Iranian Journal of Plant Protection Science
Vol 52, No 1, Spring and Summer 2021 (81-89)
DOI: 10.22059/ijpps.2020.301765.1006942

دانش گیاهپزشکی ایران
دورۀ ۵۲، شمارۀ ۱، بهار و تابستان ۱۴۰۰ (۸۹ص-۸۱)

بهبود تعلیق‌پذیری، ماندگاری و زهرآگینی فرآورده‌های تجاری باکتری *Bacillus thuringiensis*

زهرا اشجعی[۱]، رضا طلایی حسنلویی*[۲]، آیدا خرم نژاد[۳] و خلیل طالبی جهرمی[۲]
۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد حشره‌شناسی کشاورزی، گروه گیاه پزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران.
۲- استاد حشره‌شناسی کشاورزی، گروه گیاه پزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران.
۳- دانش آموخته دکتری حشره‌شناسی کشاورزی، گروه گیاه پزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران.
(تاریخ دریافت: ۹۹/۰۳/۱۱- تاریخ پذیرش:۹۹/۰۵/۱۴)

چکیده

هدف از این مطالعه، تعیین اثر برخی مواد افزودنی در بهبود ماندگاری و تعلیق‌پذیری فرمولاسیون پودر وتابل باکتری ***Bacillus thuringiensis*** (**Bt**) تهیه شده در آزمایشگاه و فرآورده‌های تجاری (**A** و **B**) بود. برای تهیه پودر وتابل بهینه از پودر خشک شده سوسپانسیون باکتری به همراه ساکارز، لاکتوز، آلجینات سدیم، فیبر نارگیل، سیلیکات آلومینیوم، در دو تیمار استفاده شد، که مبنای تفاوت دو تیمار سیلیکات آلومینیوم (فرمولاسیون بهینه شده ۱) و فیبر نارگیل (فرمولاسیون بهینه شده۲) قرار گرفت. حشره‌کشی پودر وتابل بهینه، روی لاروهای شب‌پره پشت الماسی، ***Plutella xylostella*** **(L.) (Lep.: Plutellidae)** مورد آزمون قرار گرفت. نتایج حاصل از بررسی مقایسه‌ای ماندگاری، نشان‌دهنده تأثیر مثبت این مواد در حفظ انبارداری فرمولاسیون بود. میزان تعلیق‌پذیری فرمولاسیون تهیه شده، ۷۰ درصد ثبت شد که در مقایسه با تعلیق‌پذیری فرمولاسیون‌های تجاری **A** و **B** موجود در بازار، بطور معنی-داری بالاتر بود. نتایج نشان داد که افزودن ساکارز در هر دو فرآورده موجب افزایش زهرآگینی (کاهش مقادیر **LC_{50}**) شد در حالی که فاکتور تعلیق‌پذیری، بسته به نوع و ماهیت فرآورده متفاوت عمل کرد. در نهایت افزودن مواد همراه انتخابی ارزان قیمت و در دسترس، موجب بهبود ویژگی‌های فیزیکی و زیستی فرمولاسیون‌های باکتری **Bt** شد که این امر در توسعه استفاده از این آفت‌کش میکروبی تأثیر بسزایی دارد.

واژه‌های کلیدی: آفت‌کش میکروبی، پودر وتابل، بهینه‌سازی، فرمولاسیون، ، *Plutella xylostella*.

Optimizing suspensibility, stability and virulence of commercial products of *Bacillus thuringiensis*

Z. Ashjaei[1], R. Talaei-Hassanloui[2*], A. Khorramnejad[3] and Kh. Talebi-Jahromi [2]
1. M.Sc. graduated, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
2. Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. 3. Ph.D. graduated, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
(Received: May 31, 2020 - Accepted: August 4, 2020)

ABSTRACT

The purpose of this study was to determine the effect of some additives on stability and suspensibility of wettable powder (WP) formulation of *Bacillus thuringiensis* (Bt) in laboratory products (optimized formulation) and commercial formulations. For preparation of optimized formulation; sucrose, lactose, sodium alginate, coconut fiber and aluminum silicate were added to the dried powder of bacterial product in two different treatments; which were different in aluminum silicate (optimized formulation 1) and coconut fiber (optimized formulation 2). The efficacy and toxicity of wettable powders were tested on diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lep.: Plutellidae) larvae. The results of various tests for stability showed that the additives had positive effects on the storage life of the optimized formulation. The suspensibility of the optimized formulations (70%) was significantly higher than those of the commercial formulations. Our results showed that adding sucrose in both commercial products caused an increase in toxicity (lower LC_{50s}), whereas, the suspensibility parameter varied depending on the type and feature of the products. In conclusion, selecting low-cost and available additives would improve the physical and biological characteristics of Bt formulations, which has a significant effect on the development and application of biopesticides.

Keywords: wettable powder, optimization, microbial pesticide, formulation, *Plutella xylostella***.**

* Corresponding author E-mail: rtalaei@ut.ac.ir

مقدمه

سالانه حدود ۳۰ هزار تن آفت‌کش شیمیایی در کشاورزی کشور مصرف می‌شود که برای بخش قابل توجهی از آن، می‌توان استفاده از آفت‌کش‌های میکروبی را جایگزین مناسبی دانست (Khorramvatan *et al.*, 2014)، گزارش ریاست سازمان حفظ نباتات، ۱۳۹۸- (https://www.irna.ir/news/83289319). در بین عوامل میکروبی، باکتری‌ها، به‌ویژه باکتری *Bacillus thuringiensis* (Bt) به علت تنوع سویه‌ای زیاد، کارایی بالا و دامنه اثر اختصاصی و همچنین ایمنی زیستی، در سطح جهانی جایگاه ویژه‌ای پیدا کرده است و تقریبا ۸۰ درصد از بازار جهانی آفت‌کش‌های زیستی را شامل می‌شود (Palma, 2017). این باکتری می‌تواند بیش از ۳۰۰۰ گونه از حشرات و آفات متعلق به راسته‌های بالپولکداران، قاب‌بالان و دوبالان را کنترل کند (Lacey *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2016). بیشتر فرمولاسیون‌های باکتری Bt دارای اسپور و کریستال پروتئینی باکتری هستند، اما در بعضی از محصولات اسپورها غیرفعال می‌باشند(Khaliq and Haquz, 2007) . مخلوط اسپور و کریستال باید همراه ماده بی‌اثر مناسبی باشد، تا منجر به حفاظت از مخلوط اسپور-کریستال تهیه شده، افزایش پذیرش این مخلوط توسط حشرات و جلوگیری از تأثیرات محیطی بر خواص حشره‌کشی فرآورده مبتنی بر Bt شود (Rosas-García *et al.*, 2009). اکثر پژوهش‌های صورت گرفته بر روی مواد همراه فرمولاسیون‌های آفت‌کش‌های زیستی، روی ترکیباتی متمرکز شده‌اند که منجر به افزایش سمیت فرمولاسیون برای آفت هدف و یا افزایش جلب حشرات شود (Goerge and Crickmore, 2012).

برخی از این ترکیبات مانند اسید بوریک (Morris *et al.*, 1995) و Camptothecin (Sun *et al.*, 2012) اثر سینرژیستی داشته و برخی دیگر مانند Coax، Pred و Gustole (Sneh *et al.*,1983) محرک تغذیه می‌باشند. آلجینات سدیم (Zhang *et al.*, 2016)، پسماند زیتون (Jallouli *et al.*, 2014) و نشاسته غیرغذایی (Singh *et al.*, 2007) از آفت‌کش زیستی در برابر اشعه ماورای بنفش و شرایط محیطی حفاظت می‌کنند. فرمولاسیون‌های پودر وتابل، سوسپانسیون و گرانول، سه فرمولاسیون رایج باکتری Bt می‌باشند. انتخاب نوع فرمولاسیون برای تولید انبوه عوامل کنترل میکروبی با در نظر گرفتن معیارهای مختلفی از جمله کاربرد، حمل و نقل، انبارداری، پایداری قدرت فرمولاسیون، هزینه تولید، عدم ایجاد مسمومیت برای گیاه صورت می‌گیرد (Bryant, 1994). در میان فرمولاسیون‌های خشک، فرمولاسیون پودر وتابل بیشترین توجه را به خود جلب کرده است. حمل و نقل، نگه‌داری و کاربرد آسان، کم‌خطر بودن برای کاربر، صرفه‌ی اقتصادی و عدم نیاز به غلظت زیاد از مواد نگه‌دارنده، از جمله ویژگی‌های فرمولاسیون‌های پودر وتابل می‌باشد. قابلیت تعلیق (سوسپانسیون) و پایداری هنگام ذخیره‌سازی از عوامل تأثیرگذار بر کیفیت فرمولاسیون پودر وتابل است (Couch and Jurat-Fuentes, 2013; Salehi Jouzani *et al.*, 2014). به همین دلیل برای بهبود وضعیت فرمولاسیون‌های پودر وتابل، مطالعاتی در زمینه‌های بهبود رطوبت‌پذیری آسان پودر، امتزاج خوب و تعلیق در آب ضروری به نظر می‌رسد. از این رو در این پژوهش روی بهینه‌سازی عمر انبارداری و تعلیق‌پذیری فرمولاسیون پودر وتابل باکتری *B. thuringiensis* (ارائه فرمولاسیون آزمایشگاهی) تمرکز شده است. در ادامه تلاش شده که از نتایج بدست آمده برای بهبود کارایی حشره‌کشی و همچنین بهبود تعلیق‌پذیری فرمولاسیون‌های تجاری پودر وتابل *B. thuringiensis* (تولید داخل کشور) استفاده شود.

مواد و روش‌ها

سویه‌ها و فرآورده‌های مورد استفاده از باکتری Bt

در این پژوهش از باکتری *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* تولید شده خروجی فرمانتور و دو فرمولاسیون پودر تجاری Bt تولید شده در ایران (اطلاق حروف A و B به جهت حفظ اطلاعات شرکت‌های تولیدکننده) استفاده شد.

پرورش حشره میزبان

لارو، شفیره و حشره کامل شب‌پره پشت الماسی، *Plutella xylostella* از مزارع کلم واقع در محمدشهر کرج جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل و در اتاقک رشد با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، رطوبت نسبی ۱۰±۶۰ درصد و دمای ۱±۲۵ درجه‌ی سلسیوس پرورش داده شدند (Khoramnezhad *et al*., 2015). برای تغذیه حشرات کامل از آب عسل ۱۰ درصد استفاده شد و لاروهای این حشره از گیاه کلم چینی تغذیه شدند. به منظور هم‌سن نمودن لاروها برای انجام زیست‌سنجی، تخم‌های ۱۲ ساعته از حشرات کامل شب‌پره پشت الماسی گرفته شد.

تهیه فرمولاسیون پودر وتابل از باکتری Bt

باکتری *B. thuringiensis* به صورت مایع حاصل از فرمانتور یکی از شرکت های تولید کننده تهیه شد. غلظت 9×10^{7} CFU/ml از سوسپانسیون تهیه شده و در آون با دمای ۳۵ درجه‌ی سلسیوس به مدت یک روز خشک گردید. پس از تبدیل سوسپانسیون باکتری به پودر خشک، با اضافه کردن مواد افزودنی، فرمولاسیون آزمایشگاهی در قالب دو تیمار تهیه شد. تیمارها شامل پودر باکتری ۲۰٪ وزنی، لاکتوز (پرکننده و عامل افزایش غوطه‌وری) ۱۵٪ وزنی، ساکارز (بهبود تعلیق‌پذیری و محرک تغذیه) ۱۵٪ وزنی و آلجینات سدیم (امولسیون‌کننده و تثبیت-کننده) ۲۵٪ وزنی بودند. تیمار ۱ حاوی ۲۵٪ وزنی سیلیکات آلومینیوم و تیمار ۲ حاوی ۲۵٪ وزنی فیبر نارگیل (حمل کننده) بود.

تعیین میزان ماندگاری فرمولاسیون آزمایشگاهی

برای تعیین میزان ماندگاری هر فرمولاسیون، فرآورده‌ی نهایی هر تیمار در ظروف شیشه‌ای تیره رنگ به مدت پنج ماه در شرایط دما و رطوبت آزمایشگاه (دما حدود ۲۵ درجه سلسیوس و ۵۰ درصد رطوبت) نگه‌داری شدند. در فواصل زمانی یک، سه و پنج ماه نمونه‌برداری از فرآورده‌های تهیه شده، صورت گرفت و سپس غلظت اسپور و کریستال در نمونه‌ها تعیین گردید. غلظت نمونه‌ها با غلظت فرآورده تهیه شده در زمان شروع آزمایش، مقایسه شدند. تعیین غلظت بر اساس CFU/g برای اسپور گزارش شد و غلظت دلتا-اندوتوکسین با تعیین میزان پروتئین نمونه به روش بردفورد (Bradford, 1976) تخمین زده شد.

الف) تعیین غلظت (CFU/g) فرمولاسیون آزمایشگاهی

یک گرم از هر فرمولاسیون با ۹۹ میلی‌لیتر بافر فسفات استریل ۰/۱ مولار، pH~۷، مخلوط و به مدت یک ساعت در دمای اتاق روی شیکر نگه داشته شد. سپس با تهیه‌ی سری رقت، رقت‌های متفاوتی از 10^{1} تا 10^{7} حاصل گردید. در ادامه رقت‌های تهیه شده به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم ۸۰ درجه سلسیوس نگه داشته شدند. از رقت‌های 10^{6}، 10^{5} و 10^{4} مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر در محیط غذایی آگار، NA (Nutrient Agar) تهیه شده از شرکت Merck آلمان، کشت داده شد. محیط‌های کشت به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس، در انکوباتور نگه داشته شدند. سپس تعداد کلنی‌های باکتریای رشد کرده روی محیط کشت شمارش و CFU/g محاسبه گردید (Teera-Arunisiri *et al*., 2003).

ب) تعیین میزان کل پروتئین فرمولاسیون آزمایشگاهی

میزان پروتئین کل فرمولاسیون آزمایشگاهی که شامل دلتا اندوتوکسین نیز می‌شود، در زمان شروع آزمایش، یک، سه و پنج ماه بعد از ذخیره‌سازی با آزمون برادفورد اندازه‌گیری شد. یک میلی‌گرم فرمولاسیون در محیط کشت(NB (Nutrient Broth تهیه شده از شرکت Merck آلمان، حل و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ ×*g* سانتریفیوژ گردید. ته‌نشین به دست آمده دو بار با محلول نمک NaCl یک مولار و دو بار با آب مقطر شست و شو داده شد. سپس در یک میلی‌لیتر محلول ۵۰ میلی‌مولار هیدروکسید سدیم

(pH~۱۲/۵) مخلوط گردید. سوسپانسیون به دست آمده به مدت دو ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس انکوبه شد و سپس میزان پروتئین کل رونشین به روش بردفورد محاسبه گردید. برای رسم منحنی استاندارد، از غلظت‌های متفاوت پروتئین سرم آلبومین گاوی (BSA)، به‌عنوان پروتئین استاندارد استفاده گردید (Zouari *et al.*, 2002).

تعیین میزان تعلیق‌پذیری در فرمولاسیون‌های Bt

برای تعیین خاصیت تعلیق‌پذیری سه گرم از پودر وتابل Bt (فرمولاسیون آزمایشگاهی و فرمولاسیون‌های تجاری)، با ۹۷ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط گردید و سپس به مدت یک ساعت در دمای محیط نگه داشته شد. از قسمت بالایی مخلوط به دست آمده، پنج میلی‌لیتر برداشته و در آون با دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس، قرار داده شد تا به وزن ثابت برسد. قابلیت تعلیق‌پذیری بر پایه وزن هر تیمار نسبت به وزن کنترل مثبت (محصول با خاصیت تعلیق‌پذیری کامل) اندازه‌گیری گردید. این آزمون برای هر تیمار سه بار تکرار شد (Teera-Arunisiri *et al.*, 2003).

پس از تعیین میزان تعلیق‌پذیری در فرمولاسیون‌های Bt، بهبود این خاصیت (تعلیق-پذیری) در فرمولاسیون‌های تجاری (A و B)، از طریق افزودن مواد ساکارز، لاکتوز، سیلیکات آلومینیوم و فیبر نارگیل و همچنین سوربیتول (موثر در خاصیت تعلیق‌پذیری) به نسبت‌های مختلف وزنی (۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ و ۳۰ درصد وزنی) بررسی شد و با خاصیت تعلیق‌پذیری فرمولاسیون آزمایشگاهی مقایسه گردید.

بررسی زهرآگینی فرآورده‌ها

برای اندازه گیری میزان LC_{50} فرمولاسیون آزمایشگاهی، پنج غلظت متفاوت بر مبنای نتایج پیش آزمون، از CFU/g $۱۰^{۲}$ تا $۱۰^{۶}$ روی لاروهای سن دوم شب‌پره پشت الماسی آزمایش شد. دیسک‌های برگی گیاه کلم چینی به قطر پنج سانتی‌متر در ده میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری با غلظت مشخص غوطه‌ور گردید. پس از خشک شدن برگ‌ها، به وسیله‌ی پنس استریل به ظروف پتری استریل منتقل شدند. در مورد شاهد، دیسک‌های برگی در آب مقطر استریل غوطه‌ور گردید. در نهایت ۱۵ عدد لارو سن دوم به هر دیسک برگی اضافه شد. بیست و چهار ساعت پس از تغذیهٔ لاروهای حشره از برگ آلوده به Bt ، برگ‌های سالم در اختیار لاروها قرار گرفت. تعداد لاروهای مرده در هر ظرف، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تغذیه لاروها از غذای آلوده به Bt، شمارش و ثبت گردید. آزمایش تعیین میزان زهرآگینی فرمولاسیون بهینه در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. برای محاسبه و مقایسه LC_{50} از نرم‌افزار POLO- 2.0 Plusاستفاده شد.

نتایج و بحث

میزان ماندگاری در فرمولاسیون بهینه

نتایج حاصل از تعیین غلظت باکتری بر اساس CFU/g (جدول۱) نشان داد در فرمولاسیون آزمایشگاهی ۱ در زمان شروع آزمایش و در بازه‌های زمانی یک، سه و پنج ماه اختلاف معنی‌داری در مقادیر اسپور زنده (CFU/g) وجود داشت ($F_{3,8}$=22.94, P<0.0001). اما در فرمولاسیون آزمایشگاهی ۲، بین زمان‌های تیماری در میزان اسپور (CFU/g)، اختلاف معنی داری وجود نداشت ($F_{3,8}$=0.51, P=0.6865). میزان پروتئین موجود در پودر خشک شده باکتری و فرمولاسیون بهینه به ترتیب ۸۱ و ۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید و نتایج حاصل از مقایسه میزان پروتئین کل که شامل دلتا اندوتوکسین نیز می‌شود، در فرمولاسیون آزمایشگاهی۱ ($F_{3,8}$=1.43, P=0.3045) و فرمولاسیون آزمایشگاهی۲ ($F_{3,8}$=0.50, P=0.6909) در پایان پنج ماه، بیانگر پایداری مناسب در فرمولاسیون‌های بهینه شده بود. پایداری فرمولاسیون در آفت‌کش‌های زیستی از عوامل مهم در تولید فرمولاسیون است که بارها توسط محققان و با مواد افزودنی مختلف مورد آزمون قرار گرفته است (Glare and O'Callaghan, 2000; Brar *et al.*, 2005; Koul, 2011). پایداری اسپورهای فرمولاسیون پودری دارای

تالک و گلوکز *Bacillus subtilis* بعد از یک سال قرارگیری در دمای اتاق (El-Hassan and Gowen, 2006) و پایداری فرمولاسیون پودری باکتری *B. subtilis* تا دو سال ذخیره‌سازی در دمای اتاق (Jayaraj *et al*., 2005) همچنین طولانی‌تر بودن عمر انبارداری باکتری *Pseudomonas chlororaphis* با استفاده از فیبر نارگیل (Corrêa *et al*., 2015)، نشان‌دهنده تأثیر مواد افزودنی بر پایداری فرمولاسیون است. فیبر نارگیل به‌عنوان یک حمل‌کننده با رطوبت زیاد در پایداری فرمولاسیون بهینه تهیه شده تأثیر مثبتی دارد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت حفظ رطوبت فرمولاسیون بر زنده‌مانی‌اسپور یا پایداری باکتری در فرمولاسیون موثر هستند.

جدول ۱ - نتایج حاصل از تعیین غلظت اسپور (CFU/g) و پروتئین (mg/ml) در دو فرمولاسیون آزمایشگاهی در پنج ماه.

Table 1 - Results of determining the concentration of spore (CFU/g) and protein (mg/ml) in the laboratory formulations during 5 months.

Treatment	Maintenance time (month)	Spore concentration (CFU/g) Mean ±SE	Protein concentration (mg/ml) Mean ±SE
Laboratory formulation 1	0	$2.67\times10^{10}+1.3\times10^{7}$ a*	75.83±0.16 ns
	1	$2.75\times10^{10}+3.3\times10^{7}$ a	75.63±0.01
	3	$2.72\times10^{10}+5.7\times10^{7}$ b	75.56±0.12
	5	$2.71\times10^{10}+5.7\times10^{7}$ b	75.43±0.12
Laboratory formulation 2	0	$3.60\times10^{9}+1.2\times10^{7}$ ns	76.40±0.20 ns
	1	$3.59\times10^{9}+8.8\times10^{7}$	76.10±0.55
	3	$3.58\times10^{9}+3.2\times10^{7}$	75.96±0.17
	5	$3.57\times10^{9}+6.6\times10^{7}$	75.85±0.13

* Means followed by the different letters in column for each treatment are significantly different (Tukey, P<0.05). ns= Non significant

میزان تعلیق‌پذیری در فرمولاسیون‌های Bt

خاصیت تعلیق‌پذیری در پودر وتابل آزمایشگاهی ۱، ۷۱٪ و در پودر وتابل آزمایشگاهی ۲، ۶۹٪ به دست آمد. نتایج آزمون تعلیق‌پذیری دو تیمار نشان داد اختلاف معنی‌داری بین خاصیت تعلیق‌پذیری فرمولاسیون های۱ و ۲ وجود ندارد (جدول۲). اما در خاصیت تعلیق‌پذیری بین فرمولاسیون‌های تجاری A و B و پودرهای آزمایشگاهی ۱ و ۲، تفاوت معنی‌دار وجود داشت ($F_{3,8}$=385.48, P<0.0001). صالحی و همکاران خاصیت تعلیق‌پذیری فرمولاسیون منتخب کار خودشان را ۷۱ تا ۷۳ درصد گزارش کردند (Salehi Jouzani *et al*., 2014)، که شبیه به خاصیت تعلیق‌پذیری فرمولاسیون بهینه‌ای است (حدود ۷۰٪) که در این تحقیق تهیه شده است. تیرا و همکاران ضمن بررسی مواد مختلف برای تهیه پودر وتابل Bt گزارش کردند که در تیمارهایی که مقدار ساکارز بیشتری استفاده شده بود، خاصیت تعلیق‌پذیری بهبود یافته و روی میزان خیس‌شوندگی (Wettability) فرمولاسیون تأثیر منفی نگذاشته بود، خاصیت تعلیق‌پذیری تیمار بهینه در پژوهش آنها ۵۵ درصد گزارش شده است (Teera-Arunisiri *et al*., 2003). همچنین لاکتوز به عنوان ماده پرکننده مناسب برای پودر وتابل Bt معرفی می‌شود که سبب غوطه‌وری، تثبیت‌کنندگی و جلوگیری از کلوخه شدن در فرمولاسیون می‌شود (Burges and Jones., 1998). پس از تعیین خاصیت تعلیق‌پذیری در فرمولاسیون‌های تجاری A و B، مواد افزودنی انتخاب شده شامل ساکارز، لاکتوز، سیلیکات آلومینیوم و فیبر نارگیل و همچنین سوربیتول به فرمولاسیون‌های تجاری اضافه و میزان تعلیق پذیری تعیین شد. دو ماده ساکارز و فیبر نارگیل برای بهینه‌سازی فرمولاسیون تجاری B انتخاب شدند. نتایج نشان داد که افزودن فیبر نارگیل و ساکارز به فرمولاسیون تجاری B، تأثیری در

بهبود خاصیت تعلیق‌پذیری ندارد ($F_{2,6}$=3.35, P=0.1054). سه ماده ساکارز، سوربیتول و فیبرنارگیل برای بهینه سازی فرمولاسیون A انتخاب شدند، نتایج حاصل از مقایسه تیمار بهینه این سه ماده نشان داد که اختلاف معنی‌داری در میانگین درصد تعلیق‌پذیری، بین تیمارهای مختلف وجود دارد ($F_{3,8}$=152.58, P<0.0001). مقایسه میانگین درصد تعلیق‌پذیری تیمارها با A نشان داد که، فیبر نارگیل سبب بهبود خاصیت تعلیق‌پذیری نمی‌شود، اما افزودن ساکارز و سوربیتول بر خاصیت تعلیق‌پذیری مؤثر است. در بین این دو تیمار نیز ساکارز سبب افزایش معنی‌داری در خاصیت تعلیق‌پذیری شد (جدول ۳).

جدول۲- میانگین (±SE) درصد تعلیق‌شوندگی در فرمولاسیون‌های آزمایشگاهی و تجاری

Table 2- Mean (±SE) percentages of the suspensibility in the laboratory and commercial formulations

Treatment	Suspensibility (%) Mean ± SE
Laboratory formulation 1	70.72±0.8 a*
Laboratory formulation 2	65.50±0.9 a
Trade formulation A	36.39±0.7 c
Trade formulation B	61.03±0.7 b

* Means followed by the different letters are significantly different (Tukey, P<0.05)

جدول ۳-میانگین (±SE) درصد تعلیق‌شوندگی در فرمولاسیون‌های تجاری با استفاده از مواد افزودنی

Table 3. Mean (±SE) percentages of suspensibility in commercial formulations by using additives

Commercial formulation	Adjuvants	Suspensibility percentage Mean ±SE
A	----------	36.39±0.7 c*
	Sucrose	77.58±1.8 a
	Coconut fiber	39.36±1.2 c
	Sorbitol	71.19±2.4 b
B	---------	61.03±0.7 ns
	Coconut fiber	61.02±0.8
	Sucrose	65.13±1.2

*Means followed by the different letters in column for each formulation are significantly different (Tukey, P<0.05). ns= Non significant

زهرآگینی و مقادیر LC_{50}

با توجه به استفاده از فرمولاسیون‌های مختلف باکتری Bt برای کنترل شب‌پره پشت الماسی و اهمیت استفاده از عوامل کنترل بیولوژیک برای کنترل آن (Talekar and Shelton., 1993) از این آفت به عنوان حشره مدل استفاده و میزان LC_{50} پودر وتابل باکتری Bt محاسبه شد. مقدار LC_{50} حاصل از تجزیه پروبیت به دست آمده برای فرمولاسیون بهینه شده ۱، ۲/۴×۱۰^{۳}(CFU/g) بود. مقدار LC_{50} حاصل از تجزیه پروبیت به دست آمده برای فرمولاسیون بهینه شده ۲ ۲/۲×۱۰^{۳} (CFU/g) بود (جدول ۴).

جدول ۴– مقادیر LC_{50} دو فرمولاسیون آزمایشگاهی *B. thuringiensis* روی لاروهای *P. xylostella*

Table 4. LC_{50} values of the optimized laboratory formulations of *B. thuringiensis* on *P. xylostella* larvae

Treatment	No.	Slope ± SE	χ^2	df	LC_{50} (CFU/g)	C.I. 95% Lower	C.I. 95% Upper
Optimized Formulation 1	270	0.704±0.084	6.339	13	2.4×10^3	1.2×10^3	4.7×10^3
Optimized Formulation 2	270	0.677±0.083	5.339	13	2.2×10^3	1.0×10^3	4.1×10^3

با توجه به نتایج حاصل از بهینه‌سازی خاصیت تعلیق‌پذیری در فرمولاسیون‌های تجاری، میزان LC_{50} برای فرمولاسیون تجاری A، تیمار حاوی فرمولاسیون تجاری A به همراه ساکارز، فرمولاسیون تجاری B و تیمار حاوی فرمولاسیون تجاری B به همراه ساکارز با استفاده از نرم‌افزار Polo-Plus محاسبه شد (جدول۵).

از ساکارز به‌عنوان محرک تغذیه‌ای فرمولاسیون که بر خاصیت حشره‌کشی مؤثر است، یاد شده است (Teera-Arunisiri *et al.*, 2003.). این ماده سبب تحریک آفت به تغذیه از بافت گیاهی شده (Salehi Jouzani *et al.*, 2014) و در نتیجه بر زهرآگینی فرمولاسیون موثر است. برار و همکاران گزارش کردند از گلوکز و ساکارز به‌عنوان خوش‌طعم کننده درفرمولاسیون Bt می‌توان استفاده کرد (Brar *et al.*, 2006a). به نظر می‌رسد نتایج بدست آمده از این پژوهش با نتایج بدست آمده توسط سایر پژوهشگران مطابقت دارد و ساکارز سبب تحریک تغذیه و کاهش میزان LC_{50} می‌شود. به طوری که با توجه به حدود اطمینان ۹۵ درصد، بین LC_{50} فرمولاسیون‌های تجاری و LC_{50} تیمارهای حاوی ساکارز اختلاف معنی-دار وجود دارد و میزان LC_{50} تیمارها از فرمولاسیون تجاری کمتر است.

جدول ۵- مقادیر LC_{50} فرمولاسیون تجاری A و تیمار فرمولاسیون تجاری A+ ساکارز، فرمولاسیون تجاری B و تیمار فرمولاسیون تجاریB + ساکارز روی لاروهای شب‌پره پشت الماسی، *Plutella xylostella*

Table 5. The LC_{50} values of commercial formulation A, commercial formulation A+ Sucrose treatment and commercial formulation B, commercial formulation B+ Sucrose treatment on *Plutella xylostella* larvae

Treatment	LC_{50}(CFU/g) (95% CI)	Slope (±SE)	Relative ratio
A	1×10^4 (5.1×10^3-1.8×10^4)	0.561±0.045	0.095 (0.037-0.244)
A+ Sucrose	9.9×10^2 (3.9×10^2-1.9×10^3)	0.526±0.052	
B	1.8×10^4 (1.2×10^4-2.7×10^4)	0.677±0.048	0.144 (0.068-0.306)
B+ Sucrose	2.6×10^3 (1.3×10^3-4.6×10^3)	0.540±0.048	

با توجه به اهمیت کاهش هزینه تولید با استفاده از مواد ارزان قیمت و در دسترس برای تولید تجاری فرمولاسیون‌های Bt (Brar *et al.*, 2006b)، در این پژوهش تلاش شد تا جای ممکن از مواد در دسترس و با قیمت مناسب به عنوان ماده افزودنی در تولید و بهینه سازی پودر وتابل استفاده شود. بر اساس نتایج به دست آمده، فرمولاسیون بهینه تهیه شده، دارای ماندگاری مناسبی است و از لحاظ خاصیت فیزیکی تعلیق‌پذیری شرایط بهتری نسبت به فرمولاسیون‌های تجاری مورد بررسی دارد. نتایج زیست سنجی این محصول نیز روی لاروهای سن دوم شب‌پره پشت الماسی نشان‌دهنده برتری این فرمولاسیون نسبت به فرمولاسیون تجاری بود. با توجه به نتایج بدست آمده، ضمن تکمیل مطالعات بر روی این فرمولاسیون، به نظر می‌رسد دستاوردهای حاصله قابلیت بکارگیری در صنعت را دارد.

سپاسگزاری

تحقیق حاضر بخشی از طرح پایان‌نامه نویسنده اول بوده و با حمایت مالی دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران به شماره 73132800/6/23 انجام یافته، بدین وسیله مراتب تشکر و قدردانی را اعلام می‌دارد.

REFERENCES:

1. Bradford, M.M. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Analytical Biochemistry, 72 (1–2): 248–254, *doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3*.
2. Bryant, J .(1994). Commercial production and formulation of *Bacillus thuringiensis*. *Agriculture, Ecosystems & Environment* ,49(1): 31-35.

3. Brar, SK., Verma, M., Tyagi, R., Valéro, J. (2006 a). Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Process Biochemistry* ,41(2): 323-342.
4. Brar, SK., Verma, M., Tyagi, R., Valéro J., Surampalli, RY .(2005). Starch Industry Wastewater-Based Stable *Bacillus thuringiensis* Liquid Formulation. *Journal of Economic Entomology* ,98(6):1890-1898.
5. Brar, SK., Verma, M., Tyagi, R., Valéro, J., Surampalli, RY. (2006 b). Screening of Different Adjuvants for Wastewater/Wastewater Sludge-Based *Bacillus thuringiensis* Formulations. *Journal of Economic Entomology* ,99(4):1065-1079.
6. Burges, HD., Jones, KA. (1998) Formulation of bacteria, viruses and protozoa to control insects, In Burges HD (Ed.), Formulation of microbial biopesticides: *beneficial organisms, nematodes & seed treatments.*(pp.34-109). Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
7. Corrêa, EB., Sutton, JC., Bettiol, W. (2015). Formulation of *Pseudomonas chlororaphis* strains for improved shelf life. *Biological Control*, 80 :50–55.
8. Couch, TL., Jurat-Fuentes, JL. (2013). Commercial Production of Entomopathogenic Bacteria, In: Morales-Ramos, JA,. Rojas, MG.and Shapiro-Ilan, DI (Ed.), Mass production of beneficial organisms: *invertebrates and entomopathogens*. 1st Edition.(pp.415-436). Academic Press, United States of America.
9. El-Hassan, S., Gowen, S. (2006). Formulation and delivery of the bacterial antagonist *Bacillus subtilis* for management of lentil vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis. Journal of Phytopathology*, 154(3): 148-155.
10. Glare, TR., Ocallaghan, M. (2000) *Bacillus thuringiensis : biology, ecology and safety*. New York: Wiley.
11. Goerge, Z., Crickmore, N. (2012). *Bacillus thuringiensis* Application in Agriculture, In: Sansinenea (Ed.), *Bacillus thuringiensis* Biotechnology.(pp.19-39). Springer, Netherlands.
12. Jallouli, W., Sellami, S., Sellami, M., Tounsi, S. (2014). Efficacy of olive mill wastewater for protecting *Bacillus thuringiensis* formulation from UV radiations. *Acta Tropica*, 140: 19–25.
13. Jayaraj, J., Kannan,R., Sakthivel, K., Suganya, D., Venkatesan, S., Velazhahan, R. (2005). Development of new formulations of *Bacillus subtilis* for management of tomato damping-off caused by *Pythium aphanidermatum. Biocontrol Science and Technology*, 15(1): 55-65.
14. Khaliq, MSAA., Haque, M .(2007). Scope of commercial formulations of *Bacillus thuringiensis* Berliner as an alternative to methyl bromide against *Trogoderma granarium* Everts larvae. *Pakistan Journal of Botany*, 39(3): 871-880.
15. Khoramnezhad, A., Talaei-Hassanloui, R., Ghassemi-Kahrizeh, A. (2015). Evaluating the virulence of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from host and different habitats on diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lep.: Plutellidae). *Biological Control of Pests and Plant Diseases*, 4(2): 168-172. (In Farsi)
16. Khorramvatan, S., Marzban, R., Ardjmand, M., Seifkordi, A., Askary, H. (2014) .Preparation of concentrated suspension of microencapsulated formulation of *Bacillus thuringiensis. Biocontrol in Plant Protection* ,2 (1):81-89. In Farsi.
17. Koul, O. (2011). Microbial biopesticides: opportunities and challenges. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources, 6(056): 1-26.
18. Lacey, LA., Frutos, R., Kaya, HK., Vail, P. (2001). Insect pathogens as biological control agents: do they have a future?. *Biological Control*, 21(3): 230-248.
19. Morris, ON., Convers, V., Kanagratnam, P. (1995). Chemical additive effects on the efficacy of B.t. var. *kurstaki* against *Mamestria configurata*. *Journal of Economic Entomology*, 88(4): 815-824.
20. Palma, L .(2017). *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides, are they as effective as they should be?. *Revista Argentina de microbiologia*, 49(1): 119.
21. Rosas-García, NM., Villegas-Mendoza, JM.,Torres-Ortega JA. (2009). Design of a *Bacillus thuringiensis*-based formulation that increases feeding preference on *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Journal of Economic Entomology*, 102(1): 58-63.
22. Salehi Jouzani, GH., Moaven, E., Morsali, H. (2014). Optimization of a wettable powder formulation for two native *Bacillus thuringiensis* strains. *Biological Control of Pests and Plant Diseases*, 3(1): 7-15. (In Farsi)

23. Singh, A., Boora, SK., Chaudhary, K .(2007). Effect of different additives on the persistence and insecticidal activity of native strains of *Bacillus thuringiensis. Indian Journal of Microbiology*, 47(1): 42–45.

24. Sneh, B., Schuster, S., Gross, S. (1983). Improvement of the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. *entomocidus* on larvae of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera, Noctuidae) by addition of chitinolytic bacteria, a phagostimulant and a UV-protectant. *Journal of Applied Entomology*, 96(1-5): 77-83.

25. Sun, S., Cheng, Z., Fan, J., Cheng, X., Pang, Y. (2012). The utility of camptothecin as a synergist of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* and nucleopolyhedroviruses against *Trichoplusia ni* and *Spodoptera exigua. Journal of Economic Entomology*, 05(4): 1164-1170.

26. Talekar, N., Shelton, A. (1993). Biology, ecology, and management of the diamondback moth. *Annual Review of Entomology*, 38: 275-301.

27. Teera-Arunsiri, A., Suphantharika, M., Ketunuti, U. (2003). Preparation of spray-dried wettable powder formulations of *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides. *Journal of Economic Entomology*, 96(2): 292-299.

28. Zouari, N., Achour O., Jaoua S. (2002). Production of delta-endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* and overcoming of catabolite repression by using highly concentrated gruel and fish meal media in 2- and 20-dm3 fermenters. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 77(8): 877-882.

29. Zhang, L., Zhang, X., Zhang, Y., Wu, S., Gelbic, I., Xu, L., Guan, X. (2016). new formulation of *Bacillus thuringiensis*: UV protection and sustained release mosquito larvae studies. *Scientific Reports*, 6: 39425.