



(OPEN ACCESS)

Evaluating the Effect of encapsulated *Bacillus subtilis* Formulations on Viability, Controlled Release, and Bacterial Persistence under Laboratory Condition

Pooria Pezeshknejad¹, Reza Ghorbani Nasrabadi^{*2}, Alireza Sadeghi Mahoonak³

1. M.Sc. Student of Soil Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: pooriapezeshknejad1375@gmail.com
2. Corresponding Author, Associate Prof., Dept. of Soil Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: rgnasr@yahoo.com
3. Professor, Dept. of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: sadeghiaz@yahoo.com

Article Info	ABSTRACT
Article type: Full Length Research Paper	Background and Objectives: The rapid growth of the global population and increasing demand for agricultural production, coupled with the degradation of soil quality and water resources, have created significant challenges in sustainable agriculture. Therefore, the application of plant growth-promoting bacteria (PGPB) has been considered as a supplement to chemical fertilizers and to reduce their consumption. These bacteria play crucial roles in enhancing plant growth, improving soil fertility, and mitigating environmental stresses. However, their survival under field conditions is often compromised by unfavorable environmental factors such as drought, salinity. This study aimed to evaluate the effectiveness of a bioformulation composed of sodium alginate, bentonite, starch, and nanosilica on capsule stability, viability of encapsulated PGPB and the controlled release of bacterium into the environment.
Article history: Received: 05.05.2025 Revised: 08.23.2025 Accepted: 08.23.2025	
Keywords: Bentonite, Encapsulation, Plant growth-promoting bacteria, Sodium alginate	
	Materials and Methods: To conduct this study, a bacterial suspension was first prepared using a nutrient broth medium. Capsules were then produced using the droplet method in a 2% calcium chloride solution using formulations containing sodium alginate, bentonite, starch, and nanosilica. Various physical and biological parameters were assessed, including capsule diameter, expansion rate, loading efficiency, bacterial viability, biodegradability, bacterial release rate, and survival rate of the bacterial cells.
	Results: The results indicated that incorporating bentonite into the formulation enhanced the mechanical strength of the capsules and reduced their biodegradation rate. Capsules containing both bentonite and starch exhibited less diameter reduction after the drying process than those without these components, indicating greater structural stability. The expansion rate was higher in capsules containing bentonite, suggesting improved water absorption and the formation of a more stable gel matrix. The bacterial cell counts within the capsules were influenced by the formulation type. While higher initial viability was observed in

formulations without bentonite (CK and A), a significant decline in the bacterial population was recorded over 90 days. In contrast, formulations containing bentonite and starch demonstrated a slower and more controlled bacterial release and maintained higher viable bacterial populations after 90 days than formulations without these additives and the non-encapsulated control (free cells).

Conclusion: This study demonstrated that the use of a sodium alginate–bentonite–starch–nanosilica formulation is an effective strategy for enhancing the viability and persistence of plant growth-promoting bacteria under laboratory conditions. Bentonite contributed to improved mechanical strength, reduced biodegradability, and better-controlled bacterial release, while starch served as a protective agent enhancing bacterial survival. Therefore, this technology holds promise in the future as a suitable supplement to chemical fertilizers in agriculture, and play an important role in improving soil fertility and promoting plant growth.

Cite this article: Pezeshknejad, Pooria, Ghorbani Nasrabadi, Reza, Sadeghi Mahoonak, Alireza. 2025. Evaluating the Effect of encapsulated *Bacillus subtilis* Formulations on Viability, Controlled Release, and Bacterial Persistence under Laboratory Condition. *Journal of Soil Management and Sustainable Production*, 15 (3), 119-137.



© The Author(s).

DOI: 10.22069/ejsms.2025.23603.2194

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources



اثر فرمولاسیون‌های کیسولی حاوی باسیلوس سوبتیلیس بر زنده‌مانی، رهایش کنترل‌شده و ماندگاری باکتری در شرایط آزمایشگاهی

پوریا پزشک‌نژاد¹، رضا قربانی نصرآبادی^{2*}، علیرضا صادقی ماهونک³

1. دانشجوی کارشناسی‌ارشد علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
رایانامه: pooriapezeshknejad1375@gmail.com
2. نویسنده مسئول، دانشیار گروه علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: rgnasr@yahoo.com
3. استاد گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
رایانامه: sadeghiaz@yahoo.com

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله کامل علمی - پژوهشی تاریخ دریافت: 1404/02/15 تاریخ ویرایش: 1404/06/01 تاریخ پذیرش: 1404/06/01 واژه‌های کلیدی: آلزینات سدیم، باکتری‌های محرک رشد گیاه، بنتونایت، کیسوله‌سازی	سابقه و هدف: افزایش جمعیت جهانی و نیاز به تولید بیش‌تر محصولات کشاورزی، همراه با کاهش کیفیت خاک و منابع آبی، چالش‌های مهمی در کشاورزی پایدار ایجاد کرده است. از این‌رو، استفاده از باکتری‌های محرک رشد گیاه به‌عنوان مکملی برای کودهای شیمیایی و نیز کاهش مصرف آن‌ها مورد توجه قرار گرفته است. این باکتری‌ها نقش مهمی در بهبود رشد گیاه، افزایش حاصلخیزی خاک و کاهش تنش‌های محیطی دارند. با این‌حال، زنده‌مانی این باکتری‌ها در شرایط مزرعه به دلیل عوامل نامساعد محیطی مانند خشکی، شوری کاهش می‌یابد. در این پژوهش، اثربخشی فرمولاسیون زیستی آلزینات سدیم - بنتونایت - نشاسته - نانو سیلیس بر پایداری کیسول، زنده‌مانی باکتری محرک رشد گیاه کیسوله شده و کنترل آزادسازی آن در محیط بررسی شد. مواد و روش‌ها: برای انجام این پژوهش، ابتدا سوسپانسیون باکتریایی با استفاده از محیط کشت نوترینت براث تهیه شد. سپس، کیسول‌ها با ترکیب آلزینات سدیم، بنتونایت، نشاسته و نانو سیلیس به روش قطره‌ای در محلول کلرید کلسیم دو درصد، در فرمولاسیون‌های مختلف به‌دست آمد. پارامترهای فیزیکی و زیستی از جمله اندازه قطر کیسول، میزان انبساط‌پذیری، میزان زیست‌تخریب‌پذیری، کارایی کیسوله‌سازی باکتری توسط فرمولاسیون، زنده‌مانی باکتری، نرخ آزادسازی باکتری و میزان ماندگاری سلول‌های باکتری ارزیابی شد. یافته‌ها: نتایج نشان داد که افزودن بنتونایت به فرمولاسیون، موجب افزایش استحکام مکانیکی کیسول و کاهش نرخ زیست‌تخریب‌پذیری آن‌ها شد. کیسول‌های حاوی بنتونایت و نشاسته

نسبت به تیمار شاهد (CK)، کاهش قطر کم‌تری را پس از فرایند خشک‌شدن نشان دادند که بیانگر افزایش پایداری آن‌ها بود. میزان انبساط‌پذیری در کپسول‌های دارای بتونایت بیش‌تر از تیمارهای بدون آن بود که نشان می‌دهد این ترکیب توانایی جذب آب را افزایش داده و ساختار ژلی پایداری ایجاد می‌کند. تعداد سلول باکتری‌های زنده درون کپسول نیز تحت‌تأثیر نوع فرمولاسیون قرار گرفت به‌طوری‌که در فرمولاسیون‌های بدون بتونایت (CK و A)، تعداد جمعیت باکتری بیش‌تری پس از کپسوله‌سازی در آزمون سنجش میزان زنده‌مانی باکتری مشاهده شد، اما در بلندمدت (۹۰ روز) در آزمون میزان ماندگاری سلول‌های باکتری، روند کاهش جمعیت باکتری در این فرمولاسیون‌ها (CK و A) بیش‌تر بود. در مقابل، در فرمولاسیون‌های حاوی بتونایت و نشاسته، میزان آزادسازی باکتری کندتر و پایدارتر بود و جمعیت باکتری‌های زنده پس از ۹۰ روز نگهداری، مقدار بالاتری در مقایسه با فرمولاسیون بدون بتونایت و نشاسته و تیمار بدون کپسوله‌سازی (Free cell) نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از فرمولاسیون آلزینات سدیم - بتونایت - نشاسته - نانو سیلیس می‌تواند یک روش کارآمد برای افزایش زنده‌مانی و طول عمر باکتری‌های محرک رشد گیاه در محیط‌های آزمایشگاهی باشد. ترکیب بتونایت موجب بهبود استحکام مکانیکی و کاهش زیست‌تخریب‌پذیری و کنترل نرخ آزادسازی باکتری در کپسول‌ها شد، درحالی‌که نشاسته به‌عنوان یک ماده حفاظتی باعث بهبود زنده‌مانی باکتری‌ها شد. بنابراین به نظر می‌رسد این فناوری در آینده می‌تواند به‌عنوان یک مکمل مناسب برای کودهای شیمیایی در کشاورزی پایدار مورد استفاده قرار گیرد و نقش مهمی در بهبود حاصلخیزی خاک و افزایش رشد گیاه ایفا کند.

استناد: پزشک‌نژاد، پوریا، قربانی نصرآبادی، رضا، صادقی ماهونک، علیرضا (۱۴۰۴). اثر فرمولاسیون‌های کپسولی حاوی باسیلوس سوبتیلیس بر زنده‌مانی، رهایش کنترل‌شده و ماندگاری باکتری در شرایط آزمایشگاهی. نشریه مدیریت خاک و تولید پایدار، ۱۵ (۳)، ۱۳۷-۱۱۹.

DOI: 10.22069/ejsms.2025.23603.2194



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

با توجه به رشد سریع جمعیت جهان که تخمین زده می‌شود تا سال 2050 به 9 میلیارد نفر خواهد رسید، افزایش تولید محصولات کشاورزی برای پاسخ‌گویی به نیازهای غذایی امری ضروری است (1). برآورده‌ساختن نیازهای غذایی و عرضه محصولات کشاورزی باکیفیت از عواملی هستند که چالش‌های جدیدی را برای یک کشور ایجاد می‌کنند (2). استفاده نادرست از کودهای شیمیایی مشکلات زیادی را به همراه داشته که از جمله آن می‌توان به کاهش کیفیت آب، افت کیفیت محصولات کشاورزی و عدم تعادل عناصر غذایی مانند نیتروژن و فسفر اشاره کرد (3). در دهه‌های اخیر، استفاده از باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPB)¹، به عنوان جایگزینی برای کودهای شیمیایی کشاورزی در نظر گرفته شده است. باکتری‌های محرک رشد گیاه، نقش مهمی در افزایش رشد گیاه، کاهش تنش‌های محیطی، بهبود خصوصیات میکروبیولوژی خاک و افزایش حاصلخیزی دارند (4). باسیلوس سوبتیلیس یک باکتری گرم مثبت به عنوان یکی از گونه‌های جنس باسیلوس، دارای شکل میله‌ای و قادر به تشکیل اندوسپورهای مقاوم است که این ویژگی به آن امکان می‌دهد شرایط محیطی سخت را تحمل کند. این باکتری‌ها همچنین متابولیت‌هایی ترشح می‌کنند که باعث بهبود رشد و سلامت گیاه می‌شوند. علاوه بر این گونه‌های باسیلوس قادر به تولید و ترشح پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی و سیدروفورهای هستند که از حرکت یون‌های سمی جلوگیری کرده و تعادل یونی را حفظ می‌کنند همچنین به جذب آب توسط ریشه‌ها کمک کرده و عوامل بیماری‌زا را سرکوب می‌کنند. این ویژگی‌ها، سویه‌های باسیلوس را به گزینه‌ای ارزشمند برای کنترل زیستی و افزایش مقاومت گیاهان در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی

تبدیل کرده است (5). با این حال، مطالعات مختلف نشان داده‌اند که جمعیت و عملکرد این باکتری‌ها هنگام تلقیح مستقیم به بذر یا تلقیح به همراه حامل‌های مختلف متداول تحت شرایط نامساعد محیطی مانند خشکی یا شوری یا در اثر رقابت با سایر گروه‌های میکروبی به شدت کاهش می‌یابد و فعالیت‌های زیستی و اثربخشی خود را از دست می‌دهند؛ بنابراین ضروری است که زنده‌مانی این دسته از ریزجانداران تلقیح شده به خاک افزایش یابد. برای این منظور، از حامل‌ها با فرمولاسیون مختلفی استفاده می‌شود تا میزان زنده‌مانی باکتری‌های محرک رشد گیاهی برای مدت زمان بیش‌تر تضمین شود (6). فناوری کپسوله‌سازی برای محصور کردن باکتری‌های محرک رشد گیاه درون کپسول‌ها به کار می‌رود تا از عملکرد باکتری محافظت کرده و خصوصاتی مانند زنده‌مانی، پایداری و رهاسازی تدریجی باکتری‌ها در خاک را بهبود دهد. کاربرد فناوری کپسوله‌سازی به‌طور گسترده‌ای در تخمیر مواد غذایی، صنایع دارویی و تصفیه فاضلاب نیز مورد استفاده قرار گرفته است، اما پژوهش‌های کم‌تری روی باکتری‌های محرک رشد گیاه کپسوله شده انجام شده است. این روش می‌تواند فعالیت میکروبی را افزایش داده و از باکتری‌های مورد استفاده در برابر عوامل نامطلوب محیطی و تنش‌های غیرزیستی محافظت کند که آن را به یکی از روش‌های ایده‌آل برای تولید کودهای زیستی باکتریایی تبدیل می‌کند (7). امروزه بیوپلیمرهای طبیعی سازگار با محیط‌زیست و کم‌هزینه، به عنوان بسترهای مناسبی برای فرمولاسیون‌های زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرند (8). آلژینات سدیم به دلیل قابلیت تجزیه‌پذیری در خاک و سازگار با محیط‌زیست، به‌طور گسترده‌ای به عنوان یک حامل مناسب برای محصورسازی و کپسوله‌سازی باکتری‌ها استفاده شده است. این ماده یک پلی‌ساکارید پلیمری است که از

1- Plant growth-promoting rhizobacteria

محیط نوترینت آگار (NA)¹ کشت داده شد و از طریق کشت مجدد و انتخاب کلونی‌های یکنواخت، خالص‌سازی میکروبی انجام گرفت. پس از اطمینان از خلوص کلونی‌ها، باکتری در محیط کشت نوترینت براث (NB)² کشت داده و در دمای 30 درجه سلسیوس با سرعت 150 دور در دقیقه به مدت 24 ساعت تا رسیدن به تراکم سلولی مطلوب (10^9 cfu/mL) تکان داده شد. تراکم سلولی مطلوب نیز به روش پلیت کانت (شمارش کلنی) نیز مورد سنجش قرار گرفت (13).

آماده‌سازی میکروکپسول: در این پژوهش، از ترکیباتی شامل: سدیم آلزینات $(C_6H_7NaO_6)_n$ شرکت Sigma-Aldrich، بنتونایت $(Al_2H_2O_{12}Si_4)$ شرکت مجللی، نشاسته $(C_6H_{10}O_5)_n$ شرکت Merck و نانو سیلیس (SiO_2) شرکت Us Research Nanomatetrial (+99% Purity, 20-30 nm, amorphous) به‌عنوان اجزای اصلی تشکیل‌دهنده کپسول استفاده شد. مقادیر مشخصی از هر ماده (مطابق با فرمولاسیون‌های ارائه شده در جدول 1) در 100 میلی‌لیتر آب دیونیزه حل شده و سپس در اتوکلاو به مدت 15 دقیقه در دمای 120 درجه استریل شدند. پس از سرد شدن، سوسپانسیون باسیلوس سوبتیلیس و محلول حامل با نسبت 1:2 (حجمی/حجمی، یک قسمت حجم سوسپانسیون باکتری به دو قسمت حجم محلول حامل) با هم مخلوط شدند. در مرحله بعد، محلول به‌دست‌آمده به‌وسیله سرنگ استریل و سرسوزن شماره 16 به‌صورت قطره‌ای به محلول کلرید کلسیم دو درصد منتقل شد و به مدت دو ساعت در شرایط استریل نگهداری گردید تا کپسول‌های پایدار تشکیل شوند (شکل 1). سپس کپسول‌ها دو تا سه بار با آب مقطر استریل شسته شده و تا رسیدن به وزن ثابت، در آون با دمای 40 درجه سلسیوس خشک شدند (14).

جلبک‌های قهوه‌ای استخراج می‌شود. هنگامی‌که کاتیون‌های دوظرفیتی در محلول آبی آلزینات سدیم حضور داشته باشند، یون‌های سدیم با این کاتیون‌ها جایگزین شده و ذرات ژلی تشکیل می‌دهند. با این حال، آلزینات سدیم به‌تنهایی به دلیل استحکام فیزیکی ضعیف، در حضور کاتیون‌های تک‌ظرفیتی در محیط، به راحتی آسیب‌دیده و باعث رهایش سریع و از بین رفتن ریزجانداران‌های محصور شده می‌شود به همین دلیل افزودن مواد دیگر مانند نشاسته، کائولین، بنتونایت، هیومیک اسید به آلزینات سدیم روشی مناسب برای افزایش استحکام مکانیکی می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد (9). در مطالعات مختلف کاربرد نانوسیلیس اثرات مثبت قابل‌توجهی بر رشد محصول، عملکرد و تحمل تنش‌های زیستی و غیرزیستی نشان داده است (10). نانوسیلیس به دلیل اندازه کوچک‌تر، سطح ویژه بالاتر و واکنش‌پذیری بالاتر کارایی بهتری از خود در مقایسه با میکروسیلیس نشان داده است (11). فناوری نانو تأثیر قابل‌توجهی در زمینه‌های مختلف از جمله زیست‌شناسی و کشاورزی دارد. در زمینه کشاورزی پایدار، توسعه نانو کودها و نانو عوامل آفت‌کش عملکرد و اثربخشی آن‌ها را افزایش می‌دهد (12). این پژوهش با هدف بررسی اثربخشی فرمولاسیون زیستی آلزینات سدیم - بنتونایت - نشاسته - نانو سیلیس بر بهبود زنده‌مانی و پایداری باکتری باسیلوس سوبتیلیس و کنترل میزان آزادسازی آن در محیط انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیه سوسپانسیون باکتریایی: باکتری باسیلوس سوبتیلیس مورد استفاده در این پژوهش، از کود بیولوژیک با نام تجاری Cang Mei از شرکت Deqiang Biology Co., Ltd کشور چین به‌دست آمد. محصول حاوی این باکتری پس از دریافت در

1- Nutrient agar
2- Nutrient broth

جدول 1- ترکیبات و مقادیر اجزای به کاررفته در فرمولاسیون‌های مختلف کپسول‌ها.

Table 1. Formulation components and their quantities in different capsule preparations.

فرمولاسیون‌ها Formulations	سدیم آلژینات (% وزنی/حجمی) Sodium alginate (%, w/v)	بتونایت (% وزنی/حجمی) Bentonite (%, w/v)	نشاسته (% وزنی/حجمی) Starch (%, w/v)	نانو سیلیس Nano-silicon (mg/mL)	کارایی کپسوله‌سازی Embedding efficiency (%)
CK	2	0	0	150	99/9
A	2	0	3	150	99/9
B	2	1	3	150	99/9
C	2	2	3	150	99/9
D	2	3	3	150	99/9

ترکیبات مورد استفاده در کپسوله‌سازی به ترتیب به شرح زیر است. CK: 2 درصد سدیم آلژینات (وزنی/حجمی)، 150 میلی‌گرم در لیتر نانوسیلیس، A: 2 درصد سدیم آلژینات (وزنی/حجمی)، 3 درصد نشاسته (وزنی/حجمی)، B: 150 میلی‌گرم در لیتر نانوسیلیس، 2 درصد سدیم آلژینات (وزنی/حجمی)، 1 درصد بتونایت (وزنی/حجمی)، 3 درصد نشاسته (وزنی/حجمی)، 150 میلی‌گرم در لیتر نانوسیلیس، C: 2 درصد سدیم آلژینات (وزنی/حجمی)، 2 درصد بتونایت (وزنی/حجمی)، 3 درصد نشاسته (وزنی/حجمی)، 150 میلی‌گرم در لیتر نانوسیلیس، D: 2 درصد سدیم آلژینات (وزنی/حجمی)، 3 درصد بتونایت (وزنی/حجمی)، 3 درصد نشاسته (وزنی/حجمی)، 150 میلی‌گرم در لیتر نانوسیلیس

Compositions used in encapsulation are as follows. CK: 2% sodium alginate (w/v), 150 mg/L nanosilica; A: 2% sodium alginate (w/v), 3% starch (w/v), 150 mg/L nanosilica; B: 2% sodium alginate (w/v), 1% bentonite (w/v), 3% starch (w/v), 150 mg/L nanosilica; C: 2% sodium alginate (w/v), 2% bentonite (w/v), 3% starch (w/v), 150 mg/L nanosilica; D: 2% sodium alginate (w/v), 3% bentonite (w/v), 3% starch (w/v), 150 mg/L nanosilica

کلرید سدیم 0/9 درصد غوطه‌ور شدند. سپس کپسول‌ها خارج شده و آب سطحی آن‌ها با استفاده از دستمال کاغذی استریل جذب و وزن آن بلافاصله اندازه‌گیری شد (W1). در نهایت، میزان انبساط‌پذیری کپسول‌ها با استفاده از رابطه زیر و در سه تکرار محاسبه شد (13).

اندازه‌گیری قطر کپسول‌ها: برای اندازه‌گیری قطر، تعداد 40 عدد از کپسول‌های مرطوب و خشک با استفاده از کولیس ورنیه اندازه‌گیری شدند (13). اندازه‌گیری میزان انبساط‌پذیری: ارزیابی میزان تورم و انبساط‌پذیری کپسول‌ها با روش وزنی و در دمای محیط انجام شد. به این منظور، کپسول‌های خشک شده (W0) به مدت 24 ساعت در محلول استریل

$$\text{Expansion rate (ER \%)} = [(W1 - W0) / W0] \times 100 \quad (1)$$

باسیلوس سوبتیلیس و محلول حامل هر فرمولاسیون (N0) و مرحله دوم تعداد باکتری‌های زنده کپسوله نشده در محلول کلرید کلسیم پس از انجام کپسوله‌سازی (N1) تعیین گردید و کارایی فرایند با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (14).

اندازه‌گیری کارایی کپسوله‌سازی: اندازه‌گیری کارایی کپسوله‌سازی با تهیه سری رقت و و با استفاده از روش پلیت کانت (شمارش کلنی) برای هر دو مرحله در انجام این آزمون مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور، در مرحله اول و قبل از کپسوله‌سازی تعداد باکتری‌های زنده در اختلاط سوسپانسیون

$$\text{Embedding efficiency (EE \%)} = [(N0 - N1) / N0] \times 100 \quad (2)$$

شده و پس از تهیه سری رقت، تعداد باکتری‌های زنده با استفاده از روش شمارش پلیت کانت بر روی محیط نوترینت آگار و در سه تکرار اندازه‌گیری شد (13).

زیست‌تخریب‌پذیری کپسول‌ها: برای بررسی زیست‌تخریب‌پذیری، کپسول‌ها در توری‌های پلاستیکی با اندازه منافذ ریز قرار داده شدند. در هر کیسه، مقدار مشخصی از کپسول خشک شده (یک گرم) قرار داده شده و در عمق 5 سانتی‌متری خاک دفن گردید. نمونه‌ها به مدت 30 روز در دمای محیط نگهداری شده و در صورت لزوم با اضافه‌کردن آب مقطر رطوبت خاک در حد ظرفیت زراعی حفظ شد. وزن اولیه کپسول‌های خشک شده به صورت (Wa) تعریف شد. در فواصل زمانی مشخص، کیسه‌ها از خاک خارج شده، محتویات آن با آب مقطر شسته و پس از خشک‌شدن، وزن نهایی (Wb) اندازه‌گیری شد. نرخ زیست‌تخریب‌پذیری با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (13).

$$\text{Biodegradation rate (DR \%)} = [(Wa - Wb) / Wa] \times 100 \quad (3)$$

باکتری‌های درون کپسول‌ها آزاد شوند. تعداد باکتری‌های زنده با استفاده از روش پلیت کانت در محیط نوترینت آگار و در سه تکرار تعیین شد (13).
تجزیه آماری: تجزیه و تحلیل داده‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و در 3 تکرار با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS 9 انجام و مقایسه میانگین‌ها بر مبنای آزمون توکی (tukey; $P < 0/05$) صورت گرفت. همچنین نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم شد.

میزان زنده‌مانی باکتری: برای تعیین میزان زنده‌مانی باکتری، یک گرم از کپسول‌های خشک شده در 10 میلی‌لیتر بافر فسفات استریل (pH 7.0) در دمای 30 درجه سلسیوس به مدت یک ساعت غوطه‌ور گردید. سپس کپسول‌ها تحت شرایط استریل و در زیر هود لامینار در همان محلول بافر، آسیاب شده و باکتری‌های درون آن‌ها آزاد شدند. پس از تهیه سری رقت، شمارش باکتری‌های زنده با استفاده از روش پلیت کانت در محیط نوترینت آگار انجام شد (15).

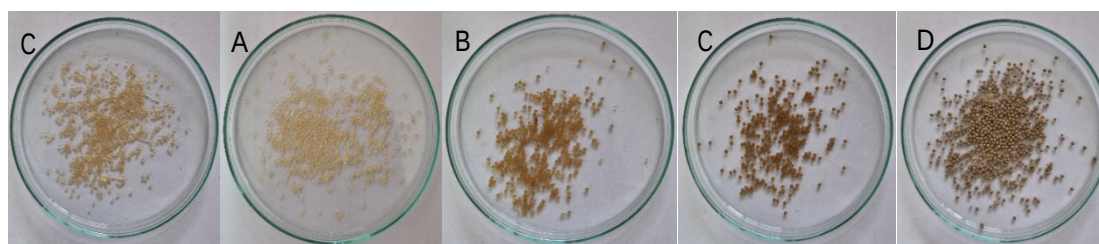
میزان آزادسازی باکتری: به منظور ارزیابی میزان آزادسازی باکتری از کپسول‌ها با فرمولاسیون‌های مختلف، آزمایشی در طی 30 روز انجام شد. برای این منظور، مقدار 0/5 گرم کپسول‌های خشک در 10 میلی‌لیتر بافر فسفات استریل 2 مولار (pH 7.0) در لوله‌های 50 میلی‌لیتری غوطه‌ور گردیدند و در دمای اتاق نگهداری شدند. در فواصل زمانی مختلف پس از ورتکس، نمونه‌هایی به حجم 0/1 میلی‌لیتر برداشت

میزان ماندگاری سلول‌های باکتری کپسوله شده: به منظور بررسی میزان ماندگاری سلول‌های باکتری کپسوله شده در فرمولاسیون‌های مختلف و بدون کپسوله‌سازی به صورت سلول‌های آزاد (Free cell) و در شرایط نگهداری یکسان، نمونه‌ها در لوله استریل و در دمای 4 درجه سلسیوس به مدت 3 ماه نگهداری شدند. هر 15 روز، مقدار 1 گرم از کپسول‌ها در لوله 50 میلی‌لیتری استریل قرار داده شده و به آن 10 میلی‌لیتر بافر فسفات استریل 2 مولار (pH 7.0) افزوده شد. سپس نمونه‌ها آسیاب گردیدند تا

نتایج

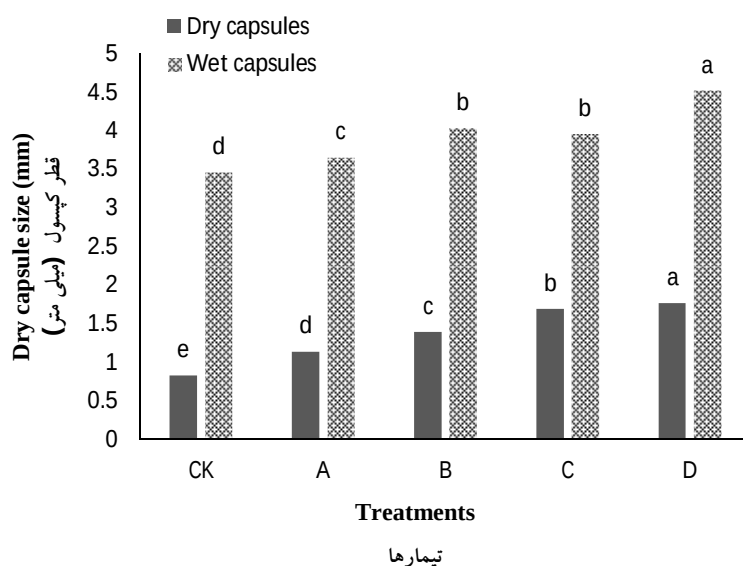
قطر و میزان انبساط‌پذیری کپسول: نتایج حاصل از بررسی اندازه قطر کپسول‌ها در فرمولاسیون‌های مختلف نشان داد که ترکیب سدیم آلژینات با بنتونیت و نشاسته تأثیر قابل‌توجهی بر اندازه قطر کپسول دارد. در هر دو حالت خشک و مرطوب، افزایش درصد بنتونیت منجر به افزایش قطر کپسول و اختلاف معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد داشت. فرمولاسیون حاوی 3 درصد بنتونیت و 3 درصد نشاسته در حالت خشک و مرطوب بالاترین اندازه را به ترتیب با (1/76 و 4/52 میلی‌متر) و کوچک‌ترین قطر مربوط به فرمولاسیون شاهد (CK) به ترتیب برابر با (0/83 و 3/46 میلی‌متر) بود (شکل 2). همچنین مشاهده شد که در همه فرمولاسیون‌ها، اندازه کپسول پس از خشک‌شدن نسبت به حالت مرطوب کاهش پیدا کرد،

اما این کاهش در نمونه‌های بدون بنتونیت محسوس‌تر بود. نتایج حاصل از بررسی میزان انبساط‌پذیری کپسول‌ها نشان داد که فرمولاسیون بدون بنتونیت کم‌ترین میزان انبساط‌پذیری را دارند به‌طوری‌که فرمولاسیون بدون بنتونیت و نشاسته دارای میزان انبساط‌پذیری 12/2 درصد بود. در مقابل با افزایش مقدار بنتونیت، این میزان انبساط‌پذیری به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافت ($P < 0/05$). نمونه حاوی 1 درصد بنتونیت دارای نرخ انبساط 24/4 درصد بود، درحالی‌که فرمولاسیون‌های دارای 2 و 3 درصد بنتونیت به ترتیب 38/33 و 36/9 درصد را نشان دادند که از لحاظ آماری نسبت به فرمولاسیون شاهد (CK) اختلاف معنی‌داری را نشان دادند (شکل 3).



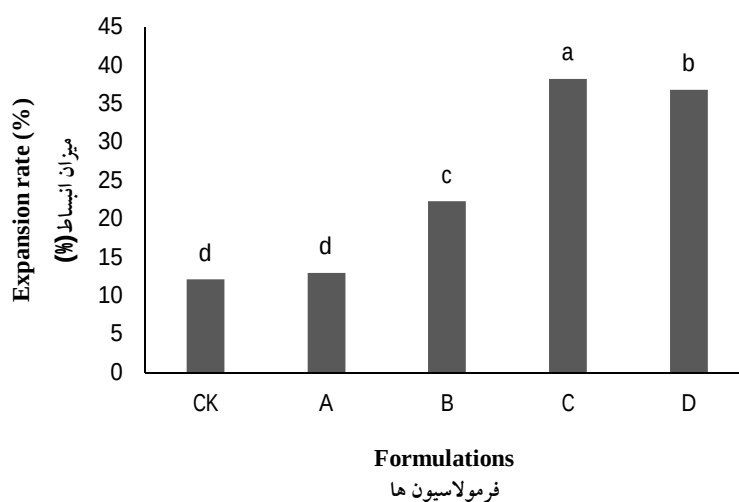
شکل 1- نمای مورفولوژیک کپسول‌ها با فرمولاسیون‌های مختلف. CK: 2 درصد سدیم آلژینات (وزنی/حجمی)، 150 میلی‌گرم در لیتر نانوسیلیس، 2 درصد سدیم آلژینات (وزنی/حجمی)، 3 درصد نشاسته (وزنی/حجمی)، B: 150 میلی‌گرم در لیتر نانوسیلیس، 2 درصد سدیم آلژینات (وزنی/حجمی)، 1 درصد بنتونیت (وزنی/حجمی)، 3 درصد نشاسته (وزنی/حجمی)، C: 150 میلی‌گرم در لیتر نانوسیلیس، 2 درصد سدیم آلژینات (وزنی/حجمی)، 2 درصد بنتونیت (وزنی/حجمی)، 3 درصد نشاسته (وزنی/حجمی)، D: 150 میلی‌گرم در لیتر نانوسیلیس، 2 درصد سدیم آلژینات (وزنی/حجمی)، 3 درصد بنتونیت (وزنی/حجمی)، 3 درصد نشاسته (وزنی/حجمی)، 150 میلی‌گرم در لیتر نانوسیلیس.

Figure 1. Morphology of the capsules with different formulations. CK: 2% sodium alginate (w/v), 150 mg/L nanosilica; A: 2% sodium alginate (w/v), 3% starch (w/v), 150 mg/L nanosilica; B: 2% sodium alginate (w/v), 1% bentonite (w/v), 3% starch (w/v), 150 mg/L nanosilica; C: 2% sodium alginate (w/v), 2% bentonite (w/v), 3% starch (w/v), 150 mg/L nanosilica; D: 2% sodium alginate (w/v), 3% bentonite (w/v), 3% starch (w/v), 150 mg/L nanosilica.



شکل 2- اندازه قطر کپسول در دو حالت خشک و مرطوب.

Figure 2. Diameter size of the dry and wet capsules.



شکل 3- میزان انبساط پذیری کپسول‌ها.

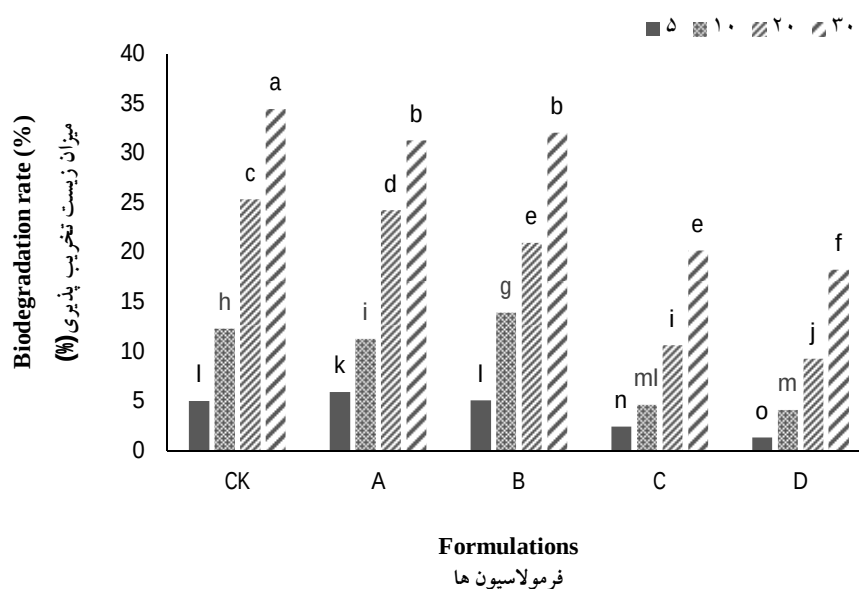
Figure 3. expansion rate of the capsules.

روز در مقایسه با تیمار شاهد (CK) نشان داد (P<0/05). در مقابل، کاهش مقدار بتونایت به 2 و 1 درصد به ترتیب باعث افزایش میزان زیست تخریب پذیری به 20/2 و 32/1 درصد شد. در تیمار بدون بتونایت، افزایش بیش تر زیست تخریب پذیری در مقایسه با سایر تیمارها مشاهده شد، به طوری که در تیمار بدون

کارایی کپسوله سازی، تعداد باکتری های زنده و زیست تخریب پذیری. نتایج بررسی زیست تخریب پذیری کپسول ها نشان داد که میزان بتونایت و نشاسته تأثیر مستقیمی بر پایداری ساختار کپسول ها دارند. تیمار حاوی 3 درصد بتونایت و نشاسته (D) کم ترین میزان زیست تخریب پذیری را با 18/3 درصد به مدت 30

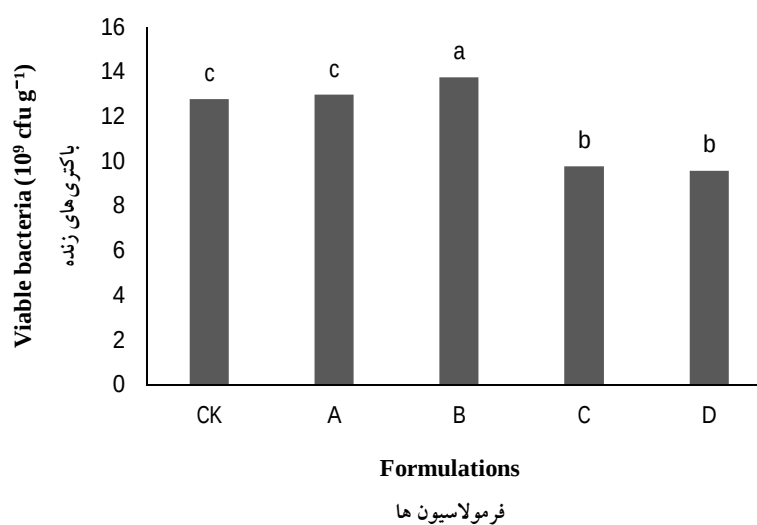
بتونایت اما با 3 درصد نشاسته (A) و تیمار شاهد (CK) به ترتیب 31/35 و 34/5 درصد زیست تخریب پذیری را در مدت 30 روز نشان دادند (شکل 4). کارایی کپسوله سازی در تمام فرمولاسیون‌ها 99 درصد گزارش شد (جدول 1). پس از فرآیند کپسوله سازی، شمار باکتری‌های زنده در تیمار شاهد

بیشتر از نمونه حاوی 3 درصد بتونایت و نشاسته ($12/8 \times 10^9$ cfu/g⁻¹) بود ($P < 0/05$) (شکل 5). در مقابل، فرمولاسیون‌های (A و CK) و فرمولاسیون با یک درصد بتونایت (B) توانست میزان جمعیت بیشتری از باکتری‌های زنده ($13/8 \times 10^9$ cfu/g⁻¹) را حفظ کند.



شکل 4- میزان زیست تخریب پذیری کپسول‌ها در طول مدت زمان‌های 5، 10، 20 و 30 روزه در خاک.

Figure 4. Biodegradation rate of the capsules at 5, 10, 20 and 30 days in soil.

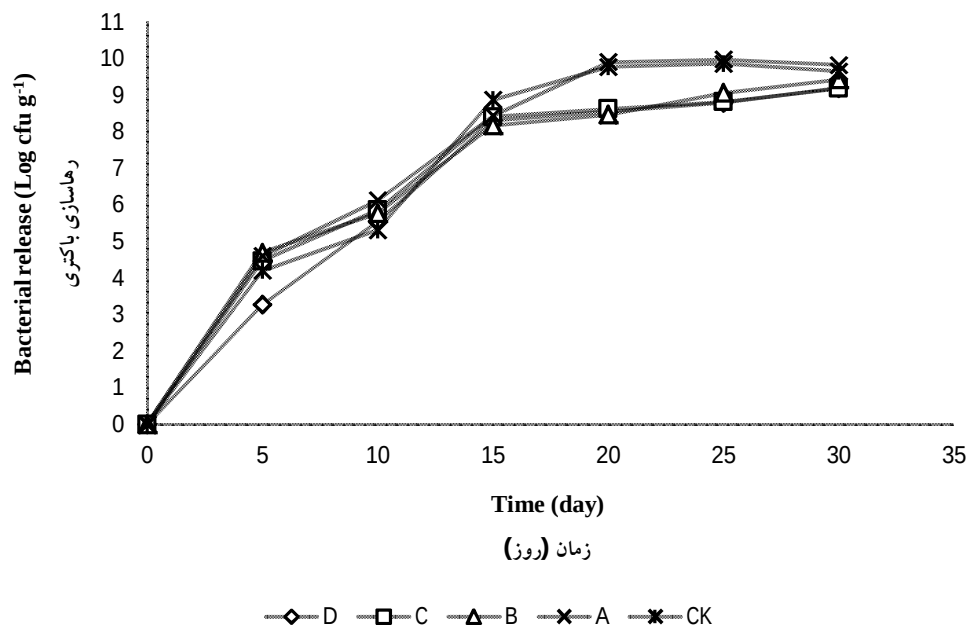


شکل 5- تعداد سلول‌های باکتریایی زنده پس از کپسوله سازی.

Figure 5. The number of viable bacterial cells after encapsulation.

تیمار حاوی 1 درصد بنتونایت بیشترین رهاسازی اولیه را در میان تیمارهای با 2 و 3 درصد بنتونایت نشان داد و میزان نهایی آن در روز سیام به $(9/44 \text{ Log cfu g}^{-1})$ رسید. فرمولاسیونهای بدون بنتونایت سرعت رهاسازی بیشتری را از خود نشان دادند. در تیمار بدون بنتونایت و دارای 3 درصد نشاسته (A)، مقدار رهاسازی اولیه در روز پنجم $(4/61 \text{ Log cfu g}^{-1})$ ثبت شد که بالاتر از تمامی تیمارهای حاوی بنتونایت بود. این مقدار در روز بیستم به حداکثر مقدار خود یعنی $(9/91 \text{ Log cfu g}^{-1})$ رسید که نشاندهنده سرعت بالای رهایش در مقایسه با سایر فرمولاسیونها است. به طور کلی، یافته‌ها نشان داد که افزایش غلظت بنتونایت موجب کنترل فرآیند رهاسازی باکتری باسیلوس سوبتیلیس و کاهش میزان آزادسازی اولیه سلولهای باکتری می‌شود (شکل 6).

میزان آزادسازی باکتری: در این پژوهش، میزان رهاسازی باکتری از کپسول با فرمولاسیونهای مختلف در بازه زمانی 30 روز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که فرمولاسیونهایی با غلظت متفاوت بنتونایت، تأثیر قابل توجهی بر میزان رهاسازی باکتری دارد به گونه‌ای که تیماری با درصد بالاتری از بنتونایت، رهاسازی کندتری را در روزهای ابتدایی نشان دادند. در تیمار حاوی 3 درصد بنتونایت و نشاسته (D)، مقدار رهاسازی باکتری در روز پنجم برابر با $(3/27 \text{ Log cfu g}^{-1})$ بود که این مقدار تا روز سیام به $(9/19 \text{ Log cfu g}^{-1})$ افزایش یافت. در تیمار حاوی 2 درصد بنتونایت و 3 درصد نشاسته (C)، مقدار رهاسازی باکتری در روز پنجم $(4/47 \text{ Log cfu g}^{-1})$ بود، اما در نهایت مقدار رهاسازی در روز سیام تفاوت چندانی با تیمار 3 درصد بنتونایت و نشاسته (D) نداشت. از سوی دیگر،

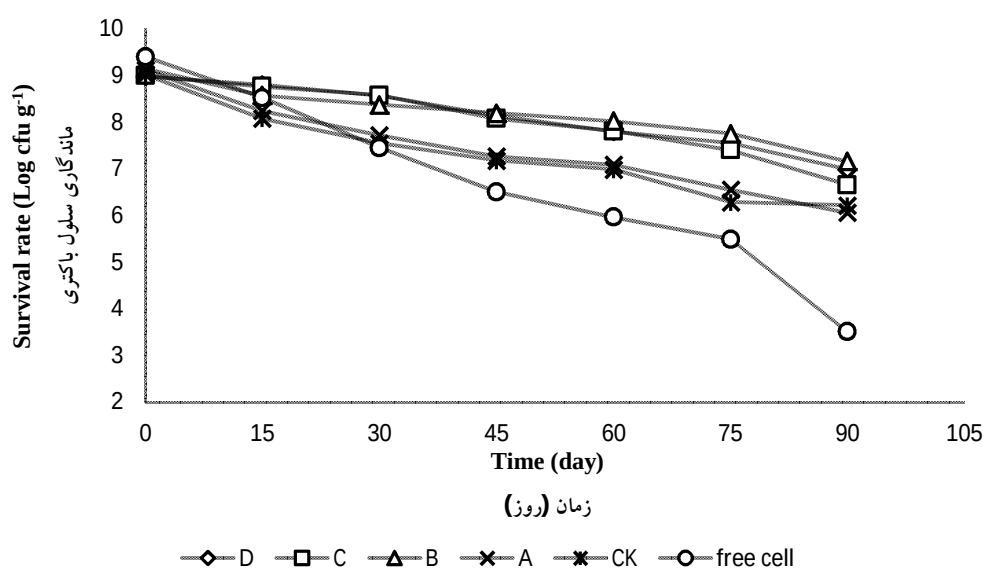


شکل 6- میزان رهایش سلولهای باکتری از فرمولاسیونهای کپسولی مختلف.

Figure 6. The release rate of bacterial cells from different capsule formulations.

میزان ماندگاری سلول‌های باکتری: در این مطالعه، میزان ماندگاری سلول‌های باکتری در کپسول با فرمولاسیون‌های مختلف در دوره‌ای 90 روزه مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که حضور بتونایت در ترکیب کپسول‌ها تأثیر مثبتی بر افزایش میزان ماندگاری سلول‌های باکتری در طول زمان نگهداری دارد. نمونه‌های حاوی درصد بالاتر بتونایت کاهش کمتری در تعداد سلول‌های زنده و افزایش میزان ماندگاری سلول‌های باکتری نشان دادند، درحالی‌که تیمارهای بدون بتونایت و نشاسته (CK) منجر به کاهش سریع‌تر جمعیت باکتری‌ها در طول زمان شد. در تیمار حاوی 3 درصد بتونایت و نشاسته (D)، زنده‌مانی اولیه باکتری‌ها برابر با $(8/98 \text{ Log cfu g}^{-1})$ بود که پس از 90 روز به $(6/98 \text{ Log cfu g}^{-1})$ کاهش یافت. تیمار با 2 درصد بتونایت (C) روند مشابهی را نشان داد به‌طوری‌که مقدار زنده‌مانی از $(8/99 \text{ Log cfu g}^{-1})$ به $(6/65 \text{ Log cfu g}^{-1})$ در روز 90 رسید. تیمار حاوی 1 درصد بتونایت (B)، کاهش زنده‌مانی با شیب ملایم‌تری همراه بود و مقدار نهایی آن در روز 90 به

نسبت به تیمارهای کپسوله شده کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد (شکل 7).



شکل 7- میزان ماندگاری سلول‌های باکتری در فرمولاسیون‌های کپسولی مختلف.

Figure 7. Survival rate of bacterial cells in different capsule formulations.

بحث

کپسوله سازی باکتری های محرک رشد گیاه در برخی از مطالعات پیشین، از پلیمرهای طبیعی مانند آلژینات سدیم یا کیتوزان به عنوان مواد کپسوله کننده و از بنتونایت، نشاسته، هیومیک اسید و قندهایی مانند ترهالوز به عنوان مواد اصلاحی برای بهبود استحکام مکانیکی و افزایش میزان زندهمانی باکتری ها استفاده شده است (21). معمولاً مواد معدنی رسی (مانند کائولین و بنتونایت) به عنوان حامل در کپسول ها اضافه می شوند که این مواد می توانند باکتری های بیش تری را جذب کرده و کارایی کپسوله سازی را در طول فرایند تولید افزایش می دهند. علاوه بر این، این ترکیبات در فرآیند رهاسازی باکتری ها به عنوان یک عامل انبساط پذیر عمل می کنند که منجر به رهایش پایدار باکتری ها به خارج از کپسول ها می شود (13). در این پژوهش نشان داده شد که مخلوط بنتونایت و نشاسته با آلژینات سدیم سبب بهبود ویژگی های کلیدی کپسول های حاوی باکتری باسیلوس سوبتیلیس می شود. بنتونایت با ایجاد ساختار یکنواخت کروی و پایدارتر، از انقباض شدید کپسول ها در هنگام خشک شدن جلوگیری کرده و به حفظ یکپارچگی و افزایش قطر آن ها کمک می کند. ابتدا با افزایش درصد بنتونایت، دوام ساختاری کپسول ها در برابر خشک شدن و زیست تخریب پذیری افزایش یافته (18) درصد در طول 30 روز برای فرمولاسیون D که به معنای بهبود ساختار دیواره ای کپسول بود (7). این یافته ها بیانگر آن است که بنتونایت نقش مؤثری در افزایش پایداری کپسول ها دارد در حالی که نشاسته نیز به صورت نسبی می تواند در بهبود ساختار کپسول مؤثر باشد (8). از طرفی این پایداری ساختاری احتمال دارد منجر به رهاسازی تدریجی و یکنواخت سلول ها در طول مدت 30 روزه شده باشد، به طوری که نمونه های حاوی 3 درصد بنتونایت

کمترین رهاسازی اولیه باکتری را در مقایسه با فرمولاسیون های بدون بنتونایت و نشاسته نشان دادند. اگرچه افزودن بنتونایت به فرمولاسیون ممکن است موجب بهبود پایداری و کنترل رهاسازی باکتری شود، اما می تواند تأثیر منفی نسبی بر میزان زندهمانی اولیه باکتری ها در فرآیند کپسوله سازی داشته باشد. در این پژوهش در سنجش تعداد باکتری های زنده پس از کپسوله سازی مشاهده شد که تیمارهایی با غلظت بالا (2 و 3 درصد بنتونایت) باعث کاهش تعداد جمعیت باکتری باسیلوس سوبتیلیس شد (شکل 5). این کاهش تعداد باکتری های زنده در نمونه دارای بنتونایت می تواند ناشی از اثرات احتمالی برخی از غلظت های بنتونایت بر زندهمانی باکتری ها در فرآیند کپسوله سازی باشد (13). تیمارهای بدون بنتونایت و با یک درصد بنتونایت تعداد بالاتری از سلول های باکتری باسیلوس سوبتیلیس را حفظ کردند، اما در نگهداری بلندمدت (90 روز) تیمار حاوی بنتونایت، به واسطه محافظت فیزیکی و جذب سطحی سلول های باکتری، کاهش جمعیت باکتری کمتری را نشان دادند به طوری که میزان ماندگاری سلول های باکتری Log cfu g^{-1} 99/8-98/6 پس از 90 روز انکوباسیون بود. این نتایج نشان می دهد که فرمولاسیون بهینه با ترکیب سدیم آلژینات و بنتونایت و نشاسته، علی رغم کاهش اندک زندهمانی و جمعیت باکتری در لحظه کپسوله سازی، عملکرد بهتری در حفظ جمعیت میکروبی در طول زمان دارد. زوهر- پرز و همکاران (2003) از بنتونایت و کائولین به عنوان مواد پرکننده و از اسید آلژینیک - گیلیسیرین به عنوان عامل تثبیت کننده برای کپسوله سازی *Pantoea agglomerans* و *Trichoderma harzianum* استفاده کردند. نتایج نشان داد که افزودن بنتونایت و کائولین به طور قابل توجهی ضخامت دیواره و تعداد باکتری های زنده در کپسول ها را افزایش می دهد (23). نتایج حاصل از

حاصل از بررسی اندازه قطر کپسول‌ها در فرمولاسیون‌های مختلف نشان داد که ترکیبات به‌کاررفته، به‌ویژه بنتونیت، تأثیر قابل‌توجهی بر ابعاد نهایی کپسول‌ها در هر دو حالت خشک و مرطوب دارد. با افزایش درصد بنتونیت در فرمولاسیون، اندازه کپسول‌ها افزایش یافت؛ به‌طوری‌که بزرگ‌ترین قطر در حالت خشک و مرطوب به ترتیب با $1/7$ و $4/5$ میلی‌متر مربوط به فرمولاسیون با 3 درصد بنتونیت و کوچک‌ترین قطر در حالت خشک و مرطوب به ترتیب با $0/8$ و $3/4$ میلی‌متر مربوط به فرمولاسیون بدون بنتونیت و نشاسته بود. در حالت مرطوب، این افزایش اندازه به دلیل ظرفیت جذب و توان بالای بنتونیت در نگه‌داشتن آب در ساختار ژل است. هم‌چنین در حالت خشک نیز، کپسول‌های دارای بنتونیت پایداری ساختاری بیشتری از خود نشان داده و در برابر انقباض ناشی از خشک شدن مقاوم‌تر بودند. در نتیجه، کاهش اندازه آن‌ها پس از فرایند خشک‌کردن کم‌تر از نمونه‌های بدون بنتونیت بود. به‌طورکلی، نتایج این بخش بیانگر آن است که بنتونیت علاوه بر نقش محافظتی و کنترل رهاسازی باکتری، در افزایش و حفظ اندازه کپسول‌ها نیز مؤثر بوده و می‌تواند به بهبود خواص فیزیکی و پایداری ساختاری آن‌ها کمک کند که با نتایج حاصل از پژوهش‌های همکاران (2015) مطابقت داشت. آن‌ها گزارش کردند که افزایش غلظت بنتونیت، ویسکوزیته قطرات محلول را افزایش می‌دهد و در نتیجه اندازه کپسول‌ها نیز افزایش یافت. هم‌چنین زیست‌تخریب‌پذیری و میزان رهاسازی باکتری *Raoultella planticola* Rs-2 با افزایش غلظت آلژینات سدیم افزایش و با افزایش غلظت بنتونیت کاهش یافت (14). در این پژوهش نیز با افزایش میزان بنتونیت، قابلیت زیست‌تخریب‌پذیری کپسول‌ها کاهش یافت که احتمالاً به دلیل افزایش برهم‌کنش‌های

این پژوهش نشان داد که ترکیب این افزودنی‌ها می‌تواند هم‌زمان با بهبود استحکام فیزیکی دیواره کپسول، کنترل در رهاسازی و طول عمر سلولی را بهینه کند، گرچه تیمار حاوی نشاسته به‌تنهایی در عملکرد زیستی باکتری مانند میزان انبساط‌پذیری و تعداد باکتری‌های زنده پس از کپسوله‌سازی اختلاف معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان نداد؛ اما در میزان ماندگاری سلول‌های باکتری در طول زمان عملکرد به نسبت بهتری را در مقایسه با تیمار شاهد داشت. مقایسه این یافته‌ها با نتایج‌های همکاران (2015) نشان می‌دهد که افزایش غلظت بنتونیت در ماتریس آلژینات-بنتونیت نیز به کاهش نرخ رهاسازی و افزایش ضخامت دیواره کپسول‌ها می‌انجامد (14)، درحالی‌که شوییتز و همکاران (2012)، نقش نشاسته و عوامل اُسموپروتکتور را در حفاظت از باکتری‌های کپسوله‌شده تأیید کرده‌اند (24). در مطالعه‌ای دیگر، شوییتز و همکاران (2013) با افزودن ترهالوز به محیط کشت میکروبی نشان دادند که ترهالوز می‌تواند نرخ زنده‌مانی ریزجانداران را در طی فرایند خشک شدن به‌طور مؤثری افزایش دهد (24). باین‌حال، بیش‌تر مطالعات کنونی از نشاسته، بنتونیت و آلژینات سدیم به‌عنوان مواد تشکیل‌دهنده کپسول‌ها به‌صورت مجزا استفاده کرده‌اند و مطالعات کمی بر ترکیب این مواد به‌منظور به‌دست آوردن بهترین فرمولاسیون متمرکز بودند. در این مطالعه، آلژینات سدیم به‌عنوان ماده کپسوله‌کننده، بنتونیت و نشاسته به‌عنوان مواد جاذب و عامل حفاظتی برای کپسوله‌سازی جدایه باکتری موردنظر استفاده شد. از نظر کارایی کپسوله‌سازی باکتری‌ها، هر دو فرمولاسیون عملکرد $99/9$ درصد را نشان دادند که می‌تواند به‌دلیل جمعیت بالای باکتری‌ها در هنگام کپسوله‌سازی باشد که مطابق با نتایج حاصل از پژوهش‌های همکاران (2015) است (14). نتایج

بین مولکول‌های آلژینات سدیم و بنتونایت است، که در نتیجه احتمال دارد باعث کاهش برهم‌کنش‌ها بین آلژینات سدیم - باکتری و سایر ریزجانداران موجود در محیط خاک شده باشد (23). علاوه بر این، افزودن ترکیباتی مانند نشاسته، ساکارز یا گلوکز به کپسول‌ها می‌تواند به محافظت از ریزجانداران، کاهش تغییرات فشار اسمزی و حفظ فعالیت میکروبی پس از فرآیند خشک شدن کمک کند (25). نشاسته یک پلیمر ارزان‌قیمت و قابل در دسترس است و افزودن آن به حامل‌ها با فرمولاسیون‌های مختلف همواره موفقیت‌آمیز بوده است. علاوه بر این، به دلیل چسبندگی سلول‌ها به ذرات نشاسته، اثر حفاظتی ایجاد می‌کند که از باکتری‌ها در برابر تنش، به‌ویژه در مرحله خشک شدن، محافظت کرده و به حفظ جمعیت پایدار میکروبی در طول دوره نگهداری کمک می‌کند (26). ترکیب آلژینات سدیم - نشاسته گزینه‌ای ایدئال، به‌ویژه برای ریزجاندارانی است که می‌توانند نشاسته را به‌عنوان منبع کربنی به منظور تأمین انرژی استفاده کنند. افزودن نشاسته می‌تواند کارایی کپسوله‌سازی و تعداد باکتری‌های زنده در کپسول‌ها را افزایش دهد. این امر به این دلیل است که در فرآیند خشک شدن، محتوای آب موجود در باکتری‌ها کاهش یافته و ساختار سلولی آن تخریب می‌شود که در نهایت باعث مرگ سلول‌ها خواهد شد (27). علاوه بر این، ارزیابی میزان ماندگاری سلول‌های باکتری در فرمولاسیون با 3 درصد بنتونایت و نشاسته نشان داد که تعداد باکتری‌های زنده پس از 90 روز نگهداری همچنان بیش از 9 میلیون بوده است، که به‌طور قابل‌توجهی بیش‌تر از سوسپانسیون باکتریایی بود. این امر ممکن است به‌دلیل کمبود مواد مغذی در سوسپانسیون باکتریایی باشد، که منجر به ناتوانی سلول باکتری‌های تکثیرشده در انجام فعالیت‌های حیاتی طبیعی شده و در نتیجه، تعداد باکتری‌های زنده را طی 90 روز

به‌طور چشمگیری کاهش داده است که این نتایج عمر نگهداری کوتاه‌تر باکتری‌های در بستر مایع را تأیید می‌کند (13). در این پژوهش مشاهده شد که کپسول‌های ساخته‌شده با آلژینات سدیم - بنتونایت - نشاسته - نانو سیلیس می‌توانند به‌طور مؤثری از سلول‌های باکتری محافظت کنند. در این میان، بنتونایت نه‌تنها به‌عنوان ماده دیواره‌ای برای کپسول‌ها عمل می‌کند، بلکه می‌تواند باعث بهبود عملکرد زیستی سلول‌های باکتری در طول زمان شود. نشاسته می‌تواند به‌عنوان یک منبع کربنی جهت حفظ فعالیت باکتری در طول دوره نگهداری مورد استفاده قرار گیرد. انتخاب نانوذرات مناسب نیز برای تضمین موفقیت فرمولاسیون و بسته به هدف مورد نظر برای کاربردهای مختلفی از جمله تغذیه و مبارزه با آفات برای گیاهان ضروری است. برخی از نانوذرات مورد استفاده در فرمولاسیون‌ها شامل نانو ذرات تیتانیوم، نانو ذرات نقره، نانو ذرات طلا، نانو زئولیت‌ها، نانو اکسید روی، نانو کربن و نانو کیتوزان هستند (28). پانیچیکال و همکاران (2021) نشان دادند که تثبیت *Pseudomonas sp.* DN1 8 در کپسول‌های آلژینات سدیم حاوی اسید سالیسیلیک و نانوذرات اکسید روی، می‌تواند به عنوان روشی مناسب برای انتقال زیستی آفت‌کش‌ها و کودهای زیستی می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد (29). علاوه بر این گزارش شده است که افزودن نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم به کپسول‌های آلژینات - بنتونایت - نشاسته حاوی سویه *Bacillus subtilis* Vru1 به‌طور قابل‌توجهی توانایی این باکتری را در مهار عامل بیماری‌زا *Rhizoctonia solani* تا 90 درصد افزایش داد و همچنین باعث بهبود پارامترهای رشد در گیاه لوبیا شد (30). به‌طورکلی در این پژوهش، کپسول‌های فروموله شده با بنتونایت، نشاسته و نانو سیلیس دارای کارایی کپسوله سازی بالا سلول‌های زنده باکتری، میزان

بهبود میزان ماندگاری سلول‌های باکتری و کنترل نرخ رهایش تدریجی آن‌ها مؤثر باشد. میزان آزادسازی باکتری از کپسول‌ها نشان داد که ترکیب بتونایت و نشاسته موجب کاهش سرعت رهایش اولیه و افزایش کنترل‌شده آن در طول زمان می‌شود که به بهبود کارایی این ریزجانداران در محیط خاک کمک می‌کند. در مجموع، این پژوهش نشان می‌دهد که استفاده از کپسول‌های زیستی بر پایه آلژینات سدیم و افزودنی‌های مناسب مانند کائولین، بتونایت و اُسموپروتکتورهای مثل ترهالوز و نشاسته، می‌تواند یک روش پایدار و کارآمد برای افزایش زنده‌مانی و بهبود فعالیت باکتری‌های مفید مورد استفاده در خاک باشد. اگرچه توصیه می‌شود عملکرد کپسول‌ها در بهبود خصوصیات رشدی و جذب عناصر غذایی گیاهان در شرایط گلدانی و مزرعه مورد بررسی قرار گیرد.

رهایش تدریجی، زیست تخریب پذیری آهسته و بهبود میزان ماندگاری سلول‌های باکتری بودند.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از فرمولاسیون آلژینات سدیم - بتونایت - نشاسته - نانو سیلیس برای کپسوله سازی باکتری‌های محرک رشد گیاه می‌تواند یک راهکار مؤثر برای بهبود خصوصیات مربوط به حفظ عملکرد زیستی باکتری مانند تعداد سلول‌های زنده پس از کپسوله‌سازی، میزان رهاسازی و میزان ماندگاری سلول‌های باکتری، در طول زمان باشد. بررسی‌ها نشان داد که افزودن بتونایت به فرمولاسیون موجب افزایش استحکام مکانیکی و پایداری کپسول‌ها شده و نرخ زیست‌تخریب‌پذیری آن‌ها را کاهش می‌دهد. همچنین، حضور نشاسته در ترکیب فرمولاسیون می‌تواند در

منابع

1. Shabaan, M., Asghar, H. N., Zahir, Z. A., Zhang, X., Sardar, M. F., & Li, H. (2022). Salt-tolerant PGPR confer salt tolerance to maize through enhanced soil biological health, enzymatic activities, nutrient uptake and antioxidant defense. *Frontiers in Microbiology*, 13, 901865. doi.org/10.3389/fmicb.2022.901865.
2. Saiz-Rubio, V., & Rovira-Más, F. (2020). From smart farming towards agriculture 5.0: A Review on Crop Data Management. *Agronomy*, 10(2), Article 2. doi.org/10.3390/agronomy10020207.
3. Long, X., Luo, Y., Sun, H., & Tian, G. (2018). Fertilizer using intensity and environmental efficiency for China's agriculture sector from 1997 to 2014. *Natural Hazards*, 92(3), 1573-1591. doi.org/10.1007/s11069-018-3265-4.
4. Jalal, A., Filho, M. C. M. T., da Silva, E. C., da Silva Oliveira, C. E., Freitas, L. A., & do Nascimento, V. (2022). Plant Growth-Promoting Bacteria and Nitrogen Fixing Bacteria: Sustainability of Non-legume Crops. In D. K. Maheshwari, R. Dobhal, & S. Dheeman (Eds.), *Nitrogen Fixing Bacteria: Sustainable Growth of Non-legumes* (pp. 233-275). Springer Nature. doi.org/10.1007/978-981-19-4906-7_11.
5. Hashem, A., Tabassum, B., & Abd_Allah, E. F. (2019). *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi journal of biological sciences*, 26(6), 1291-1297. doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.05.004.
6. Szopa, D., Mielczarek, M., Skrzypczak, D., Izydorczyk, G., Mikula, K., Chojnacka, K., & Witek-Krowiak, A. (2022). Encapsulation efficiency and survival of plant growth-promoting microorganisms in an alginate-based matrix – A systematic review and protocol for a practical approach. *Industrial Crops and Products*, 181, 114846. doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114846.

7. Rojas-Sánchez, B., Guzmán-Guzmán, P., Morales-Cedeño, L. R., Orozco-Mosqueda, M. del C., Saucedo-Martínez, B. C., Sánchez-Yáñez, J. M., Fadji, A. E., Babalola, O. O., Glick, B. R., & Santoyo, G. (2022). Bioencapsulation of microbial inoculants: mechanisms, formulation types and application techniques. *Applied Biosciences*, 1(2), Article 2. doi.org/10.3390/applbiosci1020013.
8. Balla, A., Silini, A., Cherif-Silini, H., Chenari Bouket, A., Alenezi, F. N., & Belbahri, L. (2022). Recent advances in encapsulation techniques of plant growth-promoting microorganisms and their prospects in the sustainable Agriculture. *Applied Sciences*, 12(18), Article 18. doi.org/10.3390/app12189020.
9. Simó, G., Fernández-Fernández, E., Vila-Crespo, J., Ruipérez, V., & Rodríguez-Nogales, J. M. (2017). Research progress in coating techniques of alginate gel polymer for cell encapsulation. *Carbohydrate Polymers*, 170, 1-14. doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.04.013.
10. Desoky, E.-S. M., Mansour, E., El-Sobky, E.-S. E. A., Abdul-Hamid, M. I., Taha, T. F., Elakkad, H. A., Arnaout, S. M. A. I., Eid, R. S. M., El-Tarabily, K. A., & Yasin, M. A. T. (2021). Physio-biochemical and agronomic responses of faba beans to exogenously applied nano-silicon under drought stress conditions. *Frontiers in Plant Science*, 12. doi.org/10.3389/fpls.2021.637783.
11. de Moraes, A. C. P., & Lacava, P. T. (2022). Use of silicon and nano-silicon in agro-biotechnologies. In H. Etesami, A. H. Al Saeedi, H. El-Ramady, M. Fujita, M. Pessarakli, & M. Anwar Hossain (Eds.), *Silicon and Nano-silicon in Environmental Stress Management and Crop Quality Improvement* (pp. 55-65). Academic Press. doi.org/10.1016/B978-0-323-91225-9.00017-0.
12. Adam, W., Lukacs, Z., Kahle, C., Saha-Möller, C. R., & Schreier, P. (2001). Biocatalytic asymmetric hydroxylation of hydrocarbons by free and immobilized *Bacillus megaterium* cells. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11(4), 377-385. [doi.org/10.1016/S1381-1177\(00\)00028-X](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(00)00028-X).
13. Zhang, W., Zheng, L., Lang, D., Zhang, X., Ma, X., Li, X., & Zhang, X. (2023). Eco-friendly bio-encapsulation from sodium alginate-trehalose-kaolin and its performance evaluation in improving plant growth under salt or/and drought conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 225, 123-134. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.12.009.
14. He, Y., Wu, Z., Tu, L., Han, Y., Zhang, G., & Li, C. (2015). Encapsulation and characterization of slow-release microbial fertilizer from the composites of bentonite and alginate. *Applied Clay Science*, 109-110, 68-75. doi.org/10.1016/j.clay.2015.02.001.
15. Li, X., Wu, Z., He, Y., Ye, B. C., & Wang, J. (2017). Preparation and characterization of monodisperse microcapsules with alginate and bentonite via external gelation technique encapsulating *Pseudomonas putida* Rs-198. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. [doi: 10.1080/09205063.2017.1335075](https://doi.org/10.1080/09205063.2017.1335075).
16. Hafezi Ghehestani, M. M., Azari, A., Rahimi, A., Maddah-Hosseini, S., & Ahmadi-Lahijani, M. J. (2021). Bacterial siderophore improves nutrient uptake, leaf physiochemical characteristics, and grain yield of cumin (*Cuminum cyminum* L.) ecotypes. *Journal of Plant Nutrition*, 44(12), 1794-1806. doi.org/10.1080/01904167.2021.1884703.
17. Rani, U., & Kumar, V. (2019). Microbial bioformulations: present and future aspects. In R. Prasad, V. Kumar, M. Kumar, & D. Choudhary (Eds.), *Nanobiotechnology in Bioformulations* (pp. 243-258). Springer International Publishing. doi.org/10.1007/978-3-030-17061-5_10.
18. Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., & Valéro, J. R. (2006). Recent advances in downstream processing and

- formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Process Biochemistry*, 41(2), 323-342. doi.org/10.1016/j.procbio.2005.07.015.
19. 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 and Soil*, 378(1), 1-33. doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x.
20. Forni, C., Duca, D., & Glick, B. R. (2017). Mechanisms of plant response to salt and drought stress and their alteration by rhizobacteria. *Plant and Soil*, 410(1), 335-356. doi.org/10.1007/s11104-016-3007-x.
21. Chaudhary, T., Dixit, M., Gera, R., Shukla, A. K., Prakash, A., Gupta, G., & Shukla, P. (2020). Techniques for improving formulations of bioinoculants. *3 Biotech*, 10(5), 199. doi.org/10.1007/s13205-020-02182-9.
22. Brahmaprakash, G. P., Sahu, P. K., Lavanya, G., Gupta, A., Nair, S. S., & Gangaraddi, V. (2020). Role of additives in improving efficiency of bioformulation for plant growth and development. In *Frontiers in Soil and Environmental Microbiology*. CRC Press.
23. 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. doi.org/10.1007/s10295-011-1028-2.
24. Schoebitz, M., López, M. D., & Roldán, A. (2013). Bioencapsulation of microbial inoculants for better soil-plant fertilization. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 33(4), 751-765. doi.org/10.1007/s13593-013-0142-0.
25. Magan, N. (2001). Physiological approaches to improving the ecological fitness of fungal biocontrol agents. In *Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potential* (pp. 239-251). doi.org/10.1079/9780851993560.0239.
26. Schoebitz, M., Simonin, H., & Poncelet, D. (2012). Starch filler and osmoprotectants improve the survival of rhizobacteria in dried alginate beads. *Journal of Microencapsulation*. [doi:10.3109/02652048.2012.665090](https://doi.org/10.3109/02652048.2012.665090).
27. Vassilev, N., Vassileva, M., Martos, V., Garcia del Moral, L. F., Kowalska, J., Tytkowski, B., & Malusá, E. (2020). Formulation of microbial inoculants by encapsulation in natural polysaccharides: Focus on beneficial properties of carrier additives and derivatives. *Frontiers in Plant Science*, 11. doi.org/10.3389/fpls.2020.00270.
28. Nayana, A. R., Joseph, B. J., Jose, A., & Radhakrishnan, E. K. (2020). Nanotechnological advances with PGPR applications. In S. Hayat, J. Pichtel, M. Faizan, & Q. Fariduddin (Eds.), *Sustainable Agriculture Reviews 41: Nanotechnology for Plant Growth and Development* (pp. 163-180). Springer International Publishing. doi.org/10.1007/978-3-030-33996-8_9.
29. Panichikkal, J., Prathap, G., Nair, R. A., & Krishnankutty, R. E. (2021). Evaluation of plant probiotic performance of *Pseudomonas* sp. encapsulated in alginate supplemented with salicylic acid and zinc oxide nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 166, 138-143. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.110.
30. Saberi-Rise, R., & Moradi-Pour, M. (2020). 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. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.197.

