

ساخت فرمولاسیون سوسپانسیون غلیظ میکروکپسول باکتری *Bacillus thuringiensis*سوده خرم وطن<sup>۱</sup>، رسول مرزبان<sup>۲</sup>، مهدی ارجمند<sup>۳</sup>، علی اکبر سیف کردی<sup>۱</sup> و حسن عسکری<sup>۲</sup>

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 پذیرش: ۹۳/۰۲/۲۰

۸۹-۸۱(۱)۲

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۸/۲۴

## 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 به ترتیب ۱۰٪ و ۱۴٪ کاهش و در حالت غیر میکروکپسول در برابر طول موج‌های مذکور ۶۰٪ و ۴۰٪ کاهش یافت. در آزمون زیست‌سنجی، 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 غیر میکروکپسول 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 دوفازی، اشعه‌ی ماورای بنفش

## مقدمه

عوامل، تهیه‌ی فرمولاسیون مناسب اهمیت 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 اهمیت 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

امروزه کنترل آفات محصولات کشاورزی اجتناب‌ناپذیر است و عمده‌ترین روش مورد استفاده برای کنترل آفات به‌کارگیری آفت‌کش‌های شیمیایی می‌باشد که با وجود کارایی مطلوب آن‌ها، موجب بروز مسائل زیست‌محیطی و بهداشتی می‌شود. در ایران سالانه حدود ۲۰ هزار تن آفت‌کش‌های شیمیایی مصرف می‌شود که مقدار زیادی از این آفت‌کش‌ها برای کنترل آفات به‌کار می‌رود که می‌توان آن‌ها را به‌وسیله آفت‌کش‌های میکروبی کنترل کرد. استفاده از آفت‌کش‌های میکروبی به‌تنهایی یا در ترکیب با عوامل دیگر در یک نظام مدیریت آفات مطالعه شده‌است و می‌تواند به‌عنوان جایگزینی برای آفت‌کش‌های با طیف وسیع باشد (Burgess, 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

روش های متعددی برای تولید میکروذرات وجود دارد که این امکان را فراهم می کند تا ساختار، ترکیب و خواص فیزیکی و شیمیایی آن ها بررسی شود (Scher, 1997; Dubey et al., 2009). انتخاب نوع پلیمر و روش تولید آن بستگی به پارامترهایی نظیر مادهی مؤثره، زیست سازگاری پلیمر، نحوهی مکانیسم آزادسازی ذرات و نحوهی عملکرد آن در بدن حشره دارد. در میان این عوامل، نوع ذره و نوع پلیمر تأثیر زیادی روی انتخاب روش تولید دارد. هدف از این تحقیق حفاظت از اسپور-کریستال باکتری *B. thuringiensis* در برابر اشعهی ماورای بنفش است که برای این منظور از سدیم آلترینات به عنوان یک پلیمر طبیعی برای میکروکپسول کردن *B. thuringiensis* در روش امولسیون دو فازی استفاده شد.

### مواد و روش ها

#### طرز تهیهی باکتری

باکتری *B. thuringiensis* جدایه KD2 (تهیه شده از کلکسیون بخش تحقیقات کنترل بیولوژیک) در فرماتور مجهز به همزن مکانیکی مدل Medorex, FCU/PU 05 با حجم عملیاتی ۵ لیتر، در محیط کشت عصاره ذرت و نمک های معدنی به مدت ۷۲ ساعت با دمای ۳۰ درجهی سلسیوس، با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه، اسیدیته ۷/۵، میزان هوادهی ۸۰٪ تکثیر و در داخل سردخانه برای استفاده های بعدی نگهداری شد. در ابتدا اسپور-کریستال باکتری از محلول باکتری تکثیر شده به وسیله سانتریفیوژ خالص و با آب نمک شسته شد (Saber, 2012). در مرحلهی بعد توسط دستگاه لیوفیلیز تحت شرایط خلاء خشک و پودر اسپور-کریستال به دست آمده در دمای ۴ درجهی سلسیوس نگهداری شد.

#### ساخت میکروکپسول

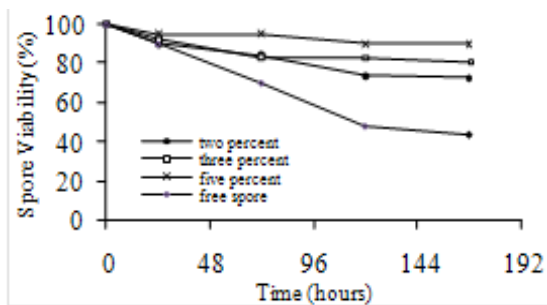
برای تهیهی فاز آبی، مقدار ۰/۱ گرم اسپور کریستال باکتری باسیلوس تورینجینسیس با ترازوی دیجیتالی به دقت وزن شد، سپس به میزان مورد نظر سدیم آلترینات با درصدهای معین (۲، ۳ و ۵ درصد) به آن اضافه و به مدت

هدف و افزایش بازدهی آن ها می شود. فرمولاسیون میکروکپسول می تواند اثر خود را در دراز مدت اعمال کند، به طوری که برای یک آفت کش بیولوژیک، عمر این فرمولاسیون دو یا چهار برابر عمر امولسیون آن آفت کش در طبیعت است. غیر فعال شدن آفت کش های میکروبی بعد از قرار گرفتن در معرض نور خورشید در محدودهی طول موج ۲۸۰-۳۲۰ نانومتر از چند دههی گذشته شناخته شده و تلاش زیادی به منظور کاهش اثر آن با استفاده از تکنیک های میکروکپسول و یا افزودن مواد محافظ و روش های متداول فرمولاسیون مورد بررسی و تحقیق قرار گرفته است (Arthurs et al., 2006; Danielle et al., 2011).

دانکل و شاشا از نشاسته به منظور تولید فرمولاسیون های مقاوم در برابر اشعهی ماورای بنفش برای باکتری *Bacillus thuringiensis* Berliner استفاده کردند (Dunkle & Shasha, 1988). سالامونی و همکاران اثر ۷۹ رنگ را به عنوان محافظ اشعهی ماورای بنفش مورد ارزیابی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که رنگ های زرد آکریدین (Acridine yellow)، آبی آکالی (Alkali blue)، زرد درخشان (Brilliant yellow)، قرمز کنگو (Congo red)، سبزیس آمین (Lissamine green) و مرکورکروم (Mercurchrom) حفاظت بسیار خوبی در برابر اشعهی ماورای بنفش ایجاد می کنند (Martin et al., 2009). سالامونی و همکاران همچنین گزارش کردند که چای دارای اثر جذب در مقابل اشعهی ماورای بنفش می باشد (Salamouny et al., 2009). عصارهی آبی چای سبز با غلظت ۱٪، حفاظت خوبی برای ویروس NPV در مقابل اشعهی ماورای بنفش در تست های آزمایشگاهی ایجاد کرد، در حالی که در تست های مزرعه ای غلظت های ۱٪، ۵٪ و ۱۰٪ از چای سبز حفاظت ویروس در برابر اشعهی ماورای بنفش غیر مؤثر بود (Robert et al., 2003). فرمولاسیون میکروکپسول شامل دانه های کروی به ابعاد ۱۰-۲۰ میکرون است که عموماً از پلیمرهای طبیعی مانند ژلاتین، نشاسته، آلترینات، سلولز استات، صمغ عربی، هیدروکسی پروپیل متیل سلولز فتالات ساخته می شوند که مهم ترین ویژگی آن ها غیر سمی بودن آن ها است (Danielle et al., 2011).

## آزمون پایداری میکروکپسول باکتری در برابر اشعه‌ی ماورای بنفش

۴۰ میلی‌لیتر از فرمولاسیون میکروکپسول و فرمولاسیون غیر میکروکپسول باکتری (شاهد) در شش عدد پتری دیش ریخته و به مدت 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 زمان‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۵ و ۳۰ دقیقه نمونه برداری شد. مقدار آب تبخیر شده در هر نمونه برداری به فرمولاسیون اضافه گردید. نمونه‌ها برای تعیین مقدار اسپور زنده، مورد آزمون شمارش کلنی باکتری قرار گرفت (CFU). به طوری که به یک میلی‌لیتر فرمولاسیون میکروکپسول سانتی‌فیوژ شده، ۵ میلی‌لیتر سدیم سیترات (محلول بافر ۵۵ میلی مولار) اضافه شد و به مدت 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 غلظت‌های ۲، 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 زیست‌سنجی

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

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 میلی‌لیتر روغن ذرت در یک بشر ۵۰۰ میلی‌لیتری ریخته و به میزان 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 میلی‌لیتر کلرید کلسیم ۰/۰۵ مولار به منظور ته‌نشین شدن کپسول‌ها به سیستم اضافه شد. در این پژوهش دور هم‌زن ۲۰۰۰ rpm انتخاب شد. پس از انجام واکنش به منظور تعیین راندمان، مقدار مشخصی از فرمولاسیون میکروکپسول به دست آمده را سانتی‌فیوژ و رسوب به دست آمده را استخراج کرده و فاز مایع بالایی آن دور ریخته شد. به رسوب به دست آمده سدیم سیترات اضافه شد به طوری که به مدت ۶ ساعت روی شیکر قرار گرفت و در مرحله‌ی بعد میزان واحد کلنی ساز باکتری محاسبه شد (Rodrigues et al., 2006).

## آزمون بررسی قطر میکروکپسول

به منظور بررسی اندازه‌ی میکروکپسول و شکل آن، از مقدار مشخصی از فرمولاسیون میکروکپسول به دست آمده توسط میکروسکوپ نوری (Olympus) در دو بزرگنمایی ۱۰ و ۴۰ عکس برداری شد.

گرفت. ۵ میلی‌لیتر از میکروذرات به ۱۰ میلی‌لیتر محلول بافر در لوله‌های مشخص اضافه شده و لوله‌ها به مدت 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 به روش دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

زیست‌سنجی روی فرمولاسیون میکروکپسول انجام شد. به‌این‌منظور از سبب *Ephestia kuehniella* Zeller استفاده شد. 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 میلی‌مولار با اسیدیته ۷ صورت

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 <sup>8</sup> )	Spore viability (percentage)	Mean mortality	Mortality (percentage)
Non-irradiated free spore	26.1 ± 1.01 <sup>a</sup>	100	14 ± 0.57 <sup>a</sup>	93
Irradiated free spore	10.5 ± 0.57 <sup>b</sup>	40	2.33 ± 0.33 <sup>c</sup>	15
Non-irradiated sodium alginate microcapsule	8.9 ± 1.06 <sup>bc</sup>	100	12 ± 1.15 <sup>ab</sup>	80
Irradiated sodium alginate microcapsule	8.01 ± 0.11 <sup>c</sup>	90	10.33 ± 1.45 <sup>b</sup>	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

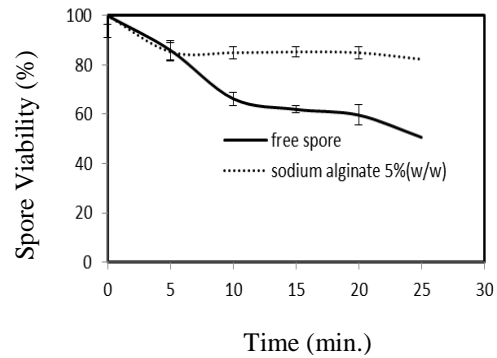
زنده‌مانی در فرمولاسیون میکروکپسول در مقایسه با کاهش چشم‌گیر آن‌ها در حالت غیر میکروکپسول می‌تواند نتیجه پوشش‌دهی خوب اسپورها توسط پلیمر باشد. از طرفی مشاهده می‌شود که کاهش زنده‌مانی اسپورها در برابر اشعه‌ی ماورای بنفش تا ۴۸ ساعت اول اتفاق افتاده است که دلیل این کاهش، وجود اسپورهای آزاد (غیر میکروکپسول 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 در فرمولاسیون غیر میکروکپسول به ۵۰٪ کاهش یافت. این افت شدید درصد زنده‌مانی در فرمولاسیون غیر میکروکپسول در مقایسه با فرمولاسیون میکروکپسول اثبات می‌کند که اسپور با عامل محافظت‌کننده (سدیم آلژینات) پوشش داده شده است (شکل ۲).

### نتایج و بحث

در جدول یک مشاهده می‌شود که درصد زنده‌مانی اسپورهای باکتری در معرض اشعه‌ی ماورای بنفش در فرمولاسیون میکروکپسول نسبت به حالت غیر میکروکپسول بعد از گذشت ۷ روز (۱۶۸ ساعت) تفاوت قابل ملاحظه‌ای وجود دارد ( $P < 0.0001$ ). همان‌طور که در شکل یک مشاهده می‌شود، در حالت غیر میکروکپسول درصد زنده‌مانی اسپورها بعد از ۷ روز به ۴۳ درصد رسید. به عبارتی ۵۷ درصد کاهش یافته ولی در حالت میکروکپسول درصد زنده‌مانی برای سدیم آلژینات با غلظت‌های دو، سه و پنج درصد به ترتیب ۷۲، ۸۰ و ۹۰ درصد بود به عبارت 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 یافته است. کاهش درصد

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 به دست آمده در محدوده‌ی ۷ تا ۲۰ میکرون است. از طرفی تأثیر مثبت پوشش باکتری توسط سدیم آلژینات را به دلیل واکنش بین محلول کلرید کلسیم به عنوان 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، 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 همان‌طور که مشاهده می‌شود درصد رهایش تا ۸ ساعت افزایش یافته و از آن به بعد روند ثابتی دارد. این منحنی رهایش کنترل یافته اسپور کریستال باکتری را نشان می‌دهد و از مدل  $Q_t = -0.1936t^2 + 7.8948t + 5.807$  پیروی می‌کند ( $R^2 = 0.98$ ). نکته‌ی بسیار مهم در این منحنی حضور کلرید کلسیم 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 به دست آمد.



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.

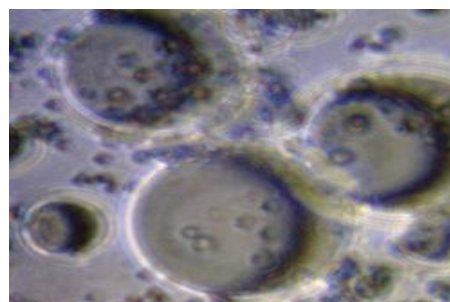
زیست‌سنجی فرمولاسیون میکروکپسول باکتری باسیلوس تورینجنسیس روی لارو سن دوم *E. kuehniella* نشان می‌دهد، درصد مرگ و میر لاروها بعد از ۱۰ روز برای فرمولاسیون میکروکپسول اشعه‌ی دیده با طول موج ۴۰۰ نانومتر، نسبت به اشعه‌ی ندیده ۱۰ درصد کاهش داشته است. این نتایج، تأثیر پوشش ذرات اسپور-کریستال باکتری توسط سدیم آلژینات را نشان می‌دهد که با نتایج جورینگو و اسپنسو مطابقت دارد (Griego & Spence, 1978). درحالیکه اسپور-کریستال غیر میکروکپسول به عنوان 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 به منظور 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).

### پیشنهادات

با توجه به وضعیت فعلی آفت کش های میکروبی در کشور که زمینه ی تولید تجاری آنها شروع شده است همواره یکی از عوامل محدود کننده، دانش و تکنولوژی است، که خصوصاً در بازیافت و فرمولاسیون این مسئله نمایان تر است. امروزه دانش فرمولاسیون آفت کش های میکروبی که غیر قابل دسترس و در انحصار شرکت های فراملیتی است پاشنه آشیل تولید آفت کش های بیولوژیک و میکروبی در شرکت های کوچک است. در ساخت فرمولاسیون آفت کش های میکروبی شایسته است به سمت دانش روز آنها که همانا فرمولاسیون میکروکپسول است حرکت کنیم. ساخت فرمولاسیون میکروکپسول جهت افزایش پایداری و کارایی آفت کش های میکروبی در برابر شرایط محیطی، به خصوص اشعه ی ماورای بنفش می تواند باعث کاهش مصرف و دفعات محلول پاشی و راه گشای مشکلات کنترل میکروبی آفات کشاورزی باشد. با توجه به تحقیقات محدود و نادر فرمولاسیون میکروکپسول آفت کش های میکروبی در داخل و نیاز به آن و همچنین در راستای کاهش مصرف آفت کش های شیمیائی در جهت حفظ محیط زیست و کاهش باقیمانده سموم روی محصولات کشاورزی، ساخت فرمولاسیون میکروکپسول آفت کش های میکروبی از اهداف مهم پژوهشی در مجامع علمی بین المللی است.

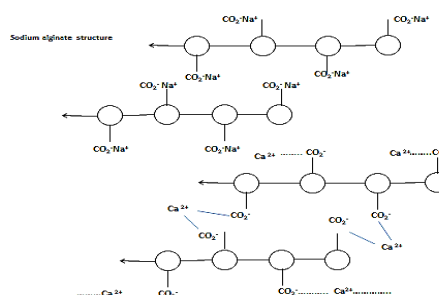
### سپاسگزاری

با تشکر از کارکنان بخش تحقیقات کنترل بیولوژیک و جناب آقای دکتر حیدری علیزاده از بخش تحقیقات آفت کش ها، مؤسسه ی تحقیقات گیاه پزشکی کشور.



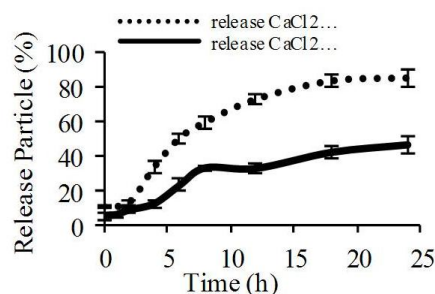
شکل ۳- میکرو ذرات تولید شده توسط سدیم آلژینات (میکرو ذرات در دمای ۲۵ درجه ی سلسیوس خشک شده اند).

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<sub>2</sub>.



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

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

## 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., Sarmiento, S.E. & Ferreira, D. 2007.** Insulin–loaded alginate microsphere for oral delivery – effect of polysaccharide rein formen 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* nucleopolyhedrovirus: 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<sup>1</sup>, Rasoul Marzban<sup>2</sup>, Mehdi Ardjmand<sup>3</sup>, Aliakbar Seifkordi<sup>1</sup>, Hassan Askary<sup>2</sup>

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

---