# ساخت فرمولاسیون سوسپانسیون غلیظ میکروکپسول باکتری *Bacillus thuringiensis*

**سوده خرم وطن[۱]، رسول مرزبان[۲]، مهدی ارجمند[۳]، علی اکبر سیف کردی[۱] و حسن عسکری[۲]**

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

۲- موسسه‌ی تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، تهران

۳- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران جنوب

**مسئول مکاتبات:** رسول مرزبان، پست الکترونیکی: ramarzban@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۸/۲۴ ۲(۱)۸۱-۸۹ تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۲/۲۰

## چکیده

در این پژوهش تولید میکروکپسول باکتری باسیلوس تورینجینسیس با پلیمر سدیم آلژینات به روش امولسیون دوفازی مورد بررسی قرار گرفت. پایداری فرمولاسیون میکروکپسول تولید شده در برابر اشعه‌ی ماورای بنفش با طول موج ۴۰۰ و ۲۵۴ نانومتر بررسی شد. نتایج آزمایشات نشان داد درصد زنده‌مانی اسپورها در فرمولاسیون میکروکپسول سدیم آلژینات ۵٪ در برابر اشعه‌ی ماورای بنفش با طول موج ۴۰۰ نانومتر و ۲۵۴ نانومتر به‌ترتیب ۱۰ و ۱۴٪ کاهش و در حالت غیر میکروکپسول در برابر طول موج‌های مذکور ۶۰ و ۴۰٪ کاهش یافت. در آزمون زیست سنجی، درصد مرگ و میر لارو سن دوم افستیا بعد از ۱۰ روز، برای فرمولاسیون میکروکپسول اشعه دیده با طول موج ۴۰۰ نانومتر، ۱۰٪ کاهش و در حالت غیرمیکروکپسول در برابر طول موج مذکور ۷۸٪ کاهش داشت. قطر ذرات میکروکپسول توسط میکروسکوپ نوری در حدود ۷-۲۰ میکرومتر و بازدهی میکروکپسول ۸۶٪ به‌دست آمد.

**واژه‌های کلیدی:** *Bacillus thuringiensis*، میکروکپسول، سدیم آلژینات، امولسیون دو فازی، اشعه‌ی ماورای بنفش

## مقدمه

امروزه کنترل آفات محصولات کشاورزی اجتناب ناپذیر است و عمده‌ترین روش مورد استفاده برای کنترل آفات به‌کارگیری آفت‌کش‌های شیمیایی می‌باشد که باوجود کارآیی مطلوب آن‌ها، موجب بروز مسائل زیست محیطی و بهداشتی می‌شود. در ایران سالانه حدود ۲۰ هزار تن آفت‌کش‌های شیمیایی مصرف می‌شود که مقدار زیادی از این آفت‌کش‌ها برای کنترل آفاتی به‌کار می‌رود که می‌توان آن‌ها را به‌وسیله آفت‌کش‌های میکروبی کنترل کرد. استفاده از آفت‌کش‌های میکروبی به تنهایی یا در ترکیب با عوامل دیگر در یک نظام مدیریت آفات مطالعه شده‌است و می‌تواند به‌عنوان جایگزینی برای آفت‌کش‌های با طیف وسیع باشد (Burges, 1998). در این آفت‌کش‌ها از میکروارگانیسم‌هایی مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها که در حشرات ایجاد بیماری می‌کنند، استفاده می‌شود (Satinder *et al*., 2006). برای استفاده‌ی اقتصادی از این عوامل، تهیه‌ی فرمولاسیون مناسب اهمیّت به‌سزایی دارد. در واقع فرمولاسیون اتصال و پلی بین تولید آفت‌کش و کاربرد آن می‌باشد. فرمولاسیونی که قادر باشد دوام، افزایش کارایی و افزایش مقاومت در برابر شرایط محیطی را تأمین نماید، ارزشمند است. به‌همین دلیل دست‌یابی به تکنولوژی فرمولاسیون میکروکپسول برای افزایش کارایی آفت‌کش‌های میکروبی اهمیّت زیادی دارد. یکی از چالش‌های مهم که در توسعه‌ی آفت‌کش‌های میکروبی وجود دارد، حفظ اثر پذیری ماده‌ی فعال این آفت‌کش‌ها در برابر عوامل نامساعد طبیعی به‌خصوص اشعه‌ی ماورای بنفش خورشید است (Bradford, 1976; Griego & Spence, 1978). یکی از روش‌های مناسب برای این کار پوشش دادن بخش فعال این آفت‌کش‌ها با یک پلیمر به‌شکل میکروکپسول است، که روش‌های مختلفی برای این کار وجود دارد (Villamizar, *et al*., 2010; Scher, 1997). فرمولاسیون میکروکپسول باعث عمر طولانی‌تر آفت‌کش میکروبی روی

هـدف و افـزایش بـازدهی آن‌هـا مـی‌شـود. فرمولاسـیون میکروکپسول می‌تواند اثر خود را در دراز مدت اعمال کند، به طوری کـه بـرای یـک آفت‌کـش بیولوژیـک، عمـر ایـن فرمولاسیون دو یا چهار برابر عمر امولسیون آن آفت‌کش در طبیعت است. غیر فعال شدن آفت‌کش‌های میکروبـی بعـد از قرار گرفتن در معرض نور خورشید در محدوده‌ی طول موج ۳۲۰-۲۸۰ نانومتر از چند دهه‌ی گذشته شناخته شده و تلاش زیادی بـه‌منظـور کـاهش اثـر آن بـا اسـتفاده از تکنیـک‌هـای میکروکپسول و یا افزودن مواد محـافظ و روش‌هـای متـداول فرمولاسـیون مـورد بررسـی و تحقیـق قـرار گرفتـه اسـت (Arthurs *et al*., 2006; Danielle *et al*., 2011).

دانکـــل و شاشـــا از نشاســـته بـــه‌منظـــور تولیـــد فرمولاسیون‌های مقاوم در برابر اشعه‌ی مـاورای بـنفش بـرای باکتری *Bacillus thuringiensis* Berliner اسـتفاده کردنـد (Dunkle & Shasha, 1988). سالامونی و همکـاران اثـر ۷۹ رنگ را به‌عنوان محافظ اشعه‌ی ماورای بنفش مورد ارزیـابی قـرار دادنـد و بـه ایـن نتیجـه رسـیدند کـه رنـگ‌هـای زرد آکریـدین (Acridine yellow)، آبـی آلکـالی (Alkali blue)، زرد درخشان (Brilliant yellow)، قرمـز کنگـو (Congo red)، ســـبز لیســـامین (Lissamine green) و مرکـــورکروم (Mercurochrom) حفاظـت بسـیار خـوبی در برابـر اشـعه‌ی مـاورای بـنفش ایجـاد مـی‌کننـد (Martin *et al*., 2009). سـالامونی و همکـاران همچنـین گـزارش کردنـد کـه چـای دارای اثر جذب در مقابل اشعه‌ی مـاورای بـنفش مـی باشـد (Salamouny *et al*., 2009). عصـاره‌ی آبـی چـای سـبز بـا غلظـت ۱٪، حفاظـت خـوبی بـرای ویـروس NPV در مقابـل اشعه‌ی ماورای بنفش در تست‌های آزمایشگاهی ایجاد کرد، در حالی‌که در تسـت‌هـای مزرعـه‌ای غلظـت‌هـای ۱٪ ، ۵٪ و ۱۰٪ از چای سبز حفاظت ویـروس در برابـر اشـعه‌ی مـاورای بـنفش غیـر مـؤثر بـود (Robert *et al*., 2003). فرمولاسـیون میکروکپسول شامل دانه‌های کروی به ابعاد ۱۰-۲۰ میکـرون است که عموماً از پلیمرهـای طبیعـی ماننـد ژلاتـین، نشاسـته، آلژینات، سلولز اسـتات ،صـمغ عربـی، هیدروکسـی پروپیـل متیل سلولز فتالات ساخته می‌شـوند کـه مهـم‌تـرین ویژگـی آن‌ها غیر سمی بودن آن‌هاست (Danielle *et al*., 2011).

روش‌های متعددی برای تولید میکروذرات وجود دارد که این امکان را فراهم می‌کند تا ساختار، ترکیـب و خـواص فیزیکـــی و شـــیمیایی آن‌هـــا بررســـی شـــود (Scher, 1997; Dubey *et al*., 2009). انتخاب نوع پلیمـر و روش تولید آن بستگی بـه پارامترهـایی نظیـر مـاده‌ی مـؤثره، زیست سازگاری پلیمر، نحوه‌ی مکانیسم آزادسازی ذرات و نحوه‌ی عملکرد آن در بدن حشره دارد. در میان این عوامـل، نوع ذره و نوع پلیمر تـأثیر زیـادی روی انتخـاب روش تولیـد دارد. هـدف از ایـن تحقیـق حفاظـت از اسـپور-کریسـتال بـاکتری *B. thuringiensis* در برابـر اشـعه‌ی مـاورای بـنفش است که برای این منظـور از سـدیم آلژینـات بـه‌عنـوان یـک پلیمر طبیعی برای میکروکپسول کردن *B. thuringiensis* در روش امولسیون دو فازی استفاده شد.

## مواد و روش‌ها

### طرز تهیه‌ی باکتری

باکتری *B. thuringiensis* جدایه KD2 (تهیـه شـده از کلکسیون بخش تحقیقـات کنتـرل بیولوژیـک) در فرمـانتور مجهز به هم‌زن مکـانیکی مـدل Medorex, FCU/PU 05 بـا حجـم عملیـاتی ۵ لیتـر، در محـیط کشـت عصـاره‌ی ذرت و نمک‌های معدنی به مـدت ۷۲ سـاعت بـا دمـای ۳۰ درجـه‌ی سلسیوس، با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه، اسـیدیته ۷/۵، میـزان هوادهی ۸۰٪ تکثیر و در داخل سـردخانه بـرای اسـتفاده‌هـای بعدی نگهـداری شـد. در ابتـدا اسـپور-کریسـتال بـاکتری از محلول باکتری تکثیر شده بـه‌وسـیله سـانتریفیوژ خـالص و بـا آب نمـک شسـته شـد (Saberi, 2012). در مرحلـه‌ی بعـد توسط دستگاه لیوفیلیز تحـت شـرایط خـلاء خشـک و پـودر اسپور-کریستال به‌دست آمده در دمای ۴ درجه‌ی سلسـیوس نگهداری شد.

### ساخت میکروکپسول

برای تهیه‌ی فاز آبی، مقدار ۰/۱ گـرم اسـپور کریسـتال باکتری باسیلوس تورینجینسیس با ترازوی دیجیتـال بـه‌دقـت وزن شـد، سـپس بـه‌میـزان مـورد نظـر سـدیم آلژینـات بـا درصدهای معین (۲، ۳ و ۵ درصد) بـه آن اضـافه و بـه مـدت

۲۴ ساعت روی شیکر قرار گرفت تا به طور کامل اسپور کریستال در محلول پلیمر حل شود (Karina *et al*., 2011).

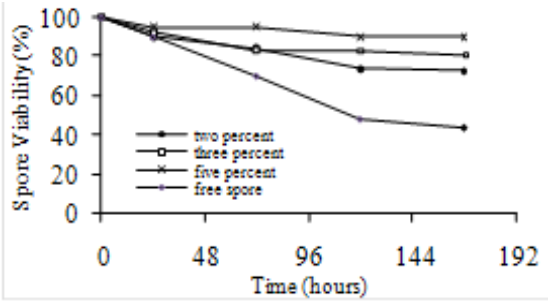
برای تهیه‌ی فاز روغنی مقدار ۶۳ میلی لیتر روغن ذرت در یک بشر ۵۰۰ میلی لیتری ریخته و به‌میزان ۲۰۰ میکرولیتر اسپن ۸۰ به آن اضافه شد. اندازه‌ی بشر طوری انتخاب شد که در موقع هم زدن، احتمال بیرون ریختن و هدر رفتن بخشی از مواد وجود نداشته باشد. از طرفی فاصله پره‌های هم‌زن با بدنه ظرف تا حدی بود که با بالا رفتن دور و ایجاد لرزش در محیط با بدنه برخورد نکند . برای کاهش خطا برای کل فرمول بندی‌ها، از بشرهایی با اندازه‌ی ارتفاع و قطر یکسان استفاده شد. قبل از اضافه کردن قطرات فاز آبی به فاز روغنی، هم‌زن را داخل فاز روغنی برای دقایقی روشن کرده تا سیستم مورد نظر ثابت شود. سپس قطرات فاز آبی با شکل یکسان و فواصل زمانی معین به فاز روغنی طی نیم ساعت اضافه شد. عامل شبکه‌ای کننده مورد استفاده در این پژوهش کلرید کلسیم بود. پس از اضافه کردن محلول از ۳۷/۵ میلی‌لیتر اتانول، ۳۷/۵ میلی‌لیتر کلرید کلسیم (با غلظت مشخص ۰/۱ و ۰/۳ مولار) و ۱ میلی‌لیتر اسید استیک، سیستم به یک ساعت زمان نیاز داشت تا تمام ذرات محکم شوند (Rodrigues *et al*., 2006). در مرحله‌ی آخر به مقدار ۱۵۰ میلی لیتر کلرید کلسیم ۰/۰۵ مولار به‌منظور ته‌نشین شدن کپسول‌ها به سیستم اضافه شد. در این پژوهش دور هم‌زن ۲۰۰۰ rpm انتخاب شد. پس از انجام واکنش به‌منظور تعیین راندمان، مقدار مشخصی از فرمولاسیون میکروکپسول به‌دست آمده را سانتریفیوژ و رسوب به‌دست آمده را استخراج کرده و فاز مایع بالایی آن دور ریخته شد. به رسوب به‌دست آمده سدیم سیترات اضافه شد به‌طوری‌که به‌مدت ۶ ساعت روی شیکر قرارگرفت و در مرحله‌ی بعد میزان واحد کلنی ساز باکتری محاسبه شد (Rodrigues *et al*., 2006).

## آزمون بررسی قطر میکروکپسول

به‌منظور بررسی اندازه‌ی میکروکپسول و شکل آن، از مقدار مشخصی از فرمولاسیون میکروکپسول به‌دست‌آمده توسط میکروسکوپ نوری (Olympus) در دو بزرگنمائی ۱۰ و ۴۰ عکس‌برداری شد.

## آزمون پایداری میکروکپسول باکتری در برابراشعه‌ی ماورای بنفش

۴۰ میلی‌لیتر از فرمولاسیون میکروکپسول و فرمولاسیون غیر میکروکپسول باکتری (شاهد) در شش عدد پتری دیش ریخته و به‌مدت یک هفته در معرض اشعه‌ی ماورای بنفش با طول موج ۳۸۵ نانومتر قرار داده و در زمان‌های ۲۴ ، ۷۲، ۱۲۰ و ۱۶۸ ساعت نمونه برداری شد. همچنین فرمولاسیون مذکور در برابر اشعه‌ی ماورای بنفش با طول موج ۲۵۴ نانومتر قرار داده و در زمان های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۵ و ۳۰ دقیقه نمونه برداری شد. مقدار آب تبخیر شده در هرنمونه برداری به فرمولاسیون اضافه گردید. نمونه‌ها برای تعیین مقدار اسپور زنده، مورد آزمون شمارش کلنی باکتری قرار گرفت (CFU). به‌طوری‌که به یک میلی‌لیتر فرمولاسیون میکروکپسول سانتریفیوژ شده، ۵ میلی‌لیتر سدیم سیترات (محلول بافر ۵۵ میلی مولار) اضافه شد و به‌مدت ۶ ساعت شیکر شد. مقدار زنده‌مانی (Viability) اسپورهای باکتری بعد از تابش اشعه‌ی ماورای بنفش در هر زمان نسبت به تعداد اسپورهای باکتری در زمان اولیه (قبل از تابش اشعه‌ی ماورای بنفش) محاسبه شد.




شکل ۱- زنده‌مانی اسپورهای میکروکپسوله شده توسط سدیم آلژینات با غلظت‌های۲، ۳ و ۵ درصد در مقایسه با اسپور آزاد (غیر میکروکپسوله شده) برای مدت ۷ روز در برابر اشعه‌ی ماورای بنفش (۳۸۵ نانومتر).

Fig. 1- Viability of spores at 2, 3, and 5% (w/w) sodium alginate in comparison with free spore (non-microencapsulated) exposed to UVB irradiation (385nm) for 7 days.

## آزمون زیست سنجی

به‌منظور بررسی پایداری کریستال‌های باکتری *B. thuringiensis* در برابر اشعه‌ی ماورای بنفش، آزمون

زیست سنجی روی فرمولاسیون میکروکپسول انجام شد. به‌این‌منظور از سن دوم *Ephestia kuehniella Zeller* استفاده‌شد. تکه‌های بادام‌زمینی به روش غوطه‌وری در فرمولاسیون میکروکپسول اشعه دیده و اشعه ندیده آغشته شدند، غذای تیمار شده در ۳ تکرار و در هر تکرار در اختیار ۱۵ لارو سن دوم قرار داده شد و به مدت ۱۰ روز مرگ و میر لاروها ثبت شد.

## بررسی رهایش باکتری بارگذاری شده

آزاد سازی باکتری در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس در سدیم سیترات بافر ۵۵ میلی مولار با اسیدیته ۷ صورت گرفت. ۵ میلی‌لیتر از میکروذرات به ۱۰ میلی‌لیتر محلول بافردر لوله‌های مشخص اضافه شده و لوله‌ها به‌مدت ۶ ساعت در شیکر چرخشی با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه قرار گرفتند و هر یک ساعت غلظت باکتری در محیط مایع توسط شمارش اسپور تعیین شد.

## تجزیه‌ی آماری

آزمایشات درصد تلفات و درصد زنده‌مانی در سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. با استفاده از نرم افزار SPSS تجزیه‌ی داده‌ها انجام و مقایسه‌ی میانگین‌ها به‌روش دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

جدول ۱- درصد زنده‌مانی اسپور و درصد تلفات فرمولاسیون میکروکپسول سدیم آلژینات (۵ ٪ وزنی) در برابر اشعه‌ی ماورای بنفش با طول موج ۴۰۰ نانومتر.

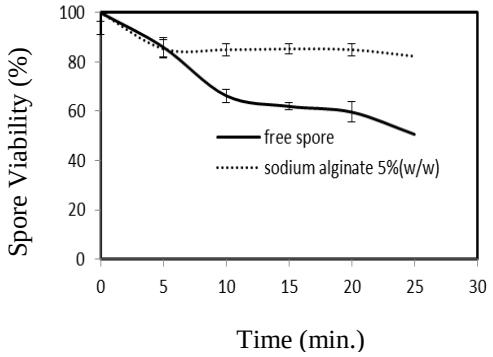
Table 1- Percentage spore viability and mortality for microencapsulated formulation of sodium alginate at 5% (w/w) against ultra violet radiation (400 nm).

| Treatment | Spore concentration CFU ($10^8$) | Spore viability (percentage) | Mean mortality | Mortality (percentage) |
|---|---|---|---|---|
| Non-irradiated free spore | $26.1 \pm 1.01^{a}$ | 100 | $14 \pm 0.57^{a}$ | 93 |
| Irradiated free spore | $10.5 \pm 0.57^{b}$ | 40 | $2.33 \pm 0.33^{c}$ | 15 |
| Non-irradiated sodium alginate microcapsule | $8.9 \pm 1.06^{bc}$ | 100 | $12 \pm 1.15^{ab}$ | 80 |
| Irradiated sodium alginate microcapsule | $8.01 \pm 0.11^{c}$ | 90 | $10.33 \pm 1.45^{b}$ | 70 |

Mortality for treatments were carried out with five replicates, F = 35.42, df = 3, P = 0.0001
Spore count for treatments were carried out with three replicates, F = 114.72, df = 3, P = 0.0001

## نتایج و بحث

در جدول یک مشاهده می‌شود که درصد زنده‌مانی اسپورهای باکتری در معرض اشعه‌ی ماورای بنفش در فرمولاسیون میکروکپسول نسبت به‌حالت غیر میکروکپسول بعد از گذشت ۷ روز (۱۶۸ساعت) تفاوت قابل ملاحظه‌ای وجود دارد ($P < ۰/۰۰۰۱$). همان‌طور که در شکل یک مشاهده می‌شود، درحالت غیر میکروکپسول درصد زنده‌مانی اسپورها بعد از ۷ روز به ۴۳ درصد رسید. به‌عبارتی ۵۷ درصد کاهش یافته ولی در حالت میکروکپسول درصد زنده‌مانی برای سدیم آلژینات با غلظت‌های دو، سه و پنج درصد به‌ترتیب ۷۲، ۸۰ و ۹۰ درصد بود به‌عبارت دیگر ۲۸، ۲۰ و ۱۰ درصد زنده‌مانی اسپورها کاهش یافته است. با افزایش درصد وزنی پلیمر از ۲ تا ۵ درصد، درصد زنده‌مانی اسپورها از ۷۲ تا ۹۰ درصد افزایش یافته‌است. کاهش درصد زنده‌مانی درفرمولاسیون میکروکپسول در مقایسه با کاهش چشم‌گیر آن‌ها در حالت غیرمیکروکپسول می‌تواند نتیجه پوشش‌دهی خوب اسپورها توسط پلیمر باشد. از طرفی مشاهده می‌شود که کاهش زنده‌مانی اسپورها در برابر اشعه‌ی ماورای بنفش تا ۴۸ ساعت اول اتفاق افتاده است که دلیل این کاهش، وجود اسپورهای آزاد (غیر میکروکپسول شده) در فرمولاسیون است. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود درصد زنده‌مانی اسپورها در برابر اشعه‌ی ماورای بنفش (۲۵۴ نانومتر) در فرمولاسیون میکروکپسول بعد از گذشت ۲۵ دقیقه به ۸۶٪ رسید در حالیکه درفرمولاسیون غیر میکروکپسول به ۵۰٪ کاهش یافت. این افت شدید درصد زنده‌مانی در فرمولاسیون غیر میکروکپسول در مقایسه با فرمولاسیون میکروکپسول اثبات می کند که اسپور با عامل محافظت کننده (سدیم آلژینات) پوشش داده شده است (شکل ۲).



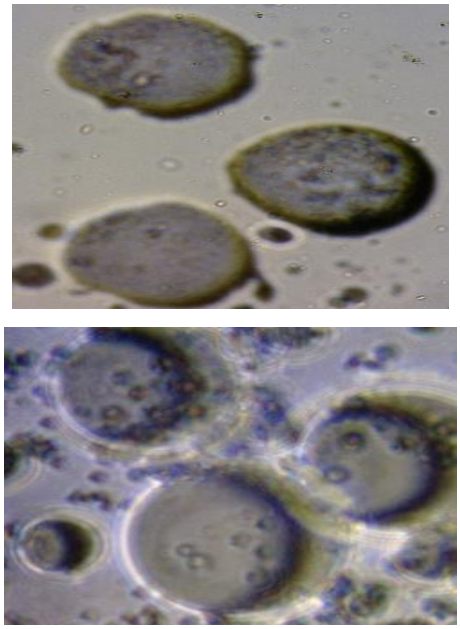

شکل ۲- زنده‌مانی اسپورهای میکروکپسوله شده توسط سدیم آلژینات با غلظت ۵٪ در مقایسه با اسپور غیر میکروکپسوله شده برای مدت ۲۵ دقیقه در برابر اشعه‌ی ماورای بنفش (۲۵۴ نانومتر).

Fig. 2- Viability of microencapsulated spores at 5% (w/w) sodium alginate comparison to free spore (non-microencapsulated) exposed to UVC irradiation (254nm) for 25 min.

زیست سنجی فرمولاسیون میکروکپسول باکتری باسیلوس تورینجنسیس روی لارو سن دوم *E. kuehniella* نشان می‌دهد، درصد مرگ و میر لاروها بعد از ۱۰ روز برای فرمولاسیون میکروکپسول اشعه‌ی دیده با طول موج ۴۰۰ نانومتر، نسبت به اشعه‌ی ندیده ۱۰ درصد کاهش داشته است. این نتایج، تأثیر پوشش ذرات اسپور-کریستال باکتری توسط سدیم آلژینات را نشان می‌دهد که با نتایج جوریگو و اسپنسو مطابقت دارد (Griego & Spence, 1978). درحالیکه اسپور-کریستال غیر میکروکپسول به‌عنوان شاهد در برابر اشعه‌ی ماورای بنفش فعالیت کشندگی آن از ۹۳٪ به ۱۵٪ کاهش یافت یعنی ۷۸٪ کاهش تلفات. این نتیجه‌ی عدم پایداری اسپور-کریستال غیر پوشش داده شده با سدیم آلژینات را در برابر اشعه‌ی ماورای بنفش نشان می‌دهد. زیرا کریستال باکتری که از جنس پروتئین است در برابر اشعه‌ی ماورای بنفش تخریب می‌شود و فعالیت کشندگی خود را از دست می‌دهد. باکتری *Bacillus sphaericus* با افزایش پلیمر سدیم آلژینات به‌منظور محافظت در برابر اشعه UV میکروکپسوله شد، نتایج نشان داد که اسپورها در ذرات میکروکپسول در برابر UV از مقاومت بالاتری در مقایسه با اسپور آزاد برخوردار بودند (Patricia *et al.*, 2002).

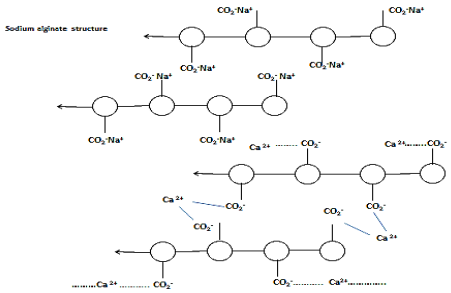
همچنین *B. thuringiensis* با روش اسپر درایر (Spore dryer) به صورت گرانول درآمد و اثرات آن را در برابر اشعه تا ۸ ساعت بررسی شد و نتایج نشان داد که *B. thuringiensis* در برابر اشعه‌ی ماورای بنفش تا ۸ ساعت محافظت شده است (Patricia *et al.*, 2002). برای اطمینان از پوشش مناسب، ذرات میکروکپسول سدیم آلژینات پس از تهیه توسط میکروسکپ نوری مشاهده شد. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود قطر ذرات به‌دست آمده در محدوده‌ی۷ تا ۲۰ میکرون است. از طرفی تأثیر مثبت پوشش باکتری توسط سدیم آلژینات را به‌دلیل واکنش بین محلول کلرید کلسیم به‌عنوان عامل شبکه‌ای کننده و پلیمر نشان داد که شبکه‌ای از ذرات ایجاد شده که از باکتری در برابر اشعه محافظت می‌کند ( شکل ۴).

در شکل ۵ آزاد سازی باکتری در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس نشان داده شده است. در مدت ۲۴ ساعت، در زمان‌های متوالی ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲،۱۴، ۱۸ و ۲۴ ساعت، غلظت باکتری در محیط رهایش توسط شمارش اسپور تعیین شد. همچنین درصد آزادسازی را در مدت ۲۴ ساعت محاسبه و منحنی رهایش بر مبنای زمان رسم شد (شکل ۵). در این نمودار همان طور که مشاهده می شود درصد رهایش تا ۸ ساعت افزایش یافته و ازآن به‌بعد روند ثابتی دارد. این منحنی رهایش کنترل یافته اسپور کریستال باکتری را نشان می‌دهد و از مدل $Q_t = -0.1936t^2 + 7.8948\,t + 5.807$ پیروی می‌کند ($R^2 = 0.98$). نکته‌ی بسیار مهم در این منحنی حضور کلریدکلسیم با غلظت ۰/۱ و ۰/۳ مولار است که مقدار رهایش در کلرید کلسیم با غلظت ۰/۳ مولار در مدت ۲۴ ساعت بسیار پایین بود (۴۵ درصد) و دلیل آن تجمع ذرات درشت حاصل از پلیمر و کلرید کلسیم است که باعث کندی رهایش ذرات به داخل محیط رهایش می‌شود، مارتین و سامنتو نیز به نتایج مشابهی دست یافته‌اند (Martins *et al.*, 2007). درصد رهایش در فرمولاسیون با غلظت ۰/۱ مولار کلرید کلسیم ۸۴ درصد بود. همچنین راندمان برای فرمولاسیون میکروکپسول ۸۶ درصد به‌دست آمد.



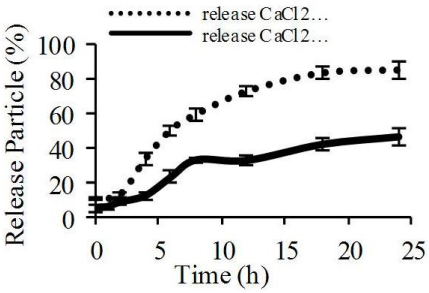
شکل ۳- میکرو ذرات تولید شده توسط سدیم آلژینات (میکرو ذرات در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس خشک شده‌اند).

Fig. 3- Prepared microcapsules with sodium alginate (Microparticles dried at 25°C).




شکل ۴- پیوند کلرید کلسیم و سدیم آلژینات.

Fig. 4. Cross linking between sodium alginate and $CaCl_2$.




شکل ۵- اسپور کریستال رهایش یافته از سدیم آلژینات حل شده در سدیم سیترات ۵۵ میلی مولار(pH = 7).

Fig. 5- Released spore-crystal from sodium alginate in sodium citrate 55 mM (pH = 7).

## پیشنهادات

با توجه به وضعیت فعلی آفت‌کش‌های میکروبی در کشور که زمینه‌ی تولید تجاری آن‌ها شروع شده‌است همواره یکی از عوامل محدود کننده، دانش و تکنولوژی است، که خصوصاً در بازیافت و فرمولاسیون این مسئله نمایان‌تر است. امروزه دانش فرمولاسیون آفت‌کش‌های میکروبی که غیر قابل دسترس و در انحصار شرکت‌های فراملیتی است پاشنه آشیل تولید آفت‌کش‌های بیولوژیک و میکروبی در شرکت‌های کوچک است. در ساخت فرمولاسیون آفت‌کش‌های میکروبی شایسته است به‌سمت دانش روز آن‌ها که همانا فرمولاسیون میکروکپسول است حرکت کنیم. ساخت فرمولاسیون میکروکپسول جهت افزایش پایداری و کارایی آفت‌کش‌های میکروبی در برابر شرایط محیطی، به‌خصوص اشعه‌ی ماورای بنفش می‌تواند باعث کاهش مصرف و دفعات محلول‌پاشی و راه‌گشای مشکلات کنترل میکروبی آفات کشاورزی باشد. با توجه به تحقیقات محدود و نادر فرمولاسیون میکروکپسول آفت‌کش‌های میکروبی در داخل و نیاز به آن و همچنین در راستای کاهش مصرف آفت‌کش‌های شیمیائی در جهت حفظ محیط زیست و کاهش باقیمانده سموم روی محصولات کشاورزی، ساخت فرمولاسیون میکروکپسول آفت‌کش‌های میکروبی از اهداف مهم پژوهشی در مجامع علمی بین‌المللی است.

## سپاسگزاری

با تشکر از کارکنان بخش تحقیقات کنترل بیولوژیک و جناب آقای دکتر حیدری علیزاده از بخش تحقیقات آفت‌کش‌ها، مؤسسه‌ی تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور.

**References**

**Arthurs, S.P., Lacey, L.A. & Behle, R.W. 2006.** Evaluation of spray-dried lignin-based formulations and adjuvants as solar protectants for the granulovirus of the codling moth *Cydia pomonella* (L). Journal of Invertebrate Pathology, 93(2): 88–95.

**Bradford, M.M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248–254.

**Burges, H.D. 1998.** Formulation of Microbial Biopesticides, Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments. Kluwer Academic, Dordrecht, 412 pp. ISBN: 0-412-62520-2.

**Danielle, M.T., Kyle, S., Wayneb, B.H. & Blake, B. 2011.** Delivery system using sodium alginate virus loaded pellets to red imported fire ants (*Solenopsis invicta*, Hymenoptera: formicidae). Florida Entomologist, 94(2):237.

**Dubey, R., Shami, T. C. & Bhasker Rao, K.U. 2009.** Microencapsulation technology and applications. Defence Science Journal, 59(1): 82-95.

**Dunkle, R.L. & Shasha, B.S. 1988.** Starch-encapsulated *Bacillus thuringiensis:* A potential new method for increasing environmental stability of entomopathogens. Environmental Entomology, 17: 120–126.

**Griego, V.M. & Spence, K.D. 1978.** Inactivation of *Bacillus thuringiensis* spores by ultraviolet and visible light. Applied and Environmental Microbiology, 35: 906–910.

**Karina, G.G., He´ctor, M.V., Fernando, E., Jorge, R. & Josefina, B.C. 2011.** Small microcapsules of crystal proteins and spores of *Bacillus thuringiensis* by an emulsification/internal gelation method. Bioprocess Biosystem Engineering.

**Martin, S., Salamouny, S.E.I. & Shepard, B.M. 2009.** Plant extracts as ultraviolet radiation protectants for the beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus: screening of extracts. Journal of Agricultural and Urban Entomology, 26(2): 47–61.

**Martins, S., Sarmento, S.E. & Ferreira, D. 2007.** Insulin–loaded alginate microsphere for oral delivery – effect of polysaccharide rein forment on physicochemical properties and release profile. Carbohydrate Polymers, 69: 725–73.

**Patricia, T.G., Michael, R.M., Robert, W.B, Baruch, S., & Randall, L.P. 2002.** Storage stability of Anagrapha falcifera nucleopolyhedrovirus in spray-dried formulations. Journal of Invertebrate Pathology, 79: 7-16.

**Robert, R., Farrar, J.R., Martin, S. & Iqbal, J. 2003.** Photostabilized titanium dioxide and a fluorescent brightener as adjuvants for a nucleopolyhedrovirus. BioControl, 48: 543–560.

**Rodrigues, A.P., Hirsch, D., Figueiredo, H.C.P., Logato, P.V.R. & Moraes, A.M. 2006.** Production and characterisation of alginate microparticles incorporating *Aeromonas hydrophila* designed for fish oral vaccination. Process Biochemistry, 41: 638–643.

**Saberi, N**. 2012. Optimization of *Bacillus thuringiensis* production in laboratory Fermenter. M.sc. thesis, Islamic Azad University, Sciences, and Research Branch of Tehran.

**Salamouny, S.E.I., Ranwala, D., Shapiro, M., Shepard, B.M. & Farrar, R.R. 2009.** Tea, coffee, and cocoa as ultraviolet radiation protectants for the beet armyworm nucleopolyhedrovirus. Journal of Economic Entomology, 102(5): 1767-1773.

**Satinder, K., Verma, M., Tyagi, R.D. & Valero, J.R. 2006.** Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. Process Biochemistry, 41, 323–342.

**Scher, H. 1997.** Microencapsulated pesticides. Journal of Controlled Release Pesticides, 53: 126–144.

**Villamizar, L., Barrera, G., Cotes, A.M., & Matinez, F. 2010.** Eudragit S100 microparticles containing *Spodoptera frugiperda* nucleopolyehedrovirus: Physicochemical characterization, photostability and in vitro virus release. Journal of Microcapsulation, 27: 314–324.

# Preparation of concentrated suspension of microencapsulated formulation of *Bacillus thuringiensis*

**Soodeh Khorramvatan[1], Rasoul Marzban[2], Mehdi Ardjmand[3], Aliakbar Seifkordi[1], Hassan Askary[2]**

1- Islamic Azad University, Sciences and Research Branch, Tehran, Iran

2- Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran

3- Islamic Azad University, Tehran South Branch, Tehran, Iran

**Corresponding author:** Rasoul Marzban, e-mail: ramarzban@yahoo.com

**Received: Nov., 15, 2013** **2 (1) 81-89** **Accepted: May, 10, 2014**

**Abstract**

In this study, the preparation of microencapsulated Spore Crystal Aggregate (SCA) of *Bacillus thuringiensis* formulation mixed with sodium alginate (2, 3, and 5 %) was investigated. Microencapsulated formulations were prepared using the emulsion gelling procedure. The protective effect of microcapsules after exposure to Ultra Violet radiation (UV) was evaluated by measuring the spore viability and bioassay tests. The use of sodium alginate (5 % w/w) resulted in the highest viabilities as 90 and 86% after exposure to UVB (400nm) and UVC (254nm) irradiation, respectively, while, viability of non- microencapsulated spores under these conditions were 40 and 50%, respectively. The mortality of irradiated and non-irradiated free spore formulations on second instar larvae of *Ephestia kuehniella* were 15 and 93%, respectively. However, the mortality caused by irradiated and non-irradiated microencapsulated formulations were 70 and 80% on the tenth day of the experiment, respectively. The size range of the microcapsules was 7-20 µm while the microencapsulation efficiency was 86%.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis*, microencapsulation, sodium alginate, emulsification, ultra violet