نشریه کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دوره۳، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۳ (۱۵-۷)

بهینه‌سازی فرمولاسیون پودر وتابل برای دو سویهٔ بومی باکتری *Bacillus thuringiensis*

۱. غلامرضا صالحی جوزانی*؛ ۲. الهام معاون؛ ۳. حسن مرسلی
۱. دانشیار بخش تحقیقات بیوتکنولوژی میکروبی و ایمنی زیستی پژوهشکدهٔ بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII)، کرج، ایران
۲ و ۳. محققان بخش تحقیقات بیوتکنولوژی میکروبی و ایمنی زیستی پژوهشکدهٔ بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII)، کرج، ایران
(تاریخ دریافت: ۹۳/۱/۲۳ - تاریخ تصویب: ۹۳/۷/۱۴)

چکیده

هدف این تحقیق، بهینه‌سازی فرمولاسیون پودر وتابل دو سویهٔ بومی KH4 و YD5 باکتری *Bacillus thuringiensis* برای افزایش کارایی و ماندگاری آن به منظور کنترل آفات پروانه‌ای و سخت‌بال‌پوش بود. دو سویهٔ مذکور در محیط کشت اقتصادی و شرایط بهینه‌شده در فرمانتور غیرپیوسته با غلظت حدود ۶×۱۰^{۹} اسپور (CFU/mg) تولید شدند. فرمولاسیون مورد استفاده حاوی ۲۵ درصد اسپور و کریستال هرکدام از سویه‌ها و ۷۵ درصد مواد افزودنی با درصدهای مختلف شامل مواد پرکننده و حجم‌دهنده، سورفاکتنت‌ها، مواد پایدارکننده، ضد UV، مواد پخش‌کننده و رطوبت‌دهنده، مواد جذب‌کننده و ترکیبات ضدمیکروبی در قالب پنج تیمار آماری مختلف استفاده شد. تیمارهای حاوی پودر شیر (۴ درصد)، پرلیت (۶ درصد)، ایروزیل (۲ درصد)، سدیم لوریل سولفات (۸ درصد)، آلکیل نفتالین (۲۰ درصد)، نشاسته (۱۰ درصد)، ژلاتین (۹ درصد)، شکر (۱۰ درصد)، سوربات پتاسیم (۱ درصد)، کازئین (۱ درصد)، گلوتن (۲ درصد)، پتاسیم دی اکساید (۳ درصد) و مونو سدیم گلوتامیت (۰/۲ درصد) با میزان ۷۳ و ۷۱ درصد سوسپانسیون‌شوندگی و مدت زمان جذب رطوبت به میزان ۲۵ و ۲۴ ثانیه برای دو سویهٔ YD5 و KH4 انتخاب شد. فرمولاسیون مذکور برای سویهٔ YD5 و KH4 به‌ترتیب دارای محتوای رطوبتی ۶ و ۷ درصد، اسیدیته ۶/۱ و ۶/۲ و دارای بیش از ۱۲ ماه ماندگاری بود. آزمایش‌های زیست‌سنجی نشان داد که LC_{50} فرمولاسیون منتخب سویه‌های YD5 و KH4 بر لاروهای سن یک کرم غوزهٔ پنبه و سوسک برگخوار نارون به‌ترتیب ۵۵۰ و ۵۱۰ نانوگرم بر سانتی‌متر مربع برگ است.

کلیدواژگان: پودر وتابل، حشره‌کش بیولوژیک، فرمولاسیون، *Bacillus thuringiensis*.

مقدمه

استفادهٔ گسترده از سموم شیمیایی دفع آفات نباتی در کشاورزی موجب خسارات جبران‌ناپذیری بر سلامت انسان، سایر موجودات زنده و محیط زیست می‌شود. استفاده از عوامل میکروبی کنترل‌کنندهٔ آفات که زیان‌های کمتری و دامنهٔ اثر محدود و اختصاصی‌تری بر حشرات هدف دارند، می‌تواند تا حدود زیادی معضلات مرتبط با سموم شیمیایی را رفع کند. از میان عوامل کنترل‌کنندهٔ میکروبی، باکتری *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) به‌علت تنوع گونه‌ای زیاد و دامنهٔ اثر اختصاصی‌تر بر آفات مختلف و همچنین، ایمنی زیستی بالا، در سطح جهانی جایگاه ویژه‌ای پیدا کرده است (Schnepf *et al.* 1998). سهم فراورده‌های بیولوژیک *Bt* نسبت به سایر فراورده‌های میکروبی کنترل بیولوژیک در دههٔ ۹۰ بیش از ۹۰ درصد بود که با گسترش سایر عوامل میکروبی این میزان در حال حاضر، حدود ۶۰ الی ۷۰ درصد رسیده است (Global Industry Analysts, Inc. (GIA), 2013; Salehi Jouzani *et al.* 2008a,b). باکتری *Bt* از خانوادهٔ *Bacillaceae* و یک باکتری گرم مثبت و اسپورزا است که در طول مرحلهٔ اسپورزایی، پروتئین‌های

تلفن: ۰۲۶۳۲۷۰۱۰۳۸
E-mail: gsalehi@abrii.ac.ir

کریستالی حاوی دلتا اندوتوکسین تولید می‌کند. پروتئین‌های کریستالی سویه‌های مختلف این باکتری به شکل اختصاصی تنها بر گروه‌های خاصی از حشرات مؤثرند و به‌طور معمول هرکدام از آن‌ها بر یک راستهٔ خاص از حشرات مؤثر است. تاکنون، حدود ۴۰۰ ژن مختلف *cry* از سویه‌های مختلف *Bt* جداسازی و شناسایی شده است (Seifinejad *et al.* 2008).

پس از دست‌یابی به بهترین سویه‌های باکتری *Bt* از لحاظ بیماری‌زایی و دامنهٔ میزبانی، تلاش برای تولید انبوه و مقرون به صرفهٔ آن‌ها انجام می‌شود (Capalbo 1995; Huang *et al.* 2007). علاوه بر نوع سویهٔ مورد استفاده و روش‌های تولید باکتری *Bt* در فرمانتور، یکی دیگر از مهم‌ترین عوامل مؤثر بر کارایی سویه‌های *Bt* در سطح مزرعه برای کنترل آفات کشاورزی و منابع طبیعی، نوع فرمولاسیون مورد استفاده است. با توجه به حساسیت بالای *Bt* به شرایط محیطی و مخصوصا نور خورشید، فرمولاسیون مناسب می‌تواند باعث افزایش ماندگاری و در نهایت، افزایش کارایی فراورده شود؛ به همین دلیل از زمان شروع تولید *Bt* به‌عنوان یک فراوردهٔ بیولوژیک برای کنترل آفات کشاورزی، بحث فرمولاسیون همواره مورد توجه جدی بوده است (Morris 1983). در ساختار فرمولاسیون‌های فراورده‌های بیولوژیک علاوه بر مادهٔ مؤثره (عامل میکروبی)، ترکیبات کمکی مختلفی شامل پخش‌کننده‌ها مثل آمیلوز (Prabakaran *et al.* 2001)، سورفکتانت‌ها و مرطوب‌کننده‌ها مثل توین (Lisansky *et al.*1993)، چسباننده‌ها مثل ژلاتین و ملاس (Parekh *et al.* 2000)، قوام‌دهنده‌ها مثل صمغ‌ها و پلیمرها (Morris *et al.*1994)، تنظیم‌کننده‌های اسیدیته مثل سدیم فسفات و پتاسیم فسفات (Prabakaran *et al.* 2001)، عوامل ضدکف مثل الکل‌ها و روغن‌ها (Ejiofor and Okafor 1991)، عوامل ضد UV مثل فولیک اسید، لیگنین و ملاس (Behle *et al.* 1996)، عوامل تحریک‌کننده تغذیهٔ آفت از بافت گیاه مثل آرد ذرت و ساکارز (McGuire *et al.*1994)، عوامل ضدمیکروبی مثل سوربیک اسید و پروپیونیک اسید (Marshall 1999)، سینرژیست‌ها مثل سوربیتول و برخی اسیدها (Tamez-Guera *et al.* 2002)، مواد حامل مثل آلژینات و آریل آمید (Yardin *et al.* 2000)، مواد جاذب حشرات مثل فرمون‌ها و آلکالوئیدها (Losel *et al.*1998) و مواد سوسپانسیون‌کننده مثل ساکارز و سوربیتول (Dubois *et al.*1993) استفاده می‌شوند. انواع مختلفی از فرمولاسیون‌های مایع و جامد وجود دارد که هرکدام از این فرمولاسیون‌ها در اکوسیستم خاصی استفاده می‌شوند. این فرمولاسیون‌ها به دو دستهٔ محصولات خشک (گردها، گرانول‌ها و بریکت‌ها) و سوسپانسیون‌ها(روغنی یا آبی و امولسیون‌ها) تقسیم‌بندی شده است (Ninfa and Rosas-García 2008; Jones and Burges 1998). در میان فرمولاسیون‌های خشک بیشترین توجه به فرمولاسیون نوع پودر وتابل یا رطوبت‌پذیر است، زیرا که زمان نگه‌داری آن بالا است و قابلیت اختلاط خوب با آب را دارد و به‌راحتی با استفاده از تجهیزات سمپاشی معمولی به‌کار می‌رود. این فرمولاسیون شامل۸۰ـ۲۰ درصد مادهٔ مؤثره، ۴۵ـ۵ درصد مادهٔ پرکننده، ۱۰ـ۱ درصد مادهٔ پخش‌کننده و ۵ـ۳ درصد سورفکتانت است (Teera-Arunasiri *et al.* 2003; Jones and Burges 1998). به‌رغم تحقیقات زیاد انجام‌شده در کشور در مورد جداسازی و شناسایی سویه‌های مختلف باکتری *Bt* و تولید سویه‌های خارجی و داخلی توسط برخی شرکت‌های خصوصی، متأسفانه، دربارهٔ بهینه‌سازی فرمولاسیون برای کاربرد این باکتری در شرایط کشور مخصوصا برای سویه‌های بومی انجام نشده است. بنابراین، در این پژوهش تلاش شده است تا فرمولاسیون پودر وتابل برای دو سویهٔ بومی *Bt* ایران شامل KH4 (جداسازی‌شده از مزارع خراسان و حاوی ژن‌های *cry* مؤثر بر سخت‌بال‌پوشان) و YD5 (جداسازی‌شده از مزارع یزد و حاوی ژن‌های *cry* مؤثر بر آفات پروانه‌ای) تهیه شود که در تحقیقات قبلی ما جداسازی شده بودند (Salehi Jouzani *et al.* 2008 a,b; Nazarian *et al.* 2009; Seifinejad *et al.* 2008).

مواد و روش‌ها

سویه‌های مورد استفاده

در این تحقیق دو سویهٔ بومی *Bt* ایران شامل KH4 (مؤثر بر سخت‌بال‌پوشان) و YD5 (مؤثر بر آفات پروانه‌ای) استفاده شدند که در تحقیقات قبلی گروه جداسازی و انتخاب شده بودند. (Nazarian *et al.*

2009; Salehi Jouzani *et al.* 2008a,b; Seifinejad *et al.* 2008). سویه‌های مورد استفاده در محیط کشت تجاری LB حاوی ۲۰ درصد گلیسرول در دمای ۸۰°C- نگه‌داری شدند.

تولید سویه‌ها در فرمانتور

ترکیب محیط کشت برای تأمین نیاز کربن، ازت و املاح معدنی براساس نتایج قبلی در ارتباط با بهینه‌سازی محیط کشت برای تولید انبوه سویه‌های KH4 و YD5 انجام شد. بر این اساس ترکیب نشاستهٔ هیدرولیزشده (۳ درصد)، شربت خیساندهٔ ذرت (۳ درصد حجمی) و نمک دریا با رقت چهار برابر برای سویهٔ YD5 و ترکیب ملاس (۲ درصد ساکارز)، شربت خیساندهٔ ذرت (۳ درصد حجمی) و نمک دریا برای سویهٔKH4 منابع ارزان‌قیمت و مؤثری برای دست‌یابی به مقادیر بالایی از اسپور ـ کریستال باکتری‌های مورد مطالعه هستند (Salehi Jouzani *et al.* 2009, 2010). برای هر فرمانتاسیون، به منظور تهیهٔ کشت فعال ۱ میلی‌لیتر از کشت نگه‌داری‌شده در سرما (۸۰°C-) به ۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع اضافه و به مدت ۱۲ـ۱۰ ساعت در دمای بهینه (۳۰ °C) قرار داده شد. سپس، ۱/۵ میلی‌لیتر از کشت فعال به ۱۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت تلقیح اضافه شد. برای کشت مایهٔ تلقیح هر فرمانتاسیون از محیط کشت یکسان با محیط کشت اصلی فرمانتاسیون استفاده شد و به‌مدت ۱۲ ساعت در گرم‌خانهٔ هم‌زن‌دار (بیو ـ شیکر، مدل BR-3000LF، ژاپن) با دمای ۲۸ °C و سرعت چرخشی ۲۰۰ دور بر دقیقه نگه‌داری شد. همهٔ فرایندهای تولید در فرمانتور ۱۰ لیتری (BIOFLO 2000, Newbruwnswick Scientific, USA) و به حجم ۱۰ لیتر به‌صورت بچ و هوازی انجام شد. اسیدیتهٔ مطلوب مورد استفاده برای هر دو سویهٔ KH4 و YD5 به‌ترتیب ۶/۵ و ۷ و میزان غلظت اکسیژن ۷۰ و ۹۰ درصد بود.

تهیهٔ فرمولاسیون پودر وتابل *Bt*

پس از تولید دو سویهٔ مورد نظر با غلظت حدود ۶×۱۰^{۹} و خشک‌سازی آن در آون در دمای ۴۰°C، فرمولاسیون‌ها با ترکیب مواد مختلف شامل مواد سوسپانسیون‌کننده، جاذب رطوبت، مواد پرکننده و حجم‌دهنده، مواد مقاوم به اشعهٔ ماورای‌بنفش، پخش‌کننده‌ها، پایدارکننده‌ها و سینرژیست‌ها و سورفاکتنت‌ها با درصدهای مختلف استفاده شدند (جدول ۱). به منظور فرموله‌کردن سویه‌های مورد مطالعه مطابق استاندارد FAO (http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/PestSpecsManual.pdf) از ۲۵ درصد تودهٔ اسپور و کریستال سویه‌ها و ۷۵ درصد مواد افزودنی در قالب پنج تیمار آماری مختلف استفاده شد.

جدول ۱. ترکیبات مورد استفاده به منظور بهینه‌سازی فرمولاسیون پودر وتابل برای دو سویهٔ KH4 و YD5

مواد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴	تیمار ۵
باکتری	۲۵	۲۵	۲۵	۲۵	۲۵
سیپرنات	۲۴	۱۰	۱۴	۰	۰
پودر شیر	۴	۴	۴	۴	۶
پودر پرلیت	۰	۴	۰	۶	۶
ایروزیل	۱	۱	۱	۲	۱
سدیم لوریل سولفات	۴	۴	۴	۸	۶
آلکیل نفتالین	۲۴	۲۴	۲۴	۲۰	۲۴
نشاسته	۰	۷	۱۲	۱۰	۵
ژلاتین	۰	۷	۵	۹	۷
شکر	۱۲	۷	۵	۱۰	۱۲
سوربات پتاسیم	۱	۱	۱	۱	۲
بنزئات سدیم	۱	۱	۱	۰	۱
کازئین و گلوتن	۱	۱	۱	۲	۱
پتاسیم دی اکساید	۳	۳	۰	۳	۴
مونو سدیم گلوتامیت	۰/۳	۰/۳	۰/۳	۰/۲	۰/۳
جمع کل (گرم)	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

مواد اصلی افزودنی فرمولاسیون شامل الکیل نفتالین (افزایش مقاومت به اشعهٔ ماورای بنفش) و نشاسته و سیپرنات (مادهٔ پرکننده و حجم‌دهنده) بودند. مواد فرعی در این فرمولاسیون شامل سدیم لوریل سولفات به‌عنوان رطوبت‌دهنده، پودر شیر و شکر به‌عنوان پایدارکننده، پتاسیم دی اکساید (ضد UV)،

سوربات پتاسیم و بنزئات سدیم به‌عنوان ترکیبات ضدمیکروبی، کازئین و گلوتن به‌عنوان افزایندهٔ میزان خوشمزگی و جاذب حشره بودند. به منظور کاهش میزان LC50 و افزایش کشندگی فرمولاسیون نیز ۲۸۷ میکرولیتر در لیتر مونو سدیم گلوتامیت افزوده شد (جدول ۱). پس از ترکیب مادهٔ مؤثره و ترکیبات اضافی، کل مواد موجود در فرمولاسیون به کمک آسیاب به‌صورت پودر خشک تبدیل شد و از آنجایی که این ذرات بسیار ریز هستند در داخل دستگاه جت میل بر اثر تراکم هوا و در دمای پایین به‌صورت ذرات ریزتر درآمدند و همگن شدند.

اندازه‌گیری اسیدیته و قابلیت سوسپانسیون‌شوندگی فرمولاسیون‌ها

میزان اسیدیتهٔ هر فرمولاسیون با استفاده از دستگاه pH متر (مدل Accumet شرکت Fisher Scientific آمریکا) براساس روش استاندارد شرکت سازنده تعیین شد. قابلیت سوسپانسیون‌شوندگی فرمولاسیون‌ها براساس روش Teera-Arunisiri *et al.* (2003) تعیین شد. ۳ گرم از هر فرمولاسیون نهایی به ۹۷ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و سی بار سر و ته شد و یک ساعت در جای ساکن قرار گرفت. از قسمت بالایی مخلوط، ۵ میلی‌لیتر به‌عنوان نمونه برداشته و در دمای ۱۰۵°C در آون هوای گرم قرار داده شد تا به وزن ثابت برسد. قابلیت تعلیق بر پایهٔ وزن هر تیمار نسبت به وزن کنترل مثبت (محصول با سوسپانسیون کامل) اندازه‌گیری شد؛ هر تیمار سه‌بار تکرار شد.

اندازه‌گیری میزان رطوبت‌پذیری فرمولاسیون

۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر داخل ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌متری ریخته و سپس، ۰/۱ گرم از پودر فرموله‌شده به سطح آب ریخته شد. سپس، زمان مورد نیاز برای ترشدن کامل پودر اندازه‌گیری شد. این آزمایش برای هر تیمار سه‌بار تکرار شد (Lisansky *et al.* 1993).

تعیین میزان ماندگاری (تعیین تعداد اسپور و میزان دلتا اندوتوکسین)

برای تعیین میزان ماندگاری هر فرمولاسیون، فرآوردهٔ نهایی هر تیمار در ظروف شیشه‌ای تیره رنگ به‌مدت یک سال در شرایط دما و رطوبت اتاق نگه‌داری شدند و سپس، در پایان سال نمونه‌برداری انجام و جمعیت اسپور و کریستال در نمونه‌های پایان سال و زمان شروع آزمایش مقایسه شد. بدین منظور از روش تعیین CFU و اندازه‌گیری میزان دلتا اندوتوکسین استفاده شد. برای اندازه‌گیری میزان CFU ابتدا از هر نمونه رقت‌های مناسب تهیه و بر محیط کشت LB آگار در دمای ۳۰°C به‌مدت ۱۶ ساعت کشت داده شدند. پس از پایان مدت انکوباسیون، تعداد کلنی تشکیل‌شده شمارش و تعداد سلول به‌صورت CFU گزارش شد.

برای مقایسهٔ میزان دلتا اندوتوکسین موجود در فرمولاسیون، ابتدا از هر فرمولاسیون ۱ میلی‌گرم نمونه‌برداری و در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت حل و سپس، به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریوفیوژ شد و رسوب تشکیل‌شده دوبار با محلول نمک ۱ مولار و دوبار با آب مقطر شست و شو داده شد. سپس، رسوب مذکور در ۱ میلی‌لیتر محلول ۵۰ میلی‌مولار هیدروکسید سدیم (pH ۱۲/۵) سوسپانسیون و به‌مدت دو ساعت در دمای ۳۰°C انکوبه شد. در نهایت، میزان پروتئین کل سوپرناتانت با معرف برادفورد و روش برادفورد اندازه‌گیری شد (Zouari *et al.* 2002).

زیست‌سنجی و تعیین LC_{50} فرمولاسیون‌ها

برای اندازه‌گیری میزان LC_{50} فرمولاسیون انتخابی سویهٔ YD5 از لاروهای سن یک کرم غوزهٔ پنبه (*Helicoverpa (Heliothis) armigera*) استفاده شد. بدین منظور غلظت‌های مختلف از ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ نانوگرم فرمولاسیون حل‌شده در آب بر سانتی‌متر مربع برگ پنبه استفاده شد. کنترل منفی در تحقیق آب مقطر بود. بعد از خشک‌کردن سطح برگ‌ها، برگ‌ها به تشتک‌های پتری با قطر ۱۵ سانتی‌متر منتقل شدند که کف آن‌ها با کاغذ صافی مرطوب پوشانده شده بود. ضمنا به‌طور روزانه کاغذهای صافی جایگزین می‌شد. ده لارو سن یک کرم غوزهٔ پنبه روی برگ‌های هر تشتک پتری قرار داده شد (هر غلظت در چهار تکرار). زیست‌سنجی‌ها در دمای ۲۵ °C و رطوبت نسبی ۷۰ـ۶۰ درصد و روشنایی و تاریکی ۱۶و ۸ ساعت انجام شدند. درصد مرگ و میر بعد از چهار روز اندازه‌گیری و با کنترل مقایسه شد. در

نهایت، میزان LC_{50} با نرم‌افزار پروبیت اندازه‌گیری شد (Seifinejad *et al.* 2008). برای اندازه‌گیری میزان LC_{50} فرمولاسیون انتخابی سویهٔ KH4 از لاروهای سن یک سوسک برگخوار نارون *Xanthogaleruca luteola* (Muller (Coleoptera: Chrysomellidae)) مطابق روش Nazarian *et al.* (2009) استفاده شد. بدین منظور غلظت‌های مختلف از ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ نانوگرم فرمولاسیون حل‌شده در آب بر سانتی‌متر مربع برگ نارون استفاده شد. کنترل منفی در تحقیق آب مقطر بود. بعد از خشک‌کردن سطح برگ‌ها، برگ‌ها به تشتک‌های پتری با قطر ۱۵ سانتی‌متر منتقل شدند که کف آن‌ها با کاغذ صافی مرطوب پوشانده شده بود. ضمنا به‌طور روزانه کاغذهای صافی جایگزین می‌شد. ده لارو سن یک سوسک برگخوار نارون روی برگ‌های هر تشتک پتری قرار داده شد (هر غلظت در چهار تکرار). زیست‌سنجی‌ها در دمای ۲۵°C و رطوبت نسبی ۷۰ـ۶۰ درصد و روشنایی و تاریکی ۱۶و ۸ ساعت انجام شدند. درصد مرگ و میر بعد از چهار روز اندازه‌گیری و با کنترل مقایسه شد. در نهایت، میزان LC_{50} به روش آماری پروبیت اندازه‌گیری شد (Dunkle and Shasha 1988).

نتایج و بحث

در میان فرمولاسیون‌های خشک بیشترین توجه به فرمولاسیون نوع پودر وتابل یا رطوبت‌پذیر است، زیرا که زمان نگه‌داری آن بالا است و قابلیت اختلاط خوب با آب را دارد و به‌راحتی با استفاده از تجهیزات سمپاشی معمولی به‌کار می‌رود. این فرمولاسیون شامل۶۰ـ۲۰ درصد مادهٔ مؤثره، ۴۵ـ۵ درصد مادهٔ پرکننده، ۱۰ـ۱ درصد مادهٔ پخش‌کننده و ۵ـ۳ درصد سورفکتانت است (Broderick *et al.* 2000; Jones and Burges1998). بنابراین، با توجه به شرایط محیطی کشور و مزایای این نوع فرمولاسیون، در این تحقیق تلاش شد تا با استفاده از ترکیبات ارزان‌قیمت و قابل دسترس برای دو سویهٔ بومی YD5 (مؤثر بر آفات پروانه‌ای) و KH4 (مؤثر بر آفات سخت‌بال‌پوش) فرمولاسیون پودر وتابل تهیه شود. با توجه به اهمیت فاکتورهایی از قبیل قابلیت خیس‌شدن و پراکندگی، قابلیت سوسپانسیون‌شدن و معلق‌بودن و پایداری هنگام ذخیره‌سازی آن (Lisansky *et al.*1993) و همچنین، میزان LC50، تلاش شد تا این فاکتورها به شکل بهینه در نظر گرفته شوند. در نتیجهٔ تولید دو سویهٔ بومی KH4 و YD5 در فرمانتور بچ براساس شرایط و محیط‌های کشت اقتصادی اشاره‌شده در قسمت مواد و روش‌ها، سویهٔ KH4 با غلظت حدود $۶/۵\times۱۰^{۹}$ اسپور (CFU/ml) و ۹۰۰ میلی‌گرم پروتئین در میلی‌لیتر و سویهٔ YD5 با غلظت حدود $۶/۱\times۱۰^{۹}$ اسپور (CFU/ml) و ۷۸۰ میلی‌گرم پروتئین در میلی‌لیتر تولید شدند. با توجه به نتایج این تحقیق و نتایج قبلی (صالحی جوزانی و همکاران، ۱۳۸۹، Salehi Jouzani *et al.* 2008 a,b; Nazarian *et al.* 2009; Seifinejad *et al.* 2008)، این دو سویه نه تنها دارای کارایی بالایی از لحاظ دامنهٔ میزبانی هستند، بلکه در محیط کشت‌های ارزان‌قیمت امتحان شده‌اند و پتانسیل بالایی در تولید اسپور ـ کریستال دارند. بنابراین، این دو سویه با منابع ارزان‌قیمت معرفی‌شده در نتایج برای تولید صنعتی یا نیمه‌صنعتی توصیه می‌شوند.

به منظور فرموله‌کردن سویه‌های مورد مطالعه از ۲۵ درصد بیوماس سویهٔ *Bt* مربوطه به همراه ۷۵ درصد مواد افزودنی در فرمولاسیون استفاده شد. از ۷۵ درصد مواد افزودنی، حدود ۱۶درصد آن به مواد پرکننده و حجم‌دهنده (مثل پودر پرلیت و نشاسته) و حدود ۵۱ درصد به مواد سورفاکتانت، مواد پایدارکننده مواد پخش‌کننده و رطوبت‌دهنده اختصاص یافت (Tamez-Guera *et al.* 2002). از سیپرنات به منظور خشک‌کردن و حفظ ظاهر و بالابردن ذرات سوسپانسیون در فرمولاسیون استفاده شد. مواد افزودنی اصلی شامل سیپرنات، الکیل نفتالین (افزایش مقاومت به اشعهٔ ماورای بنفش) و نشاسته (مادهٔ پرکننده و حجم‌دهنده) بود. مواد فرعی شامل سدیم لوریل سولفات به‌عنوان رطوبت‌دهنده، پودر شیر و شکر به‌عنوان پایدارکننده، پتاسیم دی اکساید (ضد UV)، سوربات پتاسیم و بنزئات سدیم به‌عنوان ترکیبات ضدمیکروبی، کازئین و گلوتن به‌عنوان افزایندهٔ میزان خوشمزگی برای لارو و جاذب حشره بود. به منظور کاهش میزان LC_{50} و افزایش کشندگی فرمولاسیون نیز از ۲۸۷ میکرولیتر در لیتر مونو سدیم گلوتامیت استفاده شد (Prabakaran *et al.* 2001; McMullan 2000; Montermini *et al.* (1993.

پس از تهیهٔ فرمولاسیون پودر وتابل با ترکیبات اشاره‌شده در جدول ۱، شاخص‌های کیفیت فرمولاسیون‌ها شامل قابلیت سوسپانسیون‌شوندگی، قابلیت رطوبت‌پذیری، میزان ماندگاری و میزان کشندگی (LC_{50}) آن‌ها بررسی شد.

نتایج آزمون قابلیت سوسپانسیون‌شوندگی فرمولاسیون‌های مختلف سویهٔ YD5 نشان داد که میزان سوسپانسیون‌شوندگی فرمولاسیون‌های مختلف بین ۵۶ تا ۷۳ درصد متفاوت بود و تیمار چهارم با ۷۳ درصد بالاترین میزان قابلیت سوسپانسیون‌شوندگی را نشان داد. مدت زمان جذب رطوبت نیز برای تیمارها بین ۲۵ تا ۷۵ ثانیه بود که در این میان تیمار شمارهٔ چهار سریع‌ترین قابلیت جذب رطوبت را نشان داد. میزان ماندگاری سویه‌ها تا زمان یک سال بدون تغییر باقی ماند و تفاوت معنی‌داری نسبت به زمان تولید مشاهده نشد (جدول ۲).

جدول ۲. نتایج ارزیابی‌های قابلیت سوسپانسیون‌شوندگی و رطوبت‌پذیری فرمولاسیون‌های مختلف برای سویهٔ YD5

تیمار	قابلیت سوسپانسیون‌شوندگی (درصد) در ۳۰ دقیقه	قابلیت رطوبت‌پذیری (ثانیه)	میزان دوام و ماندگاری (ماه)
۱	۶۵±۴[b]	۶۰±۵[d*]	بیش از ۱۲ ماه
۲	۶۳±۴[b]	۷۵±۵[e]	بیش از ۱۲ ماه
۳	۵۶±۳[a]	۳۸±۴[c]	بیش از ۱۲ ماه
۴	۷۳±۵[c]	۲۵±۳[a]	بیش از ۱۲ ماه
۵	۷۳±۵[c]	۳۲±۳[b]	بیش از ۱۲ ماه

* حروف کوچک متفاوت نشانگر تفاوت معنی‌دار در سطح ۹۵ درصد بین تیمارهای مختلف است.

نتایج بررسی فرمولاسیون‌های مختلف برای سویهٔ KH4 نیز نشان داد که میزان سوسپانسیون‌شوندگی فرمولاسیون‌های مختلف بین ۵۵ تا ۷۱ درصد بود که تیمار چهارم با ۷۱ درصد سوسپانسیون‌شوندگی بالاترین میزان را نشان داد.

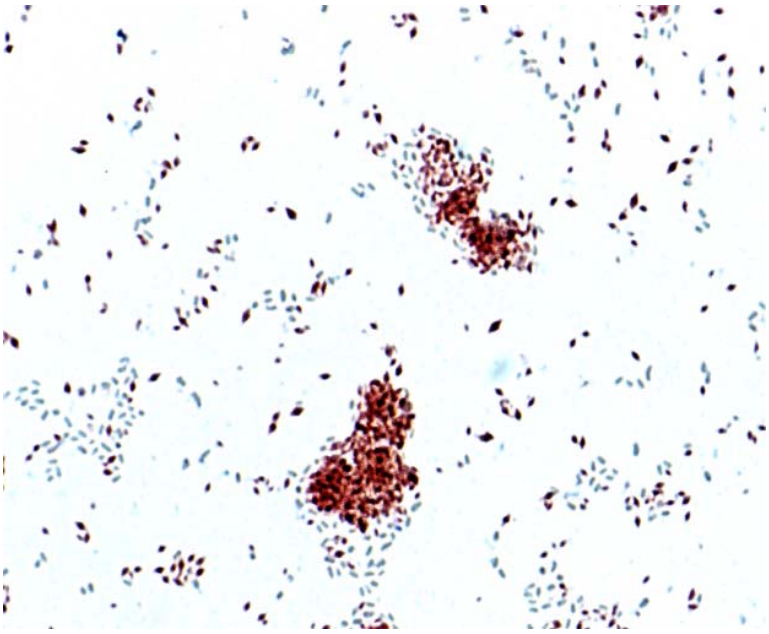
مدت زمان جذب رطوبت نیز برای تیمارها بین ۲۴ تا ۷۱ ثانیه بود و تیمار شمارهٔ چهار سریع‌ترین قابلیت جذب رطوبت را با زمان ۲۴ ثانیه نشان داد. میزان ماندگاری سویه‌ها تا زمان یک سال بدون تغییر باقی ماند و تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۳).

جدول ۳. نتایج ارزیابی‌های قابلیت سوسپانسیون‌شوندگی و رطوبت‌پذیری فرمولاسیون‌های مختلف برای سویهٔ KH4

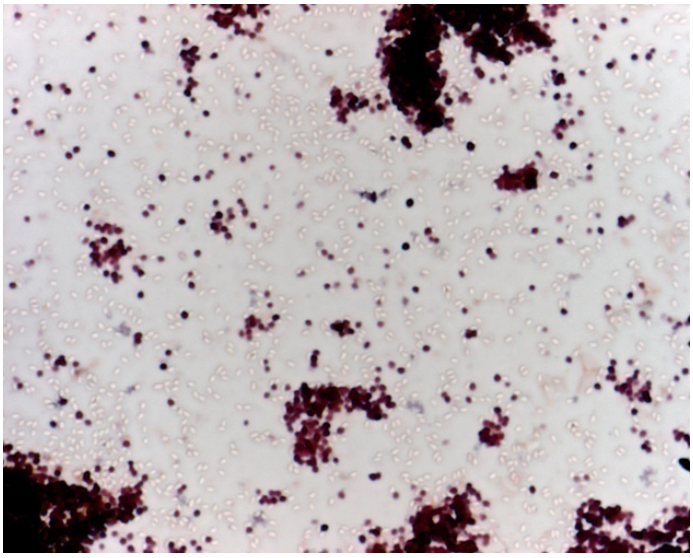
تیمار	قابلیت سوسپانسیون‌شوندگی (%) در ۳۰ دقیقه	قابلیت رطوبت‌پذیری (ثانیه)	میزان دوام و ماندگاری (ماه)
۱	۶۱±۵[b]	۶۲±۴[d]	بیش از ۱۲ ماه
۲	۵۵±۴[a]	۷۱±۵[e]	بیش از ۱۲ ماه
۳	۵۶±۴[a]	۳۸±۳[c]	بیش از ۱۲ ماه
۴	۷۱±۵[c]	۲۴±۳[a]	بیش از ۱۲ ماه
۵	۶۹±۵[c]	۳۹±۲[b]	بیش از ۱۲ ماه

نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که دو سویهٔ مذکور از نظر واکنش به تیمارهای مختلف برای تهیهٔ فرمولاسیون تقریبا خصوصیات یکسانی را نشان دادند و تیمار چهار بهترین نتایج را برای دو سویهٔ مذکور نشان داد (جدول ۲ و ۳). قابلیت سوسپاسیون‌شوندگی فرمولاسیون بهینه در این تحقیق (۷۳ـ۷۱ درصد) بسیار بالاتر از درصد سوسپاسیون‌شوندگی فرمولاسیون‌های به‌دست‌آآمده (حدود ۵۵ درصد) در تحقیقات انجام‌شده توسط تیرا و همکاران (Teera-Arunsiri *et al.* 2003) بود. اما از نظر قابلیت جذب رطوبت نتایج این تحقیق و تحقیقات محققان دیگر تقریبا مشابه بود (Teera-Arunsiri *et al.* 2003; Sulaiman *et al.* 1997). فرمولاسیون حاصل از تیمار چهار برای هر دو سویه دارای ظاهر روشن متمایل به خاکستری بود. محتوای رطوبتی فرمولاسیون برای سویهٔ YD5 و KH4 به‌ترتیب ۶ و ۷ درصد بود و همچنین، میزان اسیدیتهٔ فرمولاسیون برای دو سویهٔ YD5 و KH4 به‌ترتیب ۶/۱ و ۶/۲ بود.

مشاهدهٔ میکروسکوپی اسپور و کریستال‌های دو سویه در داخل فرمولاسیون نشان داد که کریستال‌های سویهٔ YD5 به شکل دو هرمی (لوزوی) هستند و در طول فرآیند نیز تغییراتی در آن‌ها ایجاد نشده است. شکل کریستال‌های سویهٔ KH4 نیز به‌صورت مکعبی و کروی بود که با نتایج قبلی در داخل فرمانتور مطابقت کامل داشت. این موضوع نشانگر این نکته است که ترکیبات فرمولاسیون تأثیری بر ساختار کریستال‌ها و اسپورها نداشته‌اند (شکل ۱: الف و ب). این نتایج با یافته‌های محققان قبلی دربارهٔ شکل ظاهری و سایر خصوصیات مطابقت دارد (Bok *et al.*1993, 94; Tamez-Guera *et al.* 2002; Gaudet and Puritch 1989).



الف



ب

شکل ۱. الف: مورفولوژی کریستال‌ها و اسپور سویه‌های مورد مطالعه در فرمولاسیون نهایی الف: YD5 ب: KH4

نتایج زیست‌سنجی فرمولاسیون تیمار چهار سویهٔ YD5 که علیه آفات پروانه‌ای مؤثر است، روی لاروهای سن یک کرم غوزهٔ پنبه نشان داد که میزان LC_{50} آن علیه این آفت ۵۵۰ نانوگرم بر سانتی‌متر مربع برگ است که با توجه به نتایج قبلی در پروژه‌های قبل مطابقت داشت که اسپور و کریستال این سویه به‌صورت خالص استفاده شده بود و حتی نتایج بهتری نشان داد. بدین ترتیب که در آزمایش‌های قبلی میزان LC_{50} مخلوط اسپور کریستال حدود ۱۴۱ نانوگرم بر سانتی‌متر مربع بود (Seifinejad *et al.* 2008). در حالی که، در فرمولاسیون حاضر که میزان مادهٔ مؤثره *Bt* در آن ۲۵ درصد بود این میزان به ۵۵۰ نانوگرم بر سانتی‌متر مربع برگ رسید. نتایج زیست‌سنجی فرمولاسیون تیمار چهار سویهٔ KH4 که علیه آفات سخت‌بال‌پوش مؤثر است،

روی لاروهای سن یک سوسک برگخوار نارون نشان داد که میزان LC_{50} آن علیه این آفت ۵۱۰ نانوگرم بر سانتی‌متر مربع برگ است که با نتایج پروژه‌های قبلی مطابقت داشت که اسپور و کریستال این سویه به‌صورت خالص استفاده شده بود و حتی نتایج بهتری نشان داد. بدین ترتیب که در آزمایش‌های قبلی میزان LC_{50} مخلوط اسپور کریستال سویهٔ KH4 حدود ۱۶۵ نانوگرم بر سانتی‌متر مربع بود (Nazarian *et al.* 2009). در حالی که، در فرمولاسیون حاضر که میزان مادهٔ مؤثره *Bt* در آن ۲۵ درصد بود این میزان به ۵۱۰ نانوگرم بر سانتی‌متر مربع برگ رسید. مجموعهٔ نتایج نشانگر این موضوع است که ترکیب تهیه‌شده به منظور افزایش کارایی دو سویهٔ مناسب و قابل مقایسه با نتایج سایر محققان در گذشته است. با توجه به نیاز جدی به ارزیابی فرمولاسیون دو سویهٔ مورد مطالعه در سطح مزرعه، در ادامه، در قالب پروژهٔ جدیدی فرمولاسیون‌های مذکور علیه آفات پروانه‌ای و سخت‌بال‌پوش در سطح آزمایش‌های مزرعه‌ای انجام خواهد شد.

سپاسگزاری

این تحقیق در قالب پروژهٔ تحقیقاتی پژوهشکدهٔ بیوتکنولوژی کشاورزی ایران انجام شد. نویسندگان این مقاله از همکاران بخش بیوتکنولوژی میکروبی و ایمنی زیستی پژوهشکده و همچنین، از مدیریت و همکاران شرکت گیاه به‌دلیل همکاری‌های فراوان در اجرای این تحقیق تقدیر و تشکر می‌کنند.

REFFERENCES

Behle RW, McGuire MR, Shasha BS (1996) Extending the residual activity of *Bacillus thuringiensis* with casein based formulations. Journal of Economical Entomology 89:1399–405.

Bok SH, Kim SU, Kwon YK (1994) Bioencapsulated biopesticides and process for the manufacture thereof. Canadian Patent CIPO 2,118,267.

Bok SH, Lee HW, Son KH, Kim SU, Lee JW, Kim DY (1993) Process for preparing coated microbial pesticides & pesticides produced therefrom. US Patent 5,273,749.

Broderick NA, Goodman RM, Raffa KF, Handelsman JO (2000) Synergy between zwittermicin A and *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki against gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae). Environmental Entomology 29(1): 101-107.

Burges HD (1998) Formulation of microbial biopesticides: beneficial organisms, nematodes & seed treatments. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 399 pp.

Capalbo DMF (1995) *Bacillus thuringiensis*: fermentation process and risk assessment: a short review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 90: 135-138.

Dubois NR, Reardon RC, Mierzejewksi K (1993) Field efficacy and deposit analysis of *Bacillusthuringiensis* , Foray 48B, against Gypsy moth. Journal of Economical Entomology 86(1):27–33.

Dunkle RL, Shasha BS (1988) Starch encapsulated *Bacillus thuringiensis*: a potential new method for increasing environmental stability of entomopathogens. Environmental Entomology17:120–6.

DunkleRl, ShashaBS (1989) Response of starch encapsulated *Bacillus thuringiensis* containing UV screen to sunlight.Environmental Entomology18:1035- 1041.

Ejiofor AO, Okafor N (1991) Formulation of a flowable liquid concentrate of *Bacillus thuringiensis*serotype H-14 spores and crystals as mosquito larvicide. Journal of Applied Bacteriology 71:202–208.

Gaudet MD, Puritch GS (1989) Fatty acid salt enhancement of bacterial insecticide. US Patent 4:826, 678.

Global Industry Analyst, Inc. (GIA) (2013) Global markets for Biopesticides.

Huang K, Badger M, Haney K, Evans SL (2007) Large scale production of *Bacillus thuringiensis* PS149B1 insecticidal proteins Cry34Ab1 and Cry35Ab1 from *Pseudomonas fluorescens*. Protein expression and purification 53(2): 325-330.

Lisansky SG, Quinlan RJ, Tassoni G (1993) The *Bacillus thuringiensis* production handbook. Newbury: CPL Press, p. 124.

Losel P, Penners G, Weissmuller J (1998) Insecticidal attract-and-kill formulations. US Patent 5,707,638.

McGuire MR., Shasha BS, Lewis LC, Nelsen TC (1994) Residual activity of granular starch-encapsulated Bacillus thuringiensis. Journal of Economic Entomology 87(3): 631-637.

Marshall LGI (1999) Biological control agent biocarriers and method of formation. US Patent 5,888,500.

McMullan PM (2000) Utility adjuvants. Weed Technology 14:792–7.

Montermini A, Nanni C, Boselli M (1993) Integrated defence of poplar: two years trials against *Hyphantrea cunea* (Drury) with a new microbial formulation of *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki distributed by helicopter. ANNP–BCPC Second International Symposium on Pesticide Application Techniques, Strasbourg; 22–24 September. p. 433–6.

Morris ON (1983) Protection of *Bacillus thuringiensis*from inactivation by sunlight. The Canadian Entomologist 115(09): 1215-1227.

Morris ON, Converse V, Kanagaratnam P (1994) Chemical additive effects on the efficacy of *Bacillus thuringiensis* Berliner subsp. *Kurstaki* against *Mamestraconfigurata* (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Economical Entomology 88:815–24.

Nazarian Amirani A, Jahangiri R, Salehi Jouzani Gh, Seifinejad A, Soheilivand S, Bagheri O, Keshavarzi M, Alamisaeid K (2009) Coleopteran-specific and putative novel *cry* genes in Iranian native *Bacillus thuringiensis* collection. Journal of Invertebrate Pathology, 102: 101–109.

Ninfa M and Rosas-García (2008)Biopesticide Production from *Bacillus thuringiensis*: An Environmentally Friendly Alternative Laboratorio de Biotecnología Ambiental. Centro de Biotecnología Genómica-IPN. Blvd. del Maestro s/n. Reynosa, Tamp. CP 88710 México.

Parekh S, Vinci VA, Strobel RJ (2000) Improvement of microbial strains and fermentation processes. Applied Microbiology and Biotechnology 54:287–301.

Prabakaran G, Padmanabhan V, Balaraman K (2001) Development of a self floating slow release formulation of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis and its larvicidal activity. Indian Journnal of Experimental Biology 39(1):82–84.

Salehi Jouzani Gh, Pourjan Abad A, Seifinejad A, Marzban R, Kariman K, Maleki B (2008a). "Distribution and diversity of Dipteran-specific cry and cyt genes in native *Bacillus thuringiensis* strains obtained from different ecosystems of Iran. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 35(2): 83-94.

Salehi Jouzani Gh, Seifinejad A, Saeedizadeh A, Nazarian A, Yousefloo M, Soheilivand S, Mousivand M, Jahangiri R, Yazdani M, Maali Amiri R, Akbari S (2008b) Molecular detection of nematicidal crystalliferous *Bacillus thuringiensis* strains of Iran and evaluation of their toxicity on free living and plant parasitic nematodes. Canadian Journal of Microbiology 54(10): 812–817.

Salehi Jouzani Gh, Moradali MF, Abasalizadeh S (2009) Optimization of fermentation medium for the spore and crystal production from *Bacillus thuringiensis*, Final Report of the project, Agricultural Research, Education and Extension Organization, pp 1-45 (In Persian).

Salehi Jouzani Gh, Moradali MF, Abasalizadeh S (2010) Optimization of *Bacillus thuringiensis* fermentation process, Final Report of the project, Agricultural Research, Education and Extension Organization, pp 1-45 (In Persian).

Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Dean DH (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62(3): 775.

Seifinejad A, Salehi Jouzani Gh, Hosseinzadeh A, Abdmishani C (2008) Characterization of Lepidoptera-active *cry* and *vip* genes in Iranian *Bacillus thuringiensis* strain collection. Biological Control 44(2): 216-226.

Sulaiman S, Jeffery J, Sohadi AR, Yunus H, Busparani V, Majid R (1990) Evaluation of Bactimos wettable powder, granules & briquets against mosquito larvae in Malaysia. ActaTropica47:189–95.

Tamez-Guerra P, McGuire MR, Behle RW, Shasha BS, Galan-Wong LJ (2000) Assessment of microencapsulated formulations for improved residual activity of *Bacillus thuringiensis*. Journal of Economical Entomology 93:219–25.

Tamez-Guerra P, McGuire MR, Behle RW, Shasha BS, Pingel RL (2002) Storage stability of *Anagrapha falcifera* nucleopolyhedrovirus in spray-dried formulations. Journal of invertebrate pathology 79(1): 7-16.

Teera-Arunsiri A, Suphantharika M, Ketunuti U (2003) Preparation of spray-dried wettable powder formulations of *Bacillus thuringiensis* - based biopesticides.Journal of Economical Entomology 96(2):292–9.

Yardin MR, Kennedy IR, Thies JE (2000) Development of high quality carrier materials for field delivery of key microorganisms used as biofertilisers and biopesticides. Radiation Physics and Chemistry 57: 565–8.

Zouari N, Achour O, Jaoua S (2002) Production of delta-endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and overcoming of catabolite repression by using highly concentrated gruel and fish meal media in 2- and 20-dm^3 fermenters. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 77(8): 877-882.