مقاله تحقیقی

تهیه فرمولاسیون کپسول *Bacillus subtilis* و بررسی کارایی آن در مهار مرگ گیاهچه گوجه‌فرنگی ناشی از *Rhizoctonia solani* در شرایط گلخانه

الهه لطفعلی‌نژاد[۱]، عبدالحسین طاهری[۲]، سید اسماعیل رضوی[۳]، سید جواد صانعی[۴]

۱، ۲، ۳، ۴– دانشجوی دکتری رشته بیماری‌شناسی گیاهی، دانشیار، استادیار، استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران.

مسئول مکاتبات: عبدالحسین طاهری، ایمیل:.a.taheri@gau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۰۸ ۱۰(۲)۱۲۵–۱۳۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۲۷

چکیده

استفاده از عوامل مهار زیستی یک روش امیدوارکننده و ایمن در راستای اهداف زیست‌محیطی برای مهار بیماری‌های گیاهی است. با این حال، به دلیل نداشتن پایداری و فقدان فرمولاسیون مناسب و کاربردی، نتایج به دست آمده از کاربرد این عوامل به ویژه در عرصه‌های کشاورزی به اندازهٔ کافی کارآمد نبوده است. این مطالعه با هدف توسعه فرمولاسیون کپسول با استفاده از سدیم آلژینات جهت افزایش زنده‌مانی و بهبود عملکرد *Bacillus subtilis* انجام گردید. تهیه کپسول‌ها با استفاده از روش ژلاسیون یونی انجام شد. کارایی کپسولاسیون ۹۹ درصد برآورد گردید. میانگین اندازه کپسول‌های مرطوب و خشک تهیه شده به ترتیب ۲۶۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومتر بود. نتایج تاثیر اشعه فرابنفش بر زنده‌مانی *B. subtilis* نشان داد باکتری در حالت کپسول (مرطوب و خشک) نسبت به حالت غیرکپسول مقاومت بیشتری در برابر اشعه فرابنفش داشت. در این خصوص با افزایش مدت زمان قرارگیری در معرض اشعه فرابنفش مقاومت سلول‌های باکتری در حالت کپسول نسبت به حالت غیرکپسول بیشتر بود. نتایج بررسی مقاومت حرارتی در دماهای مختلف بر نقش مثبت کپسول‌ها در افزایش زنده‌مانی و مقاومت *B subtilis* نسبت به حالت غیرکپسول تاکید داشت. در این رابطه، درصد زنده‌مانی *B. subtilis* غیرکپسوله پس از ۶۰ روز قرارگیری در دمای ۲۵ و ۳۵ درجه سلسیوس به ترتیب ۴۲ و ۴۷ کاهش یافت. اما در مورد *B. subtilis* کپسوله کاهش درصد زنده‌مانی پس از مدت زمان و دمای مشابه به ترتیب ۱۶/۵ و ۲۶ درصد برآورد گردید. نتایج بررسی گلخانه‌ای نشان داد استفاده از فرمولاسیون کپسول *B. subtilis* باعث کاهش درصد بیماری نسبت به *B. subtilis* غیرکپسول و کپسول‌های سدیم آلژینات به تنهایی شد. در این رابطه، درصد بیماری در گیاهان تیمار شده با باکتری کپسوله ۴/۴۴ درصد برآورد گردید درحالی‌که این میزان در شاهد ۷۳/۳۳ درصد بود. گیاهان تیمار شده با *B. subtilis* کپسوله از نظر شاخص‌های رشدی در مقایسه با شاهد تفاوت معنی‌داری داشتند. تغییرات شاخص رشد در رابطه با فرمولاسیون‌های مختلف *B. subtilis* (به صورت کپسوله، غیرکپسوله) و کپسول‌های سدیم آلژینات تنها برای ارتفاع ریشه معنی‌دار بود. این نتایج بر نقش مثبت تاثیر استفاده از *B. subtilis* و فرمولاسیون کپسول در کنترل مرگ گیاهچه ناشی از *Rhizoctonia solani* در گیاه گوجه‌فرنگی تاکید دارد.

واژه‌های کلیدی: فرمولاسیون کپسول، *Bacillus subtilis*، افزایش زنده‌مانی، *Rhizoctonia solani*

مقدمه

استفاده از آفت‌کش‌های شیمیایی روشی موثر جهت مهار بیماری‌های گیاهی است اما با وجود کارایی مطلوب، اثرات سوء زیست محیطی در ابعاد مختلف را به همراه دارد و موجب از بین رفتن میکروارگانیسم‌های مفید خاک، برهم زدن تعادل اکولوژیکی، کاهش تنوع زیستی و مقاومت

عوامل بیماری‌زا می‌گردد. باقی‌ماندهٔ آفت‌کش‌های شیمیایی در محصولات کشاورزی و مواد غذایی نیز همواره سلامت انسان را تهدید می‌کند (Zhang *et al*., 2016; Zhu *et al*., 2018). استفاده از عوامل مهار زیستی جایگزین مناسب و ایمنی برای سموم شیمیایی می‌باشد (Ab Rahman *et al*., 2018; Khedher *et al*., 2021). زیرا این عوامل علاوه بر کاهش خسارت بیمارگرهای گیاهی موجب برقراری تعادل در اکوسیستم‌های کشاورزی نیز می‌شوند (Hermosa *et al*., 2012; Razavi *et al*., 2021). عوامل مهار زیستی به ویژه گونه‌های مختلف جنس *Bacillus* به دلیل استفاده از سازوکارهای مختلف مهارکنندگی و تقویت رشد گیاه توانایی بالایی در مهار طیف وسیعی از بیمارگرهای گیاهی دارند. با این حال، نتایج به دست آمده از کاربرد آن‌ها به اندازه‌ی کافی کارآمد نبوده است زیرا بقا و پایداری آن‌ها به عوامل مختلفی از قبیل دما، رطوبت، مواد شیمیایی، pH، اشعه فرابنفش و میکروارگارنیسم‌های رقیب به ویژه در عرصه‌های کشاورزی بستگی دارد (Calabi–Floody *et al*., 2018). برای رفع این محدودیت‌ها، تهیه فرمولاسیون مناسب اهمیت به‌سزایی دارد تا علاوه بر استفاده از مزایای ارزشمند عامل مهارزیستی، کارایی و اثربخشی آن را حفظ نماید. کپسول کردن (Encapsulation) یا پوشش‌دهی یکی از فرمولاسیون‌های کارآمد در این زمینه می‌باشد (Jing *et al*., 2011; Fraceto *et al*., 2018). در فرمولاسیون کپسول بخش فعال عامل مهار زیستی توسط مواد پلیمری پوشش داده می‌شود. لذا عوامل خارجی قادر به ایجاد اختلال در عملکرد آن نیستند و میکروارگانیسم با حفظ فعالیت متابولیکی خود، برای مدت طولانی‌تری زنده می‌ماند (Paulo & Santos, 2017; Locatelli *et al*., 2018). علاوه بر این، با توجه به خواص مواد دیواره‌ی کپسول، سلول‌های محصور شده می‌توانند با رشد و یا تخریب مواد دیواره به آهستگی آزاد شوند که این امر منجر به افزایش استقرار در خاک، ریشه گیاه یا برگ و ماندگاری طولانی مدت پس از کاربرد آن می‌گردد. در نتیجه تعداد دفعات کاربرد و دُز مصرفی کاهش می‌یابد (Bashan, 1998; Vemmer & Patel, 2013). یکی دیگر از مزیت‌های این فرمولاسیون‌ها استفاده از پلیمرهای زیست‌سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر به عنوان حامل یا مواد دیوارهٔ کپسول می‌باشد (Poletto *et al*., 2008; Huang *et al*., 2009).

روش‌های مختلفی در فرآیند کپسول کردن استفاده می‌شود که بسته به هدف و نوع میکروارگانیسم متفاوت است. روش ژلاسیون یونی به دلیل راحتی انجام کار، قابل مهار بودن و عدم استفاده از حلال‌های آلی یکی از مناسب‌ترین روش‌ها است. این روش براساس تعاملات یونی بین بارهای مثبت و منفی انجام می‌شود (Maestrelli *et al*., 2008). در این روش میکروارگانیسم با یک محلول پلیمری آنیونی که معمولا از پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر مانند سدیم آلژینات، آگار، سلولز، کیتوزان و غیره تشکیل شده است مخلوط شده و تحت هم زدن ثابت در یک محلول کاتیونی چندظرفیتی ریخته می‌شود، در نهایت کپسول‌های کروی تشکیل خواهند شد (Souza *et al*., 2012; Vemmer & Patel, 2013; Leong *et al*., 2016). کپسول‌های تشکیل شده یکنواخت بوده و اندازه آن‌ها بسته به قطر نازل می‌تواند از چند میکرومتر تا چند میلی‌متر متغیر باشد. روش ژلاسیون یونی برای محصور کردن میکروارگانیسم‌ها جهت تولید در مقیاس وسیع سودمند است، زیرا منجر به حداقل تغییرات در کمیت و زنده‌مانی سلول‌ها می‌شود (Rodrigues *et al*., 2012). کیفیت و کارآیی فرمولاسیون کپسول به طور قابل توجهی تحت تأثیر حامل یا مواد دیواره‌ی کپسول قرار دارد (Bashan *et al*., 2014). در میان پلیمرهایی که به عنوان حامل استفاده می‌شوند، سدیم آلژینات رایج‌تر است. سدیم آلژینات یک پلی‌ساکارید خطی از اسیدهای بتا–دی مانورونیک اسید β–d–mannuronate acid (M) و آلفا ال–گلورونیک اسید α–l–guluronate acid (G) است که از طریق پیوندهای ۱،۴–گلوکوزیدی 1,4–glucosidic bonds به هم متصل می‌شوند. این پلی‌ساکارید به طور طبیعی در دیواره‌های سلولی گونه‌های مختلف جلبک‌های قهوه‌ای و برخی باکتری‌ها وجود دارد (Dobrinˇci´c *et al*., 2020). سدیم آلژینات با توجه به خاصیت زیست

تخریب‌پذیری، زیست‌سازگاری، در دسترس بودن، ماهیت غیرسمی، هزینه نسبتا کم، توانایی مقاومت در برابر شرایط اسیدی خاک و به دام انداختن تعداد زیادی سلول زنده و اجازه انتشار آهسته و پیشرونده آن‌ها، حامل مناسبی برای کپسوله کردن عوامل مهارزیستی می‌باشد (Rodrigues *et al*, 2020; .Martínez–Cano *et al*, 2022)

در سال‌های اخیر استفاده از فرمولاسیون کپسول در بخش کشاورزی افزایش یافته است. طبق بررسی Young *et al*. (2006) قابلیت زنده‌مانی بالای باکتری *Bacillus subtilis* کپسوله با حداقل تلفات سلول به مدت ۵ ماه مشاهده شد. Hernandez–Suarez *et al*. (2011) دریافتند سویه‌های میکروکپسول شده *B. subtilis* فعالیت مهارکنندگی باکتری را در برابر *Rhizoctonia solani* و *Fusarium oxysporum* افزایش می‌دهد. طبق نتایج kim *et al*. (2012) میکروکپسول‌های *Pantoea agglomerans* strain E325، پتانسیل کنترل *Erwinia amylovora* را در سیب و گلابی دارا بودند. Chen *et al*. (2013) مشاهده کردند میکروکپسوله کردن باکتری *B. cereus* C1L، به دلیل محافظت از باکتری در برابر شرایط نامساعد، فعالیت آن را افزایش می‌دهد. نتایج Ma *et al*. (2015) نشان داد زیرپوشانی *B. subtilis* B99–2 مدت ماندگاری باکتری را افزایش می‌دهد. علاوه بر این قابلیت مهار بالاتری در برابر *R. solani* گوجه‌فرنگی در شرایط مزرعه داشت. تاثیر ریزپوشانی *B. subtilis* در برابر *Meloidogyne incognita* نشان داد، در گیاهان تلقیح شده با باکتری کپسوله شده در مقایسه با شاهد، کاهش قابل توجهی در تعداد گال و تخم‌های *M. incognita* مشاهده شد، اما این کاهش در گیاهانی که با *B. subtilis* غیرکپسوله تلقیح شده بودند، دیده نشد (Pacheco–Aguirre *et al*., 2016). مشاهدات He *et al*. (2016) نشان داد، *Pseudomonas putida* Rs–198 کپسوله نرخ زنده‌مانی بالاتری داشت و به طور مؤثر ریشه گیاه پنبه را کلنیزه کرد. تلقیح سیب‌زمینی با سویه‌های *P. fluorescens* کپسوله منجر به کاهش بروز بیماری *Fusarium solani* شد (Pour *et al*., 2019).

با عنایت به اینکه توسعه فرمولاسیون‌های مناسب، کارآمد و مقرون به صرفه برای عوامل مهارزیستی، یک فرآیند مهم در صنعت کشاورزی و تولید تجاری است و لزوم بررسی‌های بیشتر در این زمینه، این پژوهش با هدف تهیه *B. subtilis* کپسوله با استفاده از سدیم آلژینات، بررسی ویژگی‌های کپسول و مقایسه فعالیت مهارکنندگی *B. subtilis* کپسوله و غیرکپسوله برعلیه *R. solani* در شرایط گلخانه بر روی گیاه گوجه‌فرنگی انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیه جدایه عامل مهارزیستی و قارچ بیمارگر

در این پژوهش جدایه *Bacillus subtilis* BS3–2J ABRIICC 10513, WDCM 843 (Mousivand *et al*., 2012) و قارچ بیمارگر *R. solani* به ترتیب از کلکسیون میکروبی پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج و کلکسیون قارچ‌های گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان تهیه شد.

تهیه سوسپانسیون باکتری *B. subtilis*

به منظور تهیه سوسپانسیون باکتری یک لوپ پر از کشت ۲۴ ساعته باکتری رشد کرده بر روی محیط کشت نوترینت آگار به فلاسک‌های حاوی محیط نوترینت براث اضافه گردید. فلاسک‌ها بر روی دستگاه شیکر با دور ۱۲۰ دور در دقیقه در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند. سپس محیط کشت جهت جدا کردن باکتری‌ها با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و سلول‌ها دو بار با محلول نمکی (۰/۸۵ درصد) شست‌وشو داده شدند. جمعیت باکتری با استفاده از اسپکتوفتومتر (طول موج ۶۲۵ نانومتر) و شمارش کلنی بر روی محیط کشت به روش تهیه سری رقت به میزان ۸×۱۰^{۸} سلول باکتری در هر میلی‌لیتر تعیین گردید (McFarland, 1907; Wu *et al*., 2014; Khimmakthong *et al*., 2020).

تهیه کپسول

کپسول‌های حاوی *B. subtilis* بر اساس روش ژلاسیون یونی طبق روش dos Santos *et al*., 2015 و Pinpimai *et al*., 2015 با کمی تغییر تهیه شد. طبق این روش پس از تهیه سوسپانسیون باکتری، ۲ گرم سدیم آلژینات (A2033, Sigma–Aldrich) به ۱۰۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلول باکتری تحت همزدن ثابت اضافه گردید تا محلول ۲ درصد سدیم آلژینات و باکتری تهیه شود. سپس به مدت یک ساعت با استفاده از همزن مغناطیسی، ترکیب شدند تا مخلوطی همگن به دست آید. محلول سدیم آلژینات حاوی باکتری با استفاده از سرنگ 21G به درون محلول ۰/۱ مولارکلسیم کلرید ($CaCl_2$–Sigma–Aldrich) ریخته شد. پس از ۲ ساعت کپسول‌ها از محلول کلسیم کلرید جدا و چندین بار با آب مقطر استریل شسته شدند. نگه‌داری کپسول‌های تهیه شده در یک ظرف شیشه‌ای استریل در دمای ۴ درجه سلسیوس صورت گرفت. مقداری از کپسول‌ها در دمای ۲±۲۷ درجه سلسیوس تا رسیدن به وزن ثابت خشک شدند تا با کپسول‌های مرطوب مقایسه شوند. تهیه کپسول‌های سدیم آلژینات تنها، طبق روش فوق بدون اضافه کردن سوسپانسیون باکتری انجام شد تا با کپسول‌های حاوی باکتری مقایسه شوند.

بررسی اندازه و ریخت‌شناسی کپسول‌ها

حدود ۶۰۰ کپسول مرطوب و خشک حاوی باکتری و فاقد آن به طور تصادفی انتخاب و میانگین قطر آن‌ها با استفاده از استریومیکروسکوپ به روش میکرومتری اندازه‌گیری شدند.

برآورد جمعیت باکتری در کپسول

به منظور آزاد شدن سلول‌های باکتری، ابتدا کپسول‌ها (۱۰ عدد) در هاون چینی استریل حاوی محلول سرم فیزیولوژیک (۰/۹ درصد) کاملا پودر شدند پس از رقیق‌سازی، به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت بر روی محیط کشت نوترینت آگار ریخته شد. ظرف‌های کشت بعد از ۲۴ ساعت قرارگیری در دمای ۲±۲۸ درجهٔ سلسیوس بررسی گردید. سپس تعداد کلنی‌های تشکیل شده به عنوان واحدهای تشکیل‌دهندهٔ کلنی در کپسول برآورد و ثبت شد (Tu *et al*., 2015).

کارایی کپسولاسیون به عنوان تعداد سلول‌های زنده بارگذاری شده در کپسول تعریف می‌شود و بر اساس فرمول زیر (Wu *et al*., 2014) محاسبه می‌شود:

$$\text{Encapsulation efficiency } (\%) = \frac{N_0 - N_u}{N_0} \times 100$$

طبق معادله، N_u تعداد سلول‌های بارگذاری نشده و N_0 تعداد کل سلول‌های زنده استفاده شده در فرآیند کپسولاسیون (CFU/ml) می‌باشد.

تاثیر اشعه فرابنفش بر پایداری سلول در کپسول

جهت بررسی پایداری باکتری در حالت کپسول و غیرکپسول، کپسول‌های خشک و مرطوب (به تعداد ۳۰ عدد)، سوسپانسیونی از باکتری (به میزان ۱۰ میلی‌لیتر) درون پتری‌دیش‌ها ریخته و در معرض نور فرابنفش (لامپ ۳۰ وات، طول موج ۲۴۵ نانومتر) به فاصله‌ی ۵ سانتی‌متری قرار گرفتند و در زمان‌های مختلف (۰، ۳۰، ۶۰، ۱۲۰، ۲۴۰، ۳۶۰ و ۱۴۴۰ دقیقه) نمونه‌برداری انجام شد (Mancera–López *et al*., 2019; Maruyama *et al*., 2020). سپس نمونه‌ها روی محیط کشت نوترینت آگار به روش سری رقت کشت شدند. پس از شمارش کلنی‌های تشکیل شده بر روی محیط کشت، میزان زنده‌مانی سلول‌های باکتری بعد از تابش اشعه فرابنفش در هر زمان نسبت به جمعیت آن‌ها در زمان اولیه (قبل از تابش اشعه فرابنفش) محاسبه شد.

تاثیر دما بر ماندگاری سلول در کپسول

به منظور بررسی تاثیر دما بر قابلیت ماندگاری باکتری در حالت کپسول و غیرکپسول، کپسول‌های خشک و مرطوب، سوسپانسیونی از سلول باکتری در دماهای ۵، ۲۵ و ۳۵ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند و طی دوره‌های زمانی مختلف بر روی محیط کشت نوترینت آگار به منظور بررسی قابلیت زنده‌مانی کشت داده شدند. پس از شمارش کلنی‌های تشکیل شده، میزان زنده‌مانی سلول‌های باکتری بعد از قرارگیری در دماهای مختلف طی دوره‌های ۱۵ روزه

نسبت به جمعیت آن‌ها در زمان اولیه (قبل از قرارگیری در دماهای مختلف) محاسبه شد (Tu *et al*., 2015; Maruyama *et al*., 2020).

بررسی فعالیت مهارکنندگی در شرایط گلخانه

تهیه زادمایه بیمارگر و خاک آلوده

به منظور تهیه زادمایه قارچ بیمارگر، ابتدا دانه‌های سالم گندم به مدت یک شب در آب قرار گرفتن پس از خارج شدن آب اضافی به میزان ۳۰۰ گرم در ارلن‌های ۱ لیتری ریخته و در دو روز متوالی به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس اتوکلاو شدند. سپس شش دیسک ۵ میلی‌متری از حاشیه پرگنه‌ی فعال (کشت ۴ روزه) قارچ *R. solani* به داخل ارلن‌ها اضافه گردید. به منظور تکمیل رشد قارچ بر روی دانه‌های گندم، ارلن‌ها در دمای ۲±۲۷ درجه سلسیوس به مدت ۳–۴ هفته نگه‌داری شدند. زادمایه به دست آمده با خاک (ترکیب شن، ماسه و خاک‌برگ) سترون شده به میزان ۵ درصد مخلوط گردید (Razavi *et al*., 2021).

کاشت بذر در گلدان‌ها و تلقیح باکتری

بذرهای گوجه‌فرنگی از رقم سوپرچف ابتدا به مدت ۲ دقیقه توسط هیپوکلریت سدیم ۱ درصد ضدعفونی شدند. پس از شست‌وشو با آب مقطر سترون و خشک شدن، در داخل گلدان‌ها حاوی مخلوط خاک استریل (ترکیب شن، ماسه و خاک‌برگ) و زادمایه بیمارگر به میزان ۵ درصد قرار داده شدند. سپس غلظت‌های مختلفی از *B. subtilis* کپسوله (CFU/g ۱×۱۰^{۳}، ۵×۱۰^{۳}، $۱۰^{۴}$) و غیرکپسوله (CFU/ml ۱×۱۰^{۳} ، ۵×۱۰^{۳}، $۱۰^{۴}$) به ازای هر بذر اضافه شدند. برای هر گلدان ۵ بذر در نظر گرفته شد. پس از گذشت یک ماه و مشاهدهٔ علائم بیماری ارزیابی فاکتورهای رشدی گیاه شامل ارتفاع، وزن تر و وزن خشک قسمت‌های هوایی و ریشه مورد بررسی قرار گرفت و درصد بیماری با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Razavi *et al*., 2021).

$$\text{Percentage of DI} = \frac{\text{NO. of infected plants}}{\text{Total no of plants}} \times 100$$

تجزیه‌وتحلیل داده

آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار اجرا شد. داده‌ها توسط نرم افزار R.4.2.2تجزیه‌وتحلیل شدند و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن با در نظر گرفتن سطح اطمینان $p\leq$ ۰/۰۵ انجام شد.

نتایج

ویژگی‌های کپسول‌ها

ویژگی‌های ظاهری و اندازه کپسول‌های تهیه شده با و بدون باکتری در شکل ۱ نشان داده شده است. کپسول‌های مرطوب تقریبا کروی شکل و رنگ سفید شفاف داشتند به اندازه‌ی ۲۶۰۰ میکرومتر درحالی که کپسول‌های خشک شده چروکیده و زرد رنگ به اندازهٔ ۱۰۰۰ میکرومتر بودند.

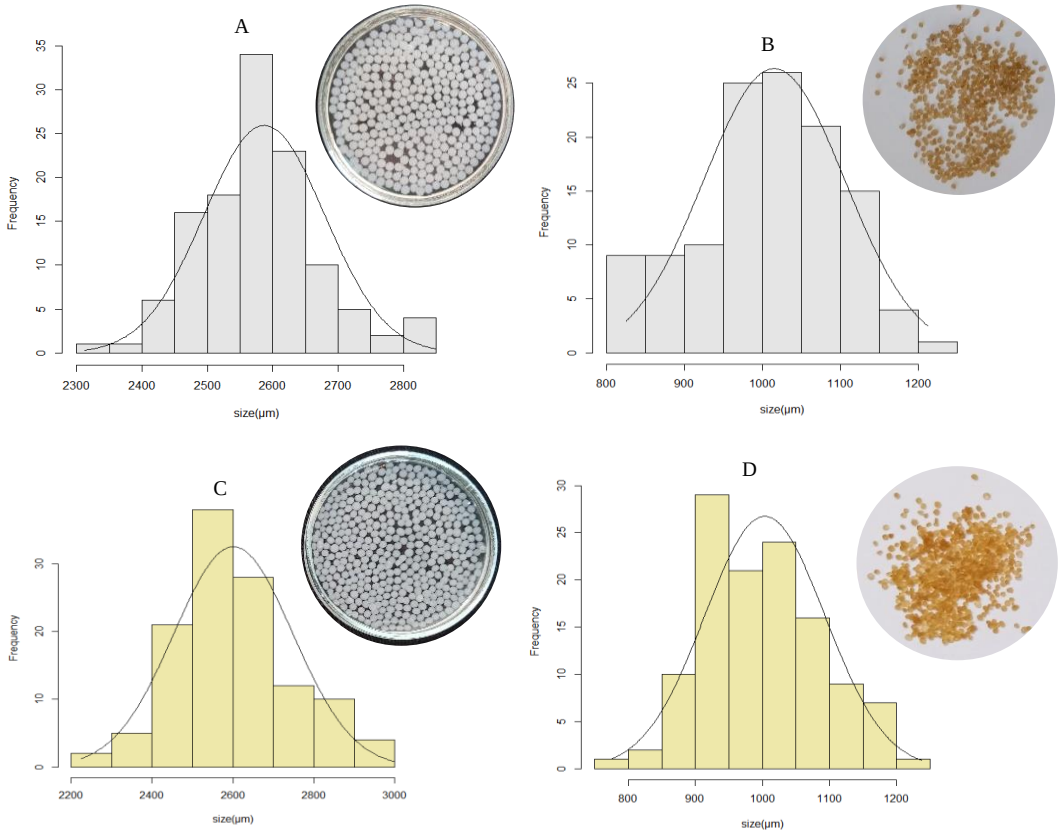
برآورد جمعیت سلول درون کپسول‌ها

تعداد سلول‌های *B. subtilis* در هر گرم کپسول $۳/۳ \times ۱۰^{۵}$ و بازده کپسولاسیون ۹۹ درصد برآورد گردید.

تاثیر اشعه فرابنفش بر ماندگاری باکتری در کپسول

نتایج تاثیر اشعه فرابنفش بر زنده‌مانی *B. subtilis* در حالت کپسول و غیرکپسول نشان داد بین تیمارها، مدت زمان قرارگیری در معرض UV و تاثیر تیمار × مدت زمان قرارگیری در معرض UV تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($p\leq0.001$ جدول‌های ۱ و ۲). نتایج مقایسه میانگین نشان داد باکتری در حالت کپسول (مرطوب و خشک) نسبت به حالت غیرکپسول (سوسپانسیون) مقاومت بیشتری در برابر اشعه فرابنفش داشت (جدول ۲، شکل ۲). در این خصوص با افزایش مدت زمان قرارگیری در معرض اشعه فرابنفش مقاومت سلول‌های باکتری در حالت کپسول نسبت به حالت غیرکپسول بیشتر بود. نتایج نشان داد پس از ۲۴ ساعت قرارگیری در معرض UV کاهش ۱۰۰ درصد در مورد سلول‌های آزاد مشاهده شد در حالی که در مورد

کپسول‌های خشک *B. subtilis* این میزان ۸۲ درصد برآورد گردید (جدول ۲).



شکل۱– ویژگی‌های ظاهری کپسول‌های مرطوب و خشک سدیم آلژینات (A، B) و *Bacillus subtilis* (C، D).

Fig. 1. Physical characteristics of wet and dry sodium alginate capsules (A, B) and *Bacillus subtilis* (C,D)

جدول۱– تجزیه‌وتحلیل واریانس پایداری نوری *Bacillus subtilis* در حالت کپسول و غیرکپسول

Table 1. Analysis of variance of the photostability of encapsulated and non–encapsulated *Bacillus subtilis*

Source of variation	df	Mean of Squares	F
Treatment	2	2050	58.06***
Duration of UV exposure	6	11441	324.04***
Treatment × Duration of UV exposure	12	414	11.73***
Residuals	63	35	
c.v.		10.04	

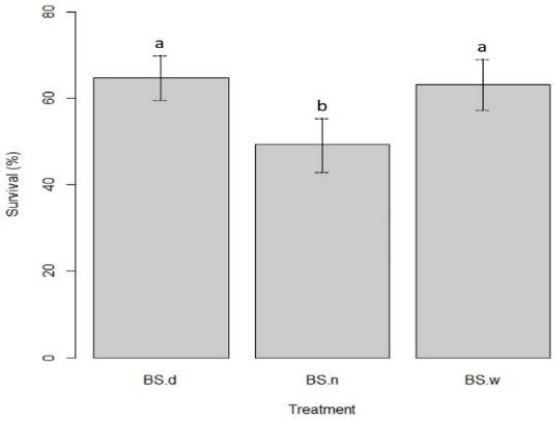
***= $p \leq 0.001$

جدول ۲– مقایسه میانگین پایداری نوری *Bacillus subtilis* در حالت کپسول خشک (BS.d)، مرطوب (BS.w) و غیرکپسول (BS.n).

Table 2. Means comparisons of photostability of *Bacillus subtilis* in the dry capsule (BS.d), wet capsule (BS.w) and non–capsule state (BS.n).

Time (min)	BS.w	BS.d	BS.n
0	$100.00^{a(A)*}$	$100.00^{a(A)}$	$100.00^{a(A)}$
30	$91.00^{b(A)}$	$88.00^{b(A)}$	$85.00^{b(A)}$
60	$78.75^{c(A)}$	$56.52^{b(B)}$	$51.12^{c(B)}$
120	$69.12^{d(B)}$	$83.43^{c(A)}$	$49.75^{c(C)}$
240	$49.12^{e(A)}$	$44.58^{c(AB)}$	$39.25^{d(B)}$
360	$51.87^{e(A)}$	$63.59^{d(A)}$	$19.99^{e(B)}$
1440	$3.00^{f(B)}$	$17.81^{e(A)}$	$0.00^{f(C)}$

* Means that have common letter(s) are not significant (Duncan test, $p \leq 0.05$). The letter(s) outside parentheses for each column and the letters inside parentheses for each row.



شکل ۲– درصد زنده‌مانی *Bacillus subtilis* در حالت کپسول خشک (BS.d)، مرطوب (BS.w) و غیرکپسول (BS.n)

Fig. 2. Survival percentage of *Bacillus subtilis* in the dry capsule (BS.d), wet capsule (BS.w) and non–capsule state (BS.n)

تاثیر دما بر ماندگاری سلول در کپسول

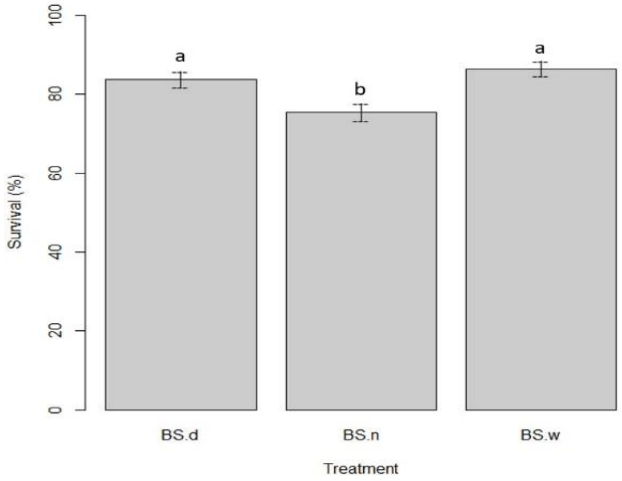
نتایج تجزیه واریانس قابلیت زنده‌ماندنی سلول‌های باکتری در کپسول‌ها تحت دما و زمان‌های مختلف در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد مقاومت نسبت به دما در *B. subtilis* کپسوله به طور قابل توجهی در مقایسه با حالت غیرکپسول بهبود یافته است. نتایج مقایسه میانگین نشان داد درصد زنده‌مانی *B. subtilis* در کپسول‌های خشک و مرطوب در مجموع دما و مدت زمان‌های مختلف نسبت به سلول‌های آزاد، بیشتر بود (شکل ۳). تغییر درصد زنده‌مانی در طول زمان در دمای ۵ درجه سلسیوس در هر سه گروه با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۴). اما درصد زنده‌مانی در مورد *B. subtilis* غیرکپسوله پس از ۶۰ روز قرارگیری در دمای ۲۵ و ۳۵ درجه سلسیوس به ترتیب ۴۲ و ۴۷ کاهش یافت. اما در رابطه با *B. subtilis* کپسوله (مرطوب) کاهش درصد زنده‌مانی پس از مدت زمان و دمای مشابه به ترتیب ۱۶/۵ و ۲۶ درصد برآورد گردید. بر اساس این نتایج، کپسول کردن تاثیر مثبتی بر ماندگاری *B. subtilis* در دمای ۲۵ و ۳۵ درجه سلسیوس نسبت به حالت غیرکپسول دارد. اما دمای ۵ درجه سلسیوس جهت نگه‌داری طولانی‌مدت مناسبت‌تر می‌باشد.

جدول ۳– تجزیه‌وتحلیل واریانس تاثیر دماهای مختلف بر درصد زنده‌مانی *Bacillus subtilis* در حالت کپسول خشک (BS.d)، مرطوب (BS.w) و غیرکپسول (BS.n)

Table 3. Analysis of variance of the effect of different temperatures on the survival percentage of *Bacillus subtilis* in dry capsule (BS.d), wet capsule (BS.w) and non–capsule state (BS.n)

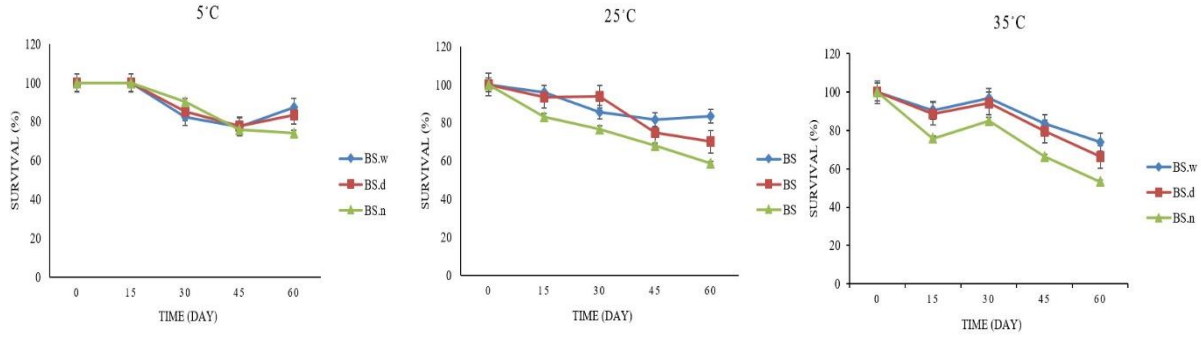
Source of variation	df	Mean of Squares	F
Treatment	2	1593.9	13.818***[a]
Temperature	2	622.3	5.393**
Day	3	3149.2	27.301***
Treatment ×Temperature	4	275.6	2.389
Treatment × Day	6	134.6	1.167
Temperature × Day	6	387.7	3.361**
Treatment ×Temperature × Day	12	31.1	0.270
Residuals	108	115.3	
c.v.		13.09	

a***= $p \leq 0.001$ and **= $p \leq 0.01$



شکل ۳– درصد زنده‌مانی *Bacillus subtilis* در حالت کپسول خشک (BS.d)، مرطوب (BS.w) و غیرکپسول (BS.n) تحت تاثیر دماهای مختلف

Fig. 3. Survival percentage of *Bacillus subtilis* in the dry capsule (BS.d), wet capsule (BS.w), and non–capsule state (BS.n) under the influence of different temperatures

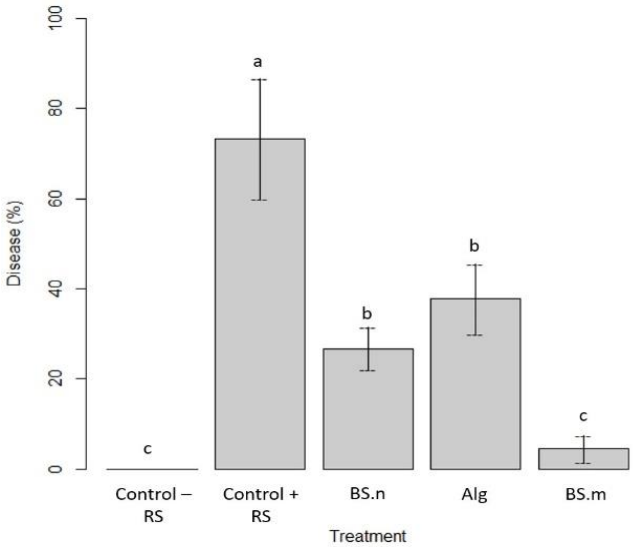


شکل ۴– درصد زنده‌مانی *B. subtilis* در حالت کپسول خشک (BS.d)، مرطوب (BS.w) و غیرکپسول (BS.n) طی ۶۰ روز نگه‌داری در دمای ۵، ۲۵ و ۳۵ درجه سلسیوس

Fig. 4. Survival percentage of *Bacillus subtilis* in the dry capsule (BS.d), wet capsule (BS.w), and non–capsule state (BS.n) at 5, 25 and 35°C for 60 days

بررسی فعالیت مهارکنندگی در شرایط گلخانه

نتایج بررسی گلخانه‌ای نشان داد درصد بیماری در گیاهان تیمار شده در مقایسه با شاهد کاهش یافت. درصد بیماری در گیاهان تیمار شده با باکتری کپسوله ۴/۴۴ درصد برآورد گردید درحالی‌که این میزان در شاهد ۷۳/۳۳ درصد بود. نتایج نشان داد که استفاده از فرمولاسیون کپسول *B. subtilis* باعث کاهش درصد بیماری نسبت به *B. subtilis* غیرکپسول و کپسول‌های سدیم آلژینات به تنهایی شد (شکل ۵). گیاهان تیمار شده با *B. subtilis* کپسوله از نظر شاخص‌های رشدی در مقایسه با شاهد تفاوت معنی‌داری داشتند (جدول ۴). تغییرات شاخص رشد در رابطه با فرمولاسیون‌های مختلف *B. subtilis* (کپسوله، غیرکپسوله) و کپسول‌های سدیم آلژینات تنها برای ارتفاع ریشه معنی‌دار بود (جدول ۴).



شکل ۵– تأثیر *Bacillus subtilis* کپسوله و غیرکپسوله بر درصد بیماری *R. solani*.

Fig. 5. The effect of capsulated and non–capsulated *Bacillus subtilis* on the disease percentage of *R. solani*.

جدول ۴– مقایسه میانگین شاخص‌های رشدی در گیاه گوجه‌فرنگی برای تأثیر *R. solani* در حضور و عدم حضور *B. subtilis*. (باکتری کپسوله= BS.m، غیرکپسوله = BS.n و کپسول‌های سدیم آلژینات به تنهایی = Alg)

Table 4. Means comparisons of growth parameters in tomato plant for influence of *R. solani* in presence and absence of *B. subtilis*. (capsulated bacteria = BS.m, non–capsulated bacteria = BS.n, and sodium alginate capsules alone = Alg)

Treatment	Shoot height (cm)	Root height (cm)	Shoot wet weight (g)	Root wet weight (g)	Shoot dry weight (g)	Root dry weight (g)
Control	4.22 [c*]	3.94 [bc]	0.13 [b]	0.036 [c]	0.010 [c]	0.0040 [b]
R. solani–	4.35 [bc]	3.47 [c]	0.15 [b]	0.038 [c]	0.011 [bc]	0.0030 [b]
+*R. solani* BS.m	5.67 [a]	5.63 [a]	0.24 [a]	0.11 [a]	0.019 [a]	0.0097 [a]
+*R. solani* BS.n	5.26 [ab]	4.70 [b]	0.21 [ab]	0.089 [ab]	0.017 [ab]	0.0065 [ab]
+*R. solani* Alg	5.21 [ab]	4.21 [bc]	0.21 [ab]	0.060 [bc]	0.017 [abc]	0.0058 [ab]

* Columns that have common letter(s) are not significant (Duncan test, $p \leq 0.05$).

بحث

توسعه فرمولاسیون‌های مناسب و مقرون به صرفه برای عوامل مهار زیستی، یک فرآیند مهم در صنعت کشاورزی و تولید تجاری است. که به منظور کاهش استفاده از آفتکش‌های شیمیایی و افزایش بهره‌وری در تولید محصولات کشاورزی انجام می‌شود. جهت توسعه فرمولاسیون کارآمد ابتدا باید عامل مهار زیستی مناسب را گزینش نمود سپس با توجه به خصوصیات آن، فرمولاسیون را تهیه کرد. در واقع کلید دستیابی به موفقیت، پس از یافتن میکروارگانیسم مفید، انتخاب فرمولاسیون مناسب برای حفظ بقا، کارایی و مقاومت عامل مهار زیستی در برابر شرایط نامساعد محیطی می‌باشد (Young *et al*., 2006). افزودن مستقیم باکتری به محیط به دلیل حساسیت به عوامل محیطی مانند رقابت بین میکروارگانیسم‌ها در خاک، شرایط نامطلوب فیزیکوشیمیایی، pH و دما باعث ایجاد مشکل در بقا و عملکرد آن می‌گردد (John *et al*., 2011).

کپسول کردن یا پوشش‌دهی باکتری‌ها روشی موثر برای محافظت از آن‌ها در برابر محیط‌های نامناسب است. علاوه بر این، سلول‌های محصور شده به صورت کنترل شده در طول زمان از کپسول‌ها آزاد می‌شوند (Bashan, 1998; Wu *et al*., 2012). یکی از مزیت‌های ارزشمند فرمولاسیون‌های کپسوله استفاده از پلیمرهای زیست‌سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر به عنوان مواد دیواره‌ی کپسول (یا حامل) می‌باشد (Poletto *et al*., 2008; Huang *et al*., 2009). روش‌های مختلفی در فرآیند کپسول کردن استفاده می‌شود که بسته به هدف و نوع میکروارگانیسم متفاوت است. روش ژلاسیون یونی به دلیل راحتی انجام کار، قابل مهار بودن و عدم استفاده از حلال‌های آلی یکی از مناسب‌ترین روش‌ها است (Maestrelli *et al*., 2008). کیفیت و کارآیی فرمولاسیون کپسوله به طور قابل توجهی تحت تأثیر حامل یا مواد دیواره‌ی کپسول قرار دارد (Bashan *et al*., 2014). سدیم آلژینات با توجه به خاصیت زیست‌تخریب‌پذیری، زیست‌سازگاری، در دسترس بودن، ماهیت غیرسمی، هزینه نسبتا کم، توانایی مقاومت در برابر شرایط اسیدی خاک و به دام انداختن تعداد زیادی سلول زنده و اجازه انتشار آهسته و پیشرونده آن‌ها، حامل مناسبی برای پوشش‌دهی عوامل مهارزیستی می‌باشد (Rodrigues *et al*, 2020; Martínez–Cano *et al*, 2022).

در پژوهش حاضر از روش ژلاسیون یونی برای تولید کپسول‌های سدیم آلژینات حاوی سلول‌های *B. subtilis* استفاده شد. کپسول‌های مرطوب تقریبا کروی شکل و رنگ سفید شفاف داشتند به اندازه‌ی ۲۶۰۰ میکرومتر درحالی که کپسول‌های خشک شده چروکیده و زرد رنگ به اندازهٔ ۱۰۰۰ میکرومتر بودند. به طور کلی، اندازه و شکل کپسول‌ها

عمدتا توسط ویسکوزیته محلول آلژینات، قطر نازل، غلظت کلسیم کلرید، نرخ جریان محلول و فاصله بین نازل‌ها تا حمام ژل‌سازی تعیین می‌شود (Jurić *et al*., 2019). در شرایط آزمایشی ما، کپسول‌های تهیه شده تقریباً کروی بودند. Wu *et al*. (2014) و Tu *et al*. (2015) نتایج مشابهی را مشاهده کرده‌اند.

ارزیابی و موفقیت کپسول کردن میکروارگانیسم‌ها به عوامل مختلفی مانند راندمان کپسوله‌سازی، میزان بقا، رهاسازی، سازگاری با مواد حامل و فعالیت مهار زیستی بستگی دارد (Adzmi *et al*., 2021). با توجه به مطالعه حاضر، راندمان کپسولاسیون بسیار بالا و تقریبا ۹۹ درصد برآورد شد.

ماندگاری یکی از مهمترین عوامل در تولید تجاری عوامل بیولوژیکی است. در طول ذخیره‌سازی، زنده ماندن میکروارگانیسم‌های مختلف در محدوده دمایی ۴ تا ۳۷ درجه سلسیوس کاهش می‌یابد (Fu & Chen, 2011). نتایج تحقیق حاضر نشان داد، کپسول کردن تاثیر مثبتی بر بقا و ماندگاری *B. subtilis* در دمای ۲۵ و ۳۵ درجه سلسیوس نسبت به حالت غیرکپسول دارد. اما دمای ۵ درجه سلسیوس جهت نگه‌داری طولانی‌مدت مناسبت‌تر می‌باشد. طبق بررسی He *et al*., (2016)، باکتری *P. putida* Rs–198 به صورت کپسول نرخ زنده‌مانی بالاتری داشت. قابلیت زنده‌مانی بالای باکتری *B. subtilis* کپسوله با حداقل تلفات سلول به مدت ۵ ماه در بررسی Young *et al*. (2006) مشاهده شد.

نتایج تاثیر اشعه فرابنفش بر زنده‌مانی *B. subtilis* در حالت کپسول و غیرکپسول نشان داد، باکتری در حالت کپسول (مرطوب و خشک) نسبت به حالت غیرکپسول (سوسپانسیون) مقاومت بیشتری در برابر اشعه فرابنفش داشت. در این خصوص با افزایش مدت زمان قرارگیری در معرض اشعه فرابنفش مقاومت سلول‌های باکتری در حالت کپسول نسبت به حالت غیرکپسول بیشتر بود. نتایج نشان داد پس از ۲۴ ساعت قرارگیری در معرض UV کاهش ۱۰۰ درصد در مورد سلول‌های آزاد مشاهده شد در حالی که در مورد کپسول‌های خشک *B. subtilis* این میزان ۸۲ درصد برآورد گردید. Chen *et al*. (2013) مشاهده کردند فرمولاسیون میکروکپسول به دلیل محافظت از باکتری *B. cereus* C1L در برابر شرایط نامساعد، فعالیت آن را افزایش می‌دهد. طبق نتایج Ma *et al*. (2015) مدت ماندگاری باکتری *B. subtilis* B99–2 به صورت فرمولاسیون میکروکپسول بیشتر شد.

نتایج به‌دست‌آمده از مقایسه کپسول‌های خشک و مرطوب *B. subtilis* تفاوت معنی‌داری بین آن‌ها نشان نداد. هر دو حالت (خشک و مرطوب) محافظت موثری از باکتری در برابر دما و اشعه فرابنفش داشتند. اما انتخاب کپسول‌های خشک از دیدگاه تجاری‌سازی انتخاب مناسب‌تری خواهد بود. این امر عمدتا به ذخیره‌سازی و کاربرد راحت آن‌ها نسبت داده می‌شود.

نتایج بررسی گلخانه‌ای نشان داد استفاده از فرمولاسیون کپسول *B. subtilis* باعث کاهش درصد بیماری نسبت به *B. subtilis* غیرکپسول و کپسول‌های سدیم آلژینات به تنهایی شد. گیاهان تیمار شده با *B. subtilis* کپسوله از نظر شاخص‌های رشدی در مقایسه با شاهد تفاوت معنی‌داری داشتند. تغییرات شاخص رشد در رابطه با فرمولاسیون‌های مختلف *B. subtilis* (کپسوله، غیرکپسوله) و کپسول‌های سدیم آلژینات تنها برای ارتفاع ریشه معنی‌داری بود. این نتایج بر نقش مثبت تاثیر استفاده از *B. subtilis* و فرمولاسیون کپسول در کنترل مرگ گیاهچه در گیاه گوجه‌فرنگی دارد.

نتایج Hernandez–Suarez *et al*. (2011) نشان داد استفاده از *B. subtilis* میکروکپسوله تاثیر مناسبی بر رشد گیاه، سطح برگ، زیست توده و عملکرد گوجه‌فرنگی داشت. علاوه بر این، منجر به کاهش خسارات پژمردگی ناشی از *R. solani* و *F. oxysporum* شد. Guo *et al*. (2012) بیان کرد استفاده هم‌زمان از *Klebsiella oxytoca* کپسوله و سه سویه *B.subtilis* در کنترل *R. solani* موثر بوده است. طبق نتایج kim *et al*. (2012) میکروکپسول‌های *P. agglomerans* strain E325، پتانسیل کنترل *E. amylovora* را در سیب و گلابی دارا بودند. Tu *et al*. (2015) گزارش کردند *B. subtilis* SL–13 میکروکپسوله

منجر به افزایش درصد جوانه زنی بذر، رشد و طول ریشه می‌گردد. طبق بررسی Ma *et al*., (2015)، *B. subtilis* B99–2 میکروکپسوله قابلیت مهار بالاتری در برابر *R. solani* گوجه‌فرنگی در شرایط مزرعه داشت. He *et al*., (2016) نشان داد، *P. putida* Rs–198 کپسوله به طور قابل توجهی زیست توده پنبه را تحت تنش شوری افزایش داد. فرمولاسیون میکروکپسول منجر به محافظت و رهاسازی تدریجی *P. putida* می‌گردد. علاوه بر این، استقرار و کلونیزاسیون آن‌ها را روی ریشه‌ها افزایش می‌دهد. لذا منجر به افزایش رشد و بهره‌وری گیاهان فلفل قرمز می‌گردد (Hernández Montiel *et al*., 2018). بررسی Saberi–Rise & Moradi–pour (2019) نشان داد، *B. subtilis* کپسوله نسبت به حالت غیرکپسوله بازدارندگی بیشتری در برابر *R. solani* داشت. تلقیح سیب‌زمینی با سویه‌های *P. fluorescens* کپسوله منجر به کاهش بروز بیماری *F. solani* شد (Pour *et al*., 2019). به گفته Saberi-Riseh & Moradi–pour (2021) کپسول‌های *Streptomyces fulvissimus* Uts22 به طور موثر تا ۹۰ درصد بیماری پاخوره در گندم را کنترل کردند.

نتایج بررسی حاضر بیانگر آن است که استفاده از فرمولاسیون کپسول، ماندگاری و زنده‌مانی *B. subtilis* را نسبت به حالت غیرکپسول افزایش می‌دهد. علاوه بر آن می‌تواند فعالیت مهارکنندگی آن را نیز بهبود بخشد. لذا یافته‌های حاصل از این پژوهش، اطلاعات ارزشمندی را در رابطه با کاربرد عملی قارچ‌کش‌های میکروبی مبتنی بر فرمولاسیون کپسول ارائه می‌دهد و چشم‌انداز روشنی از کاربرد فرمولاسیون کپسول *B. subtilis* به عنوان جایگزین مؤثر جهت کاهش مصرف آفتکش‌های شیمیایی را نمایان می‌سازد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از همکاری کلکسیون میکروبی پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج و سرکار خانم دکتر موسیوند جهت در اختیار قرار دادن جدایه باکتری، صمیمانه سپاسگزاری می‌گردد.

References

Ab Rahman, S.F.S., Singh, E., Pieterse, C.M. & Schenk, P.M. 2018. Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. Plant Science, 267: 102–111.

Adzmi, F., Musa, M.H., Siddiqui, Y., Yun, W.M., Hamid, H. A., Abdu, A. & Abiri, R. 2021. Development of Alginate–Montmorillonite–Starch with Encapsulated *Trichoderma harzianum* and Evaluation of Conidia Shelf Life. International Journal of Agriculture and Biology, 26(01): 87–96.

Bashan, Y. 1998. Inoculants of plant growth–promoting bacteria for use in agriculture. Biotechnology advances, 16(4): 729–770.

Bashan, Y., de–Bashan, L.E., Prabhu, S.R. & Hernandez, J.P. 2014. Advances in plant growth–promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998–2013). Plant Soil, 378: 1–33.

Calabi–Floody, M., Medina, J., Rumpel, C., Condron, L.M., Hernandez, M., Dumont, M. & de La Luz Mora, M. 2018. Smart fertilizers as a strategy for sustainable agriculture. Advances in agronomy, 147: 119–157.

Chen, K.N., Chen, C.Y., Lin, Y.C. & Chen, M.J. 2013. Formulation of a novel antagonistic bacterium based biopesticide for fungal disease control using microencapsulation techniques. Journal of Agricultural Science, 5(3): 153.

Dobrinˇci´c, A., Balbino, S., Zori´c, Z., Pedisi´c, S., Bursa´c Kovaˇcevi´c, D., Elez Garofuli´c, I. & Dragovi´c–Uzelac, V. 2020. Advanced technologies for the extraction of marine brown algal polysaccharides. Marine drugs, 18(3): 168.

dos Santos, G.F., Locatelli, G.O., Coêlho, D.A., Botelho, P.S., Amorim, M.S., de Vasconcelos, T.C.L. & Bueno, L.A. 2015. Factorial design, preparation and characterization of new beads formed from alginate, polyphosphate and glycerol gelling solution for microorganism microencapsulation. Journal of Sol–Gel Science and Technology, 75(2): 345–352.

Fraceto, L.F., Maruyama, C.R., Guilger, M., Mishra, S., Keswani, C., Singh, H.B. & de Lima, R. 2018. *Trichoderma harzianum*–based novel formulations: potential applications for management of Next–Gen agricultural challenges. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 93(8): 2056–2063.

Fu, N. & Chen, X.D. 2011. Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. Food Research International, 44(5): 1127–1149.

Guo, L., Wu, Z., Rasool, A. & Li, C. 2012. Effects of free and encapsulated co–culture bacteria on cotton growth and soil bacterial communities. European Journal of soil biology, 53: 16–22.

He, Y., Wu, Z., Ye, B.C., Wang, J., Guan, X. & Zhang, J. 2016. Viability evaluation of alginate–encapsulated *Pseudomonas putida* Rs–198 under simulated salt–stress conditions and its effect on cotton growth. European journal of soil biology, 75: 135–141.

Hernandez–Suarez, M., Hernandez–Castillo, F.D., Gallegos–Morales, G., Lira–Saldivar, R.H., Rodríguez–Herrera, R. & Aguilar, C.N. 2011. Biocontrol of soil fungi in tomato with microencapsulates containing *Bacillus subtilis*. American Journal of Agricultural and Biological Sciences, 6(2): 189–195.

Hernández Montiel, L.G., Chiquito Contreras, R.G., Castillo Rocha, D.G., Chiquito Contreras, C.J., Vidal Hernández, L. & Beltrán Morales, F.A. 2018. Effect of microcapsules of *Pseudomonas putida* on growth and yield of red pepper. Revista mexicana de ciencias agrícolas, 9(SPE20): 4223–4233.

Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I. & Monte, E. 2012. Plant–beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. Microbiology, 158(1):17–25.

Huang, W., Wang, Y., Ren, L., Du, C. & Shi, X. 2009. A novel PHBV/HA microsphere releasing system loaded with alendronate. Materials Science and Engineering: C, 29(7): 2221–2225.

Jing, H.U., Zuobing, X.I.A.O., Rujun, Z.H.O.U., Shuangshuang, M.A., Mingxi, W.A.N.G. & Zhen, L.I. 2011. Properties of aroma sustained–release cotton fabric with rose fragrance nanocapsule. Chinese Journal of Chemical Engineering, 19(3): 523–528.

John, R.P., Tyagi, R.D., Brar, S.K., Surampalli, R.Y. & Prévost, D. 2011. Bio–encapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery. Critical reviews in biotechnology, 31(3): 211–226.

Jurić, S., Đermić, E., Topolovec–Pintarić, S., Bedek, M. & Vinceković, M. 2019. Physicochemical properties and release characteristics of calcium alginate microspheres loaded with *Trichoderma viride* spores. Journal of Integrative Agriculture, 18(11): 2534–2548.

Khedher, S.B., Mejdoub–Trabelsi, B. & Tounsi, S. 2021. Biological potential of *Bacillus subtilis* V26 for the control of *Fusarium* wilt and tuber dry rot on potato caused by *Fusarium* species and the promotion of plant growth. Biological Control, 152: 104444.

Khimmakthong, U., Khumpouk, P., Saichanaphan, N., Intarasin., Y. & Tirawanichakul, K. 2020. The Efficiency of Microencapsulation with Alginate, Gelatin, and Chitosan on the Survival of *Bacillus subtilis.* Chiang Mai University Journal of Natural Sciences, 19(4): 684.

Kim, I.Y., Pusey, P.L., Zhao, Y., Korban, S.S., Choi, H. & Kim, K.K. 2012. Controlled release of *Pantoea agglomerans* E325 for biocontrol of fire blight disease of apple. Journal of controlled release, 161(1): 109–115.

Leong, J.Y., Lam, W.H., Ho, K.W., Voo, W.P, Lee, M.F. X., Lim, H.P., Lim, S.L., Tey, B.T., Poncelet, D. & Chan, E.S. 2016. Advances in fabricating spherical alginate hydrogels with controlled particle designs by ionotropic gelation as encapsulation systems. Particuology, 24: 44–60.

Locatelli, G.O., dos Santos, G.F., Botelho, P.S., Finkler, C.L.L. & Bueno, L.A. 2018. Development of *Trichoderma* sp. formulations in encapsulated granules (CG) and evaluation of conidia shelf–life. Biological control, 117: 21–29.

Ma, X., Wang, X., Cheng, J., Nie, X., Yu, X., Zhao, Y. & Wang, W. 2015. Microencapsulation of *Bacillus subtilis* B99–2 and its biocontrol efficiency against *Rhizoctonia solani* in tomato. Biological control, 90: 34–41.

Maestrelli, F., Zerrouk, N., Cirri, M., Mennini, N. & Mura, P. 2008. Microspheres for colonic delivery of ketoprofen–hydroxypropyl–β–cyclodextrin complex. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 34: 1–11.

Martínez–Cano, B., Mendoza–Meneses, C.J., García–Trejo, J.F., Macías–Bobadilla, G., Aguirre–Becerra, H., Soto–Zarazúa, G.M. & Feregrino–Pérez, A.A. 2022. Review and perspectives of the use of alginate as a polymer matrix for microorganisms applied in agro–industry. Molecules, 27(13): 4248.

Maruyama, C.R., Bilesky–José, N., de Lima, R. & Fraceto, L.F. 2020. Encapsulation of *Trichoderma harzianum* Preserves Enzymatic Activity and Enhances the Potential for Biological Control. Frontiers in bioengineering and biotechnology, 8: 225.

Mancera–López, M.E., Izquierdo–Estévez, W.F., Escalante–Sánchez, A., Ibarra, J.E. & Barrera–Cortés, J. 2019. Encapsulation of *Trichoderma harzianum* conidia as a method of conidia preservation at room temperature and propagation in submerged culture. Biocontrol Science and Technology, 29(2): 107–130.

McFarland, J. 1907. The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. Journal of the American Medical Association, 49(14): 1176–1178.

Mousivand, M., Jouzani, G., Monazah, M. & Kosari, M. 2012. Characterization and antagonistic potential of some native biofilm and surfactant producing *Bacillus subtilis* strain against six pathotypes of *Rhizoctonia solani*. Journal of plant pathology, 171: 180.

Pacheco–Aguirre, J., Ruiz–Sanchez, E., Reyes–Ramírez, A., Cristóbal–Alejo, J., Tun–Suárez, J. & Borges–Gómez, L. 2016. Polymer–based encapsulation of *Bacillus subtilis* and its effect on *Meloidogyne incognita* in tomato. Phyton–International Journal of Experimental Botany, 85: 1–6.

Paulo, F. & Santos, L. 2017. Design of experiments for microencapsulation applications: a review. Materials Science and Engineering: C, 77: 1327–1340.

Pinpimai, K., Rodkhum, C., Chansue, N., Katagiri, T., Maita, M. & Pirarat, N. 2015. The study on the candidate probiotic properties of encapsulated yeast, *Saccharomyces cerevisiae* JCM7255, in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Research in Veterinary Science, 102: 103–111.

Poletto, F.S., Jäger, E., Cruz, L., Pohlmann, A.R. & Guterres, S.S. 2008. The effect of polymeric wall on the permeability of drug–loaded nanocapsules. Materials Science and Engineering: C, 28(4): 472–478.

Pour, M.M., Saberi–Riseh, R., Mohammadinejad, R. & Hosseini, A. 2019. Investigating the formulation of alginate–gelatin encapsulated *Pseudomonas fluorescens* (VUPF5 and T17–4 strains) for controlling *Fusarium solani* on potato. International journal of biological macromolecules, 133: 603–613.

Razavi, S.E., Sanei, S.J., Sharbatkhari, M., & Ghorbani nasrabadi, R. 2021. Detection and isolation of soil fungi and fungus–like. Peyk–e Reyhan Gorgan Publication, 384p. (In Persian with English Summary).

Rodrigues, S., da Costa, A.M.R. & Grenha, A. 2012. Chitosan/carrageenan nanoparticles: effect of cross–linking with tripolyphosphate and charge ratios. Carbohydrate polymers, 89(1): 282–289.

Rodrigues, F.J., Cedran, M.F., Bicas, J.L. & Sato, H.H. 2020. Encapsulated probiotic cells: Relevant techniques, natural sources as encapsulating materials and food applications–A narrative review. Food research international, 137: 109682.

Saberi–Rise, R. & Moradi–Pour, M. 2019. The effect of *Bacillus subtilis* Vru1 encapsulated in alginate–bentonite coating enriched with titanium nanoparticles against *Rhizoctonia solani* on bean. International journal of biological macromolecules, 152: 1089–1097.

Saberi-Riseh, R. & Moradi-Pour, M. 2021. A novel encapsulation of *Streptomyces fulvissimus* Uts22 by spray drying and its biocontrol efficiency against *Gaeumannomyces graminis*, the causal agent of take-all disease in wheat. Pest Management Science, 77(10): 4357–4364.

Souza, F.N., Gebara, C., Ribeiro, M.C.E., Chaves, K.S., Gigante, M.L. & Grosso, C.R.F. 2012. Production and characterization of microparticles containing pectin and whey proteins. Food Research International, 49(1): 560–566

Tu, L., He, Y., Yang, H., Wu, Z. & Yi, L. 2015. Preparation and characterization of alginate–gelatin microencapsulated *Bacillus subtilis* SL–13 by emulsification/internal gelation. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 26(12): 735–749.

Vemmer, M. & Patel, A.V. 2013. Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. Biological Control, 67(3): 380–389.

Wu, Z., Guo, L., Qin, S. & Li, C. 2012. Encapsulation of *R. planticola* Rs–2 from alginate–starch–bentonite and its controlled release and swelling behavior under simulated soil conditions. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 39(2): 317–327.

Wu, Z., He, Y., Chen, L., Han, Y. & Li, C. 2014. Characterization of *Raoultella planticola* Rs–2 microcapsule prepared with a blend of alginate and starch and its release behavior. Carbohydrate polymers, 110: 259–267.

Young, C.C., Rekha, P.D., Lai, W.A. & Arun, A.B. 2006. Encapsulation of plant growth-promoting bacteria in alginate beads enriched with humic acid. Biotechnology and bioengineering, 95(1): 76–83.

Zhang, F., Ge, H., Zhang, F., Guo, N., Wang, Y., Chen, L., Ji, X. & Li, C. 2016. Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T–aloe against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. Plant Physiology and Biochemistry, 100: 64–74.

Zhu, J., Wang, J., Ding, Y., Liu, B. & Xiao, W. 2018. A system–level approach for investigating organophosphorus pesticide toxicity. Ecotoxicology and environmental safety, 149: 26–35.

Preparation of *Bacillus subtilis* capsule formulation and evaluation of its efficacy in controlling damping–off in tomato caused by *Rhizoctonia solani* under greenhouse conditions

Elahe Lotfalinezhad[1], Abdolhossein Taheri[2], Seyed Esmaeil Razavi[3], Seyed Javad Sanei[4]

1., 2., 3., 4. Ph.D. student of plant pathology, Associated Professor, Assistant Professor, Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of plant production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

Corresponding author: Abdolhossein Taheri, email: a.taheri@gau.ac.ir

Received: Aug., 14, 2023 10(2) 125–139 Accepted: Nov., 18, 2023

Abstract

The use of biocontrol agents is a promising and safe method towards achieving environmental goals for controlling plant diseases. However, due to the lack of stability and appropriate and applicable formulations, the results obtained from the application of these agents, especially in agricultural fields, have not been sufficiently efficient. This study was conducted with the aim of developing a capsule formulation using sodium alginate to increase the viability and improve the performance of *Bacillus subtilis*. Capsules were prepared using the ionic gelation method. The encapsulation efficiency was estimated to be 99%. The mean size of the wet and dry capsules produced was 2600 and 1000 micrometers, respectively. The effects of ultraviolet radiation on the survival of *B. subtilis* showed that the bacterium in the capsule state (wet and dry) was more resistant to ultraviolet radiation compared to the non–encapsulated state. With increasing exposure time to ultraviolet light, bacterial cells resistance in the capsule state were greater than in the non–encapsulated state. The results of the thermal resistance examination at different temperatures emphasized the positive role of the capsules in increasing the survival and resistance of *B. subtilis* compared to the non–encapsulated state. The survival percentage of non–encapsulated *B. subtilis* after 60 days at 25 and 35 degrees Celsius decreased by 42% and 47%, respectively. However, for the encapsulated *B. subtilis*, the survival percentage decrease after the same period and temperature was estimated to be 16.5% and 26%, respectively. Greenhouse results showed that the use of *B. subtilis* capsule formulation reduced disease percentage compared to non–encapsulated *B. subtilis* and sodium alginate capsules alone. The disease percentage in plants treated with encapsulated *B. subtilis* was estimated to be 4.44%, while this rate was 73.33% in the control. Plants treated with encapsulated B. subtilis had significant differences in growth indices compared to the control. Growth index changes in relation to different formulations of *B. subtilis* (encapsulated, non–encapsulated) and sodium alginate capsules alone were significant only for root height. These results emphasize the positive role of using *B. subtilis* and capsule formulation in controlling damping–off caused by *Rhizoctonia solani* in tomato plants.

Keywords: Capsule formulation, *Bacillus subtilis*, increased viability, *Rhizoctonia solani*.