

بررسی اثر نانوصفحات گرافن اکسید بر عملکرد آفت کش زیستی *Bacillus thuringiensis*الهام جلالی^{۱،۲}، شهاب مقصودی^{۱*} و رسول مرزبان^۳

۱. بخش شیمی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

۲. انجمن پژوهشگران جوان، دانشگاه شهید باهنر کرمان

۳. دانشیار، موسسه تحقیقات گیاه پزشکی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۳/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۱۸)

چکیده

حشره‌کش‌های زیستی مبتنی بر باکتری *Bacillus thuringiensis* (Bt) مهم‌ترین و پرکاربردترین عوامل کنترل زیستی حشرات آفت در جهان هستند. یکی از مهم‌ترین عواملی که باعث غیرفعال شدن باکتری Bt در طبیعت می‌شود، اشعه فرابنفش است. حفظ مقاومت باکتری در برابر شرایط محیطی باعث افزایش گسترده از این باکتری به‌عنوان عامل کنترل آفات می‌شود. هدف از اجرای تحقیق حاضر، بررسی اثر حفاظتی نانوصفحات گرافن اکسید بر زنده‌مانی اسپوره‌های باکتری جدایه KD-2 در مقابل اشعه فرابنفش بود. در این راستا، زیست‌سنجی فرمولاسیون‌های نانو و غیرنانو روی لارو سن دو *Ephestia kuehniella* انجام شد. زنده‌مانی اسپورها در فرمولاسیون نانو و فرمولاسیون اسپور آزاد بعد از ۱۲۰ ساعت قرار گرفتن در معرض اشعه فرابنفش A به ترتیب $28.43 \pm 0.36\%$ و $19.29 \pm 0.69\%$ و مرگ لارو سن دو *E. kuehniella* تیمار شده با فرمولاسیون نانو و فرمولاسیون غیر نانو اشعه دیده پس از ده روز $35 \pm 2.88\%$ و $22 \pm 3.05\%$ حاصل شد. لذا نتایج تحقیق حاضر نشان داد که نانوصفحات گرافن اکسید می‌تواند به‌عنوان محافظ اشعه فرابنفش A در فرمولاسیون‌های باکتری Bt استفاده شوند.

واژه‌های کلیدی: گرافن اکسید، *Bacillus thuringiensis*، فرمولاسیون نانو، *Ephestia kuehniella*، اشعه فرابنفش.Effect of Graphene oxide nanosheets on efficiency of *Bacillus thuringiensis* biological pesticideElham Jalali^{1,2}, Shahab Maghsoudi^{1*}, Rasoul Marzban³

1. Department of Chemistry, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

2. Young Researchers Society, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

3. Biocontrol Department, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, Iran.

(Received: June 8, 2017 - Accepted: January 8, 2018)

ABSTRACT

Biological insecticide *Bacillus thuringiensis* (Bt) is known as the most important and also, the most commonly used biological control agents in the world. One of the most important factors that disable Bt in nature is ultraviolet radiation. Maintaining bacterial resistance against environmental conditions causes widespread increases of this bacterium as a pest control agent. The objective of the present study was to evaluate the protective effectiveness of graphene oxide (GO) on spore viability of Bt subsp. KD-2 against Ultra Violet-A (UV-A) radiation. In this regard, bioassay of nano and non-nano formulations were carried out against second-instar larvae of *Ephestia kuehniella*. After 120 h exposure to UV-A, spore viability of the nano-formulation and free spore formulation were $28.43 \pm 0.36\%$ and $19.29 \pm 0.69\%$, respectively. The mortality of irradiated free spore formulations and non-nano formulation on the second-instar larvae of *E. kuehniella* were $22 \pm 3.05\%$ and $35 \pm 2.88\%$ on the 10th day of the experiment. Therefore, the results of this study showed that nanosheet of GO can be used as protective UV-A for Bt formulation.

Keywords: Graphene oxide, *Bacillus thuringiensis*, Nano-formulation, *Ephestia kuehniella*, UV.

دارند و نمی‌توانند به‌عنوان یک عامل کنترل با اثر طولانی مدت در مقابل آفات باشند، به‌این دلیل نیاز به سمپاشی مجدد در محیط دارند (Pusztai et al. 1991). این مشکل را می‌توان تا حدی با به‌کارگیری محافظ‌های اشعه فرابنفش رفع کرد (Yuya et al. 2009).

یکی از مواد به‌کار گرفته شده برای افزایش مقاومت Bt در مقابل اشعه فرابنفش، نشاسته بوده است (Dunkle and Shasha, 1989). براساس مطالعات انجام شده روی اثر چندین نوع رنگ شامل آبی آلكالی، قرمز کنگو، زرد درخشان، زرد آکریدین، سبز لیسامین، بر مقاومت Bt نتیجه گرفته شده که محافظ‌های خوبی در برابر اشعه فرابنفش هستند و همچنین اثر عصاره چای مورد بررسی قرار گرفته و نتایج، اثر آن را به‌عنوان جاذب اشعه فرابنفش تایید کرده است (El-Salamouny et al. 2009). در تحقیقات انجام شده بر روی اثر ده نوع جاذب اشعه فرابنفش برای باکتری Bt نشان داده شده است که ملاس دارای بیشترین خاصیت محافظت Bt در برابر اشعه فرابنفش است (Jallouli et al. 2014).

با توجه به موارد فوق، هدف از تحقیق حاضر دستیابی به فرمولاسیون نانوی آفت‌کش Bt با استفاده از نانو صفحات گرافن اکسید با توجه به ساختار سطحی لایه‌ای و خاص و مقاومت فتولومینسانس بالا به‌منظور افزایش کارایی و مقاومت Bt و حفظ اثرپذیری ماده فعال آن در برابر اشعه فرابنفش بوده است.

مواد و روش‌ها

مواد استفاده شده شامل اتانول، آمونیاک، تریتون ایکس یکصد، سدیم هیدروکسید، سدیم نترات، پتاسیم پرمنگنات، نیتریک اسید (با خلوص ۶۳٪) و هیدروکلریک اسید (با درصد خلوص ۳۷٪ و چگالی ۱/۱۸ گرم بر میلی‌لیتر)، سولفوریک اسید (با درصد خلوص ۹۵٪ و چگالی ۱/۹۸ گرم بر میلی‌لیتر)، محیط کشت نوترینت آگار همگی از شرکت مرک کشور آلمان، پودر گرافیت از شرکت سیگما آلد ریچ کشور آمریکا و آب بدون یون به‌وسیله سیستم میلی‌پور تهیه شد. باکتری Bt جدایه KD2 از کلکسیون بخش کنترل بیولوژیک موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور و لاروهای *Ephestia kuehniella* از شهرستان جیرفت استان کرمان تهیه شدند.

تازه‌های تحقیق

اولین بار از نانوتکنولوژی برای محافظت اسپور و کریستال های Bt استفاده شد. زنده مانی و درصد تلفات لاروها با فرمولاسیون نانو بهبود داده شد. نانو صفحات گرافن اکسید به‌عنوان محافظ Bt در برابر اشعه فرابنفش عمل کرده است. نانوصفحات گرافن اکسید باعث افزایش مقاومت Bt در برابر شرایط محیطی شده است.

مقدمه

کاربرد فرآورده‌های زیستی برای کنترل آفات محصولات کشاورزی، طی سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است. باکتری *Bacillus thuringiensis* (Bt) به‌عنوان پرکاربردترین آفت‌کش زیستی، یک باکتری گرم مثبت، میله‌ای شکل و هوازی است که به‌طور معمول در طبیعت یافت می‌شود (Sansinenea et al. 2015). باکتری Bt در طی اسپوردهی کریستال‌های پروتئینی سمی تولید می‌کند که به‌عنوان یک آفت‌کش گوارشی عمل می‌کند. مهمترین توکسین با نام دلتا اندوتوکسین، ماده اصلی فرمولاسیون‌های امروزی است. فعالیت حشره‌کشی در اثر توکسین‌های Cry است. این باکتری گستره وسیعی از تاثیر علیه لاروهایی از راسته بال‌پولکداران، سخت‌بال‌پوشان، و دوبالان را در بر می‌گیرد ولی به‌دلیل وجود نژادهای متفاوت از این باکتری، به‌صورت اختصاصی عمل می‌کند (Gill et al. 1992, Bravo et al. 2007).

عامل فعال آفت‌کش‌های زیستی از جمله Bt موجودات زنده هستند، بنابراین باید تا زمان مصرف و تماس و خورده شدن توسط آفات زنده بمانند، هرچند برخی مشتقات میکروبی مانند کریستال‌های بیماری‌زا که به‌وسیله باکتری‌ها تولید می‌شوند، از نظر فرمولاسیون، رفتاری شبیه حشره‌کش‌های شیمیایی دارند. آفت‌کش‌های زیستی به-شرایط محیطی مانند نور خورشید، رطوبت، دما، pH و ترکیبات شیمیایی موجود در محیط حساس هستند (Khorramvatan et al. 2014). بنابراین نیاز به فرمولاسیون پایداری داریم که هنگام استفاده در شرایط نامساعد فعال بمانند (Navon 2000). تابش طولانی مدت اشعه فرابنفش باعث کاهش قابلیت اسپورها و کریستال‌های Bt می‌شود (Marzban et al. 2009). کریستال‌ها و اسپورهای باکتری دوام عمومی کمتری نسبت به ترکیبات شیمیایی در محیط

آب مقطر استریل شده و ۰/۰۱ گرم تریتون ایکس یکصد حل شد و به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر قرار گرفت.

تعیین پایداری فرمولاسیون نانو - Bt در برابر اشعه فرابنفش

پنج‌میلی‌لیتر از فرمولاسیون نانو و غیر نانو (به‌عنوان شاهد) از Bt در شش عدد پتری دیش ریخته شد و به مدت پنج روز در فاصله پانزده سانتی‌متری از لامپ فرابنفش تولید کننده پرتو با طول موج ۳۸۵ نانومتر قرار داده شد. سپس در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت نمونه برداری انجام شد. مقدار آب تبخیر شده در هر نمونه برداری به فرمولاسیون اضافه شد. نمونه‌ها در زمان‌های متفاوت برای بررسی مقدار اسپور زنده کشت داده شدند و مورد آزمون شمارش کلونی‌ها قرار گرفتند (Sansinenea et al. 2015). نسبت زنده‌مانی اسپورهای باکتری بعد از تابش اشعه فرابنفش در هر زمان نسبت به تعداد اسپورهای باکتری در زمان قبل از تابش محاسبه شد.

آزمون زیست‌سنجی

برای ارزیابی پایداری کریستال‌های باکتری Bt در برابر اشعه فرابنفش روی فرمولاسیون نانو و غیرنانو آزمون زیست-سنجی انجام شد. به این منظور از لارو سن دوم *Ephestia kuehniella* استفاده شد. غذای تیمار شده لاروها شامل دو گرم (مخلوط آرد و سبوس) و چهار میلی‌لیتر از فرمولاسیون‌های متفاوت Bt (نانو و غیرنانو) اشعه دیده و اشعه ندیده) بود که آن‌ها را در یک هاون مخلوط کرده و اجازه داده شد در دمای محیط خشک شود سپس آن‌ها را ساییده و در یک پتری دیش استریل تا زمان استفاده نگهداری شد (BenFarhat et al. 2013). غذای تیمار شده در سه تکرار و در هر تکرار از پانزده لارو سن دوم استفاده و به مدت ده روز مرگ‌ومیر لاروها ثبت شد.

تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش‌های درصد زنده‌مانی و درصد تلفات در سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

روش کار

روش سنتز نانو صفحات گرافن اکسید

نانو صفحات گرافن اکسید به روش اصلاح شده هامر تهیه شد (Hummers Jr and Offeman 1958). ابتدا پنج گرم پودر گرافیت به یک بالن پانصد میلی‌لیتر حاوی ۱۱۵ میلی‌لیتر سولفوریک اسید غلیظ و ۲/۵ گرم سدیم نیترات که در حمام آب یخ قرار داشت، اضافه شد و به مدت سی دقیقه با هم‌زن مکانیکی، با سرعت دویست دور در دقیقه هم زده شد. سپس پانزده گرم پتاسیم پرمنگنات به آرامی به سوسپانسیون اضافه شد. مخلوط حاصل در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت یک ساعت با هم‌زن مکانیکی با سرعت دویست دور در دقیقه هم زده شد. ظرف واکنش در حمام یخ/نمک سرد شد و به آرامی ۲۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شد. در مرحله بعد با اضافه کردن هفتصد میلی‌لیتر آب و سی میلی‌لیتر هیدروژن پراکسید، سوسپانسیون به زرد کمرنگ تغییر رنگ داد. سوسپانسیون هم زده شد و پس از آن سه بار با هیدروکلریک اسید پنج درصد شسته شد و تا رسیدن pH لایه فوقانی سوسپانسیون به هفت با آب بدون یون شستشو داده شد. پس از اضافه کردن آب، به مدت یک ساعت در دستگاه هم‌زن‌نایزر اولتراسونیک قرار گرفت. سپس در دستگاه خشک‌کن انجمادی قرار گرفت پس از خشک شدن گرافن اکسید جمع‌آوری شد.

تهیه فرمولاسیون نانو Bt

ابتدا ۰/۰۱ گرم نانو صفحات گرافن اکسید و ۰/۰۵ گرم تریتون ایکس یکصد در چهل میلی‌لیتر آب مقطر به مدت دو ساعت در حمام فراصوت پراکنده شد. سپس در اتوکلاو با حرارت ۱۲۱ درجه سلسیوس استریل شده و پس از سرد شدن تا دمای سی درجه سلسیوس، ۰/۲ گرم باکتری Bt به آن اضافه شده و به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر قرار گرفت تا اسپور و کریستال‌های باکتری به‌طور کامل مخلوط شود. غلظت نهایی گرافن اکسید ۰/۰۲۵ درصد وزنی/حجمی به دست آمد. در این مطالعه از روش کشت سطحی برای کشت باکتری‌ها استفاده شد.

تهیه فرمولاسیون غیر نانو

ابتدا ۰/۲ گرم از باکتری Bt وزن شد و در چهل میلی‌لیتر

نتایج و بحث

در شکل ۱ الگوی XRD^۱ مربوط به گرافیت و گرافن اکسید نشان داده شده است. گرافیت دارای یک پیک قوی در زاویه پراکندگی (2θ) ۲۶/۳۴ است که ساختار لایه‌ای بسیار سازمان‌یافته با فاصله بین لایه‌ای ۰/۳۳ نانومتر را نشان می‌دهد (Zhao et al. 2010)، در حالی که بعد از اکسیداسیون، این پیک به‌طور کامل حذف شده و یک پیک قوی در زاویه پراکندگی (2θ) ۱۰/۷۹ و فاصله بین لایه‌ای ۰/۸۵ نانومتر ظاهر شد که سنتز موفق نانوصفحات گرافن اکسید را نشان داد و این الگو کاملاً با مطالعات انجام شده توسط یانگ و همکارانش مطابقت دارد (Yang et al. 2011). افزایش فاصله بین لایه‌ای بین کربن‌های متوالی از ۰/۳۳ به ۰/۸۵ نانومتر، نشان از قرار گرفتن گروه‌های عاملی اکسیژن‌دار بین لایه‌های کربنی است. برای بررسی مورفولوژی نانوصفحات گرافن اکسید از میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شد. میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM^۲) نوعی میکروسکوپ الکترونی است که قابلیت عکس‌برداری از سطوح با بزرگنمایی ده تا پانصد هزار برابر با قدرت تفکیکی کمتر از یک تا بیست نانومتر (بسته به نوع نمونه) را دارد (Oatley et al. 1966). تصویر FE-SEM^۳ (شکل ۲) مورفولوژی سطح نانو صفحات گرافن اکسید را نشان می‌دهد که براساس آن، متشکل از ورقه‌های نازک جمع‌شده و با چین و چروک‌هایی روی سطح گرافن اکسید است. این نتایج، دوبعدی بودن نانو صفحات گرافن اکسید سنتز شده از گرافیت را نشان می‌دهد.

بررسی درصد زنده‌مانی اسپورها بعد از تابش‌دهی اشعه فرابنفش

در جدول ۱ و شکل ۳ درصد زنده‌مانی اسپورها در زمان‌های متفاوت تابش‌دهی (۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت) نشان داده شده است. نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که در فرمولاسیون غیر نانو میزان زنده‌مانی اسپورها از ۱۰۰ درصد بعد از ۱۲۰ ساعت تابش‌دهی به ۱۹/۳ درصد رسیده است که نشان دهنده کاهش زنده‌مانی به میزان ۸۰/۷ درصد است. در فرمولاسیون نانو، میزان زنده‌مانی اسپورها از ۱۰۰ درصد به ۲۸/۴ درصد کاهش یافته که

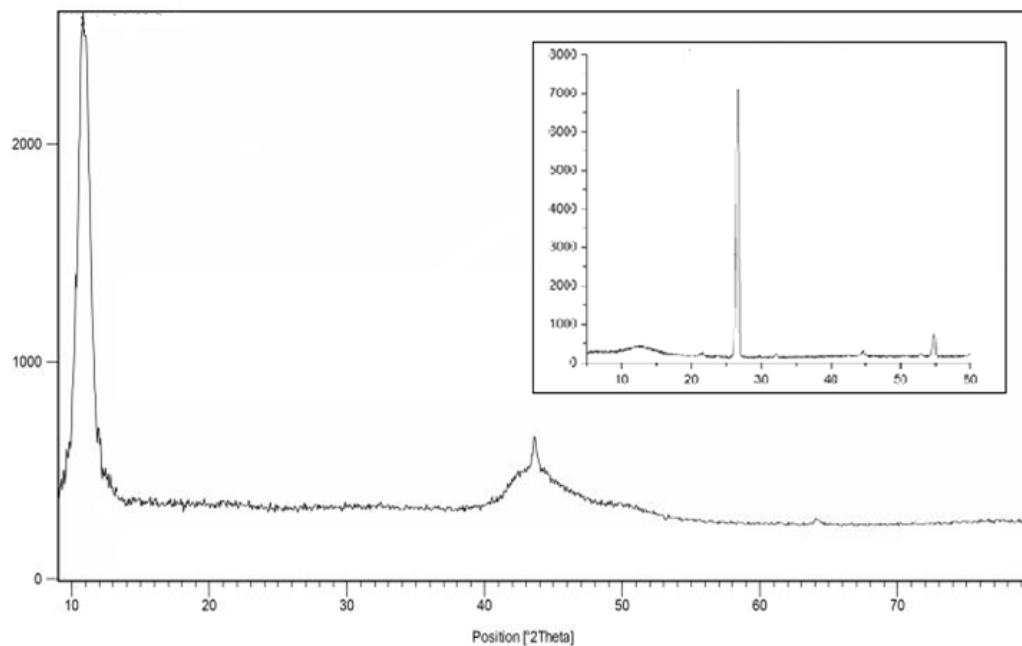
نشان دهنده کاهش زنده‌مانی به میزان ۷۱/۶ درصد است. همان‌طور که مشخص است در تمامی زمان‌های نمونه-برداری شده، میزان زنده‌مانی در فرمولاسیون نانو نسبت به فرمولاسیون غیر نانو بیشتر است. نتایج تست دانکن نشان می‌دهد که در همه ساعات اشعه‌دهی (۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰) درصد زنده‌مانی بین چهار تیمار مختلف (فرمولاسیون نانو اشعه ندیده و اشعه دیده و فرمولاسیون غیر نانو اشعه ندیده و اشعه دیده) در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌دار وجود دارد (Sig. = ۰/۰۰۰۱) (جدول ۱).

درصد زنده‌مانی اسپورها بعد از ۱۲۰ ساعت قرار گرفتن در معرض اشعه فرابنفش با طول موج ۳۸۵ نانومتر، در فرمولاسیون نانو و غیر نانو، به ترتیب به ۲۸/۴ درصد و ۱۹/۳ درصد رسید. به عبارت دیگر میزان کاهش در فرمولاسیون نانو کمتر است و همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد در این حالت بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌دار وجود دارد (Sig. = ۰/۰۰۰۱) در صورتی که فرمولاسیون نانو و غیرنانونی اشعه ندیده تفاوت معنی‌دار ندارند.

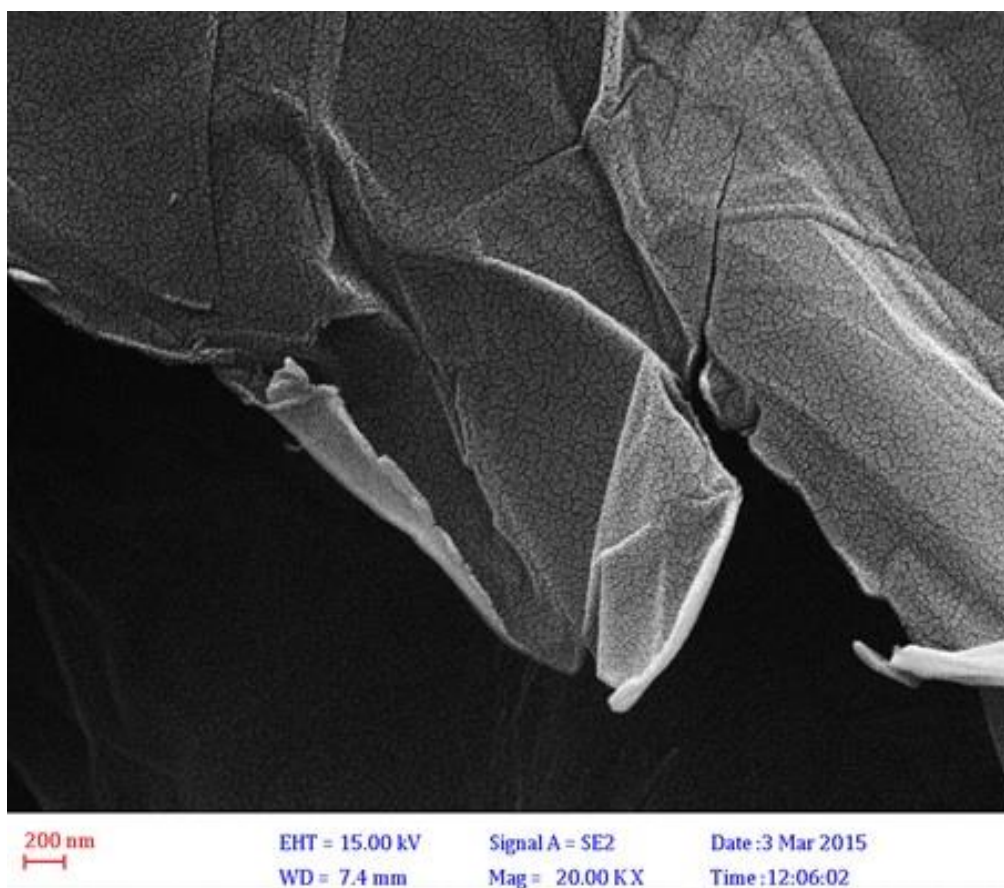
بررسی درصد تلفات لاروهای تغذیه شده با فرمولاسیون نانو و غیر نانو اشعه دیده

زیست‌سنجی فرمولاسیون نانو و غیر نانو روی لارو سن دوم *Ephestia kuehniella* نشان می‌دهد که درصد مرگ‌ومیر لاروها بعد از گذشت ده روز در فرمولاسیون ۱۲۰ ساعت اشعه دیده نانو سیزده درصد بیشتر از فرمولاسیون غیر نانو با همین میزان اشعه دهی است. درصد تلفات در زمان‌های متفاوت تابش‌دهی (۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت) در شکل ۴ نشان داده شده است. طبق نتایج به‌دست آمده مشخص می‌شود بین درصد تلفات در فرمولاسیون ۲۴ ساعت اشعه دیده بین حالت نانو و غیر نانو، اختلاف معنی‌دار وجود ندارد اما در سایر زمان‌های نمونه‌برداری شده (۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت) اختلاف معنی‌داری بین دو فرمولاسیون ارائه شده وجود دارد. نتایج تست دانکن (جدول ۱) نشان می‌دهد درصد تلفات لاروهای سن دوم شب‌پره آرد بعد از گذشت ده روز بین تیمارهای نانو و غیر نانو ۱۲۰ ساعت اشعه دیده اختلاف معنی‌داری وجود دارد (Sig. = ۰/۰۰۰۱). درصد تلفات در فرمولاسیون نانو بعد از ۱۲۰ ساعت قرارگرفتن تحت اشعه فرابنفش با طول موج ۳۸۵ نانومتر به ۳۵٪ و در فرمولاسیون غیر نانو به ۲۲٪ می‌رسد.

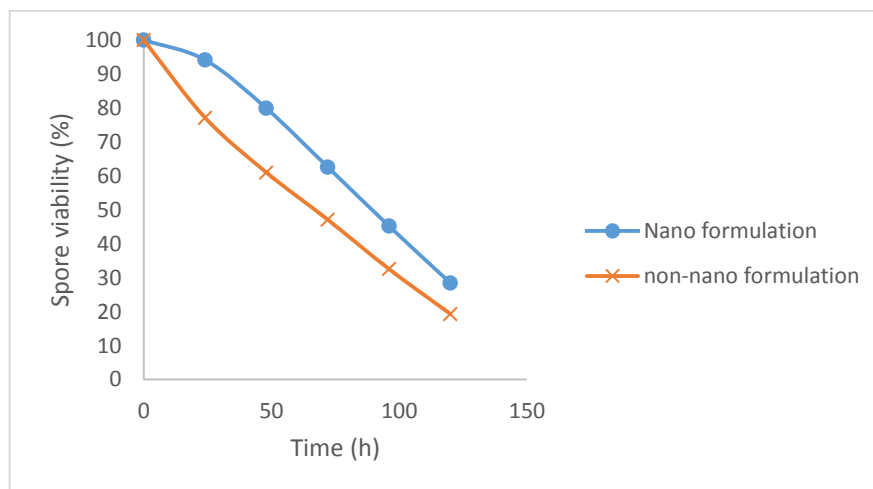
1. X-Ray Diffraction (XRD)
2. Scanning Electron Microscopy
3. Field Emission Scanning Electron Microscopy



شکل ۱- الگوی XRD گرافیت و نانوصفحات گرافن اکسید
Figure 1- XRD spectra of GO and Graphite



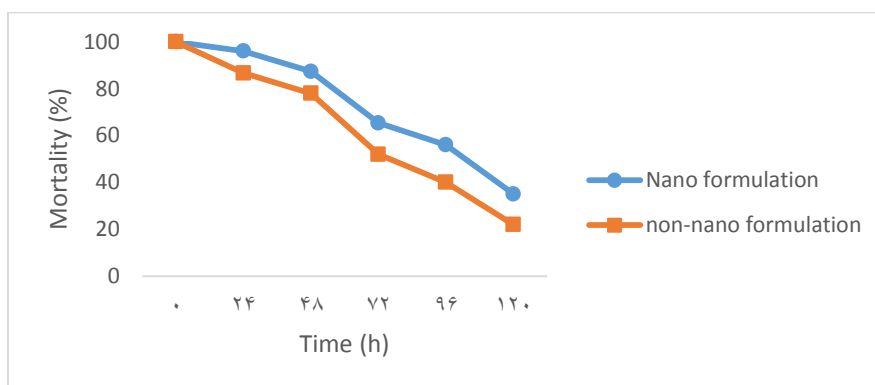
شکل ۲- FESEM نانو صفحات گرافن اکسید
Figure 2- FESEM image of GO nanosheet



شکل ۳- درصد زنده‌مانی فرمولاسیون نانو و غیر نانو به مدت ۵ روز
Figure 3- Viability of nano and non-nano formulation for 5 days.

شده با برگ‌های کتان تیمار شده با فرمولاسیون Bt و کازئین، بعد از هشت ساعت در معرض قرارگیری اشعه فرابنفش ۴۶٪ گزارش شده است (Behle et al. 1996). از بین ترکیبات نانو، نانومواد معدنی دارای خاصیت ضد باکتری بوده و اثر منفی روی رشد باکتری دارند (Kathirvelu et al. 2009) و بدین ترتیب در صورت انتخاب باید سایر عوامل موثر بررسی شود. اثر نانومواد با پایه کربنی به علت دارا بودن خواص فیزیکی و شیمیایی خاص و گسترده بر رشد گیاهان بررسی شده است و نتایج نشان داده است که می‌توان از آن‌ها به‌عنوان کود استفاده کرد (Pereira et al. 2014). نانوصفحات گرافن اکسید از دسته نانومواد با پایه کربنی با دارا بودن خواص منحصر به فرد می‌توانند گزینه مناسبی برای افزایش مقاومت Bt باشند.

آفت‌کش زیستی Bt به‌خاطر مزیت‌های فراوان، جایگاه مهمی در مدیریت کنترل آفات دارد. از عمده‌ترین معایب آفت‌کش زیستی Bt مقاومت کم آن در برابر اشعه فرابنفش است. یکی از راه‌های غلبه بر این مشکل استفاده از عوامل محافظت‌کننده در برابر اشعه فرابنفش است. در مورد محافظت‌کننده‌های اشعه فرابنفش باید علاوه بر توانایی افزایش مقاومت Bt در برابر شرایط محیطی، سایر فاکتورهای موثر، مانند تجزیه‌پذیری در محیط زیست و خاصیت ضد باکتری آن‌ها در نظر گرفته شود. مطالعات صورت گرفته بر روی روغن ذرت و روغن زیتون به‌عنوان محافظ ماده فعال Bt نشان داده است که بعد از ۹۶ ساعت در معرض قرارگیری اشعه فرابنفش، اسپورهای باکتری از بین رفته است (Jallouli et al. 2014). در مطالعه دیگری، درصد تلفات لاروهای کرم ساقه‌خوار اروپایی ذرت تغذیه



شکل ۴- درصد تلفات لارو *Ephestia kuehniella* تیمار شده با فرمولاسیون‌های مختلف Bt در طی ۵ روز
Figure 4- Mortality of *Ephestia kuehniella* larvae treated by UV irradiated Bt-nano and non-nano formulation during 5 days.

جدول ۱- درصد زنده‌مانی اسپور و درصد تلفات لارو *Ephestia kuehniella* تیمار شده با فرمولاسیون‌های مختلف Bt قبل و بعد از اشعه دهی (۱۲۰ ساعت).

Table1- Spore viability and mortality of the *Ephestia kuehniella* larvae treated by UV irradiated Bt-nano and non-nano formulation pre and after UVA irradiation (120 h).

Treatment	Mortality (%)	Spore viability (%)	cfu (10 ⁸ spores/ml)
Non irradiated free spore	100 ± 0.00 ^a	100 ± 0.00 ^a	32 ± 1.00 ^a
Irradiated free spore	22 ± 3.05 ^b	19.29 ± 0.69 ^b	6.17 ± 0.22 ^b
Non irradiated GO formulation	100 ± 0.00 ^a	100 ± 0.00 ^a	32 ± 0.73 ^a
Irradiated GO formulation	35 ± 2.88 ^c	28.43 ± 0.36 ^c	9.9 ± 0.45 ^c

یادداشت: تلفات برای تیمارها در سه تکرار، ۴۵ لارو انجام شده است. $F=392/20$ ، $df=3$ ، $p=0/0001$.

شمارش اسپور برای تیمارها در سه تکرار انجام شده است. $F=12776/93$ ، $df=3$ ، $p=0/0001$.

میانگین‌ها در ستون‌های یکسان با حروف مختلف در $p < 0/05$ اختلاف معنی‌دار دارند، آزمون دانکن.

داده‌ها در جدول به صورت میانگین ± خطای استاندارد هستند.

Note : Mortality for treatments were carried out with three replicates 45 larvae per in treatment, $F=392.20$, $df=3$, $p=0.0001$.

spore count for treatments was carried out using three replicates. $F=12776.93$, $df=3$, $p=0.0001$.

Means within the same column followed by a different letter are significant at $p < 0.05$, Duncan test.

The data in the table are mean ± SE.

اشعه فرابنفش با طول موج ۳۸۵ نانومتر نسبت به حالت محافظت نشده اثبات می‌کند. به نظر می‌رسد که نانو صفحات گرافن اکسید اطراف باکتری را می‌پوشاند و از باکتری در برابر اشعه فرابنفش محافظت کرده و بدین ترتیب باعث افزایش ماندگاری باکتری Bt می‌شوند. علاوه بر این ویژگی فتولومینسانس گرافن اکسید در مطالعات زیستی مورد توجه است که به دلیل ساختار سطحی خاص و مقاومت فتولومینسانس بالای گرافن اکسید است.

نتیجه گیری کلی

در این مطالعه از نانو صفحات گرافن اکسید به عنوان عاملی برای بهبود عملکرد آفت‌کش زیستی Bt در برابر اشعه فرابنفش استفاده شد. تکنیک به کار رفته، اهمیت افزایش عامل محافظت کننده اشعه فرابنفش به فرمولاسیون باکتری Bt در افزایش عملکرد و بازدهی این آفت‌کش زیستی را نشان می‌دهد و همچنین اثر مثبت نانو صفحات گرافن اکسید را در افزایش ماندگاری باکتری Bt در برابر

REFERENCES

- Behle R W, McGuire M R, Shasha B S** (1996) Extending the residual toxicity of *Bacillus thuringiensis* with casein-based formulations. *Journal of Economic Entomology*. Oxford University Press Oxford, UK, 89(6): 1399–1405.
- BenFarhat D, Dasmak M, Khedher S Ben, Mahfoudh S, Kammoun S, Tounsi S** (2013) Response of larval *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) to individual *Bacillus thuringiensis kurstaki* toxins mixed with *Xenorhabdus nematophila*. *Journal of Invertebrate Pathology*. Elsevier 114(1): 71–75.
- Bravo A, Gill S S, Soberon M** (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control, *Toxicon*. Elsevier 49(4): 423–435.
- Dunkle R L, Shasha B S** (1989) Response of starch-encapsulated *Bacillus thuringiensis* containing ultraviolet screens to sunlight. *Environmental Entomology*. The Oxford University Press 18(6): 1035–1041.
- El-Salamouny S, Ranwala D, Shapiro M, Shepard B M, Farrar Jr R R** (2009) Tea, coffee, and cocoa as ultraviolet radiation protectants for the beet armyworm nucleopolyhedrovirus. *Journal of Economic Entomology*. BioOne 102(5): 1767–1773.
- Gill S S, Cowles E A, Pietrantonio P V** (1992) The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annual Review of Entomology*. Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, 37(1): 615–634.
- Hummers Jr W S, Offeman R E** (1958) Preparation of graphitic oxide. *Journal of the American Chemical Society*. ACS Publications, 80(6): 1339.
- Jallouli W, Sellami S, Sellami M, Tounsi S** (2014) Efficacy of olive mill wastewater for protecting *Bacillus thuringiensis* formulation from UV radiations. *Acta Tropica*. Elsevier 140: 19–25.
- Kathirvelu S, Souza L D, Dhurai B** (2009) UV protection finishing of textiles using ZnO nanoparticles, 34:

267–273.

- Khorramvatan S, Marzban R, Ardjmand M, Safekordi A, Askary H** (2014) The effect of polymers on the stability of microencapsulated formulations of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Bt-KD2) after exposure to Ultra Violet Radiation. *Biocontrol Science and Technology*. Taylor & Francis, 24(4): 462–472.
- Marzban R, He Q, Liu X, Zhang Q** (2009) Effects of *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and cytoplasmic polyhedrosis virus of *Helicoverpa armigera* (Hübner)(HaCPV) on cotton bollworm (*Lepidoptera: Noctuidae*). *Journal of Invertebrate Pathology*. Elsevier 101(1): 71–76.
- Navon A** (2000) *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection—reality and prospects. *Crop Protection*. Elsevier 19(8): 669–676.
- Oatley C W, Nixon W C, Pease R F W** (1966) Scanning electron microscopy. *Advances in Electronics and Electron Physics*. Elsevier, 21: 181–247.
- Pereira A E S, Grillo R, Mello N F S, Rosa A H, Fraceto L F** (2014) Application of poly (epsilon-caprolactone) nanoparticles containing atrazine herbicide as an alternative technique to control weeds and reduce damage to the environment. *Journal of Hazardous Materials*. Elsevier 268: 207–215.
- Pusztai M, Fast P, Gringorten L, Kaplan H, Lessard T, Carey P R** (1991) The mechanism of sunlight-mediated inactivation of *Bacillus thuringiensis* crystals. *Biochemical Journal*. Portland Press Limited, 273(1): 43–47.
- Sansinenea E, Salazar F, Ramirez M, Ortiz A** (2015) An Ultra-Violet Tolerant Wild-Type Strain of Melanin-Producing *Bacillus thuringiensis*. *Jundishapur Journal of Microbiology*. Kowsar Medical Institute 8(7).
- Yang S T, Chen S, Chang Y, Cao A, Liu Y, Wang H** (2011) Removal of methylene blue from aqueous solution by graphene oxide. *Journal of Colloid and Interface Science*. Elsevier 359(1): 24–29.
- Yuya A I, Tadesse A, Azerefegne F, Tefera T** (2009) Efficacy of combining Niger seed oil with malathion 5% dust formulation on maize against the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (*Coleoptera: Curculionidae*). *Journal of Stored Products Research*. Elsevier 45(1): 67–70.
- Zhao X, Zhang Q, Chen D, Lu P** (2010) Enhanced mechanical properties of graphene-based poly (vinyl alcohol) composites. *Macromolecules*. ACS Publications 43(5): 2357–2363.