

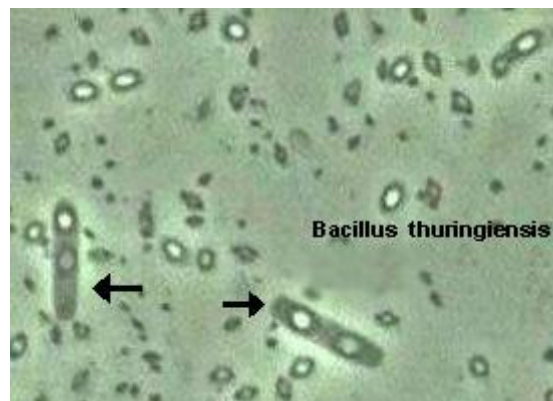


مقدمه :

Bacillus thuringiensis یک باکتری بیماری زا در حشرات است که عنصر فعال برخی حشره کش ها را تشکیل می دهد.

این باکتری گرم مثبت و خاکزی به عرض ۱-۱.۲ و طول ۳-۴ میکرون با اسپور نیمه انتهایی و بیضی شکل می باشد. این باکتری همزمان با تشکیل اسپور در داخل اسپورانژیوم تولید بلور های سمی (Cry=crystal) می کند. گونه ی **B.thuringiensis** متعلق به خانواده **Bacillaceae** می باشد.

این باکتری برای رشد به نور نیاز ندارد و از سلسله **Prokaryotes** می باشد (Bergg ، ۱۹۷۴). این باکتری در بسیاری از محیط های کشت ساده ی آزمایشگاهی مانند محلول آبگوشت (**Nutrient broth**) در شرایط هوازی و در دمای بین ۱۵ تا ۴۰ درجه سانتی گراد (اپتیمم ۳۰ درجه سانتی گراد) به راحتی رشد می کند.



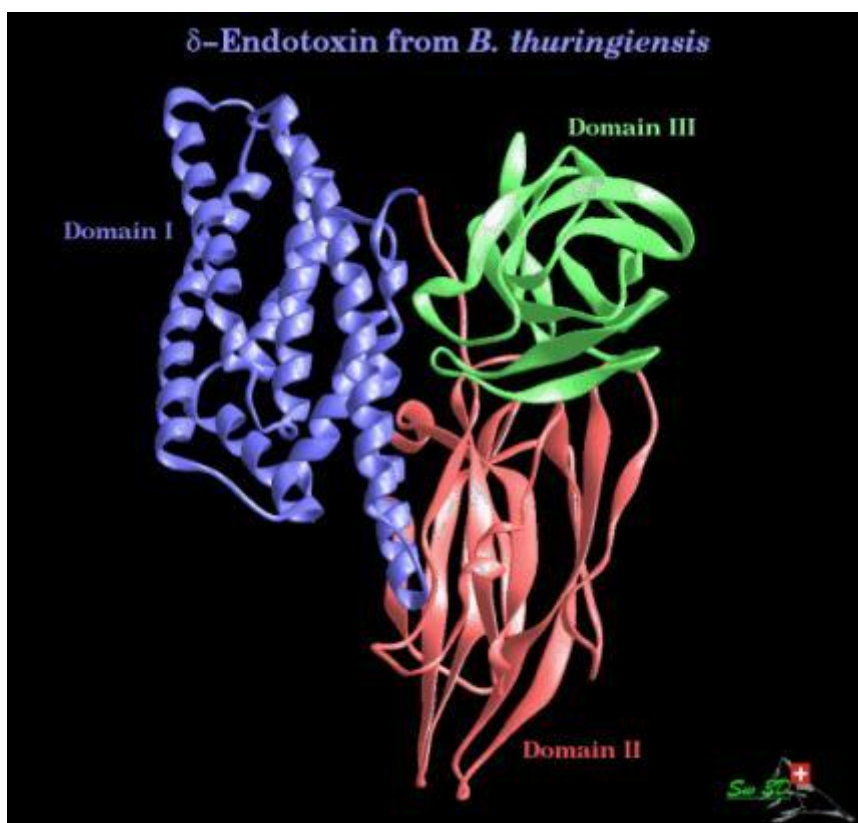
نمایی از باکتری B.T



۱-۱- پروتئین های حشره کش B.t و نحوه ی عمل آنها

این باکتری چندین توکسین تولید می کند که شامل :

- ۱- آلفا اگزوتوکسین : این سم علاوه بر حشرات برای موش و دیگر مهره داران سمی می باشد
- ۲- بتا اگزوتوکسین : در برخی نژاد های این باکتری تولید شده و بر روی پستانداران عوارض عمده ای دارد.
- ۳- گاما اگزوتوکسین : این توکسین برای حشرات سمی نمی باشد .
- ۴- دلتا اندوتوکسین (Delta-endotoxin): در مرحله مرگ باکتری و تشکیل اسپور تشکیل می شود.



شکل ۱-۱ نمایشی از سم آندوتوکسین تولید شده بوسیله B.T



توکسین های آلفا اگزوتوکسین و بتا اگزوتوکسین علاوه بر حشرات، برای پستانداران مضر بوده و در نتیجه، امروزه از زیر گونه های *Bacillus thuringiensis* که این دو توکسین را تولید می کنند، استفاده نمی شود. سومین توکسین نیز به دلیل عدم سمیت برای حشرات استفاده نمی شود.

امروزه در فراورده های تجاری *B.t* از استرین هایی از باکتری که دلتا اندو توکسین تولید می نمایند، استفاده می شود.

۱-۲- موارد استفاده از B.T

امروزه از *B.t* به دو طریق استفاده می شود:

۱- تولید سموم میکروبی حشره کش: فرآورده های تجاری *B.t* به عنوان حشره کش میکروبی به صورت گرد یا پودر های وتابل قابل تعلیق در آب ارائه می شود و امروزه جزء پر مصرف ترین عوامل کنترل میکروبی حشرات به شمار می آید.



Courtesy USDA

شکل ۱-۲ نحوه استفاده از حشره کش میکروبی



۲- تولید گیاهان **B.t** : این گیاهان حاوی ژن تولید کننده توکسین که از باکتری **Bacillus thuringiensis** بدست آمده است ، می باشد . این گیاهان خود قادر به تولید سم بوده و آفات حشره ای را که از این گیاهان تغذیه کنند ، از بین می روند . در این مطالعه ما به بررسی پروتئین های **Cry** حشره کش و همچنین نحوه ی عمل آنها می پردازیم .



شکل ۱-۳ گیاه آسیب دیده توسط حشرات

۱-۳- ساختار و چگونگی تاثیر پروتئین های حشره کش **B.t** :

روده ی میانی عده ای از لارو های حشرات، مانند بال پولک داران و برخی از دو بالان و قاب بالان، دارای محیط قلیایی بسیار بالایی است ($PH= 10.2-10.15$) ; در این شرایط (حداقل PH مورد نیاز ۸.۹ می باشد) ، کریستال های سمی حل شده و توکسین لازم به وسیله ی آنزیم های تجزیه کننده پروتئین آزاد می شود و فرم فعال توکسین تولید می شود . مطالعات بلورشناسی پروتئین های **Cry** نشان می دهد که این پروتئین دارای سه ناحیه ویژه می باشد .

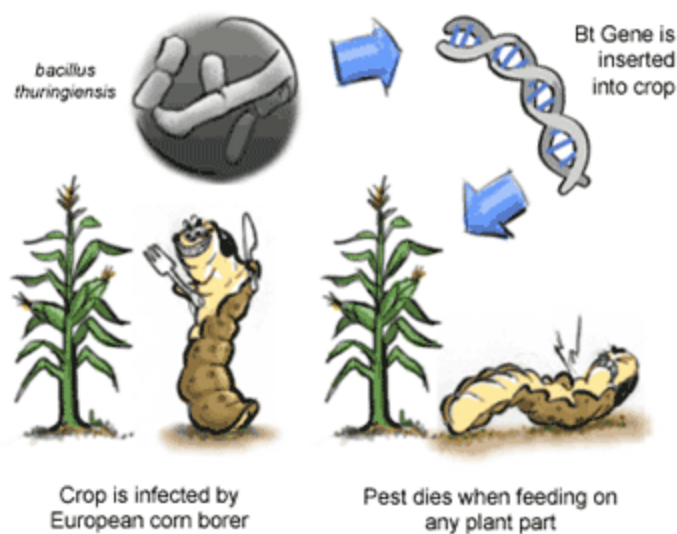
ناحیه **I** شامل هفت آلفا هلیکس که در فعل و انفعالات غشا و تشکیل منافذ نقش دارد ،

ناحیه **II** از یک ستون سه گوش شامل سه بتا شیت که در اتصال سم به سلول های پوشش روده نقش دارد

و ناحیه **III** شامل دو رشته ی آنتی پارالل بتا است



که همانند ناحیه II در ثبات سم روی گیرنده و تنظیم کانال یونی نقش دارد. در روده ی حشراتی که دارای شرایط قلیایی می باشند، سیگما اندو توکسین به فرم فعال خود یعنی دلتا اندو توکسین تبدیل شده و توسط ناحیه II به سطح سلول های پوششی روده وصل شده و توسط ناحیه I باعث ایجاد منافذی در غشای سلول شده که موجب اختلال یونی بین خون و روده می شود. گونه های آلوده شده می توانند دو نوع عکس العمل متفاوت نسبت به توکسین از خود نشان دهند. در اکثر موارد بعد از تغذیه، فلج سریع دستگاه گوارش در مدت یک ساعت یا کمی بیش از آن اتفاق می افتد و در نتیجه حشره دچار مرگ می شود. بسیاری از حشرات تنها به وسیله ی اثر کریستال سمی از بین می روند، ولی در برخی موارد، ترکیبی از اسپور و کریستال مورد نیاز است و این ترکیب همیشه در فرمولاسیون ماده ی تجارتي سم ارائه می شود.



شکل ۱-۴- نحوه ی تاثیر توکسین در بدن لارو حشرات



۴-۱- ساختار و چگونگی تاثیر پروتئینهای حشره کش میکروبی B.t

روده میانی عده‌ای از لاروهای حشرات ، مانند بال پولک‌داران و برخی از دو بالان و قاب بالان ، دارای محیط قلیایی بسیار بالایی است. در این شرایط ، کریستالهای سمی حل شده و توکسین لازم بوسیله آنزیمهای تجزیه کننده پروتئین آزاد می‌شود و فرم فعال توکسین تولید می‌شود. مطالعات بلورشناسی این پروتئینها نشان می‌دهد که این پروتئین دارای سه ناحیه ویژه می‌باشد.

ناحیه I شامل هفت آلفا هلیکس که در فعل و انفعالات غشا و تشکیل منافذ نقش دارد، ناحیه II از یک ستون سه گوش شامل سه بتا شیت که در اتصال سم به سلولهای پوشش روده نقش دارد و ناحیه III شامل دو رشته آنتی پارالل بتا است که همانند ناحیه II در ثبات سم روی گیرنده و تنظیم کانال یونی نقش دارد. در روده حشراتی که دارای شرایط قلیایی می‌باشند، سیگما اندو توکسین به فرم فعال خود یعنی دلتا اندو توکسین تبدیل شده و توسط ناحیه II به سطح سلولهای پوششی روده وصل شده و توسط ناحیه I باعث ایجاد منافذی در غشای سلول شده که موجب اختلال یونی بین خون و روده می‌شود.

گونه‌های آلوده شده می‌توانند دو نوع عکس‌العمل متفاوت نسبت به توکسین از خود نشان دهند. در اکثر موارد بعد از تغذیه ، فلج سریع دستگاه گوارش در مدت یک ساعت یا کمی بیش از آن اتفاق می‌افتد و در نتیجه حشره دچار مرگ می‌شود. بسیاری از حشرات تنها بوسیله اثر کریستال سمی از بین می‌روند، ولی در برخی موارد ، ترکیبی از اسپور و کریستال مورد نیاز است و این ترکیب همیشه در فرمولاسیون ماده تجارتي سم ارائه می‌شود .



۱-۵- تقسیم بندی پروتئینها بر اساس خصوصیات حشره کشی و توالی اسیدهای آمینه آنها

استرین های *Bacillus thuringiensis* دو نوع توکسین تولید می نمایند. نوع اصلی ، توکسینهای کریستالین می باشد که بوسیله **ژنهای Cry** کد می شود. نوع دوم توکسین Cyt یا سیتولیتیک می باشد که فعالیت توکسینهای Cry را تکمیل کرده و موجب بالا بردن تاثیر توکسین می شوند. بیش از ۱۵۰ توکسین Cry متفاوت تاکنون کلون شده است و برای سمیت روی گونه های حشرات مختلف آزمایش شده است. برای همسان سازی لیست در حال رشد توکسینها ، آنها را با یک کد چهار حرفی بر اساس توالی اسیدهای آمینه و خصوصیات حشره کشی آنها تقسیم بندی می نمایند.



۲-۱- صادرات و واردات حشره کش زیستی

با توجه به این که این محصول به شکل تجاری در بازار کشور موجود نمی باشد و هم اکنون نیز در مراحل آزمایشی تولید انکوباتوری (درا یران) به سر می برد لذا هیچ گونه آمار و اطلاعات وارداتی یا صادراتی در بازار یا گمرکات کشور موجود نمی باشد.

(مراجعه به سایت گمرک ایران آمار سالیانه از سال ۱۳۸۰ لغایت ۱۳۹۰)

در ذیل اطلاعات تجاری مربوط به نمونه های شیمیایی این محصول جهت روشن شدن اذهان خوانندگان محترم در کاربرد و میزان استفاده این محصول ارائه می گردد.

شرایط واردات :

طبق بررسی های صورت گرفته از مقررات صادرات و واردات وزارت بازرگانی، حقوق ورودی برای کد تعرفه فوق الذکر، به شرح جدول ۱ می باشد.

شاخص	حقوق ورودی	کد تعرفه	ردیف
kg	۴۰	۳۸۰۸۱۰	۱

جدول ۲-۱- وضعیت واردات حشره کش زیستی

حقوق ورودی مندرج در جدول فوق شامل حقوق پایه و سود بازرگانی است. حقوق پایه طبق ماده قانون تجمیع عوارض، حقوق گمرکی، مالیات، حق ثبت سفارش کالا، انواع عوارض و سایر وجوه دریافتی (از کالاهای وارداتی تجمیع گردیده است و معادل ۴ درصد ارزش گمرکی کالاها تعیین می شود. به مجموع این دریافتی و سود بازرگانی که طبق قوانین مربوط توسط هیأت وزیران تعیین می شود، حقوق ورودی اطلاق می گردد.

روند واردات به ایران

کد تعرفه ۳۸۰۸۱۰ یک کد تعرفه کلی بوده که چهار گروه زیر را شامل می شود:

۳۸۰۸۱۰۱۱ : حشره کش خانگی

۳۸۰۸۱۰۱۹ : سایر حشره کش ها آماده غیر خانگی

۳۸۰۸۱۰۲۱ : اتیون

۳۸۰۸۱۰۲۹ : سایر حشره کش ها تکنیکال (سم رقیق نشده)



مشاهده می شود که از میان چهار گزوه فوق کد تعرفه ۳۸۰۸۱۰۱۱ برای اسپری حشره کش محتمل تر است.

واردات انواع اسپری حشره کش به کشور مطابق با کد تعرفه ۳۸۰۸۱۰۱۱ طی سال های گذشته به شرح زیر می باشد.

جدول ۲-۲- روند واردات انواع اسپرس حشره کش

سال	۱۳۸۳	۱۳۸۴	۱۳۸۵	۱۳۸۶
واردات (کیلوگرم)	۱۹۳۴۶۹	۹۸۴	۶۳۱۳۷	۸۳۴۶۳۶
واردات (عدد*)	۴۸۳۶۷۳	۲۴۶۰	۱۵۷۸۴۳	۲۰۸۶۵۹۰

*هر عدد حشره کش ۴۰۰ گرم می باشد.

بررسی ها نشان می دهد که مبادی وارداتی انواع اسپری حشره کش ایران طی سال های گذشته عمدتاً کشورهای ژاپن و ترکیه بوده اند.

مشاهده می شود که روند واردات اسپری حشره کش خانگی طی سال های اخیر قابل ملاحظه بوده است.

علیرغم تولید داخلی، سالانه مقدار قابل توجهی انواع اسپری حشره کش به کشور وارد می شود که این نشان از کشش بازار داخل به این کالا دارد. پر واضح است که تنوع در شکل ظاهری و همچنین کیفیت این کالا یکی از مهمترین عوامل در فروش آن می باشد زیرا علاوه بر اهمیت کاربرد آن، شکل ظاهری، رنگ و جنبه فانتری بودن آن برای مصرف کننده بسیار حائز اهمیت می باشد.

شرایط صادرات محصول:

اسپری حشره کش از جمله محصولاتی است که محدودیت صادراتی نداشته و در زمره محصولات با مشوق های صادراتی محسوب می گردد. این محصول که خود به صورت قوطی بوده در بسته های ۱۲ تایی و ۲۴ تایی با توجه به شکل و ابعاد آن بسته بندی شده و جهت صادرات عرضه می گردد.



اسپری حشره کش هنگام حمل و نقل بایستی در دماهای خنک (کمتر از ۲۵ درجه سانتیگراد) و به دور از اشعه مستقیم خورشید و وسایل گرمازا قرار بگیرند چرا که در مجاورت نور و گرما احتمال آتشگیری آنها وجود دارد.

۱۳۷۲ مجلس شورای اسلامی:

اسپری حشره کش طبق ماده ۲ قانون مقررات صادرات و واردات ایران (مصوب ۴ اسلامی) دارای کد شماره ۱ می باشند.

ماده ۲ قانون مقررات صادرات و واردات ایران: کالاهای صادراتی و وارداتی به سه گروه تقسیم می شوند:

۱- کالاهای مجاز: کالاهایی که صدور یا ورود آن با رعایت ضوابط نیاز به کسب مجوز ندارد.

۲- کالاهای مشروط: کالایی است که صدور یا ورود آن با کسب مجوز امکان پذیر است.

۳- کالاهای ممنوع: کالایی است که صدور یا ورود آن به موجب شرع مقدس اسلام (به اعتبار خرید و فروش یا مصرف) و یا به موجب قانون ممنوع است.

صادرات انواع اسپری حشره کش از کشور طی سالهای گذشته به شرح زیر می باشد.

جدول ۲-۳- پتانسیل مصرف اسپری حشره کش

سال	۱۳۸۸	۱۳۸۹	۱۳۹۰	۱۳۹۱	۱۳۹۲
پتانسیل مصرف (عدد)	۵۲,۵۰۰,۰۰۰	۵۳,۳۵۰,۵۰۰	۵۴,۲۱۴,۷۷۸	۵۵,۰۹۳,۰۵۷	۵۵,۹۸۵,۵۶۵

کشورهای هدف صادراتی انواع اسپری حشره کش ایران طی سالهای گذشته عمدتاً کشورهای پاکستان، افغانستان، ارمنستان، ازبکستان، تاجیکستان، ترکمنستان، عراق، گرجستان و آذربایجان بوده اند. رشد قابل ملاحظه صادرات اسپری حشره کش در سال اخیر نشان از وجود بازارهای صادراتی دارد که مسلماً این بازارها در آینده قابل توسعه می باشند.

عمده ترین مشتریان خارجی ایران کشورهای تازه استقلال یافته از شوروی سابق می باشند. با توجه به اینکه این کشورها از نظر صنعتی در زمره کشورهای رتبه دوم (در حال توسعه) بوده و اینکه در کشور ما با توجه به وجود و دسترسی آسانتر به مواد اولیه، امکان تولید اسپری حشره کش نسبت به آن کشورها بیشتر است، بنابراین امکان توسعه صادرات نیز قوت بیشتری دارد. علاوه بر این نزدیکی



مسافت نیز دلیل دیگری بر افزایش توان صادراتی خواهد بود. دو کشور عراق و افغانستان نیز که با کشور ما همجوار بوده و با توجه به شرایط استراتژیک ویژه ای که دارند می توانند به عنوان بازارهای اصلی صادراتی برای کشور ما باشند. روابط سیاسی نزدیک، بعد مسافت، نیاز شدید این کشورها به توسعه و... از عوامل مهم انتخاب این کشورها جهت صادرات انواع اسپری حشره کش می باشد. در حداقل پیش بینی ها می توان پتانسیل صادراتی اسپری حشره کش را حداقل ۱ میلیون عدد در سال برآورد نمود.

بررسی نیاز به محصول با اولویت صادرات.

طبق آنچه که در قسمت های قبلی بیان شد:

عمده ترین واردکننده ها و کشورهایی که می توانند به عنوان بازار هدف صادراتی مد نظر قرار گیرند، کشورهای آذربایجان، ترکمنستان، ارمنستان، تاجیکستان، قزاقستان و سایر کشورهای این حوزه و همچنین کشورهای عراق و افغانستان و کشورهای آفریقایی می باشند.

کشورهای صادرکننده اسپری حشره کش در دنیا، کشورهای اروپایی و امریکایی بوده که قیمت محصولاتشان بالاتر از قیمت کالاهای ایرانی می باشد و بالطبع کشورهای هدف صادراتی که عمدتاً کشورهای در حال توسعه بوده و یا کشورهایی مانند عراق، افغانستان و کشورهای آفریقایی که از اقتصاد ضعیف تری برخوردارند می باشند، قیمت کالا پارامتر تعیین کننده ای برای آنها می باشد. مصرف سرانه اسپری حشره کش در ایران پایین بوده و تقریباً یک سوم استاندارد مصرف این کالا می باشد.



۲-۲- بررسی عرضه و تقاضای اسپری حشره کش

۲-۲-۱- بررسی ظرفیت بهره برداری فعلی و روند تولید از گذشته تاکنون

مطابق با کد آیسیک ۲۴۲۱۱۱۱۰ روند افزایش ظرفیت تولید انواع اسپری حشره کش از ابتدای سال- ۱۳۸۱ تا آخر سال ۱۳۸۶ به شرح جدول ۲-۱ می باشد.

جدول ۲-۴- روند افزایش ظرفیت اسپری حشره کش

سال	۱۳۸۱	۱۳۸۲	۱۳۸۳	۱۳۸۴	۱۳۸۵	۱۳۸۶
ظرفیت	تن ۵۳۵۸ عدد ۲۹۵۰۶۴۰۰	تن ۱۴۲۵۳ عدد ۲۹۵۰۶۴۰۰	تن ۱۹۹۷۳ عدد ۲۹۵۰۶۴۰۰	تن ۲۰۲۱۳ عدد ۳۳۶۵۶۴۰۰	تن ۲۲۰۰۰ عدد ۳۳۶۵۶۴۰۰	تن ۲۴۷۰۷ عدد ۳۳۶۵۶۴۰۰
تعداد واحد	۱۳	۱۵	۱۸	۱۹	۲۲	۲۵

مشاهده می شود که تا آخر سال ۱۳۸۶ تعداد واحدهای فعال ۲۴ واحد و ظرفیت کل واحدهای فعال نیز ۲۴۷۰۷ تن و ۳۳۶۵۶۴۰۰ عدد بوده است. شایان ذکر است که با توجه به اینکه طرح مورد نظر "اسپری حشره کش" می باشد بنابراین فقط ظرفیتهایی که بر مبنای عدد یا قوطی هستند در نظر گرفته می شوند.

۲-۲-۱- واحدهای فعال

بنابراین از میان ظرفیت های فوق مشخصات واحدهای فعال فعلی اسپری حشره کش به شرح جدول ۲-۲ می باشد.



جدول ۲-۵ - مشخصات واحدهای فعال فعلی اسپری حشره کش

نام استان	نام شرکت یا واحد	محل واحد	واحد ظرفیت	ظرفیت
تهران	به آرا	تهران	عدد	۴,۰۰۰,۰۰۰
	پاکفام	تهران	عدد	۲,۵۰۰,۰۰۰
	تریبون	تهران	عدد	۵۰۰,۰۰۰
	دنیای بهداشت (لابراتورهای فارمکس)	شهریار	قوطی	۵,۰۰۰,۰۰۰
	شیمیائی رازی	ساوجبلاغ	عدد	۶,۵۷۸,۴۰۰
	گیاه تولیدات شیمیائی و کشاورزی	تهران	عدد	۴,۱۵۰,۰۰۰
مرکزی	پارس مارین	ساوه	قوطی	۸,۲۲۸,۰۰۰
			عدد	۲,۷۰۰,۰۰۰

مطابق جدول مشاهده می شود که تنها در ۲ استان تهران و مرکزی واحدهای تولیدکننده اسپری حشره کش وجود دارد که مجموع ظرفیت آنها ۳۳۶۵۶۴۰۰ عدد می باشد. طبق تحقیقات و مطالعات صورت گرفته و مذاکراتی که با تولیدکنندگان این محصول صورت پذیرفت نرخ تولید این واحدها متغیر بوده و عمدتاً متناسب با نیاز بازار تولید می نمایند. بنا به اظهارات تولیدکنندگان و با توجه به آنچه بیان شد متوسط نرخ تولید اسپری حشره کش در کشور حدود ۵۰ درصد کل ظرفیت موجود می باشد بنابراین روند تولید اسپری حشره کش از آغاز برنامه سوم توسعه به صورت زیر می باشد.



۲-۲-۳- روند تولید انواع اسپری حشره کش

جدول ۲-۶- روند تولید انواع اسپری حشره کش

سال	۱۳۸۲	۱۳۸۳	۱۳۸۴	۱۳۸۵	۱۳۸۶
تولید	۱۴,۷۵۳,۲۰۰	۱۴,۷۵۳,۲۰۰	۱۶,۸۲۸,۲۰۰	۱۶,۸۲۸,۲۰۰	۱۶,۸۲۸,۲۰۰

در تولید اسپری حشره کش، ماشین آلات و فرآیند ساخت از پیچیدگی خاصی برخوردار نیست و دانش فنی عمدتاً مربوط به نوع فرمولاسیون ترکیب مواد با هم می باشد. تولیدکنندگان این محصولات نیز بناو ترکیبات نیاز مشتری را برآورده می کنند.

بررسی وضعیت طرح های جدید و در دست اجراء:

مطابق تحقیقات و بررسی های صورت گرفته واحدهای زیادی طی سال های گذشته و اخیر اقدام به اخذ مجوز طرح تولید اسپری حشره کش نموده اند که تعدادی از آنها با توجه به مدت زمان طی شده و پیشرفت فیزیکی صفر درصد (طبق الگوی توسعه و تولید طرح هایی را که پس از گذشت ۳ سال پیشرفت فیزیکی کمتر از ۱۰ درصد دارا هستند را نمی توان در زمره طرح های آتی تولید دانست) از طرح های در دست اجراء حذف گردیده اند. با این توضیح، لیست و مشخصات کامل طرح های جدید و طرح های توسعه در دست اجراء اسپری حشره کش (تعداد، ظرفیت، محل اجراء، میزان پیشرفت فیزیکی، و) در جدول زیر آورده شده است.



جدول ۲-۷- طرح های در دست احداث اسپری حشره کش در کشور

نام استان	نام واحد	محل احداث	پیشرفت فیزیکی درصد	تاریخ اخذ مجوز	ظرفیت طرح
اردبیل	سیروس و علیرضا نادری	اردبیل	۱۰	۸۶/۶/۱۸	عدد ۱,۱۰۰,۰۰۰
تهران	ابوالقاسم سلیمی	فیروزکوه	۰	۸۱/۹/۲۶	۱,۰۰۰,۰۰۰ قوطی
سمنان	پرند کالا	گرمسار	۲۵	۸۵/۱۰/۱۴	عدد ۳۰,۰۰۰,۰۰۰
قزوین	ام - یا	البرز	۱۴	۸۵/۱۱/۱۱	عدد ۴,۰۰۰,۰۰۰
مرکزی	غلامرضا شجاعی	ساوه	۰	۸۶/۵/۱۹	عدد ۲,۴۰۰,۰۰۰

مطابق جدول فوق مشاهده می شود که تعداد ۵ طرح در دست اجرای اسپری حشره کش در ۵ استان اردبیل، تهران، سمنان، قزوین و مرکزی با مجموع ظرفیت ۳۸۵۰۰۰۰۰ عدد وجود دارد که طی سال های آتی به بهره برداری خواهند رسید. شایان ذکر است که واحد پرند کالا واقع در منطقه صنعتی فجر شهرستان گرمسار دارای ظرفیتی معادل ۳۰ میلیون عدد در سال هست که یک ظرفیت قابل ملاحظه م میباشد و حتی اگر فقط همین واحد به بهره برداری برسد به نظر می رسد که با توجه به واحدهای تولیدکننده بازار ایران اشباع گردد. چنانچه این واحدها طی سال های آتی به بهره برداری رسیده و در حداقل پیش بینی ها با ۵۰ درصد ظرفیت فعالیت نمایند می توان گفت که طی سال های آتی، ۱۹۲۵۰۰۰۰ عدد اسپری حشره کش به تولید کشور افزوده خواهد شد. بنابراین با توجه به تولید فعلی و تولید حاصل از طرح های آینده : تولید اسپری حشره کش کشور طی سال های آتی حدود ۳۶ میلیون عدد در سال برآورد می شود.



۲-۲-۴- روند مصرف

برآورد مصرف ظاهری (تولید به علاوه واردات منهای صادرات) اسپری حشره کش در ایران به شرح زیر می باشد.

جدول ۲-۸- روند مصرف اسپری حشره کش

سال	۱۳۸۳	۱۳۸۴	۱۳۸۵	۱۳۸۶
مصرف (عدد)	۱۴,۹۸۶,۲۹۵	۱۶,۴۳۹,۸۷۳	۱۶,۳۷۰,۸۳۸	۱۸,۸۶۳,۶۳۰

همانطوری که مشاهده می شود روند مصرف اسپری حشره کش در کشور طی سال های اخیر رشد صعودی داشته و این نشان از وجود پتانسیل های بسیار بالای مصرف برای این محصول در داخل کشور می باشد. بنابر اعلام مرکز سرشماری و آمار ایران، تعداد خانوار موجود در ایران طی سال ۱۳۸۶ برابر ۵ میلیون نفر بوده است که به طور متوسط هر خانواده در سال یک عدد اسپری حشره کش مصرف دارد.

در واقع هرچه کشورهای جهان از نظر بهداشت و ثروت، اقتصاد و توسعه صنعتی پیشرفته تر هستند، سطح فرهنگ اجتماعی- بهداشتی آن ها نیز بالا رفته و بالطبع استانداردها نیز بیشتر مد نظر قرار می گیرد.

آنچه مسلم است مصرف اسپری حشره کش در ایران کمتر از حد استاندارد در کشورهای پیشرفته می باشد. بنابراین هنوز در کشور ما به دلایل پایین بودن سطح آگاهی مردم از مسائل سلامت درمانی مصرف اسپری حشره کش به استاندارد جهانی نرسیده است. بنابراین برای رسیدن به استاندارد استفاده از اسپری حشره کش (در نیمه گرم سال هر دو ماه یک عدد و به طور کلی در سال ۳ عدد) بایستی با فرهنگ سازی و آگاهی دادن به مردم، اهمیت و ضرورت استفاده از این کالا را در جامعه به مردم شناساند. در این صورت درصد در سال) به / می توان پتانسیل مصرف اسپری حشره کش را با مشاهده می شود نیاز کشور به اسپری حشره کش تا سال ۱۳۹۲ حداقل ۵۵ میلیون عدد می باشد.



۲-۳- کد آیسیک

در آمار ثبت شده واحدهای تولیدی وزارت صنایع و معادن - معاونت توسعه صنعتی- این محصول بانام "انواع حشره کش" ثبت گردیده و کد آیسیک آن ۲۴۲۱۱۱۱۰ می باشد.
شایان ذکر است که این کد آیسیک تمامی انواع حشره کش را شامل می شود.

شماره تعرفه گمرکی :

کد تعرفه ای که برای حشره کش تعریف شده است و برای کلیه تبادلات بین المللی این کالا مشخص است ۳۸۰۸۱۰ می باشد.

۲-۴- بررسی و ارائه استاندارد ملی یا بین المللی

اسپری های حشره کش متناسب با قدرت از بین بردگی دارای درصدهای متفاوت از مواد و محتویات و حد (DOSE) می باشند. استانداردهایی که برای انواع مختلف حشره کش تعریف می گردد در واقع بیانگر دوز مجاز محتویات آن بوده بطوریکه چنانچه آن اسپری مورد نظر بیشتر از حد مجاز از بین برنده داشته باشد فاقد استاندارد لازم است.

اما به طور کلی استانداردهای جهانی حشره کش عبارتند از استاندارد DIN , CE اروپا همچنین استفاده از سموم مجاز و استاندارد مورد تایید بهداشت جهانی و همچنین نظارت فنی مؤسسه انگلستان. BVCC

۲-۵- موارد مصرف و کاربرد :

همانطوریکه از نام این کالا پیداست، اسپری حشره کش برای کشتن انواع حشرات، سوسک و به طور کلی تمامی گونه های حیوانی که در قالب حشرات موذی شناخته میشوند، به کار می رود.



۲-۶- کالاهای جایگزین

اسپری حشره کش یک محصول بهداشتی بوده که برای از بین بردن حشرات مزاحم مورد استفاده قرار می گیرد. بطور کلی انواع حشره کش ها به صورت های فیزیکی جامد، مایع و گاز وجود دارند که طرح مورد بررسی در این گزارش نوع اسپری آن را که تقاضای بیشتری نسبت به سایر گون ههای آن دارد، بررسی می نماید. برای از بین بردن حشرات و جانوران موذی مزاحم که برای سلامتی مضر می باشند، مواد و ترکیبات شیمیایی بسیار زیادی به اشکال فیزیکی مختلف وجود دارد. مایعات حشره کش و سوسک کش، قرص های جاذب حشره و سایر انواع این گروه محصولات می توانند به عنوان جایگزین برای اسپری حشره کش به کار گرفته شوند. حتی در برخی موارد از نفت، بنزین و سایر هیدروکربن های آلی نیز برای از بین بردن انواع حشرات موذی استفاده می شود.

آنچه مسلم است تقاضا برای اسپری های حشره کش بیشتر از سایر گونه های این گروه محصولات است که دلیل آن هم سهولت استفاده و نگهداری و حمل و نقل آن می باشد.

اهمیت استراتژیکی کالا در دنیای امروز - هر چه هوا رو به گرمی می رود، موجودات موذی همچون پشه، مگس، سوسک و مورچه پیدا شده و گاهی وجود آنها در محیط به قدری آزاردهنده است که نه تنها سبب سلب آسایش افراد ساکن در آن محیط می شود بلکه برخی از آنها مانند بید، سوسک و موریانه به لوازم و وسایل شخصی و خانه نیز آسیب می رسانند.

حفظ پاکیزگی و بهداشت محیط کار از انواع آلودگ یها - از جمله عاری کردن آن از وجود انواع حشرات - تأثیر بسیار چشمگیری در افزایش بازدهی داشته و بهره وری را افزایش می دهد. سلامت محیطهای زندگی و کار اگرچه در نگاه اول ممکن است به عنوان اولوی تهای چندم باشد ولی ریزنقشی این مسأله در جهت افزایش راندمان کاری و همچنین سلامت افراد جامعه غیرقابل انکار می باشد.

برای مبارزه با حشرات موذی مزاحم راهکارهایی وجود دارد که اگر درست و بجا مورد استفاده قرار گیرند دیگر اثری از این مزاحمان ریزجثه باقی نخواهد ماند. از جمله مهمترین این ابزار استفاده از اسپری های حشره کش می باشد.



۲-۷- کشورهای عمده تولیدکننده و مصرف کننده محصول:

به طور کلی اسپری حشره کش در تمامی کشورهای پیشرفته و توسعه یافته و همچنین کشورهای در حال توسعه تولید می شود.

ایالات متحده امریکا، آلمان، ژاپن، ایتالیا، فرانسه، اسپانیا، اتریش، بلژیک، سوئیس، چین، کره جنوبی از جمله عمده ترین کشورهای تولیدکننده این کالا در دنیا محسوب می شوند. شایان ذکر است که اغلب کشورهای تولیدکننده این کالا تقریباً قسمتی از بازار مصرف کشور خود را در دست دارند و سایر میزان آن را نیز صادر می نمایند.

جدول ۲-۹- نتیجه گیری بررسی بازار اسپری حشره کش

تولید فعلی	۱۶/۸ میلیون عدد
پتانسیل تولید آتی	۳۶ میلیون عدد
مصرف فعلی	۱۸/۸ میلیون عدد
پتانسیل مصرف آتی	۵۶ میلیون عدد
پتانسیل صادرات	۱ میلیون عدد
کمبود عرضه	۲۱ میلیون عدد

❖ در حال حاضر و طی سالهای آتی کشور با کمبود عرضه اسپری حشره کش مواجهه است.

۲-۸- محل پیشنهادی اجرای طرح:

استان فارس



مقدمه

کنترل زیستی با استفاده از دشمنان طبیعی گونه های مهاجم، حشرات بیماری زا و علف های هرز، آنها را محدود کرده و از صدمات ناشی از به کارگیری آفت کش های شیمیایی جلوگیری می کند. در این روش، محققان، گونه های آسیب رسان را در طبیعت مورد مطالعه و بررسی قرار می دهند تا دشمنان طبیعی آنها را بیابند. سپس این دشمنان طبیعی از نظر رفتاری مورد بررسی قرار می گیرند تا اطمینان حاصل شود که فقط گونه آسیب رسان را مورد حمله قرار می دهند و برای سایر گیاهان و جانوران خطری ندارند. در صورتی که این دشمنان طبیعی یا کنترل کننده های زیستی اثر مخربی بر سایر گونه ها نداشته باشند و تعادل زیست محیطی را بر هم نزنند جهت کنترل آفات و علف های هرز مورد استفاده قرار می گیرند (۱۳). از زمانی که انسان جهت تهیه غذای خود آموخت که کشاورزی نماید، یکی از رقبا جدی در امر تولید بهتر و بیشتر محصولاتش، حشرات بودند. انسان جهت از بین بردن این رقیب سر سخت از میدان نبرد همواره به طرقی بسیار و متفاوت سعی در مبارزه با حشرات داشته است. در ابتدای امر این کار را با مبارزه مکانیکی و زراعی شروع کرد و نهایتاً به مبارزه شیمیایی دست یافت. بعدها اثرات زیانبار مواد شیمیایی در تخریب آفات، انسان را بر آن داشت تا از روشهای بیولوژیکی جهت مبارزه با این آفات استفاده نماید و آن روش چیزی نبود جز استفاده از میکروارگانیسم هایی چون باکتریها، قارچها و ویروس ها، که در حشرات ایجاد بیماری می کرد. بدلیل استفاده از میکروبهایی علیه حشرات از این آفت کشها تحت عنوان حشره کشهای میکروبی نام برده شد. یکی از باکتریهای معروف که در مرحله لاروی، بسیاری از حشرات مضر را بیمار و نابود می کند، باکتری باسیلوس تورنجنسیس است که این باکتری دارای اسپور مرکزی و بیضوی شکلی می باشد که همراه با بلور کریستالی شناسایی می گردد و تاریخچه پیدایش آن به سال ۱۹۰۲ بر می گردد، زمانی که ایشی واتا دانشمند ژاپنی باکتری اسپوردار **موازی** را از کرم ابریشم بیمار جدا و آن را سوتو باسیلوس نام نهاد. در سال ۱۹۱۱ برلینر نیز در ناحیه تورجنیای آلمان باکتری مشابهی از پروانه آرد گندم جدا کرد. این باکتری کاملاً اختصاصی عمل کرده و در حشرات مفید و انسان و سایر مهره داران بیماری ایجاد نمی نماید. نحوه اثر باکتری باسیلوس تورنجنسیس بدین صورت است که پس از آلوده شدن سیستم گوارشی لارو حشره به این باکتری، این

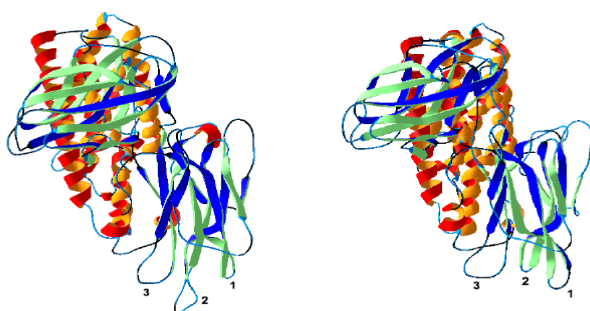


باکتری منجر به فلج شدن سیستم گوارشی لارو حشره شده و در نهایت لارو را از تغذیه باز می دارد و حتی اگر لارو سریعاً کشته نشود عدم تغذیه لارو منجر به کاهش خسارات وارده از لارو به محصولات کشاورزی می گردد. از جمله نشانه های بیماری حشراتی که بوسیله سم باکتری باسیلوس تورینجسیس از بین می روند این است که این حشرات سریعاً تغییر رنگ داده و تیره رنگ و غالباً خیلی نرم می شوند، بافتها و اندامهای داخلی به سرعت تخریب شده و به حالت لزج و غلیظ در آمده و گاهی با بوی تعفن همراه می شود، مدت کوتاهی پس از مرگ مقدار زیادی باکتری در داخل بدن حشره تولید می گردد، لاشه لارو حشره چروک خورده خشک و سخت می شود. در سال ۱۹۸۳ فراورده های تجارתי این باکتری با نام تجاری اسپورین در فرانسه تولید شد. هم اکنون در سطح جهان باسیلوس تورینجسیس با نام تجاری مختلفی از قبیل دیپل X - کاتالاس و تولید و به بازار عرضه می گردد. با این وجود اینکه سموم میکروبی باکتریایی باسیلوس تورینجسیس از کارایی بسیار خوب و موثری برخوردار است، عوامل مختلفی می توانند بر کارایی این سموم اثرات منفی داشته باشند، از جمله این عوامل می توان به اشعه ماوراء بنفش، شرایط جوی و شسته شدن از روی سطح گیاه اشاره کرد (۲۴ و ۲۵).



۳-۱- تولید حشره کشهای زیستی :

سم تولید شده توسط باسیلوس تورینجنسیس *Bacillus thuringiensis* ماهیتی پروتئینی داشته و یک سم پروتئینی کریستالی می باشد، با وزن مولکولی ۶۵ KDa، که در زمانی که باکتری در فرم اسپوری است ساخته شده و به نام دلتا توکسین معروف می باشد و از سه جزء^۱ ساخته شده است (شکل ۱) (۲۵).



شکل ۳-۱- اجزاء مولکولی سم باسیلوس تورینجنسیس

جزء ۱ : که مسئول ایجاد سوراخ در دیواره روده است.

جزء ۲ : مسئول ایجاد پیوند با رسپتور های سلولهای اپیتلیکال روده است.

جزء ۳ : مسئول محافظت دلتا توکسین در مقابل پروتئازهای روده است.

مکانیسم اثر سم در بدن حشره به این صورت است که در ابتدا که سم توسط حشره مصرف می شود، در قسمت مجرای گوارش توسط شرایط قلیایی و آنزیمهای روده، فعال شده و با اتصال به گیرنده های^۲ سلولهای اپی تلیال، سبب تخریب بافت سلولهای روده می شود. مراحل در شکل ۲ نشان داده شده است (۱۸).

۱- خوردن سم و حل شدن کریستال

۲- چسبیدن سم به مجرای گوارشی حشره

۳- شکستن سلولهای اپی تلیال مجرای روده و سوراخ شدن دیواره روده

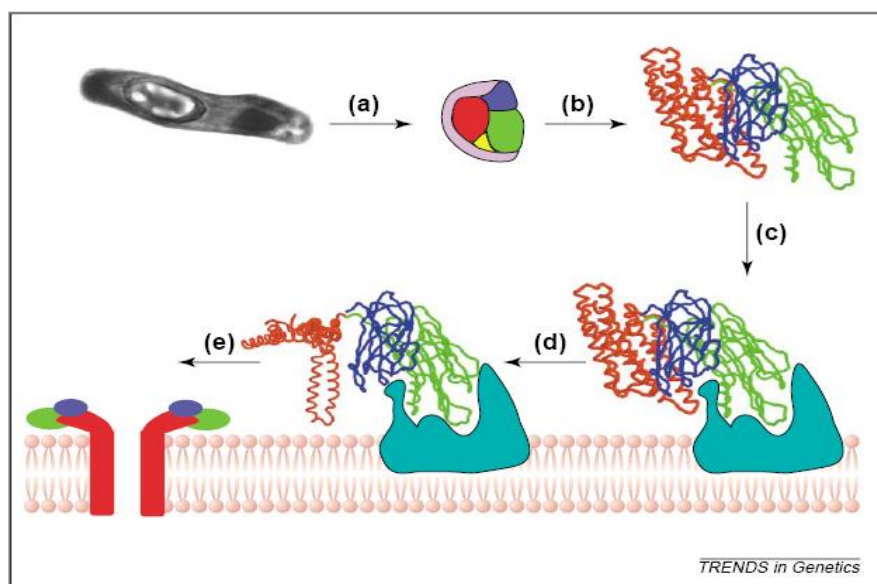
^۱ domain
^۲ receptor



۴- از کار افتادن گوارش

۵- توقف تغذیه

۶- مرگ و عفونت خونی



شکل ۳-۲- مراحل تاثیر سم در بدن لارو ها

۳-۲- مزایای استفاده از حشره کش های زیستی:

- ۱- ارگانسیم بکار رفته به عنوان حشره کش، برای انسان و سایر موجودات زنده غیر سمی و غیر بیماری زا بوده و خطری در جهت آلودگی محیط زیست ندارد (۲۹).
- ۲- فعالیت یک سم (Toxic action) فقط در مورد یک گونه یا یک گروه از حشرات می باشد و از این رو بسیار اختصاصی عمل کرده و خطری برای سایر گونه های مفید در بر ندارد (۲۹).
- ۳- به علت اینکه سم خطری برای سلامتی انسان ندارد، می توان آن را در زمانهای مختلف حتی زمانی که محصول آماده بر داشت است، بکار برد. (بر خلاف سموم شیمیایی که محدودیت در دوره پایان سم پاشی دارند) (۲۹)



۳-۳- معایب استفاده از حشره کش های زیستی:

- ۱- کاربرد اختصاصی این حشره کش سبب می شود که فقط در مورد یک یا تعداد محدودی از حشرات موثر باشد و بر سایر گونه ها اثری نداشته باشد (۲۹).
- ۲- گرما و خشکی بیش از حد محیط و دوزهایی از اشعه فرابنفش خورشید سبب کاهش قدرت حشره کش می شود .
- ۳- به فرمولاسیون خاص و پروسه نگهداری مخصوص برای نگهداری برخی سموم نیازمندیم که این ویژگی سبب کارایی محدود آن در مناطق مختلف می شود (۲۹).

۳-۴- مواد و روش ها

۳-۴-۱- باکتری *Bacillus Thuringiensis Var Kurstaki*

در این پژوهش از باکتری باسیلوس تورینجنسیس واریته کوروستاکی (۱۵ PTCC) استفاده شد. که این باکتری از مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتری های صنعتی ایران تهیه گردید. برای فعال سازی محیط کشت ابتدا باکتری در محیط محلول آبگوشت مغذی در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت گرم خانه گذاری و پس از آن در دمای یخچال، ۴ درجه سانتی گراد نگهداری گردید (۴,۵).

۳-۴-۲- محیط کشت تخمیر

با توجه به این که در این پژوهش از ضایعات، جهت تولید سم استفاده می گردد، لذا از پساب کارخانه تولید نشاسته فارس گلوکوزین شیراز استفاده گردید. آنالیز عناصر موجود در پساب طبق جدول ۱ می باشد.



جدول ۳-۱ - آنالیز عناصر موجود در پساب کارخانه نشاسته

آنالیز مواد آلی و معدنی پساب نشاسته	میزان مورد نظر
pH پساب	۳/۸۱
مواد جامد کل در یک لیتر پساب	۱۷ گرم برلیتر
مواد جامد سوسپانسیونی کل	۱۹ گرم برلیتر
میزان کربن بر حسب درصد ماده خشک	۵۱/۸۳
میزان نیتروژن کل بر حسب درصد ماده خشک	۸/۸۹
میزان فسفر بر حسب میلی گرم بر کیلو گرم	۱۴/۳۳

۳-۴-۳- آماده سازی و تخمیر

مراحل انتقال باکتری از محیط کشت اولیه به محیط کشت تخمیری توسط فرایند اسکیل آپ انجام گردید. برای انجام این مراحل ابتدا باکتری ها با ۱۰۰ سی سی از محیط سترن (دما ۱۲۱ درجه سانتی گراد و مدت زمان ۳۰ دقیقه) آبگوشت تریپتیکاز سوی^۱ مخلوط گشته و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد نگهداری گردیدند. سپس ۲٪ از این محیط کشت را وارد ۳۰۰ سی سی از آبگوشت تریپتیکاز سوی کرده و مجدداً به مدت ۲۴ ساعت در همان دمای ۳۰ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. در نهایت ۲٪ از این محیط، به محیط کشت تخمیری که از قبل سترن شده و pH آن روی ۷ تنظیم شده است، تلقیح می شود. در این مرحله، زمان تخمیر ۴۸ ساعت و دما نیز ۳۰ درجه سانتی گراد می باشد. اسپور زایی در این مرحله انجام شده که منجر به تولید پروتئین کریستالی با وزن ۶۵ کیلو دالتون می گردد (۲،۲۸).

۳-۴-۴- شمارش میزان سلول ها و اسپورزایی

از محیط کشت تخمیر به صورت رقیق سازی مرحله به مرحله توسط محلول کلرید سدیم ۰/۹٪ رقت سازی سریالی، ۱۰^۶ برابر کاهش می دهیم و از هر کدام از رقت ها ۰/۱ سی سی را به محیط پلیت کانت آگار انتقال داده و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. جهت شمارش میزان

^۱ Trypticase Soy Broth (TSB)



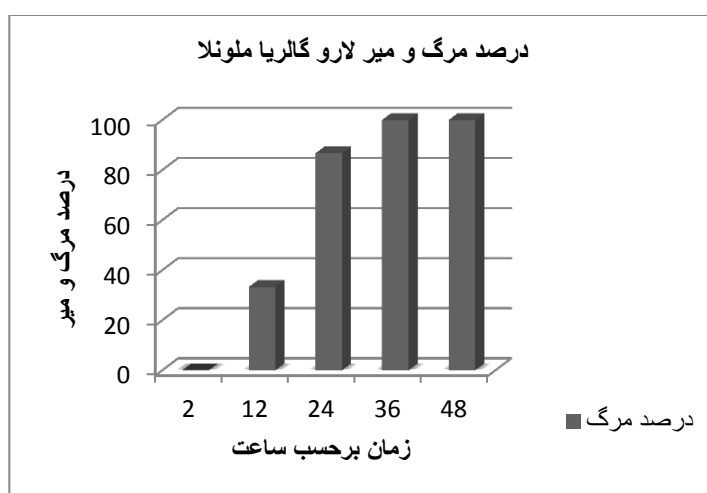
اسپور ها رقت های از قبل تهیه شده را در حمام ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه حرارت داده شد و پس از رسیدن به دمای مناسب، به محیط های پلیت کانت آگار وارد گردید.

۳-۴-۵- الکتروفورز SDS-PAGE بر روی نمونه حاوی پروتئین های کریستاله

برای بررسی پروتئین های کریستاله، الکتروفورز SDS-PAGE انجام شد (۱۵). برای ژل جداکننده، گرادیان غلظت ۲۰-۵٪ و برای ژل متراکم کننده غلظت ۵٪ تهیه گردید. نشانگر فرمنتاز^۱ به عنوان استاندارد استفاده شد و وزن مولکولی پروتئین حاصل با استفاده از پروتئین های استاندارد تعیین گردید.

۳-۴-۶- ارزیابی زیستی^۲

برای تعیین قدرت حشره کشی نمونه ها، مخلوطی از اسپور و کریستالهای *B. thuringiensis* *Var. kurstaki* بر لارو *Galleria melonella* که از بخش گیاه پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز تهیه گردید، تاثیر داده شد و میزان مرگ و میر ارزیابی گردید. برای این منظور غذای آنها (موم عسل) به حشره کش آلوده شده و در ۵ ظرف جداگانه قرار داده شدند سپس ظرف های کوچکی از آب در محیط کشت آنها قرار داده شد و در هر ظرف ۱۰ لارو اضافه گردید سپس در دمای معمولی تحت شرایط هوایی نگهداری شدند و میزان مرگ و میر آنها بعد از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت محاسبه گردید.



شکل ۳-۳: میزان درصد مرگ و میر با گذشت زمان

^۱ Fermentase

^۲ Bioassay



۳-۴-۷- آنالیز آماری

به منظور تجزیه و تحلیل نتایج، برنامه کامپیوتری SPSS مورد استفاده قرار گرفت و اطلاعات بدست آمده از آزمون ارزیابی زیستی با استفاده از T test تحلیل و برای تعیین اختلاف بین میانگین نمونه ها آزمون دانکن به کار برده شد و مقایسه در سطح ۵ درصد صورت پذیرفت.

۳-۴-۸- نتایج و بحث

۳-۴-۸-۱- رابطه شمارش اسپور و میزان پروتئین کریستالی

طبق نتایج بدست آمده در این تحقیق، تعداد کل باکتری ها و اسپورهای شمارش شده با استفاده از محیط کشت پلیت کانت آگار به ترتیب، $10^8 \times 12/5$ و $10^7 \times 48$ کولنی در هر میلی لیتر بود (جدول ۲).

بام^۱ و همکاران در سال ۱۹۹۵ نشان دادند تولید دلتا- اندوتوکسین با اسپورزایی *B. thuringiensis* رابطه دارد و بیشترین میزان اثر سمیت پروتئین های کریستالی در غلظت بالای اسپورها رخ میدهد. تیرادو- مونیتل^۲ و همکاران در سال ۲۰۰۳ بیان کردند حضور اسپورها در محیط کشت اثر تقویت کنندگی بر فعالیت کریستالهای سم و اثر آنها دارد. البته تحقیقات یزا^۳ و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان داد که دانسیته بالای اسپور نیز می تواند یک عامل ممانعت کننده برای تشکیل اندوتوکسین باشد.

^۱ Baum

^۲ Tirado-Montiel

^۳ Yezza



جدول ۳-۲- تعداد کل باکتریها و اسپورهای حاصل از *B. thuringiensis* در محیط کشت تخمیر بعد از ۲۴ ساعت

شمارش کلی باکتری (cfu/ml)	$12/5 \times 10^8$
شمارش اسپور (cfu/ml)	4×10^7
اسپورزایی (/.)	۳۸/۴

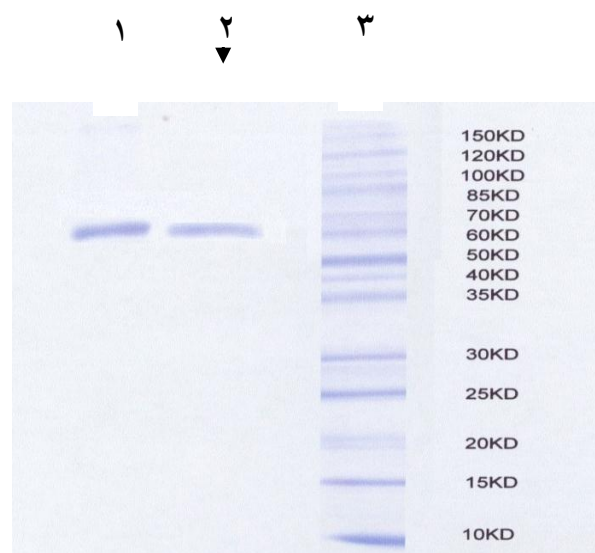
لاچهب^۱ و همکاران در سال ۲۰۰۱ اعلام کردند در محیط پساب نشاسته، باکتری *B. thuringiensis* فاز تاخیر^۲ کوتاهی دارد و سریعاً می تواند خود را با شرایط محیطی وفق داده و آنزیم های ویژه برای کاهش مواد آلی موجود در پساب تولید کند و انرژی مورد نیاز خود را برای انجام اعمال سلولی تامین نماید، اما این باکتری در محیط حاوی نشاسته بدلیل دارا بودن میزان زیاد کربوهیدرات قابل دسترس و نیتروژن (جدول ۱)، مرحله رشد^۳ طولانی داشته و مرحله اسپورزایی آن اندکی به تاخیر می افتد.

۳-۴-۸-۲- الکتروفورز

وزن مولکولی پروتئین کریستاله با روش SDS-PAGE و با استفاده از پروتئین نشانگر اندازه گیری شد و حدود ۶۵ کیلو دالتون تعیین گردید (شکل ۱).
 در شروع مرحله اسپورزایی برای هیدرولیز مواد آلی مورد نیاز خود چندین نوع پروتئاز تولید می کند که میزان تولید آنزیم پروتئاز بستگی به غلظت کربن و نیتروژن قابل دسترس در محیط دارد. هر چه میزان این ترکیبات آلی بیشتر باشد تولید پروتئاز کاهش می یابد. بنابراین، پساب کارخانه تولید نشاسته بدلیل دارا بودن ترکیبات آلی محیط مناسبی برای تولید سم میکروبی حاصل از *B. thuringiensis* می باشد. چنانچه زمان تخمیر بیشتر شود میزان فعالیت آنزیم پروتئاز بیشتر گردیده و باعث هیدرولیز پروتئین کریستاله تولیدی شده و فعالیت سم حاصل کاهش می یابد. پس، مدت زمان مرحله تخمیر باید معین و حدود ۳۵-۳۰ ساعت در نظر گرفته شود (۲۴).

^۱ Lachheb
^۲ Lag phase
^۳ Log phase

نتایج به دست آمده در این تحقیق با نتیجه تانسی^۱ و همکاران (۲۰۰۵) که بر روی محیط حاوی پروتئین کریستاله، SDS-PAGE انجام دادند مطابقت دارد. آنها مشاهده کردند که پروتئین کریستاله دلتا اندوتوکسین حاصل از *B. thuringiensis* که در مرحله اسپورزایی باکتری تولید می شود، حدود ۱۳۰ کیلو دالتون می باشد که به دلیل فعالیت بالای آنزیم پروتئاز این باکتری در محیط کشت شکسته شده و تولید دلتا اندوتوکسین با وزن مولکولی ۶۵ کیلو دالتون می کند.



شکل ۳-۳- الگوی SDS-PAGE مربوط به پروتئین کریستاله تولید شده توسط باکتری *B. thuringiensis* Var. *kurstaki* ۱. پروتئین کریستاله ۲. پروتئین کریستاله (تکرار) ۳. نشانگر فرمنتاز

^۱ Tounsi



۳-۴-۸-۳- ارزیابی زیستی

نتایج بدست آمده حاکی از آن است که میزان مرگ و میر لاروهای *Galleria melonella* نسبت به نمونه های کنترل (فاقد سم پروتئینی حاصل از باکتری *B. thuringiensis*) در سطح ۵ درصد به صورت معنی دار افزایش داشته است. البته میزان مرگ و میر لاروها در مدت زمان ۴۸ ساعت نگهداری در محیط حاوی موم عسل آغشته به سم پروتئینی نسبت به ۲۴ ساعت افزایش بیشتری داشته است.

نولس^۱ و همکاران در سال ۱۹۸۴ گزارش دادند سم حاصل از *B. thuringiensis* Var. *kurstaki* با فسفولیپیدهای موجود در غشای پلاسما واکنش داده و سبب پارگی سلول^۲ می شوند. آنها این سم را بر روی موش مورد مطالعه قرار دادند و مشاهده کردند هیچ کدام از موش ها از بین نرفتند. بنابر این دریافتند که واکنش این سم پروتئینی با فسفولیپید غشای پلاسما بسیار اختصاصی می باشد و در سلول تمام جانداران رخ نمی دهد.

جدول ۳-۳- مقایسه مرگ و میر لاروهای *Galleria melonella* در اثر سم حاصل از *B. thuringiensis*

زمان	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت
نمونه		
کنترل (بدون سم)	۰/۰۰ ^{a*}	۰/۵۰ ^a
پلیت های حاوی سم	۹/۰۰ ^b	۹/۶۰ ^b

* حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار می باشد ($p < 0.05$).

^۱ knowles
^۲ cytolysis



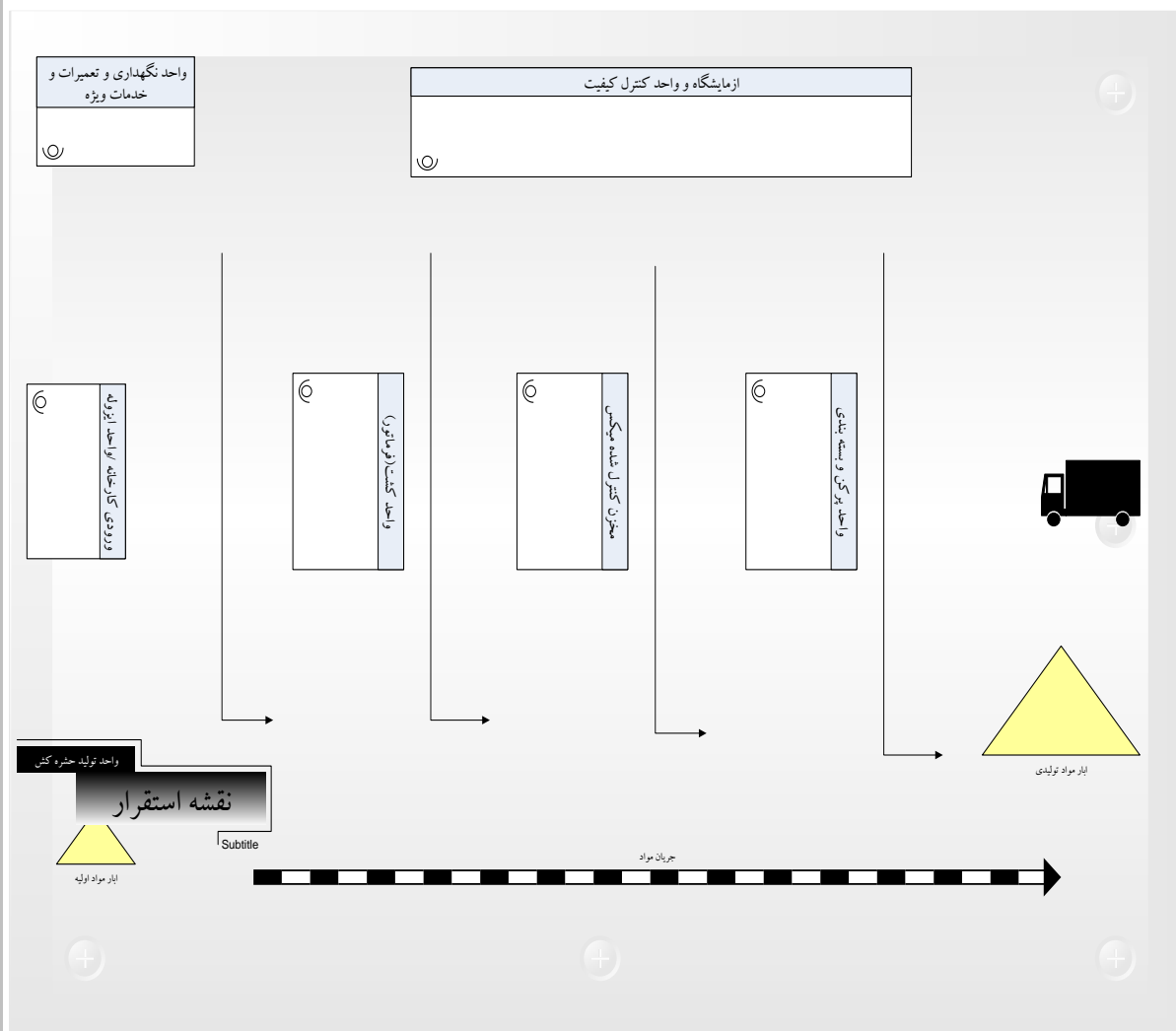
۳-۴-۹- نتیجه گیری نهایی

B. با استفاده از پساب کارخانه تولید نشاسته به عنوان محیط کشت تخمیر و تلقیح آن با باکتری *B. thuringiensis Var. kurstaki* سم پروتئینی به صورت کریستاله با وزن مولکولی ۶۵ کیلو دالتون تولید شد که باعث از بین بردن لارو *Galleria melonella* گردید. این نوع حشره کش زیستی در مقایسه با سموم شیمیایی علاوه بر اینکه مزایایی همچون هزینه تولید کم در نتیجه استفاده از سوبسترای ارزان قیمت و عملکرد اختصاصی دارد، باعث کاهش آلودگی محیط زیست و تولید غذای ایمن و سالم خواهد شد و می تواند با تحقیقات گسترده تر کاربرد وسیعی در صنعت کشاورزی به ویژه در ایران داشته باشد.



سازمان ملی استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

۳-۵- جانمایی کارخانه تولید صنعتی حشره کش



شکل ۳-۴- نقشه استقرار کارخانه



۳-۶- مراحل تولید به اختصار:

- ۱: کشت میکروب
- ۲: ترکیب با مواد افزودنی
- ۳: تولید سم و آزمایشات کیفی
- ۳: بسته بندی
- ۴: نگهداری
- ۵: کنترل کیفیت
- ۶: حمل به بازار مصرف



جدول ۴-۱- ماشین آلات مورد نیاز:

لیست ماشین آلات

هزینه میلیون ریال	تعداد	تجهیز مورد نیاز	ردیف
۵۰۰	۲ دستگاه	باسکول	۱
۱۰۰	۲ دستگاه	جرثقیل سقفی	۲
۶۰۰	۲ دستگاه	میکسر	۳
۱۰۰۰	۲ دستگاه	فرمانتور	۴
۱۲۰	۴ دستگاه	پمپ	۵
۸۰۰۰	۱ عدد	فرمانتور	۶
۵۰۰	۲ عدد	دستگاه پکینک	۷
۲۰۰	۲ عدد	لیبلینگ	۸
۳۰۰	۱۰ عدد	مخزن نگهداری	۹
۹۰	۲ عدد	پمپ و کیوم	۱۰
۱۲۰۰۰		مجموع	

مجموع هزینه ماشین آلات به شکل برآوردی معادل ۱۲۰۰۰ میلیون ریال می باشد.



جدول ۴-۲- وسایل نقلیه مورد نیاز

ردیف	شرح	تعداد	هزینه کل (ریال)
۱	لیفتراک	۲ دستگاه	۵۰۰
۲	وانت	۲ دستگاه	۵۰۰
۳	سواری	۲ دستگاه	۲۵۰
	جمع		۱۲۵۰

جدول ۴-۳- هزینه های سرمایه گذاری زمین

شرح	مقدار	واحد	قیمت واحد
خرید زمین هزینه های قانونی	۶۰۰۰	متر مربع	۴۵۰۰
		متر مربع	۵۰۰
هزینه ساختمان	۱۰۰۰	متر مربع	۵۰۰۰
هزینه آماده سازی زمین	۵۰۰۰	متر مربع	۱۰۰
جمع هزینه های سرمایه گذاری و آماده سازی زمین			۱۰۱۵۰



جدول ۴-۴- لوازم کارگاهی و اداری

ردیف	شرح	هزینه کل (میلیون ریال)
۱	لوازم اداری دفتری	۵۰
۲	ابزار آلات کارگاه	۶۰
	جمع	۱۱۰

جدول ۴-۵- هزینه های غیر عملیاتی

ردیف	شرح	هزینه کل (میلیون-ریال)
۱	بازاریابی / فروش و توزیع(سالانه)	۴۰۰
۲	اداری	۲۰۰
	جمع	۶۰۰



جدول ۴-۶- هزینه های قبل از بهره برداری

ردیف	شرح	هزینه کل (میلیون -ریال)
۱	هزینه مربوط به اخذ مجوز تاسیس شرکت	۱
۲	هزینه های مربوط به نقشه کشی و مطالعه و مشاوره	۱۵۰
۳	هزینه های متفرقه و سایر	۱۰۰
	جمع کل	۲۵۱

جدول ۴-۷- هزینه های ثابت سرمایه گذاری در طرح

ردیف	شرح هزینه های سرمایه گذاری	هزینه کل (ریال)
۱	زمین و محوطه سازی	۵۰۱۵
۲	ساختمان	۵۰۰۰
۳	ماشین آلات ، نصب ، راه اندازی و آموزش پرسنل	۱۲۰۰۰
۴	نجهیزات عمومی	۲۰۰
۶	وسایل نقلیه	۱۲۵۰
۷	لوازم کارگاهی واداری	۱۱۰
	جمع کل :	۲۳۵۷۵



جدول ۴-۸- سرمایه در گردش

هزینه (میلیون-ریال)	لیست هزینه برای سه ماه	ردیف
۹۶۳.۰۵۵	هزینه مواد اولیه	۱
۱۵۰۰	هزینه حقوق و بیمه کارکنان	۳
۶۷۰	هزینه سوخت و مصارف دیگر	۴
۳۱۳۳.۰۵۵	جمع کل :	

جدول ۴-۹- کل هزینه‌های سرمایه گذاری :

هزینه (میلیون-ریال)	شرح	ردیف
۲۳۵۷۵	هزینه‌های ثابت سرمایه گذاری	۱
۳۱۳۳.۰۵۵	هزینه‌های سرمایه در گردش	۲
۲۵۱	هزینه‌های قبل از بهره برداری	۳
۲۶۹۵۹.۰۵۵	جمع کل :	



هزینه های تولید

هزینه های تولید مشتمل بر مواد اولیه و بسته بندی ، حقوق ، دستمزد ، سوخت ، تعمیر و نگهداری و استهلاک می باشد و به شرح ذیل برآورد می گردد :

جدول ۴-۱۰- هزینه های مواد اولیه و جهت ۳۰۰ روز کاری

ردیف	شرح مواد اولیه	مقدار	قیمت کل (میلیون-ریال)
۱	حشره کش	۴۰۰۰lit	۵۰۰۰
۲	عطر	۲۰۰۰lit	۱۳۰۰۰
۳	سم اصلی	lit۴۰۰۰	۶۰۰۰
۴	قوطی	۴۰۰۰۰۰۰	۸۰۰۰
۵	کارتن	۴۰۰۰۰۰۰	۴۰۰۰
	جمع		۳۸۵۲.۲۶



هزینه حقوق و دستمزد

پرسنل مورد نیاز و هزینه های مربوطه به شرح ذیل است : \times حقوق سالیانه ۱۸ ماه محاسبه میگردد. (۱۲ ماه حقوق، یک ماه مرخصی، ۱.۶ ماه پاداش، ۳ ماه کارانه و ۲۰ درصد بیمه سهم کارفرما.

جدول ۴-۱۱- هزینه حقوق و دستمزد

تعداد	تحصیلات	سمت
۱	فوق لیسانس مهندسی شیمی	مدیر عامل
۲	فوق دیپلم یا لیسانس	کارمند اداری، مالی و بازرگانی
۱	لیسانس مهندسی شیمی، متالورژی یا مکانیک	سرپرست تولید
۲	لیسانس متالورژی یا مکانیک (تزریق پلاستیک)	مهندس خط تولید
۱	فوق دیپلم یا لیسانس شیمی	تکنسین آزمایشگاه
۲	فوق دیپلم مکانیک و برق	تکنسین فنی تعمیرات
۱	دیپلم یا بالاتر	منشی
۱	دیپلم	راننده
۲	دیپلم	نظافت چی- نگهبان
۶	دیپلم	کارگر ماهر مونتاژ کار
۶	دیپلم	کارگر غیر ماهر و ساده
۲۵	جمع	

هزینه حقوق و دستمزد معادل ۶۰۰۰ (میلیون ریال) به ازای هر سال در نظر گرفته شده است.



برآورد هزینه های انرژی

جدول ۴-۱۲- هزینه های انرژی

عنوان	میزان مصرف سالانه در واحد
آب (متر مکعب)	۱۵۰۰
برق (کیلو وات)	۳۰۰
گازوئیل (مترمکعب)	۲۵۰۰۰

برای ۳۰۰ روز کاری معادل ۲۶۸۰ میلیون ریال

هزینه های تعمیر و نگهداری

هزینه تعمیر و نگهداری دارائیهی ثابت به شرح جدول زیر پیش بینی می گردد:

جدول ۴-۱۳- هزینه تعمیر و نگهداری

ردیف	شرح	هزینه کل (میلیون-ریال)
۱	ساختمان و محوطه سازی ۱٪	۱۰۰
۲	ماشین آلات و تجهیزات ۱٪	۱۲۰
۳	تاسیسات ۲٪	۵۰
۴	تجهیزات عمومی ۲٪	۴۰
۵	وسایل نقلیه ۲٪	۱۲۵
	مجموع	۴۳۵



هزینه استهلاک

هزینه استهلاک دارائیهای ثابت بشرح جدول زیر برآورد می گردد :

جدول ۴-۱۴- هزینه استهلاک

ردیف	شرح	قیمت تمام شده (ریال)	درصد نرخ	هزینه استهلاک (ریال)
۱	ساختمان و محوطه سازی	۱۰۱۵۰	۸.۵	۸۶۲
۲	ماشین آلات و تجهیزات	۱۲۰۰۰	۱۰	۱۲۰۰
۵	وسایل نقلیه	۱۲۵۰	۳۵	۴۳۷.۵
۶	لوازم اداری ، کارگاهی	۱۱۰	۲۱	۲۳.۱
جمع				۲۵۲۲.۶

هزینه های تولید

هزینه های تولید مشتمل بر مواد اولیه و بسته بندی ، حقوق ، دستمزد ، سوخت ، تعمیر و نگهداری و استهلاک می باشد . هزینه تولید این طرح معادل ۱۵۴۱۹.۲۶ میلیون ریال در سال می باشد.

محاسبه قیمت تمام شده محصول

۳۸۸۰ ریال

تولید ۴ میلیون عدد در سال



جدول شاخص های مالی پروژه

ردیف	شاخص	مقدار (ریال)
۱	برآورد قیمت تمام شده هر عدد	۳۸۸۰
۲	برآورد قیمت فروش هر عدد در بازار بین الملل (با احتساب هزینه حمل و نقل و دلار ۱۰۰۰۰۰ ریال)	۹۰۰۰۰
۳	برآورد حاشیه سود کل سالیانه	۲۰۰۰۰۰۰۰۰
۴	برآورد سود خالص ۱ تن	
۵	برآورد ظرفیت اسمی طرح	lit۲۲۰۰۰۰۰
۶	برآورد نقطه سربه سر	%۴۰
۷	دوره بازگشت سرمایه	۲ سال



منابع :

- ۱) Abdel-Hameed, A. ۲۰۰۱. Stirred tank culture of *Bacillus thuringiensis* H-۱۴ for production of the mosquitocidal δ -endotoxin: mathematical modeling and scaling-up studies. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. ۱۷:۸۵۷-۸۶۱.
- ۲) Adjalle, K.D., S.K. Brar, M. Verma, R.D. Tyagi, J.R. Valero and R.Y. Surampalli. ۲۰۰۷. Ultrafiltration recovery of entomotoxicity from supernatant of *Bacillus thuringiensis* fermented wastewater and wastewater sludge. *Process Biochemistry*. Kansas city, USA. ۱-۳۹.
- ۳) Baum, J. and T. Malvar. ۱۹۹۵. Regulation of insecticidal crystal protein production in *Bacillus thuringiensis*. *Molecular Microbiology*. ۱۸: ۱-۱۲.
- ۴) Brar, S. K., M. Verma and R.D. Tyagi. ۲۰۰۷. *Bacillus thuringiensis* fermentation of hydrolyzed sludge – Rheology and formulation studies. **Chemosphere**. ۶۷(۴):۶۷۴-۶۸۳.
- ۵) Brar, S.K. and K.R. Stauffer. ۲۰۰۵. Sludge based *Bacillus thuringiensis* biopesticides: Viscosity impacts. **Water Research**. ۳۹(۱۳): ۳۰۰۱-۳۰۱۱.
- ۶) Bravo, A., S.S. Gill and M. Soberón. ۲۰۰۷. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon** . ۴۹(۴): ۴۲۳-۴۳۵.
- ۷) Cruieger, w. and A. Cruieger. ۲۰۰۰. *Biotechnology Industrial Microbiology*. Kluwer Academic, Boston. ۵۷۱-۵۸۴.
- ۸) Fong, K. and H.M. Tan. ۲۰۰۰. Isolation of a microbial consortium from active sludge for the biological treatment of food waste. *World journal of Microbiology and Biotechnology*. ۱۶:۴۴۱-۴۴۳.
- ۹) Herzka, A. and R.G. Booth. ۱۹۸۱. *Food industry wastes: disposal and recovery*. Applied Science Publishers, London. ۲۱۰-۲۱۴.
- ۱۰) Kang, B.C., S.Y. Lee and H.N. Chang. ۱۹۹۲. Enhanced spore production of *Bacillus thuringiensis* by fed batch culture. *Biotechnology Letters*. ۱۴ (۸): ۷۲۱-۷۲۶.
- ۱۱) Knowles, B.H. ۱۹۹۴. Mechanisms of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal delta- toxins. In *Advances in Insect Physiology*, ۲۴:۲۴۵-۳۰۸. Academic press, London.
- ۱۲) Knowles, B.H., W.E. Thomas and D. J. Ellar. ۱۹۸۴. Lectin-like binding of *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* lepidopteran-specific toxin is an initial step in insecticidal action. *Federation of European Biochemical Societies*. ۱۶۸ (۲): ۱۹۷- ۲۰۲.



- ۱۳) Kroyer, G.T. ۱۹۹۳. Bioconversion of food processing wastes: recent research and new development. An overview . *Micribiology Europe* sept/oct, ۳۰-۳۴.
- ۱۴) Lachhab, K., R.D. Tyagi and J.R. Valero. ۲۰۰۱. Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides using wastewater sludge as a raw material: effect of inoculum and sludge solids concentration. *Process Biochemistry*. ۳۷ (۲): ۱۹۷-۲۰۸.
- ۱۵) Laemmler, U.K. ۱۹۷۰. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T۴. *Nature (London)*. ۲۲۷: ۶۸۰-۶۸۵.
- ۱۶) Lau, D.C.W. ۱۹۸۱ . Utilization of sewage sludge as a resource for protein extraction and recovery. **Conservation & Recycling**. ۴(۳): ۱۹۳-۲۰۰.
- ۱۷) Mohammadi, S., S.Subramanian, S. Yan, RD. Tyagi and J.R. Valéro. ۲۰۰۶. Molecular screening of *Bacillus thuringiensis* strains from wastewater sludge for biopesticide production. **Process Biochemistry**. ۴۱(۴):۸۲۹-۸۳۵.
- ۱۸) Stanbury, P.F., A. Whitaker and S.J. Hall. ۱۹۹۵. Principles of Fermentation Technology (Second ed.), Elsevier Science Ltd., New York.
- ۱۹) Tirado-Montiel, M.L., R.D. Tyagi, J.R. Valero and R.Y. Surampalli. ۲۰۰۳. Production biopesticides using wastewater sludge as a raw material- effect of process parameters. *Water Science and Technology*. ۴۸ (۸): ۲۳۹-۲۴۶.
- ۲۰) Tounsi, S., M. Dammak, A. Rebaï and S. Jaoua. ۲۰۰۵. Response of larval *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) to individual *Bacillus thuringiensis kurstaki* toxins and toxin mixtures. *Biological Control*. ۳۵(۱): ۲۷-۳۱.
- ۲۱) Valero, J.R., S. Mohammadi, N.J. Payne and R.D. Tyagi. ۱۹۹۹. Microbial control of defoliating forest insects. *Recent Research Developments in Microbiology*. ۳: ۴۵۵-۴۶۴.
- ۲۲) Waites, M.J., N.L. Morgan and J.S. Rockey. ۲۰۰۱. *Industrial Microbiology: An Introduction*. Academic press, New York. ۴۲۵-۴۳۰.
- ۲۳) Yezza, A. and R.D. Tyagi. ۲۰۰۶. Correlation between entomotoxicity potency and protease activity produced by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* grown in wastewater sludge. *Process Biochemistry*. ۴۱(۴): ۷۹۴-۸۰۰.
- ۲۴) Yezza, A., and R.D Tyagi. ۲۰۰۵. Bioconversion of industrial wastewater and wastewater sludge into *Bacillus thuringiensis* based biopesticides in pilot fermentor .*Bioresource Technology*. ۹۷(۱۵): ۱۸۵۰-۱۸۵۷.
- ۲۵) Zhong, Ch. and S.G. Edelson. ۲۰۰۰. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* δ -Endotoxin Which Is Toxic to Insects in Three Orders. **J. of Invertebrate Pathology**. ۷۶(۲): ۱۳۱-۱۳۹.



- ۲۶- مرکز اطلاع رسانی وزارت صنایع و معادن - نرم افزار محصولات و واحدهای تولیدی WIMS
- ۲۷- گمرک جمهوری اسلامی ایران - معاونت طرح و برنامه - دفتر آمار و خدمات ماشینی - آمار صادرات و واردات کشور
- ۲۸- مقررات صادرات و واردات - قوانین و مقررات - ایران - وزارت بازرگانی - ناشر : شرکت چاپ و نشر بازرگانی
- ۲۹- استانداردهای ملی ایران - اداره استاندارد ایران، وزارت بازرگانی
- ۳۰- اطلاعات اخذ شده از فعالیت های میدانی و بررسی های بازار.
- ۳۱- اطلاعات اخذ شده از سایت های معتبر اینترنتی