دستورالعمل فنی

کنترل کیفی آفت‌کش‌های میکروبی مبتنی بر *Bacillus thuringiensis*

نگارنده:

رسول مرزبان

شماره فروست

٦٤٤٠٣

١٤٠٢

وزارت جهادکشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور

عنوان دستورالعمل:

کنترل کیفی آفت‌کش‌های میکروبی مبتنی بر
Bacillus thuringiensis

عنوان پروژه‌های منتج به دستورالعمل

عنوان پروژه	شماره پروژه
ساخت فرمولاسیون پودر وتابل حشره‌کش بیولوژیک *Bacillus thuringiensis*	۴-۱۶-۱۶-۰۷۶-۹۵۰۶۳۵
ردیابی بتاا‌گزوتوکسین درفرآورده داخلی BTH براساس ماده موثره *Bacillus thuringiensis*	۸۰۰۱۳-۰۰۰۰-۰۰-۱۱۰۰۰۰-۱۰۷-۲

نگارنده: رسول مرزبان

ناشر: موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور

نوع: دستورالعمل فنی

تاریخ انتشار: ۱۴۰۲

چکیده

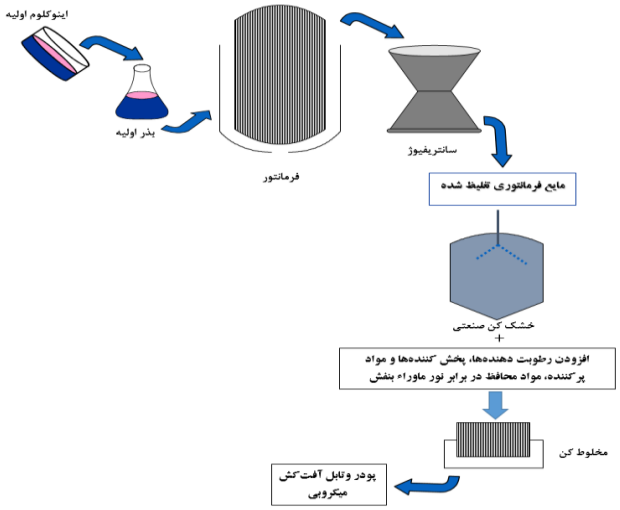
کارایی و ایمنی دو عامل مهم در تجاری سازی آفت‌کش‌های زیستی میکروبی هستند. این دو ممکن است به دلایل مختلف مورد چالش قرار گیرند. عمده بحث کنترل کیفی آفت‌کش‌های میکروبی مربوط به بازرسی نمونه‌ها و تعمیم نتایج کنترل کیفی به کل بچ تولیدی محصول است. کنترل کیفی روی محصول فرموله شده یا نهایی انجام می‌شود. پارامترهای مورد آزمون در کنترل کیفی آفت‌کش‌های میکروبی بر پایه Bt شامل تعداد واحد تشکیل دهنده کلنی یا عامل فعال آفت‌کش میکروبی، خواص فیزیکی و شیمیایی فرمولاسیون، آلاینده‌های میکروبی احتمالی موجود در فراورده، گیاه‌سوزی و کارایی آفت‌کش میکروبی است. آلاینده‌های موجود در آفت‌کش‌های میکروبی، ایمنی و کارآیی آنها را به شدت تحت‌تاثیر قرار می‌دهند. پروتکل‌های کنترل کیفی فقط مقدار کمی از آلاینده‌ها را می‌پذیرد و در مورد پاتوژن‌های انسانی این مقدار صفر است. کارایی یکی دیگر از پارامترهای مهم در کنترل کیفی است. ارزیابی کارایی می‌تواند با استفاده از آزمون‌های زیست سنجی به سرعت و با روشی مقرون به صرفه انجام شود. آزمون‌های زیست سنجی بایستی به گونه ای طراحی شوند که پیش بینی قابل اعتمادی از نحوه عملکرد یک محصول را در مزرعه ارائه دهند.

واژه‌های کلیدی: کنترل کیفی، آفت‌کش میکروبی، کارایی، ارزیابی

مقدمه

تاریخچه استفاده از آفت‌کش‌های میکروبی به حدود صد سال پیش برمی‌گردد، در واقع در سال ۱۹۳۸ بود که Sporeine به عنوان فراورده تجاری *Bacillus thuringiensis* در فرانسه وارد بازار شد (Beegle & Yamamoto, 1992) و بعد از جنگ جهانی دوم همزمان با پدیدار شدن مقاومت آفات به آفت‌کش‌های شیمیایی، تولید و مصرف آفت‌کش‌های میکروبی به سرعت توسعه یافت. اکنون فروش آفت‌کش‌های میکروبی در دنیا سالانه بیش از پنج میلیارد دلار گزارش شده است (Globe Newswire, 2023). هر چند در دهه‌های اخیر، تعداد سویه‌های مؤثر فراوانی از قارچ‌ها و باکتری‌ها مورد شناسایی قرار گرفته‌اند اما کمتر از یک درصد آنها به مرحله تجاری سازی رسیده‌اند (Bailey & Falk, 2011). یکی از دلایل اصلی عدم موفقیت آن‌ها در تجاری سازی، پایین بودن کیفیت و کارایی فرمولاسیون نهایی است (مرزبان و عسکری، ۱۳۸۸). برای توسعه آفت‌کش‌های میکروبی و قبل از تجاری سازی، باید جداسازی و شناسایی میکروارگانیسم‌های مفید، آزمون‌های غربالگری در آزمایشگاه، تکثیر و تولید، فرمولاسیون، کنترل کیفی و ارزیابی‌های مزرعه‌ای انجام شود. علاوه بر این، مکانیسم اثر، پاسخ به شرایط محیطی یا اکولوژیک، دوام در طبیعت و ملاحظات ایمنی نیز باید مدنظر قرارگیرد.

برای توسعه و تجاری سازی یک آفت‌کش میکروبی در ابتدا یک سویه مؤثر مورد نیاز است.



شکل ۱) فرمانتاسیون و تولید پودر وتابل آفت‌کش‌های میکروبی بر پایه Bt (اصلی)

معمولاً کارایی کنترل میکروبی غیرقابل پیش‌بینی و در مقیاس وسیع بیش از حد متغیر است. هرچند تعداد عوامل کنترل میکروبی ثبت شده درحال افزایش است، اما تعداد کمی از آنها توانسته‌اند عملکرد موفقیت‌آمیزی در مقیاس وسیع داشته باشند. علت نوسان زیاد عملکرد عوامل کنترل میکروبی

در عرصه کشاورزی را می‌توان، در آشنا نبودن کشاورزان و کاربران با سیستم‌های کنترل میکروبی و عدم دسترسی کشاورزان به آفت‌کش‌های میکروبی با کیفیت و کارایی بالا دانست. بنابراین، کنترل کیفی و نظارت بر آفت‌کش‌های میکروبی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

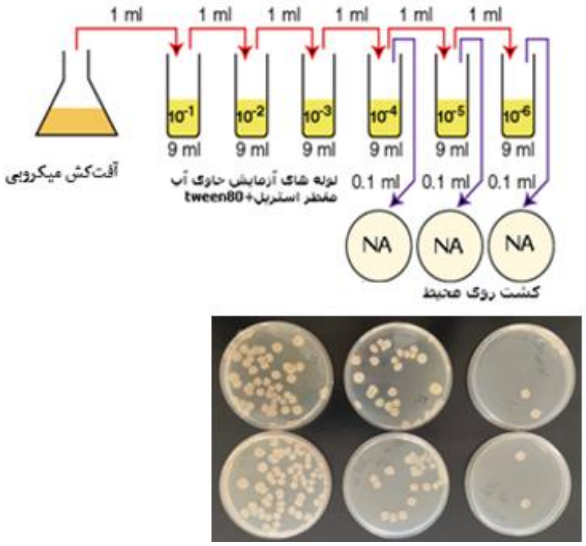
کنترل کیفی مجموعه عملیاتی نظیر اندازه گیری یا آزمون روی یک محصول یا کالا است تا مشخص شود که آیا آن محصول با مشخصات فنی استاندارد یا ادعا شده روی برچسب محصول مطابقت دارد یا خیر. امروزه کنترل کیفی بخشی ضروری از فرایند تولید تجاری آفت‌کش‌های میکروبی است. کنترل کیفی را می‌توان به کنترل تولید، کنترل فرایند و کنترل محصول تقسیم کرد. دو مورد اول به کنترل کیفی تولید محصول اشاره دارد و فرایند تولید پایدار با حداقل نقصان را تضمین می‌کند. کنترل محصول به کیفیت محصول نهایی که از کارخانه خارج می‌شود اطلاق می‌شود و باید مطابق با ضرورت‌های سازمان‌های نظارتی و رضایت مشتری انجام شود (شکل ۱). کنترل کیفی محصول باید روی محصول فرموله شده انجام شود. آزمایش باید تا حد امکان به زمان کمتری نیاز داشته باشد تا زمان بهینه برای ذخیره سازی محصول از دست نرود.

دستورالعمل

پارامترهای مورد آزمون در کنترل کیفی آفت‌کش‌های میکروبی شامل تعداد واحد تشکیل دهنده کلنی، CFU (Colony Forming Unit) یا عامل فعال، خواص فیزیکی و شیمیایی فرمولاسیون، آلاینده‌های میکروبی همراه محصول، میزان کارایی محصول در شرایط آزمایشگاه و آزمون گیاه‌سوزی است.

۱- تعداد واحد تشکیل دهنده کلنی، CFU یا عامل فعال آفت‌کش‌های میکروبی در برخی از آنها مانند قارچ‌های بیمارگر حشرات مستقیما با کارایی آفت‌کش همبستگی دارد و در برخی مانند Bt تعداد اسپور به تنهایی ملاک نیست. برای تعیین و محاسبه تعداد واحد تشکیل دهنده کلنی یا عامل فعال آفت‌کش‌های میکروبی یا به اصطلاح CFU در هر میلی‌لیتر یا گرم فراورده تجاری آفت‌کش‌میکروبی بایستی بر اساس روش تهیه رقت‌های سریالی عمل کرد (شکل ۲).

در این رقیق سازی از محلول غلیظ‌تر سری‌هایی از رقت‌ها تهیه می‌شود، استفاده متداول از این رقت‌ها باعث ایجاد رقت‌هایی است که در آن غلظت هر ماده یک دهم کمتر می‌شود. و این کار تا جایی انجام می‌شود که تعداد کلنی‌های موجود در پتری قابل شمارش باشد.



شکل ۲) تهیه رقت‌های سریالی آفت‌کش‌های میکروبی (اصلی)

۲- تعیین سطح آلاینده‌ها در آفت‌کش‌های میکروبی باید بخشی از کنترل کیفی محصول نهایی باشد و این مسئله از نظر ایمنی و کارایی عامل مهمی بشمار می‌رود که در مرحله تعیین تعداد واحد تشکیل دهنده کلنی قابل محاسبه است. تعداد کل یا درصد آلاینده‌های میکروبی باید محدود باشد. این آلاینده‌ها ممکن است بر کیفیت محصول (ماندگاری، کارایی و ویژگی‌های فیزیکی) تأثیر منفی بگذارند. علاوه بر این، آلاینده‌ها ممکن

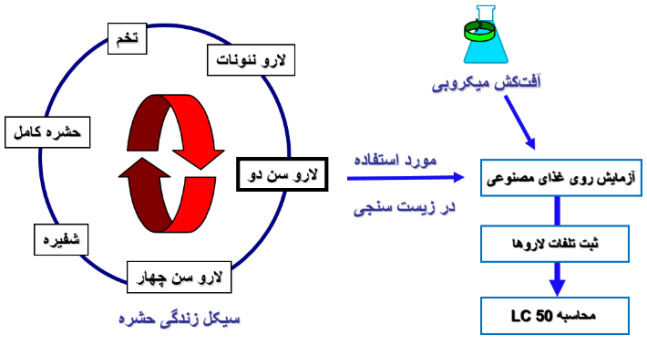
است برای کاربر و مصرف کننده محصولات کشاورزی نیز خطر ایجاد کند.

۳- قابلیت تعلیق شوندگی فرمولاسیون‌های پودر وتابل براساس روش CIPAC (۱۹۷۰) تعیین می‌شود، که این روش برای آفت‌کش‌های میکروبی کمی متفاوت است. برای این کار ۰/۷۵ گرم از هر فرمولاسیون نهایی آفت‌کش میکروبی به ۲۵۰ میلی لیتر آب مقطر با سختی ۳۴۲ پی پی ام و اسیدیته (pH) ۶ تا ۷ اضافه و ظرف حامل ۶۰ بار سر و ته شده و سپس نیم‌ساعت ساکن قرار داده می‌شود. از قسمت بالایی مخلوط ۲۲۵ میلی لیتر برداشته و باقی مانده را صاف کرده و در آون خشک و وزن خشک آن ثبت می‌شود. درصد سوسپانسیون شوندگی بر پایه وزن ثبت شده هر تیمار پس از خشک شدن نسبت به وزن اولیه در سه تکرار اندازه گیری و محاسبه می‌شود. در آفت‌کش‌های میکروبی بر خلاف آفت‌کش‌های شیمیایی بایستی میزان و درصد عامل فعال آفت‌کش‌میکروبی موجود در رسوب حاصل بررسی و تعیین شود. همچنین رطوبت فرمولاسیون نبایستی از درصد معینی (۵ تا ۱۲درصد) بیشتر باشد.

۴- تعیین قابلیت سوسپانسیون شوندگی در فرمولاسیون‌های مایع، برای این منظور ۵۰ میلی لیتر از فرمولاسیون را در استوانه مدرج ۱۰۰ میلی لیتری ریخته و به کمک آب مقطر حجم به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده می‌شود. بعد از

۲۰ بار بهم زدن به کمک وارونه کردن استوانه مدرج، میزان رسوب ایجاد شده بعد از یک ساعت بر حسب درصد حجمی اندازه گیری و محاسبه می‌شود.

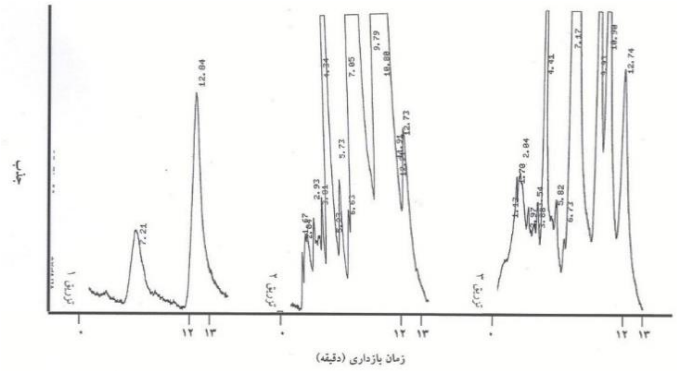
۵- کارایی یکی از مهمترین پارامترها در کنترل کیفی آفت‌کش‌های میکروبی است. عملکرد میدانی محصول نه تنها برای دستگاه‌های نظارتی، بلکه برای استمرار فروش محصول شرکت با ارزش‌ترین جنبه است. بنابراین، هر واحد تولیدی (Batch) باید قبل از توزیع مورد آزمون قرار گیرد. این کار تنها با استفاده از سنجش‌های زیستی می‌تواند به سرعت و به روشی مقرون به صرفه انجام شود (شکل ۳). سنجش‌های زیستی در هر بیمارگر و هر هدف متفاوت است. همان زیست سنجی که برای انتخاب سویه توسعه داده می‌شود، می‌تواند در آزمایش‌های کنترل کیفی نیز استفاده شود. بایستی یک محصول استاندارد به عنوان مرجع در آزمایش گنجانده شده و نتایج نمونه با نتایج استاندارد مقایسه شود. این در فرآورده‌های براساس باکتری‌ها و باکولوویروس‌ها که محصول را می‌توان برای سال‌ها بدون تغییر خواص ذخیره کرد امکان‌پذیر است؛ اما در قارچ‌ها این کار دشوارتر است. در نماتدهای بیمارگر حشرات به دلیل مشکلات در ذخیره سازی برای مدت طولانی، تقریبا غیرممکن است.



شکل ۳) آزمون زیست سنجی Bt روی لارو سن دوکرم قوزه پنبه (اصلی)

۶- تعدادی از استرین‌های باکتری *B. thuringiensis* در زمان رشد و تکثیر بتاگزوتوکسین تولید می‌کنند. این زهرابه برای همه موجودات زنده از جمله انسان سمی و خطرناک است. به دو روش زیست سنجی و HPLC وجود بتاگزوتوکسین در فرمولاسیون‌های تجاری و سویه‌های Bt قابل ردیابی است (شکل ۴)، که روش زیست سنجی، روش قابل اعتمادتری است (مرزبان و تاجبخش ۱۳۸۲). در روش زیست سنجی غلظت‌های 5x (۵ برابر دوز مصرفی در مزرعه)، ۱۰x، ۲۵x و ۵۰x حشره‌کش میکروبی که پس از سانتریفوژ، مایع رویی حاصل (سوپرناتانت) در دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه در داخل بن ماری یا حمام آب قرار گرفته و

اسپور و کریستال‌های آنها حذف می‌شود، روی لاروهای سن دو هلیوتیس در سه تکرار مورد آزمون قرار می‌گیرد (مرزبان و تاجبخش ۱۳۸۲).



شکل ۴) مقایسه زمان بازداری بتا اگزوتوکسین خالص تزریق۱، آفت‌کش میکروبی (Bt) تزریق۲ و تلفیقی از بتا اگزوتوکسین خالص و آفت‌کش میکروبی تزریق۳، بوسیله HPLC (مرزبان و تاجبخش ۱۳۸۲)

۷- در آزمون گیاه‌سوزی، میزان گیاه سوزی و آسیبی که ترکیبات آفت‌کش‌های میکروبی به جوانه‌ها و برگ‌های گیاه حساسی مانند گوجه فرنگی ممکن است وارد کنند، با محلول پاشی رقت چهار درصد بمدت ۷ روز در سه تکرار سنجیده می‌شود (مرزبان و هدی ۱۳۹۳).

منابع

رسول مرزبان و حسن هدی ۱۳۹۳. بررسی فرمولاسیون سوسپانسیون غلیظ باکتری *Bacillus thuringiensis*. گزارش نهایی پروژه تحقیقاتی، شماره ثبت۴۶۱۲۶ در سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی. ۲۸ صفحه.

رسول مرزبان و محمدرضا تاجبخش. ۱۳۸۲. مقایسه چند روش برای ردیابی و تعیین مقدار بتا اگزوتوکسین در فرآورده‌های تجاری باکتری Bt نشریه آفات و بیماریهای گیاهی، شماره ۷۱ .صفحه ۱۴۹-۱۴۱.

رسول مرزبان و حسن عسکری. ۱۳۸۸. دستاوردها، چالش‌ها و چشم انداز کنترل میکروبی آفات. همایش ملی نیم قرن مصرف آفت‌کش‌ها، مؤسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، تهران، ایران.

Globe Newswire, 2023. The global biopesticides market size. Pune, India, Sept. 21, 2023.

CIPAC, 1970. Handbook, vol. 1. Analysis of technical and formulated pesticides. Collaborative, UK.

Bailey, K.L. & Falk, S. 2011. Turning research on microbial bioherbicides in to commercial products – A *Phoma* story. Pest Technology, 5 (Special Issue 1), 73–79.

Beegle, C.C. & Yamamoto, T. 1992. Invitation paper (C.P. Alexander Fund): history of *Bacillus thuringiensis* Berliner reseach and development. Canadian Entomologist, 124: 587-616.

Abstract

Efficacy and safety are two important factors in the commercialization of microbial biopesticides. These two may always be challenged for various reasons. The main issue of quality control of microbial biopesticides is related to inspecting samples, and generalizing the results to the entire product accumulation. Product quality control is performed on the formulated or final product. The parameters tested in the quality control of microbial biopesticides based on Bt include the number of Colony Forming Units (CFU) or the active ingredients of the microbial biopesticide, physical and chemical properties of the formulation, possible microbial contaminants in the product, plant burn, and the efficiency of the microbial biopesticides. Contaminants in microbial biopesticides are a very important factor in terms of safety and efficiency. Quality control protocols accept only a small number of contaminants and zero for human pathogens. Efficiency is another important parameter in quality control. Efficacy assessment can be done quickly and cost-effectively using bioassay. Bioassay should be designed to provide a reliable prediction of how a crop will perform in the field.

Key words: Quality control, microbial biopesticide, efficacy, evaluation

Ministry of Jihad–e-Agriculture
Agricultural Research, Education & Extension Organization
Iranian Research Institute of Plant Protection

Instruction Title:
Quality control of *Bacillus thuringiensis*-based microbial biopesticides

Project Titles:

Project Title	Project Number
Preparation of Wettable Powder Formulation of *Bacillus thuringiensis*-Based Biopesticide.	4-16-16-076-950635
Detection of beta-exotoxin in BTH native product based on *Bacillus thuringiensis*.	80013-0000-00-110000-107-2

Author: Rasoul Marzban
Publisher: Iranian Research Institute of Plant Protection
Date of Issue: 2023

Ministry of Jihad–e-Agriculture
Agricultural Research, Education & Extension Organization
Iranian Research Institute of Plant Protection

Applied Instruction

Quality control of *Bacillus thuringiensis*-based microbial biopesticides

Rasoul Marzban

Registration No.

64403

Date of Issue

2023