

بررسی ترکیب چند نوع پلیمر در افزایش پایداری ویروس HaNPV در برابر اشعه‌ی فرابنفش

آیدا گیفانی^۱، رسول مرزبان^۲، علی اکبر سیف کردی^۱، مهدی ارجمند^۳، احمد دزنیانیان^۴

۱- گروه مهندسی شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

۲- بخش تحقیقات کنترل بیولوژیک، موسسه‌ی تحقیقات گیاه پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

۳- گروه مهندسی شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران جنوب

۴- مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان-شاهرود، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

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

تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۲/۰۹

۳(۱)۱-۸

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۱۴

چکیده

پژوهش حاضر به منظور بررسی نقش و تأثیر پلیمرهای گوناگون در میکروکپسول کردن و پوشش دهی ویروس HaNPV در مقابل اشعه‌ی فرابنفش انجام شده است. برای این منظور فرمولاسیون میکروکپسول ویروس HaNPV با استفاده از سه پلیمر سدیم آلزینات، ژلاتین و نشاسته و نیز ترکیب این سه پلیمر، به کمک روش امولسیون ساخته شد. میزان پایداری و فعالیت بیولوژیکی ویروس در فرمولاسیون‌های حاصل پس از ۵ و ۲۴ ساعت اشعه دهی با نور UVA (۳۸۵ nm)، روی لارو *Helicoverpa armigera* ارزیابی شد. میزان تلفات لاروهای تغذیه شده با سوسپانسیون غیر میکروکپسول از ۱۰۰ درصد قبل از اشعه دهی به ۴۶/۶۶ درصد پس از ۲۴ ساعت اشعه دهی کاهش یافت. پلیمرهای نشاسته و سدیم آلزینات به طور مجزا و در غلظت‌های به کار رفته نه تنها نتوانستند پوشش مناسبی برای ویروس HaNPV در مقابل اشعه‌ی فرابنفش ایجاد کنند، بلکه قبل از اشعه دهی، موجب کاهش فعالیت کشندگی ویروس شدند. در حالیکه ترکیب نشاسته و سدیم آلزینات دارای اثر هم افزایی بوده و موجب افزایش فعالیت بیولوژیکی ویروس شد. به طوری که پس از گذشت ۵ و ۲۴ ساعت از زمان اشعه دهی، درصد تلفات فرمولاسیون حاصل از ترکیب نشاسته و سدیم آلزینات، در هر دو زمان ۱۰۰ درصد گزارش شد و این میزان در مقایسه با درصد تلفات حاصل از سوسپانسیون غیر میکروکپسول از نظر آماری دارای تفاوت معنی دار بود ($P < 0.05$). در صد تلفات فرمولاسیون تهیه شده با ژلاتین پس از ۵ و ۲۴ ساعت اشعه دهی، به ترتیب ۱۰۰ و ۹۵/۵ درصد بود. پس از گذشت این دو زمان، ژلاتین و ترکیب آن با سایر پلیمرهای به کار رفته، از نظر درصد تلفات با سوسپانسیون غیر میکروکپسول تفاوت معنی داری داشتند ($df = 7, P < 0.05$). به طور کلی ژلاتین و ترکیب آن با سایر پلیمرها پایداری لازم را برای ویروس HaNPV در برابر اشعه UV فراهم کردند.

واژه‌های کلیدی: آفت کش میکروبی، ویروس HaNPV، UV، میکروکپسول، پلیمر

مقدمه

می‌شود و نیز در مدیریت تلفیقی آفات از جایگاه ویژه‌ای برخوردارند (Rodriguez et al., 2012). اشعه‌ی فرابنفش خورشید (Ultraviolet) که به اختصار UV نامیده می‌شود، امواج الکترومغناطیسی هستند با دامنه‌ی طول موج کوتاه‌تر از نور مرئی و بلندتر از پرتو X. این تابش براساس تأثیر بر سلامت انسان و محیط زیست و طول موج آن‌ها به سه گروه UVA، UVB و UVC تقسیم می‌شوند. به سبب

آفت کش‌های میکروبی، اولین فرآورده‌های حاصل از کاربرد بیوتکنولوژی در کشاورزی هستند که استفاده از آن‌ها با هدف دستیابی به امنیت و سلامت غذایی همواره رو به گسترش می‌باشد. خانواده باکولوویروس‌ها که مهمترین خانواده ویروس‌های بیمارگر بی‌مهرگان هستند، از جمله عواملی می‌باشند که از آن‌ها در تهیه این آفت کش‌ها استفاده

ترکیب نشاسته، لیگنین و ملاس بیشترین تأثیر را در میزان پوشش دهی ویروس در برابر اشعه UV از خود نشان داد (Dezianian, 2011). ویلامیزار و همکاران از پلیمر Eudragit برای میکروکپسول کردن ویروس S/npv با استفاده از روش امولسیون روغن در روغن استفاده کردند، و نتیجه گرفتند که فرمولاسیون میکروکپسول پوشش مناسبی برای ویروس S/npv در برابر اشعه UV فراهم می کند و این نوع فرمولاسیون پتانسیل خوبی برای توسعه آفت کش های میکروبی دارد (Villamizar et al., 2010).

هدف از تحقیق حاضر، ارزیابی نقش میکروکپسول کردن در میزان حفاظت از ویروس چند وجهی هسته ای *Helicoverpa armigera* (HaNPV) و نیز بررسی تأثیر ترکیب پلیمرهای سدیم آلژینات، ژلاتین و نشاسته در این فرآیند بوده است.

مواد و روش ها

مواد

ویروس HaNPV (Henan Jiyuan Baiyun Industry Co., Ltd)، نشاسته (Merck, Germany)، سدیم آلژینات (Sigma Aldrich, USA)، ژلاتین (Difco Co.)، کلرید کلسیم (Merck, Germany)، اتانول (Merck, Germany)، اسپن ۸۰ (Alfa Aesar, USA)، اسید استیک (Merck, Germany) و روغن ذرت (Golden maize, Iffco, UAE) با در نظر گرفتن مرغوبیت و تاریخ تولید آنها تهیه شدند.

تکثیر و خالص سازی ویروس HaNPV

به منظور تکثیر و خالص سازی ویروس HaNPV از لاروهای کرم قوزه ی پنبه، *Helicoverpa armigera* استفاده شد. تکه های غذای مصنوعی لاروهای *H. armigera* (Teakle & Jensen, 1991) با ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ویروس با غلظت 10^6 OB ml⁻¹ آلوده و به ظروف حاوی لاروهای سن سوم هلیوتیس منتقل شدند. پس از گذشت چهار روز، لاروهای مرده در اثر ویروس جدا شده و به ظروف اپندورف حاوی بافر ۵۰ میلی مولار منتقل شدند. بافت های جمع آوری شده در هاون چینی یا هموژنایزر

جذب اشعه UV در لایه ی ازن اتمسفر، ۹۹٪ تابش فرابنفشی که به زمین می رسد از نوع UVA است (Anonymous, 2000). یکی از مهمترین عوامل محدود کننده فعالیت باکولو ویروس ها در طبیعت، اشعه ی فرابنفش نور خورشید است. اشعه ی فرابنفش نور خورشید، روی DNA ویروس تأثیر گذاشته و موجب تغییر و غیرفعال شدن آن شده و نیز سبب کاهش و یا از بین رفتن فعالیت بیولوژیکی ویروس می شود (Filho et al., 2001; Ignoffo & Garcia 1992; Sajap et al., 2007). با در نظر داشتن ملاحظات زیست محیطی، میکروکپسول کردن یکی از روش های مؤثر حفاظت از آفت کش های میکروبی در برابر اشعه ی فرابنفش نور خورشید است که به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است (Yang et al., 2012). میکروکپسول کردن آفت کش ها باعث کاهش دوز مصرفی ماده ی مؤثره و نیز موجب فراهم ساختن یک مدیریت مؤثر و از نظر اقتصادی سودآور در کنترل آفات می شود (Kailasapathy, 2002; Masuda, 2011). علاوه بر آن میکروکپسول کردن موجب پایداری فعالیت بیولوژیکی عامل فعال در آفت کش های میکروبی و نیز افزایش راندمان و عملکرد فرمولاسیون می شود (Winder et al., 2003).

میکروارگانسیم های زیادی تاکنون به روش های گوناگون میکروکپسول شده اند و پلیمرهای گوناگونی برای این منظور مورد استفاده قرار گرفته اند. پلیمرهای طبیعی به علت زیست تخریب پذیری، ارزان و در دسترس بودن و برخورداری از خاصیت فرآیند پذیری، بیشتر مورد توجه بوده اند (Gifani et al., 2009). سدیم آلژینات، ژلاتین، نشاسته، لیگنین و غیره برای میکروکپسول کردن میکروارگانسیم های متعددی در بحث کنترل بیولوژیک به کار رفته اند. باکتری *Bacillus thuringiensis* یکی از میکروارگانسیم هایی است که با روش های گوناگون و با استفاده از پلیمرهای مختلف میکروکپسول شده و در بسیاری مواقع نتایج ارزنده ای به دنبال داشته است (Junxin et al., 2011; Khorramvatan et al., 2013). دزیبایان ویروس PxGV را با استفاده از ترکیب چند ماده و به کمک روش خشک کردن پاششی میکروکپسول کرد.

جدول ۱- غلظت پلیمرهای به کار رفته در فرمولاسیون‌های میکروکپسول ساخته شده.

Table 1. Polymer concentrations (w/v) in the microencapsulated formulations.

Formulations No.	Polymers concentration (w/v)
1	Gelatin (5%)
2	Starch (5%)
3	Sodium alginate (5%)
4	Gelatin (2.5%) / Starch (5%)
5	Starch (2.5%) / Sodium alginate (5%)
6	Sodium alginate (2.5%) / Gelatin (5%)
7	Gelatin (5%) / Starch (2.5%) / Sodium alginate (5%)

قرار دادن فرمولاسیون‌های ساخته شده در معرض اشعه

در این پژوهش از اشعه‌ی UVA (۳۸۵ nm) استفاده شد. برای قرار دادن نمونه‌ها (فرمولاسیون‌های میکروکپسول و غیر میکروکپسول) زیر اشعه از ظرف‌های پتری ۹ سانتی‌متری استفاده شد. و برای تکرارپذیری آزمایش برای هر فرمولاسیون تعداد سه ظرف پتری قرار داده که در هر یک مقدار ۱۰ میلی لیتر از فرمولاسیون مورد نظر ریخته شد. سپس نمونه‌های آماده شده به مدت ۵ و ۲۴ ساعت به فاصله ۱۵۰ میلی‌متر زیر اشعه‌ی فرابنفش با طول موج 385 nm (Entela lamp model UVGL-25, 4 W) قرار گرفتند. پس از اتمام فرآیند اشعه دهی، حجم درون پتری‌ها اندازه‌گیری و به‌میزان آب تبخیر شده در آن‌ها، آب مقطر استریل اضافه شد و سپس پتری‌ها در یخچال نگهداری شدند.

پایداری فرمولاسیون‌های ویروس HaNPV در برابر اشعه‌ی فرابنفش

میزان فعالیت بیولوژیکی فرمولاسیون‌های میکروکپسول ویروس قبل و بعد از اشعه دهی توسط آزمون زیست‌سنجی، روی لاروسن دو *H. armigera* بررسی شد. برای این منظور غذای مصنوعی در اندازه‌ای که برای ۴۸ ساعت غذای یک عدد لارو را تأمین کند، بریده شد و سپس با فرمولاسیون‌های ساخته شده آلوده شدند. سپس هر برش غذای آلوده داخل ظروف سس خوری کوچک حاوی یک

شیشه‌ای استریل یکنواخت شده و توسط یک پارچه‌ی دولایه تطیف صاف گردید تا ذرات درشت بافتی و بقایای بدن لاروها جدا شود (Tamez-Guerra *et al.*, 2000; Wakil *et al.*, 2012). محتویات باقی مانده به منظور خالص سازی ویروس، به مدت یک دقیقه در دمای ۵ درجه‌ی سیلسیوس با دور ۷۰۰rpm سانتریفیوژ شد. لایه‌ی رویی (سوپرناتانت) به آرامی از رسوب جدا و مجدداً در دور ۳۸۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵ درجه‌ی سیلسیوس سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل سه بار با آب مقطر استریل شسته شد و در بافر NaOH (۰/۱ mM) به منظور بررسی‌های تکمیلی در دمای ۵ درجه‌ی سیلسیوس نگهداری شد (Tamez-Guerra *et al.*, 2000; Wakil *et al.*, 2012).

تهیه فرمولاسیون میکروکپسول ویروس HaNPV

در این مرحله برای ساخت فرمولاسیون میکروکپسول ویروس HaNPV از روش امولسیون استفاده شد. مقدار ۰/۰۶ گرم از عامل فعال (ویروس) با غلظت 10^6 OB ml⁻¹ در ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون هر یک از پلیمرها یا ترکیب آن‌ها با غلظت مشخص (جدول ۱) مخلوط کرده و به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر با دور ۱۴۰ rpm قرار داده شد. سوسپانسیون حاصل به ترکیب ۶۳ میلی‌لیتر روغن ذرت و ۲۰۰ میکرو لیتر اسپن ۸۰ که در حال هم خوردن با هم‌زن مکانیکی بودند، افزوده شد. پس از ۲۰ دقیقه سوسپانسیون به دست آمده به بشر حاوی ۷۰ میلی لیتر از مخلوط (۳۷/۵ میلی لیتر سدیم کلراید ۰/۱ مولار، ۳۷/۵ میلی لیتر الکل اتیلیک و یک میلی لیتر اسید استیک) در حال هم زدن اضافه شد. سپس مقدار ۱۵۰ میلی لیتر سدیم کلراید ۰/۰۵ مولار افزوده شد که در نتیجه یک سوسپانسیون روغنی دوفاز غلیظ حاصل در یخچال نگهداری شد.

بررسی میکروسکوپی

میکروذرات ساخته شده با استفاده از میکروسکوپ نوری Olympus با بزرگ‌نمایی ۴۰X مشاهده و اندازه‌ی میکروذرات، مورفولوژی سطح و شکل آن‌ها بررسی شد.

نتایج و بحث

بررسی میکروسکوپی میکرو ذرات

همان گونه که در شکل ۱ مشاهده می شود در فرمولاسیون میکروکپسول ژلاتین ذرات با قطر تقریبی $10 \pm 4/57 \mu m$ به صورت تقریباً کروی و مجزا از هم با سطح صاف می باشند (شکل ۱c). با وجود این که میکروذرات ساخته شده با پلیمر سدیم آلژینات نیز کروی هستند ولی توزیع اندازه ی ذرات آن ها گسترده و نامنظم می باشد (شکل ۱b). درحالی که میکروذرات ساخته شده با پلیمر نشاسته نه تنها کروی نیستند، بلکه از نظر شکل و مورفولوژی متفاوتند (شکل ۱a).

پایداری فرمولاسیون ها در برابر اشعه ی فرابنفش

جدول ۲، درصد مرگ و میر لاروهای *H. armigera* تغذیه شده با غذای آلوده به فرمولاسیون های میکروکپسول و غیر میکروکپسول، قبل و بعد از اشعه دهی را نشان می دهد. میزان مرگ لاروهای هلیوتیس تغذیه شده با سوسپانسیون ویروس میکروکپسول نشده از ۱۰۰ درصد قبل از اشعه دهی به ۴۶/۶۶ درصد پس از اشعه دهی به مدت ۲۴ ساعت کاهش یافت.

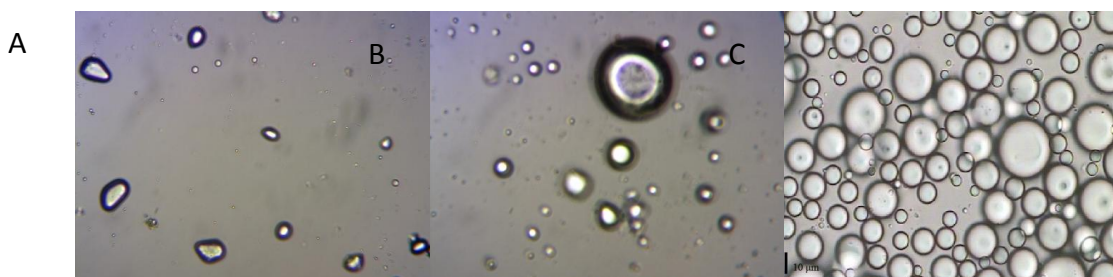
عدد لارو سن دو قرار داده شد. برای هر تیمار ۴۵ ظرف در سه تکرار ۱۵ تایی تدارک دیده شد. پس از ۴۸ ساعت تغذیه با غذای آلوده، لاروها به ظروف مشابه حاوی غذای سالم انتقال داده شدند. مرگ و میر لاروی از روز چهارم آلودگی به بعد به صورت روزانه تا روز چهاردهم ثبت شد (Bouwer & Avyidi 2006; Villamizar *et al.*, 2010). ۴۵ عدد لارو در سه تکرار ۱۵ تایی با غذای تیمار نشده به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. زیست سنجی فوق برای هر فرمولاسیون در دو حالت قبل از اشعه دهی و بعد از اشعه دهی صورت گرفت. درصد تلفات اصلاح شده طبق معادله ی Schneider & Orelli محاسبه و گزارش شد (Villamizar *et al.*, 2010).

$$\text{Corrected mortality} = [(A-B) \div (100-B)] \times 100$$

A: درصد مرگ و میر تیمار

B: درصد مرگ و میر شاهد

درصد تلفات اصلاح شده در قالب طرح کاملاً تصادفی به وسیله ی نرم افزار SPSS تجزیه و به وسیله ی آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ مقایسه شدند.



شکل ۱- میکروذرات ویروس HaNPV ساخته شده با پلیمر نشاسته (A)، سدیم آلژینات (B) و ژلاتین (C).
Fig. 1. *HaNPV* microparticles prepared by starch (A), sodium alginate (B) and gelatin (C).

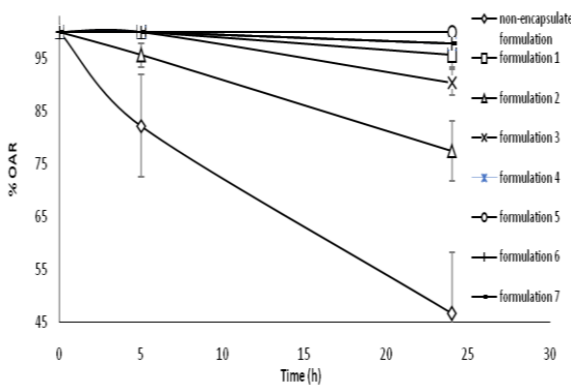
جدول ۲- درصد تلفات لاروهای *Helicoverpa armigera* تغذیه شده با غذای آلوده به فرمولاسیون های میکروکپسول، قبل و بعد از اشعه دهی (۵ و ۲۴ ساعت).

Table 2. Mortality percentage of *Helicoverpa armigera* larvae fed with the microencapsulated virus formulations pre and post UVA irradiation (5 and 24 hours exposure).

Treatment	No UV exposure	5 h exposure	24 h exposure
Non-microencapsulated formulation	100 ± 0.00 ^a	82.22 ± 9.68 ^b	46.66 ± 11.54
1	100 ± 0.00 ^a	100 ± 0.00 ^a	95.55 ± 2.22 ^a
2	97.77 ± 2.22 ^b	93.33 ± 0.00 ^b	75.55 ± 4.44 ^b
3	93.33 ± 3.85 ^b	93.33 ± 3.85 ^b	84.44 ± 4.44 ^b
4	100 ± 0.00 ^a	100 ± 0.00 ^a	97.77 ± 2.22 ^a
5	100 ± 0.00 ^a	100 ± 0.00 ^a	100 ± 0.00 ^a
6	100 ± 0.00 ^a	100 ± 0.00 ^a	97.77 ± 2.22 ^a
7	100 ± 0.00 ^a	100 ± 0.00 ^a	97.77 ± 2.22 ^a

اعداد با حروف مشابه در ستون از لحاظ آماری تفاوت معنی داری با هم ندارند.

نشاسته نیز بسیار مورد توجه بوده و بررسی خصوصیات ترکیب این دو پلیمر در مطالعات متعددی بررسی شده است. به طور کلی فیلم ترکیبی پلی ساکارید و پروتئین نسبت به هر یک از فیلم‌ها به صورت خالص، مقاومت بیشتری در برابر عبور گاز (Gas barriers) از خود نشان می‌دهد (Liu et al., 2014). مشاهدات میکرو ساختاری صورت گرفته، سازگاری مناسب میان این پلیمر با ژلاتین را برای تشکیل فیلم ماتریسی و بهبود خصوصیات فیزیکی و میکروساختاری فیلم تأیید می‌کند (Acosta et al., 2013).



شکل ۲- درصد فعالیت باقیمانده‌ی ویروس در فرمولاسیون‌های میکروکپسول اشعه دیده.

Fig. 2. OAR percentage of Irradiated microencapsulated formulations.

شکل ۲ درصد فعالیت باقیمانده‌ی ویروس (OAR: Original Activity Remaining) را در فرمولاسیون‌های میکروکپسول اشعه دیده نشان می‌دهد. همان‌طور که از نمودار دیده می‌شود، درصد OAR برای ترکیب پلیمرها بالاتر از همان میزان در پلیمرها به صورت انفرادی می‌باشد که این نشان دهنده‌ی اثر مثبت ترکیب پلیمرها در میزان حفاظت از ویروس در برابر اشعه‌ی فرابنفش می‌باشد. و در این میان ترکیب سدیم آلژینات و نشاسته با غلظت‌های آورده شده در جدول یک بهترین اثر بخشی را داشته است.

نتیجه گیری

به منظور بهبود پایداری ویروس HaNPV در مقابل اشعه UV نور خورشید فرمولاسیون میکروکپسول ویروس با

براساس جدول ۲ درصد تلفات حاصل از فرمولاسیون‌های میکروکپسول نشاسته و سدیم آلژینات تفاوت معنی‌داری با درصد تلفات فرمولاسیون غیر میکروکپسول دارند و پایین‌تر از آن قرار گرفته‌اند. به نظر می‌رسد پلیمرهای نشاسته و سدیم آلژینات در غلظت‌های به کار رفته نه تنها نتوانستند پوشش‌دهی مناسبی برای ویروس HaNPV در مقابل اشعه‌ی فرابنفش ایجاد کنند، بلکه موجب کاهش فعالیت بیولوژیکی ویروس شده‌اند. فیلم نشاسته با توجه به خاصیت شکنندگی آن، دارای مقاومت پائین و خواص مکانیکی بسیار ضعیف است (Acosta et al., 2013). در حالیکه مشاهده می‌شود که این پلیمرها وقتی با هم ترکیب می‌شوند دارای اثر هم‌افزایی شده و موجب پوشش‌دهی مناسب شدند. و به این ترتیب تغییرات درصد تلفات لاروها در حالت ترکیب این دو پلیمر نسبت به سوسپانسیون غیر میکروکپسول ویروس قبل از اشعه‌دهی تفاوت معناداری ندارند. تأثیر هم‌افزایی این دو پلیمر پس از ۵ و ۲۴ ساعت اشعه‌دهی، قابل مشاهده است. به طوری که پس از گذشت این زمان‌ها، ترکیب این دو پلیمر نه تنها با سوسپانسیون غیر میکروکپسول تفاوت چشم‌گیری دارد، بلکه ماکزیم میزان تلفات را نشان می‌دهد. ترکیب نشاسته و سدیم آلژینات نسبت به فرآیند ژل شدن دارای اثر هم‌افزایی می‌باشند و موجب فراهم آوردن پوشش مضاعف برای عامل محبوس و در نتیجه بهبود بازیابی فرآیند میکروکپسول کردن می‌شود (Sultana et al., 2000). و این با گزارش‌های منتشر شده مبنی بر افزایش راندمان میزان پوشش‌دهی برای ترکیب نشاسته و سدیم آلژینات در فرآیند میکروکپسول کردن مطابقت دارد (Puttipipatkachorn et al., 2005). پس از اشعه‌دهی، پلیمر ژلاتین و نیز ترکیب این پلیمر با سایر پلیمرهای به کار رفته، در گروه متفاوت و بالاتر نسبت به سوسپانسیون غیر میکروکپسول ویروس قرار دارند و با آن تفاوت معنادار دارند. به طوری که بعد از ۵ ساعت، ژلاتین و نیز ترکیب آن با هر یک از پلیمرهای دیگر، ماکزیم میزان تلفات را دارند و پس از گذشت ۲۴ ساعت نیز درصد تلفات ایجاد شده بالا بوده و نسبت به سوسپانسیون غیر میکروکپسول تفاوت معنی‌دار دارند (df=7, P<0.05). ترکیب ژلاتین و

ایجاد شده در اثر ترکیبات حاوی ژلاتین بسیار بالا بوده است. پس از اشعه دهی، فعالیت باقیمانده ویروس در ترکیب پلیمرها به مراتب بیشتر از همان میزان در پلیمرها به صورت انفرادی بود و این نشان دهنده اثر هم افزایی ترکیب پلیمرها در حفاظت از ویروس در برابر اشعه فرابنفش می باشد.

استفاده از پلیمرهای سدیم آلژینات، ژلاتین و نشاسته به صورت مجزا و نیز ترکیب با یکدیگر، به کمک روش امولسیون ساخته شد. ترکیب سدیم آلژینات و نشاسته دارای اثر هم افزایی بوده و موجب فراهم آوردن پوشش مضاعف برای ویروس و در نتیجه بهبود بازیابی فرآیند میکسول کردن می شود. پس از گذشت ۲۴ ساعت نیز میزان تلفات

References

- Acosta, S., Jiménez, A., Chiralt, A., González- Martínez, C., & Cháfer, M. 2013. Mechanical, barrier and microstructural properties of films based on cassava starch gelatin blends: effect of aging and lipid addition. Inside Food Symposium, 9-12 April, Leuven, Belgium.
- Anonymous, 2000. UVA Technology Planning and Management Corporation. FINAL report on carcinogens: background document for broad-spectrum ultraviolet radiation and UVA, UVB, and UVC. Meeting of the NTP board of scientific counselors report on carcinogens subcommittee, http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/newhomeroc/roc10/uv_no_appendices_508.pdf.
- Bouwer, G. & Avyidi, D. 2006. Application of the droplet feeding assay method to two economically important African lepidopteran pests: short communication. African Entomology, 14: 195-198.
- Dezianian, A. 2011. Biological Control of the Diamondback Moth (*plutella xylostella* Linnaeus) using *plutella xylostella* Granulovirus. Thesis Presented to the Senate of University Putra Malaysia in Fulfillment of the Requirement for the degree of Doctor of Philosophy.
- Filho, A.B., Alves, S.B., Augusto, N.T. & Pereira, R.M. 2001. Stability and persistence of two formulations containing *Anticarsia gemmatilis* Nuclear Polyhedrovirus (AgMNPV). Neotropical Entomology, 30: 411-416.
- Gifani, A., Taghizadeh, M., Seifkordi, A.A. & Ardjmand, M. 2009. Preparation and investigation the release behaviour of wax microspheres loaded with salicylic acid. Journal of Microencapsulation, 26: 485-492.
- Ignoffo, C.M. & Garcia, C. 1992. Combinations of environmental factors and simulated sunlight affecting activity of inclusion bodies of Heliothis (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrosis virus. Journal of Environmental Entomology, 21: 210-213.
- Junxin, Y., Defu, C. & Jia, Y. 2011. Encapsulated *Bacillus thuringiensis* powders by internal gelation of alginate microspheres for stability. Advanced Materials Research, 183: 272-277.
- Kailasapathy, K. 2002. Microencapsulation of probiotic bacteria: Technology and potential applications. Current Issues in Intestinal Microbiology, 3: 39-48.
- Khorramvatan, S., Marzban, R., Ardjmand, M., Safekordi, A.A. & Askary, H. 2013. 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, 24: 462-472.
- Liu, X.X., Wang, Y.F., Zhang, N.Z., Shank, R.A., Liu, H.S., Tong, Z., Chen, L. & Yu, L. 2014. Morphology and phase composition of gelatin-starch blends. Chinese Journal of Polymer Science, 32: 108-114.

- Masuda, M. 2011. Microencapsulation of Pesticides for Controlling Release from Coatings. Department of Chemical and Biological Engineering Chalmers University of Technology, Göteborg, Sweden.
- Puttipipatkachorn, S., Pongjanyakul, T. & Priprem, A. 2005. Molecular interaction in alginate beads reinforced with sodium starch glycolate or magnesium aluminum silicate, and their physical characteristics. *International Journal of Pharmaceutics*, 293: 51–62.
- Rodriguez, V.A., Belaich, M.N. & Ghiringhelli, P.D. 2012. Baculoviruses: Members of integrated pest management strategies. <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/29617.pdf>.
- Sajap, A.S., Bakir, M.A., Kadir, H.A. & Samad, N.A. 2007. Effect of pH, rearing temperature and sunlight of infectivity of Malaysian isolate of nucleopolyhedrovirus tolarvae of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *International Journal of Tropical Insect Science*, 27: 108–113.
- Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., & Kailasapathy, K. 2000. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, 62: 47–55.
- Tamez-Guerra, P., Michael, R.M., Behle, R.W., Hamm, J.J., Sumner, H.R. & Shasha, B.S. 2000. Sunlight persistence and rainfastness of spray-dried formulations of Baculovirus isolated from *Anagrapha falcifera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 93: 210-218.
- Teakle, R.E., & Jensen, J.M. 1991. *Heliothis armigera*, pp. 313-332. In: Singh, p. & Moore, R.F. (eds.), *Hand Book of Insect Rearing*. Elsevier, Amsterdam.
- Villamizar, L., Barrera, G., Cotes, A.M. & Martinez, F. 2010. Eudragit S100 microparticles containing *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus: Physicochemical characterization, photostability and in vitro virus release. *Journal of Microencapsulation*, 27: 314–324.
- Wakil, W., Ghazanfar, M.U., Nasir, F., Qayyum, M.A. & Tahir, M. 2012. Insecticidal efficacy of *Azadirachta indica* nucleopolyhedrovirus and chlorantraniliprole singly or combined against field populations of *Helicoverpa armigera* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae). *Chilean Journal of Agricultural Research*, 72.
- Winder, R.S., Wheeler, J.J., Conder, N., Otvos, I.S., Nevill, R., & Duan, L. 2003. Microencapsulation: a strategy for formulation of inoculum, *Biocontrol Science and Technology*, 13: 155-169.
- Yang, W., He, K., Zhang, J. & Guo, S. 2012. pH-Controlled *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin loading and release from polyelectrolyte microcapsules. *PLoS ONE* 7(9): e45233.

Evaluation of some polymers combinations in improvement of HaNPV stability against ultraviolet radiation

Aida Gifani¹, Rasoul Marzban², Aliakbar Safekordi¹, Mehdi Ardjmand³, Ahmad Dezianian⁴

1. Department of Chemical Engineering, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Biological Control Research Department, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, Iran

3. Chemical Engineering department, Islamic Azad University, Tehran South Branch, Tehran, Iran

4. Semnan Center for Research of Agricultural Science and Natural Resources, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Shahroud, Iran

Corresponding author: Rasoul Marzban, email: ramarzban@yahoo.com

Received: Feb., 03, 2015

2 (2) 1-8

Accepted: April, 22, 2015

Abstract

The current project was carried out to investigate the role of microencapsulation and influence of different polymers on the protection of *Helicoverpa armigera* nuclear polyhedrosis virus (HaNPV) against ultraviolet radiation. For this purpose, microencapsulated formulation of HaNPV was produced by emulsion technique using three natural polymers including sodium alginate, gelatin, and starch individually in and combined with each other. After exposing to UV irradiation for 5 and 24 hours, the stability and viral activity of the obtained formulations were evaluated by bioassay test on *H. armigera* larvae. However, the mortality rate for the non-microencapsulated virus suspension, declined from 100% before UV radiation to 46.66% after 24 hours exposing to the UVA radiation. Before UV radiation, each of the sodium alginate and starch microencapsulated formulations separately, not only could provide a proper coating for HaNPV virus, but also decreased the viral activity. Whereas the combination of these two polymers together had a synergistic effect and resulted in an increased mortality. After 5 and 24 hours exposing to UV, their combination was significantly different from the non-microencapsulated formulation (Duncan test, $P < 0.05$). After 5 and 24 hours exposing to UV, the difference of gelatin and its combinations with the non-microencapsulated formulation was significant.

Keywords: biopesticide, HaNPV, UV radiation, microencapsulation, polymer