداری و افزایش ویژگی‌های زیستی جمعیت میکروبی موجود در فرمولاسیون اثر مثبت داشته باشد حیاتی است (۱۹).

استرپتومایسس باکتری میسلیوم‌دار بوده و در شرایط نا مساعد اسپور تولید می‌کند. از آنجا که این باکتری ها نسبت به تنش های محیطی مقاوم‌اند، علاوه بر اسپور رشته‌های میسلیومی آن‌ها نیز می‌تواند شرایط نامساعد را تا مدت‌ها تحمل کند (۱۷). آسیاب کردن نمونه آب‌گیری شده همراه با ماسه بادی (حامل میکروبی) رشته های میسلیومی را تا حد امکان به قطعات کوچک‌تر شکسته و جمعیت باکتری را در فرمولاسیون نهایی بالا برد. این در حالی است که در روش مخلوط‌سازی با همزن دستی امکان شکسته شدن میسلیوم‌ها وجود ندارد. شرایط نگهداری فرمولاسیون در حفظ جمعیت میکروبی بسیار مهم بوده و می تواند در میزان اثرگذاری و حتی بازارپسندی آن نقش کلیدی داشته باشد. بررسی‌ها نشان می‌دهند خشک کردن همراه با انجماد سریع (لیوفیلیز کردن) یکی از بهترین انواع روش ها در نگهداری جمعیت میکروبی به شمار می‌آید. پودر حاصل از این فرآیند قابلیت نگهداری بیشتری داشته و حمل و نقل آن نیز ایمن‌تر است (۱۹ و ۲۳). در این مطالعه نیز لیوفیلیز کردن توده میکروبی توانست زنده‌مانی سویه مورد مطالعه را به میزان زیادی در حامل ماسه بادی افزایش دهد.

در پایان باید اشاره کرد در بهینه‌سازی شرایط غذایی *استرپتومایسس رایموسوس* سویه C-2012، قند گلوکز به همراه دمای رشدی ۲۸ درجه سانتی‌گراد و اسیدیته ۷ در رشد این سویه از متغیرهای مهم به شمار می‌روند. افزودن کلرید سدیم با غلظت ۳۰۰ میلی‌مولار به محیط کشت نیز در فراهم کردن تراکم بالای سلولی نقش مهمی دارد. همچنین، توان تولید متابولیت‌های فرار و مایع در حضور کلرید سدیم و کنترل بیمارگرهای قارچی توسط *استرپتومایسس رایموسوس* نشان می دهد این سویه را می‌توان هم در مناطق نرمال و هم دارای تنش شوری استفاده کرد. ماندگاری بالا (۳ سال) و غیرسوسپانسیونی بودن فرمولاسیون نهایی به دست آمده در این بررسی از دید اقتصادی برای تولید کنندگان عوامل بیوکنترل و کشاورزان بسیار مهم است و می‌تواند زمینه توسعه کنترل زیستی را فراهم کند.

References

(1) Karimi E., Rohani H., Zafari D., Khodakaramian Gh., Taghinasab M. Biological control of vascular wilt disease of carnation caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* by *Bacillus* and *Pseudomonas* strains isolated from rhizosphere of carnation. *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources* 2007; 11 (41): 309- 20.

(2) Heydari A., Pessarakli M. A review of biological control of fungal plant pathogen using microbial antagonists. *Journal of Biological Sciences* 2010; 10 (4): 273- 90.

(3) Ezziyyani M., Requena ME., Egea-Gilabert C., Candel ME. Biological control of *Phytophthora* root rot of pepper using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in combination. *Journal of Phytopathology* 2007; 155 (6): 342- 49.

(4) Gyenis L., Anderson NA., Ostry ME. Biological control of *Septoria* leaf spot of hybrid poplar in the field. *Plant Diseases* 2003; 87 (7): 809- 13.

(5) Tahtamouni MEW., Hameed KM., Saadoun IM. Biological Control of *Sclerotinia sclerotiorum* Using Indigenous Chitinolytic Actinomycetes in Jordan. *Plant Pathology Journal* 2006; 22 (2): 107- 14.

(6) Karimi E., Sadeghi A., Dahaji PA., Dalvand Y., Omidvari M., Nezhad MK. Biocontrol activity of salt tolerant *Streptomyces* isolates against phytopathogens causing root rotof sugar beet. *Biocontrol Science Technology* 2012; 22 (3): 333- 49.

(7) Sadeghi A., Hesan AR., Askari H., Aghighi S., Shahidi Bonjar GH. Biological control potential of two *Streptomyces* isolates on *Rhizoctonia solani*, the causal agent of damping-off of sugar beet. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 2006; 9 (5): 904- 10.

(8) Satinder K. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopestisides. *Process Biochemistry* 2006; 41 (2): 323- 42.

(9) Junaid JM., Dar NA., Bhat TA., Bhat AH., Bhat MA. Commercial Biocontrol Agents and Their Mechanism of Action in the Management of Plant Pathogens. *International Journal of Modern Plant and Animal Sciences* 2013; 1 (2): 39- 57.

(10) Barihi R., Panahpour E., Mirzaee Beni HM. Super Absorbent Polymer (Hydrogel) and its Application in Agriculture. *World of Sciences Journal* 2013; 1 (15): 223- 28.

(11) Ghashghaei S., Emtiazi G. Optimization of polyphosphate production by *Bacillus megaterium* strain G11. *Biological Journal of Microorganism* 2013; 2 (7): 69- 78.

(12) Shirling EB., Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1966; 16 (3): 313- 40.

(13) Sadeghi A., Karimi E., Abaszadeh Dahaji P., Ghorbani Javid M., Dalvand Y., Askari H. Plant growth promoting activity of an auxin and siderophore producing isolate of *Streptomyces* under saline soil conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2012; 28 (4): 1503- 09.

(14) Narayanasamy P. *Microbial Plant Pathogens-Detection and Disease Diagnosis: Bacterial and Phytoplasmal Pathogens* Volume 2. New York: Springer; 2011.

(15) Fiddaman PJ., Rossall S. The production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology* 1993; 74 (2): 119- 26.

(16) Hagedron C., Gould WD., Bardinelli TR. Rhizobacteria of cotton and their repression of seedling disease pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 1989; 55 (11): 2743- 797.

(17) Sadeghi A., Soltani BM., Salehi Jouzni G., Karimi E., Khayam Nekouei M., Sadeghizadeh M. Taxonomic study of a salt tolerant *Streptomyces* sp. strain C-2012 and the effect of salt and ectoine on lon expression level. *Microbiological Research* 2014; 169 (2-3): 232- 38.

(18) Hastuti RD., Lestari Y., Saraswati R., Suwanto A., Chaerani A. Capability of *Streptomyces* spp. In Controlling Bacterial Leaf Blight Disease in Rice Plants. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 2012; 7 (2): 217- 23.

(19) Nakkeeran S., Fernando WGD., Siddiqui ZA. Plant growth promoting rhizobacteria formulations and its scope in commercialization for the management of pests and diseases. In: Siddiqui ZA., editor. PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Netherlands: Springer; 2005: 257- 96.

(20) Yakhchali B., Afzal-alghoum AH., Yeganegi P., Shorgashti H., Siami A., Alavi SM. Optimization of growth condition of Barvar2 plant growth promoting Bacteria. *Iranian Journal of Biology* 2011; 24 (4): 494- 07.

(21) Riesenberg D., Guthke R. High–Cell–Density Cultivation of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1999; 51 (4): 422- 30.

(22) Choi SH., Son MJ., Kim SH., Choi SY., Lee YH., Choi JE., An G. Isolation and Medium Development of the Actinomycetes, *Streptomyces griseofuscus* CNU-A91231, Inhibiting Phytopathogenic Fungi. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology* 2009; 37 (4): 322- 32.

(23) Formulation of a *Streptomyces* Biocontrol Agent for the Suppression of Rhizoctonia Damping-off in Tomato Transplants. *Biological Control* 2002; 23 (3): 245- 53.

[1]- *Streptomyces rimosus* strain C-2012
[2]- *Rhizoctonia solani* AG-4
[3]- Formulations
[4]- Fermentation
[5]- Lyophilisation
[6]- Kaolin
[7]- Talc Powder
[8]- Polymer
[9]- Hydrogel (Superabsorbent)
[10]- Fructose
[11]- Raffinose
[12]- Mannitole
[13]- Sucrose
[14]- Glucose
[15]- Xylose
[16]- Minimum medium
[17]- Colony Forming Unit (CFU)
[18]- Physiological serum
[19]- Suspension
[20]- Volatile metabolites
[21]- *Rhizoctonia solani*
[22]- *Fusarium solani*
[23]- *Phytophthora* sp.
[24]- Vitavax
[25]- Centrifuge

Study on optimum growth condition and designing formulation for increasing shelf life of *Streptomyces rimosus* strain C-2012 as biocontrol agent

Ebrahim Karimi
M.Sc. of Plant pathology, Microbial biotechnology and Biosafety Department, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, ekarimi@abrii.ac.ir
Akram Sadeghi *
Assistant Professor of Molecular genetics, Microbial biotechnology and Biosafety Department, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, aksadeghi@abrii.ac.ir

Abstract

Introduction: An important issue in microbial biotechnology is linkage between screened beneficial strains in laboratory and industry. Therefore, to develop beneficial microbial biocontrol agents; optimization of nutritional and physiological condition for high level production and selection of carrier for final formulation are necessary. In this research we tried to find the best growth condition and suitable formulation for biocontrol *Streptomyces rimosus* strain C-2012.

Materials and methods: For optimization of growth condition of strain C-2012, utilization of carbon sources, growth in different media, effect of temperature, pH and NaCl were investigated. Then the effect of different carriers and additives in final formulation and shelf life of microbial community were studied.

Results: Study on utilization of carbon sources showed that glucose, fructose and mannitole were suitable carbon sources for growth and the best initial pH and temperature were 7 and 28°C, respectively. Results showed that the culture medium containing glucose, yeast extract and malt extract was the best medium. Investigation on NaCl effect showed that from 0 up to 300 mM sodium chloride could increase microbial community and salinity more than this range decreased microbial community. Based on the results we found that sand is suitable as microbial carrier comparing hydrogel polymers. Viability test during 36 months showed that formulation with NaCl content could keep 200 times ($8*10^6$ cfu/g) more than samples without salinity at last month.

Discussion and conclusion: Using suitable carbon sources such as glucose at 28 °C and pH at 7 are important items in optimum growth and preparing final formulation with good level of microbial community. Capability in secondary volatile and liquid metabolites production and fungal pathogen control by *Streptomyces rimosus* in the presence of NaCl showed that this strain has high potentiality to apply in both normal and saline area. Long shelf life (3 years) without any saprophytic contamination of this strain in final formulation is important in industry and it can prepare a lucrative business.

Key words: *Streptomyces*, Biocontrol, Lyophilisation, Formulation, Shelf life

* Corresponding author
Received: April 29, 2014 / **Accepted:** August 26, 2014