

## مقاله تحقیقی

تأثیر منابع کربن و نیتروژن بر رشد و اسپورزایی *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*فاطمه صابری<sup>۱</sup>، رسول مرزبان<sup>۲</sup>، مهدی ارجمند<sup>۳</sup>، فرشید پژوم شریعتی<sup>۴</sup>، امید توکلی<sup>۵</sup>

۱- دانشجوی دکتری مهندسی شیمی، گروه مهندسی شیمی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

۳- گروه مهندسی شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران جنوب، تهران، ایران

۴- گروه مهندسی شیمی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۵- دانشکده مهندسی شیمی، پردیس دانشکده‌های فنی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

مسئول مکاتبات: رسول مرزبان، پست الکترونیک: r.marzban@areeo.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۵/۰۵

۶۲-۴۹(۲)

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۲/۰۷

## چکیده

برای بومی‌سازی دانش تولید *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* کنترل‌کننده آفات سخت بالپوش، اولین گام پس از جداسازی باکتری، بهینه‌سازی محیط تولید می‌باشد که در پروژه حاضر مورد مطالعه قرار گرفت. در این مطالعه از *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*-BN1 (Btt-BN1) به عنوان یک آفت‌کش بیولوژیک برای کنترل سوسک برگ‌خوار نارون استفاده شد. هدف از بهینه‌کردن محیط کشت مطلوب، افزایش راندمان تولید آفت‌کش بیولوژیک *B. thuringiensis* با ارزش افزوده بالا می‌باشد که در این محیط کشت از ضایعات کشاورزی و صنایع غذایی (ملاس نیشکر، جو دوسر، سبوس گندم و شربت ذرت) به عنوان مواد اولیه ارزان قیمت استفاده شده است. برای بهینه‌سازی پارامترهای محیط کشت از طراحی آزمایش به روش پاسخ سطح (RSM) و با رویکرد طراحی مرکب مرکزی استفاده شد. متغیرهای مستقل شامل مقدار منبع کربن و مقدار منبع نیتروژن در ۳ سطح غلظت (۰/۶ تا ۱ درصد ملاس نیشکر، ۰/۳ تا ۰/۹ درصد جو دوسر، ۰/۳ تا ۰/۹ درصد سبوس گندم و ۱ تا ۵ درصد شربت ذرت) با پاسخ واحدهای تشکیل‌دهنده پرگنه (CFU) و درصد تلفات برگ‌خوار نارون مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده در شرایط عملیاتی  $pH = 7$  و دمای ۳۰ درجه سلسیوس پس از ۷۲ ساعت نشان داد که حداکثر میزان CFU برای حداقل غلظت جو دوسر (۰/۳٪)، حداقل غلظت سبوس گندم (۰/۳٪)، حداکثر غلظت ملاس نیشکر (۱٪) و حداقل غلظت شربت ذرت (۱٪) معادل  $8.36^{11}$  spores.ml<sup>-1</sup> بدست آمد. همچنین نتایج زیست‌سنجی Btt-BN1 روی برگ‌خوار نارون نشان داد دو غلظت ۰/۵ و ۱ درصد به ترتیب ۶۷/۷٪ و ۸۰٪ تلفات ایجاد می‌کند.

**واژه‌های کلیدی:** *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*، برگ‌خوار نارون، راندمان تولید، بستر تولید، شرایط رشد

## مقدمه

سلامت جامعه اشاره کرد (Marrone, 1999). با وجود کارآیی حشره‌کش‌های شیمیایی، استفاده از این آفت‌کش‌ها سبب ایجاد مشکلات زیست‌محیطی مانند افزایش مقاومت، اثرات غیر هدفمند، سمیت پستانداران و باقی‌ماندن بخشی از آنها در زنجیره غذایی شده است. این مشکلات و تلاش در

افزایش جمعیت و صنعتی شدن کشاورزی منجر به استفاده بی‌رویه از سموم شیمیایی به منظور افزایش بهره‌وری و محافظت از محصولات زراعی شده است. از عواقب استفاده از سموم شیمیایی می‌توان به آلودگی آبهای زیرزمینی، آلودگی خاک، تخریب محیط زیست و تهدید

جهت رفع آنها، نیاز به عوامل کنترل بیولوژیک را در حوزه آفت‌کش‌ها بسیار برجسته کرده است (Oberemok *et al.*, 2015).

در استراتژی مدیریت تلفیقی آفات، آنجا که دشمنان طبیعی آفات و دیگر عوامل نقش مهمی در حفظ محصولات کشاورزی دارند، استفاده از آفت‌کش‌های بیولوژیک دارای جایگاه ویژه‌ای هستند. خانواده Chrysomelidae (سوسک برگ) شامل آفات مهم برگ‌خوار است. سوسک برگ توسکا (*Agelastica alni* (Coleoptera: Chrysomelidae) یکی از جدی‌ترین آفات درختان فندق و توسکا است که در اروپا، قفقاز، سیریر، شمال شرقی قزاقستان و ترکیه پراکنده شده است (Suchy, 1988; Bauer *et al.*, 1991; Urban, 1999) برگ‌خوار نارون *Xanthogaleruca luteola* حشرات رایجی هستند که قسمت زیرین برگ درختان نارون را می‌چوند و برگ بصورت توری مانند درآمده و نوعی از الگوی آسیب‌دیدگی را ایجاد می‌کنند که به اسکلت‌سازی معروف است. برگ‌های آسیب دیده توسط لارو سوسک برگ‌خوار نارون زودتر از موعد از درختان رها می‌شوند (Thurston, 1998). با این حال، برنامه موفق برای کنترل این دسته از آفات سخت بالپوش وجود ندارد (Sezen *et al.*, 2004).

کریستال‌های پروتئینی موجود در آفت‌کش‌های بیولوژیک بر پایه باکتری باسیلوس تورنجینسیس (Bt) سبب کشندگی بسیاری از آفات نظیر Coleoptera, Lepidoptera و Diptera می‌شوند (Marzban, 2012). حدود ۷۰٪ از بازارهای جهانی کنترل بیولوژیک در اختیار آفت‌کش‌های بیولوژیک مبتنی بر Bt است (Cannon, 1993; Melo *et al.*, 2016; Osman *et al.*, 2015; Rodriguez *et al.*, 2019; Sayed & Behle, 2017) است که تولید کریستال پروتئینی به نام دلتا-اندوتوکسین می‌کند که به گیرنده‌های سلول‌های اپیتلیال روده میانی حشرات متصل و سبب اخلاص در فیزیولوژی حشرات شده و در نهایت به مرگ آنها می‌انجامد. این آفت‌کش‌ها در کنترل حشرات در کشاورزی و جنگل‌داری به صورت تجاری استفاده می‌شوند (Elleuch *et al.*, 2016; Mazid

(Kalita, 2011; Marzban *et al.*, 2016). در بین سویه‌های مختلف Bt، برای اولین بار در سال ۱۹۸۵ فعالیت آفت‌کش بیولوژیک *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* (Btt) روی سوسک‌های خانواده Chrysomelidae از جمله سوسک کلرادوی سیب‌زمینی توسط لانجنبروخ و همکاران در آلمان اثبات گردید (Langenbruch *et al.*, 1985). Btt دارای دامنه تأثیر کمی است و اختصاصی لاروهای سوسک کلرادوی سیب‌زمینی و تعداد محدودی از سوسک‌های خانواده Chrysomelidae می‌باشد (Ferro *et al.*, 1993). Ozkan *et al.* (2003) تأثیر کشت و تغذیه را بر میزان سنتز دلتا اندوتوکسین حاصل از باسیلوس تورنجینسیس (HD500) مورد ارزیابی قرار دادند. آنها گزارش کردند که اینولین، دکستروز، لاکتوز، ساکارز، آب پنیر و گلیسرول محیط کشت مصنوعی را شبیه‌سازی می‌کنند در حالی که گلوکز، نشاسته، و ملاس باز دارنده‌اند سویه‌های Bt به راحتی در محیط مصنوعی پرورش می‌یابند. استفاده از یک محیط نیمه سنتزی مانند سویا، مصرف مواد مغذی اساسی را برای رشد بهینه و سنتز متابولیت‌های ثانویه توسط باکتری‌ها تضمین می‌کند (Zouari & Jaoua, 2002). اثر منابع کربن و نیتروژن برای افزایش میزان تولید پروتئین کریستال در باکتری Bt توسط ایزگن و همکاران مورد بررسی قرار گرفت (Icgen *et al.*, 2002). نتایج نشان داد که بین میزان کشندگی Bt و مقادیر ساکاروز، لاکتوز و اینولین موجود در محیط کشت، همبستگی مثبت معنی‌داری وجود دارد. آب پنیر و ملاس نیز بسترهای بالقوه کربن برای تولید سم دلتا-اندوتوکسین بودند. کربوهیدرات‌های دیگر از جمله گلوکز، گلیسرول، مالتوز، نشاسته و دکستروز مقادیر کمتری از سم را تولید کردند. پیتون بهترین منبع نیتروژن آلی، باعث تولید بهینه میزان اسپور در بیشترین تراکم سلول بود.

با این حال، هزینه محیط کشت تجاری برای تخمیر، مانع از رقابت آفت‌کش‌های بیولوژیک با سموم شیمیایی می‌شود و همچنین مانعی برای تجاری‌سازی آفت‌کش‌های بیولوژیک در کشورهای در حال توسعه است. بنابراین، تصفیه خانه‌های فاضلاب و ضایعات صنایع غذایی و

پروتئینی دلتا-اندوتوکسین، آزمون زیست‌سنجی روی حشره کامل برگ‌خوار نارون انجام شده است.

### مواد و روش‌ها

#### میکروارگانسیم

میکروارگانسیم مورد استفاده در این تحقیق یک سویه بومی *B. thuringiensis* جدا شده از برگ‌خوار نارون از کلکسیون Bt بخش تحقیقات کنترل بیولوژیک مؤسسه تحقیقات گیاه پزشکی است. ملاس نیشکر از مجتمع کشت و صنعت نیشکر هفت تپه، سبوس گندم از شرکت رقم نوید شهرکرد، جو دوسر از کارخانه سویای سبحان شربت ذرت از شرکت فناوری زیستی طبیعت گرا تهیه شدند. سایر ترکیبات شامل نمک‌های محیط کشت، محلول توین ۸۰ و غیره از شرکت مرک آلمان خریداری شد.

#### تهیه کشت اولیه

برای تکثیر باکتری *B. thuringiensis* از محیط کشت تجاری NB (نوترینت براث) حاوی نمک‌های معدنی ۰/۱٪  $(w/v)$   $KH_2PO_4$  ۰/۱٪،  $(w/v)$   $K_2HPO_4$  ۰/۳٪،  $(w/v)$   $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  ۰/۰۲٪،  $(w/v)$   $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  ۰/۰۲٪،  $(w/v)$   $CaCO_3$  ۰/۱٪ و  $(w/v)$   $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  استفاده و سپس ترکیب بوسیله اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سترون شد. در نهایت به میزان ۵٪ از باکتری Btt-BN1 به آن اضافه و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت با دور ۲۰۰ rpm روی شیکر قرار داده شد.

#### محیط کشت

آزمایش‌ها در یک فلاسک ارلن آزمایشگاهی به حجم ۵۰۰ سی‌سی انجام شد. منابع کربن (سبوس گندم، جو دوسر و ملاس نیشکر) و منبع نیتروژن (شربت ذرت، Corn Steep Liquor) در نسبت‌های مختلف (طبق طراحی آزمایش) و همچنین نمک‌های معدنی ۰/۳٪  $(w/v)$   $KH_2PO_4$ ، ۰/۳٪  $(w/v)$   $K_2HPO_4$  و ۰/۴٪  $(w/v)$   $MgSO_4$  با هم مخلوط و محیط‌های کشت ۱۰۰ سی‌سی تهیه شد. جدول ۱ میزان کربن، نیتروژن و سایر عناصر هر یک از منابع کربنی استفاده

کشاورزی گزینه‌های جایگزین برای محیط کشت این باکتری است (Ballardo, 2017). همچنین مشخص شده که کریستال‌های پروتئینی از بسترهای پیچیده (مانند لجن‌های شهری یا صنعتی) کشته‌تر از محیط کشت‌های تلفیقی مصنوعی می‌باشند (Azmi et al., 2015; Schnepf et al., 1998). در گروه تحقیقاتی INRS، آفت‌کش بیولوژیک Bt با استفاده از فاضلاب حاصل از صنعت تولید نشاسته (SIW=starch industry wastewater) که سرشار از منابع کربن و نیتروژن است تولید شده و می‌تواند جایگزین محیط کشت‌های گران‌قیمت مورد استفاده در فرایند تخمیر شود (Dang Vu et al., 2009; Gnepe et al., 2014). به دلیل استفاده از کریستال و اسپورهای باکتری در آفت‌کش، کشت غوطه‌وری باکتری بهترین انتخاب برای تولید در مقیاس بالا است (Rao YK et al., 2007).

روش‌های مرسوم بهینه‌سازی ترکیبات محیط کشت بدل‌یل در نظر گرفتن تعداد زیادی از متغیرها بسیار وقت‌گیر و گران است. به منظور رفع این مشکل و تعیین تعامل بین متغیرهای مورد مطالعه، از یک طرح فاکتوریل آزمایشی و روش سطح پاسخ برای بهینه‌سازی استفاده شد (Tokcaer et al., 2006; Gorret et al., 2004). های باکتری Btt که Coleoptera را هدف قرار می‌دهند انجام شده است. علاوه بر این، مطالعات تحقیقاتی انجام شده شرایط فنی تولید Btt را برآورده نمی‌کند و کمتر فرآورده تجاری Btt در دسترس است. از آنجا که رشد، اسپورزایی و تولید دلتا‌اندوتوکسین Btt به منابع کربن، نیتروژن، پتاسیم و یون‌های فلزی نیاز دارد و تحت تأثیر pH، دما و میزان هوادهی است، بنابراین بهینه‌سازی این عوامل ضروری می‌باشد.

هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر منابع کربن و نیتروژن در رشد و اسپورزایی Btt برای تولید آفات‌کش بیولوژیک مؤثر از سویه‌های بومی Btt در کنترل برگ‌خوار نارون و همچنین بهینه‌سازی محیط کشت اقتصادی به منظور تأمین منابع مورد نیاز باکتری از ضایعات صنعتی با بیشترین کارایی در شرایط آزمایشگاهی است. همچنین به منظور بررسی کارایی این باکتری بومی و با هدف تأیید تولید کریستال‌های

دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس سترون و پس از خنک شدن با ۵٪ از محیط کشت اولیه تلقیح و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت با دور ۲۰۰ rpm در شیکر انکوباتور کشت داده شد.

شده را بر اساس آنالیز عنصری انجام شده در آزمایشگاه آنالیز مرکزی پردیس علوم دانشگاه تهران نشان می دهد (CHNS/O Elemental Analyzer-Eager 300 EA1112). pH هر محیط کشت در ۷ تنظیم شد. نمونه ها به مدت ۱۵

جدول ۱- آنالیز عنصری منابع کربنی استفاده شده در این تحقیق.

Table 1. Elemental analysis of carbon sources used in this study.

Carbon source	C (%)	H (%)	N (%)	S (%)
Sugar Cane molasses (SCM)	32.61	6.06	1.88	0.71
Wheat bran (WB)	41.5	6.19	2.78	0.19
Oat (OA)	42.3	6.73	2.58	ND

آزمایش های اولیه و تجربیات گذشته، محدوده تغییر هر متغیر مشخص شده و سپس بر اساس دامنه های تغییر تعیین شده، ۳ سطح تغییر برای متغیرها توسط نرم افزار محاسبه می شود. تعداد آزمایش های طراحی شده برای فاکتورهای عددی از رابطه (۲) به دست آمده که در آن k تعداد متغیرهای مستقل عددی و  $C_p$  تعداد تکرارها در نقطه مرکزی می باشد:

$$N = (k^2 + (2 \times k) + C_p) \times 2 \quad (1)$$

جدول ۲ مقادیر متغیرهای مستقل طراحی را برای چهار ترکیب مذکور و موثر در محیط کشت در سه سطح +۱، ۰، -۱ و ۰ نمایش می دهد.

### طراحی آزمایش RSM به روش مرکب مرکزی (Central Composite Design)

هدف از طراحی آزمایش در این تحقیق، بررسی اثر مهم ترین متغیرهای عملیاتی است. همچنین با کمک طراحی آزمایش، امکان بررسی همزمان اثر متغیرهای مؤثر و تأثیر متقابلی که احتمالاً بر روی همدیگر داشته و نیز بهینه سازی مقادیر آنها، با انجام حداقل تعداد آزمایش ها، وجود دارد. با استفاده از آزمایش های اولیه و بر اساس مطالعه تحقیقات گذشته، مهمترین متغیرهای عملیاتی در این فرایند مقدار کربن در منبع جو دوسر، منبع سبوس گندم، منبع ملاس نیشکر و نیز مقدار نیتروژن در منبع شربت ذرت در نظر گرفته شد. بر مبنای این متغیرها مقدار CFU به عنوان پاسخ مد نظر قرار گرفت. طراحی آزمایش ها با روش مرسوم مرکب مرکزی توسط نرم افزار Design Expert Version 7.3 انجام شده است. در این روش طراحی، ابتدا با استفاده از

جدول ۲. مقادیر حداقل و حداکثر متغیرهای مستقل مورد مطالعه در طراحی آزمایش

Table 2. Minimum and maximum values of the main parameters in the experimental design

Level	Oat OA (%)	Corn syrup CS (%)	Wheat bran WB (%)	Sugar cane molasses SCM (%)
-1	0.3	1.0	0.3	0.6
0	0.6	3.0	0.6	0.8
+1	0.9	5.0	0.9	1.0

استفاده شد. بدین منظور ۱۰ لوله آزمایش که از قبل در آون سترون شده بودند (دمای ۱۸۰ درجه سلسیوس، ۳۰ دقیقه) آماده کرده و بعد از شماره گذاری لوله ها داخل هر کدام ۹ ml از محلول آب مقطر سترون و Tween80 (به نسبت ۰/۰۴)

### تعیین تعداد واحدهای تشکیل دهنده پرگنه (colony forming unit=CFU)

برای محاسبه تعداد اسپور زنده باکتری در هر یک از محیط های کشت از روش رقیق سازی و شمارش پرگنه

باکتری Btt، طراحی آزمایش با روش مرکب مرکزی صورت گرفت. طراحی حاصل شامل ۲۵ آزمایش می‌باشد. سطوح کدگذاری شده متغیرها و نیز پاسخ طراحی (میزان CFU) در جدول ۳ گزارش شده است.

### آنالیز واریانس و مدل پیشنهادی طراحی آزمایش

در این مدل، اطلاعات به صورت کامل و بصورت مدل مکعبی ارائه شده است. بر اساس جدول ۴ و نتایج ANOVA مشاهده می‌شود که در مدل پیشنهادی برای مقدار CFU مقدار F برابر با ۱۵۱/۲۶ و مقدار P بسیار پایین است که این نشان از دقت بالای مدل برای پیش‌بینی پاسخ است.

از ترکیب تخمین‌ها برای متغیرها و نتایج ANOVA، مدل‌های چندجمله‌ای و از لحاظ آماری معنادار به دست می‌آید که برای پیش‌بینی مقدار CFU مدل زیر پیشنهاد شده که در رابطه زیر مشاهده می‌شود:

$$(3) \quad (R1)^{1.01} = +3.713E+011 - 9.938E+010 * A - 4.833E+010 * B - 3.185E+011 * C + 2.365E+010 * D + 3.035E+010 * AB + 6.173E+010 * AC - 1.037E+010 * AD + 3.285E+010 * BC + 2.197E+009 * B D - 1.938E+010 * CD + 1.242E+010 * A^2 + 4.376E+009 * B^2 + 3.395E+010 * C^2 + 2.269E+010 * D^2$$

همانطور که در شکل ۱ از مقایسه مقادیر آزمایشگاهی و مقادیر پیش‌بینی شده مدل مشاهده می‌شود، مدل از دقت بالایی برخوردار بوده و رگرسیون بدست آمده معادل ۹۷ درصد می‌باشد. در شکل ۲ نمودار برهمکنش مقدار منابع کربن جو دوسر، سبوس گندم و ملاس نیشکر و منبع نیتروژن شربت ذرت با پاسخ CFU نشان داده شده است. همانطور که از نمودار شکل ۲ انتظار می‌رفت برهمکنش زیادی میان تمامی پارامترها با پاسخ وجود دارد و رگرسیون ۹۵-۹۶٪ برای هر پارامتر بدست آمده است.

### اثر متغیرها و برهمکنش آن‌ها روی مقدار CFU

مقدار CFU نمونه‌های آزمایش شده از ترکیب منابع کربن (جو دوسر، سبوس گندم و ملاس نیشکر) با درصدهای مختلف با منبع نیتروژن (شربت ذرت) مورد نیاز باکتری Btt در شرایط طراحی شده، مورد بررسی قرار گرفت.

درصد ریخته شد. سپس ۱ ml محلول اولیه باکتری Bt داخل هر میکروتیوب را به وسیله سمپلر برداشته و درون لوله‌ی اول ریخته و حجم آن به ۱۰ ml رسید، با این کار باکتری‌های موجود ۱۰ برابر رقیق شده و غلظت  $10^{-1}$  ساخته و در نهایت لوله حاصل روی دستگاه ورتکس قرار داده شد. این کار تارقت مورد نظر ادامه پیدا کرد. سپس ۰/۱ سی سی از محلول داخل لوله آزمایش با سمپلر برداشته و در ظروف حاوی نوترینت آگاری که از قبل آماده شده بودند توسط پیپت پاستور پخش شد. هر نمونه در سه تکرار کشت داده شد. ظروف به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس انکوباتور قرار داده شدند و سپس تعداد پرگنه‌ها شمارش و مطابق با رابطه ۱، میانگین سه تکرار محاسبه و یادداشت گردید. هر پرگنه بیانگر یک واحد اسپور زنده است (Kalantari et al., 2013).

(۲)

$$CFU = \frac{\text{Colony formed} \times \text{Dilution factor}}{\text{Aliquot taken}}$$

### آزمون سمیت *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* روی برگ‌خوار نارون

برای انجام زیست‌سنجی آفت کش Btt-BN1، در هر تیمار تعداد ۱۵ حشره برگ‌خوار نارون در سه تکرار و در مجموع ۴۵ حشره در نظر گرفته شد. در این آزمایش هر ۱۵ حشره در یک ظرف بصورت جداگانه به همراه سه عدد برگ نارون قرار داده شد. هر ظرف با ۱۰۰ میکرولیتر Btt در غلظت‌های ۰/۵ و ۱ درصد آلوده شد. تیمار شاهد بدون آلوده‌سازی با باکتری، تنها با آب مقطر آغشته و ظروف تیمار شده در داخل ژرمیناتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار گرفته و پس از ۴۸ ساعت برگ‌های تازه در اختیار حشرات قرار گرفت. مرگ و میر حشرات بعد از ۵ روز ثبت شد.

### نتایج

به منظور بررسی هدفمند تأثیر کربن (حاصل از سه منبع ملاس نیشکر، سبوس گندم، جو دوسر) و نیز نیتروژن (حاصل از منبع شربت ذرت) بر روی میزان اسپورزایی

جدول ۳- آزمایشات انجام شده مطابق با طراحی آزمایش با روش مرکب مرکزی

Table 3. Experiment runs designed by central composite design (CCD)

Std run	Main parameters level				Response
	Oat OA	Corn syrup CS	Wheat bran WB	Sugar cane molasses SCM	CFU value
1	-1	-1	-1	-1	7.42 <sup>11</sup>
2	+1	-1	-1	-1	4.7 <sup>11</sup>
3	-1	+1	-1	-1	5.86 <sup>11</sup>
4	+1	+1	-1	-1	4.12 <sup>11</sup>
5	-1	-1	+1	-1	1.32 <sup>11</sup>
6	+1	-1	+1	-1	9.12 <sup>10</sup>
7	-1	+1	+1	-1	0.92 <sup>11</sup>
8	+1	+1	+1	-1	7.3 <sup>10</sup>
9	-1	-1	-1	+1	8.36 <sup>11</sup>
10	+1	-1	-1	+1	5.12 <sup>11</sup>
11	-1	+1	-1	+1	6.38 <sup>11</sup>
12	+1	+1	-1	+1	4.68 <sup>11</sup>
13	-1	-1	+1	+1	1.58 <sup>11</sup>
14	+1	-1	+1	+1	0.42 <sup>11</sup>
15	-1	+1	+1	+1	1.1 <sup>11</sup>
16	+1	+1	+1	+1	8.8 <sup>10</sup>
17	0	0	0	0	2.9 <sup>11</sup>
18	-1	0	0	0	3.98 <sup>11</sup>
19	+1	0	0	0	1.8 <sup>11</sup>
20	0	-1	0	0	3.54 <sup>11</sup>
21	0	+1	0	0	2.12 <sup>11</sup>
22	0	0	-1	0	5.44 <sup>11</sup>
23	0	0	+1	0	0.65 <sup>11</sup>
24	0	0	0	-1	2.63 <sup>11</sup>
25	0	0	0	+1	3.31 <sup>11</sup>

حاصل شده است. در شکل ۳ (c) و شکل ۳ (f)، بهترین پاسخ CFU در حالتی حاصل شده است که غلظت ملاس نیشکر در بالاترین غلظت خود بوده حال آنکه غلظت جو دوسر و نیز سبوس گندم به ترتیب در هر یک از شکل‌های فوق، در پایین‌ترین حد خود می‌باشند. در شکل ۳ (e)، تغییرات ملاس نیشکر تاثیر معناداری روی پاسخ ندارد.

شکل ۴ نمودار سه بعدی تاثیر همزمان سه منبع کربن و مقدار منبع نیتروژن بر مقدار CFU را نشان می‌دهد. در این نمودارهای سه بعدی که اثر متقابل منابع کربنی روی هم و یا منابع کربن با منبع نیتروژن بر پاسخ نمایش داده شده، نتایج حاصل از گراف‌های دوبعدی تأیید می‌شود.

#### بررسی میزان کشندگی باکتری

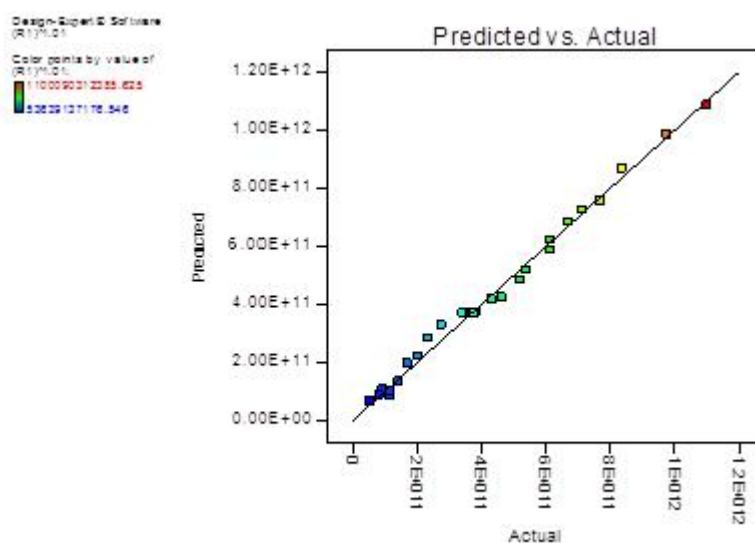
در شکل ۳ تأثیر متقابل پارامترهای مقدار منبع کربن، نوع منبع کربن و مقدار منبع نیتروژن و تأثیر آنها روی میزان CFU بررسی شده است. در شکل ۳ (a) تأثیر متقابل پارامترهای دو منبع کربن جو دوسر و شربت ذرت بر مقدار CFU بررسی شده است. طبق نمودار ۳ (a) می‌توان گفت در کمترین مقدار نیتروژن (شربت ذرت) و کمترین مقدار کربن (جو دوسر)، میزان CFU بیشینه شده است. بطور مشابه در حالتی که دو منبع شامل کربن جو دوسر و نیز کربن سبوس گندم (شکل ۳ (b)) و دو منبع شامل کربن سبوس گندم و نیتروژن شربت ذرت (شکل ۳ (d)) همزمان و در پایین‌ترین غلظت این منابع استفاده شده، بیشترین میزان پاسخ CFU بدست آمده است. در صورتی که در نمودارهای حاوی منبع کربن ملاس نیشکر (شکل ۳ (c) و شکل ۳ (f)) نتایج متفاوتی

آزمایشات مربوط به بررسی میزان کشندگی اسپور کریستال‌های تولیدشده روی برگخوار نارون انجام شد. در تیمار شاهد تمام حشرات زنده مانده‌اند در صورتی که در دو غلظت ۰/۵ و ۱ درصد (معادل ۵ و ۱۰ میلی‌لیتر بر لیتر) از جدول ۴- آنالیز واریانس برای درصد تبدیل و پاسخ CFU بدست آمده از طراحی آزمایش

میزان کشندگی آن به ترتیب ۶۷/۷٪ و ۸۰٪ بدست آمد که بیانگر عملکرد مناسب این آفت‌کش بیولوژیک می‌باشد.

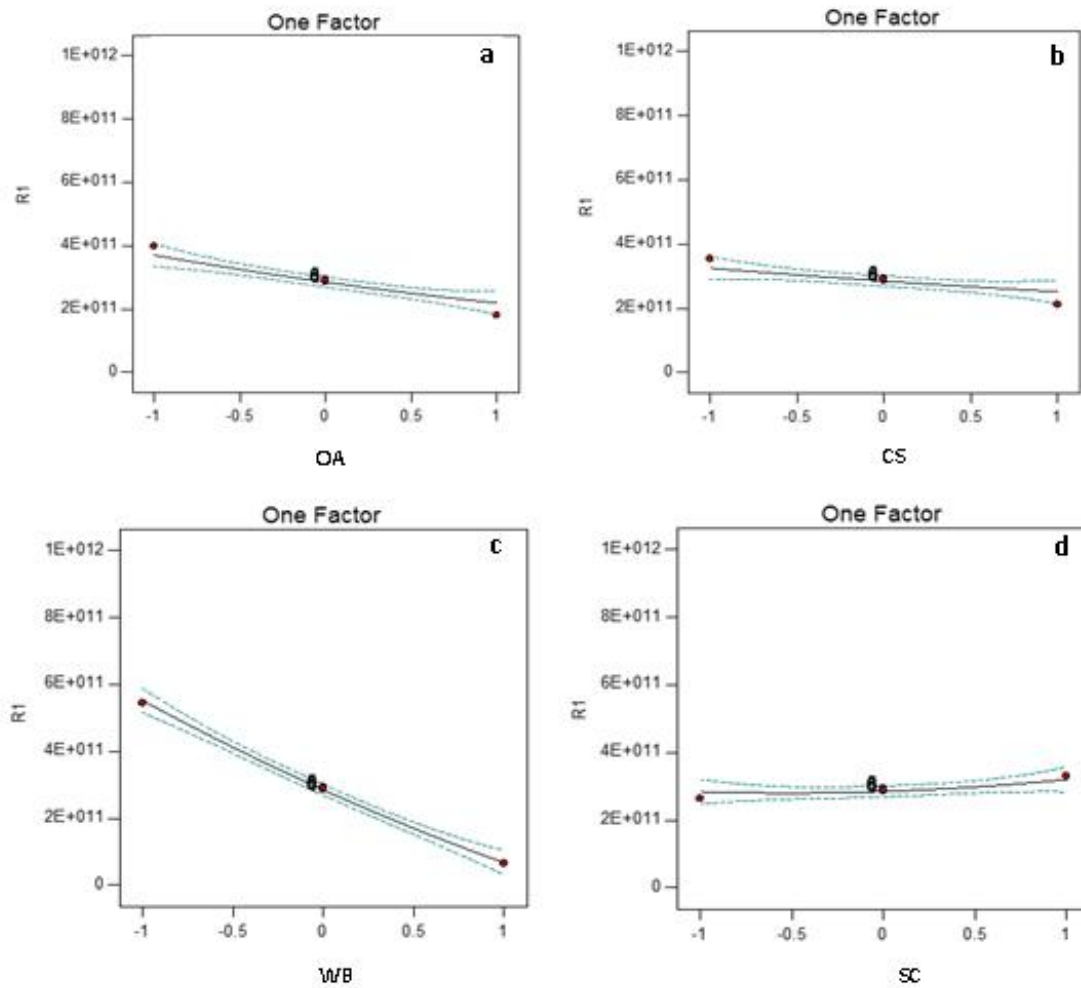
Table 4. The analysis of variance for CFU response obtained from the model of experimental design

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	P-value	
Model	2.19E+24	14	1.56E+23	151.26	1.57E-8	significant
A-OA	1.78E+23	1	1.78E+23	172.0325	1.27E-09	
B-CS	4.2E+22	1	4.2E+22	40.67882	1.24E-05	
C-WB	1.83E+24	1	1.83E+24	1766.95	5.59E-17	
D-SCM	1.01E+22	1	1.01E+22	9.745855	0.006998	
AB	1.47E+22	1	1.47E+22	14.2605	0.00183	
AC	6.1E+22	1	6.1E+22	59.00375	1.42E-06	
AD	1.72E+21	1	1.72E+21	1.664992	0.216468	
BC	1.73E+22	1	1.73E+22	16.70977	0.00097	
BD	7.72E+19	1	7.72E+19	0.074708	0.788329	
CD	6.01E+21	1	6.01E+21	5.816341	0.02915	
A^2	4E+20	1	4E+20	0.386979	0.543232	
B^2	4.96E+19	1	4.96E+19	0.048009	0.829518	
C^2	2.99E+21	1	2.99E+21	2.889385	0.109801	
D^2	1.33E+21	1	1.33E+21	1.291209	0.273654	
Residual	1.55E+22	15	1.03E+21			
Lack of Fit	1.54E+22	10	1.54E+21	94.18406	4.68E-05	significant
Pure Error	8.19E+19	5	1.64E+19			
Cor Total	2.2E+24	29				



شکل ۱- مقایسه مقادیر آزمایشگاهی با مقادیر پیش‌بینی شده مدل برای مقدار CFU

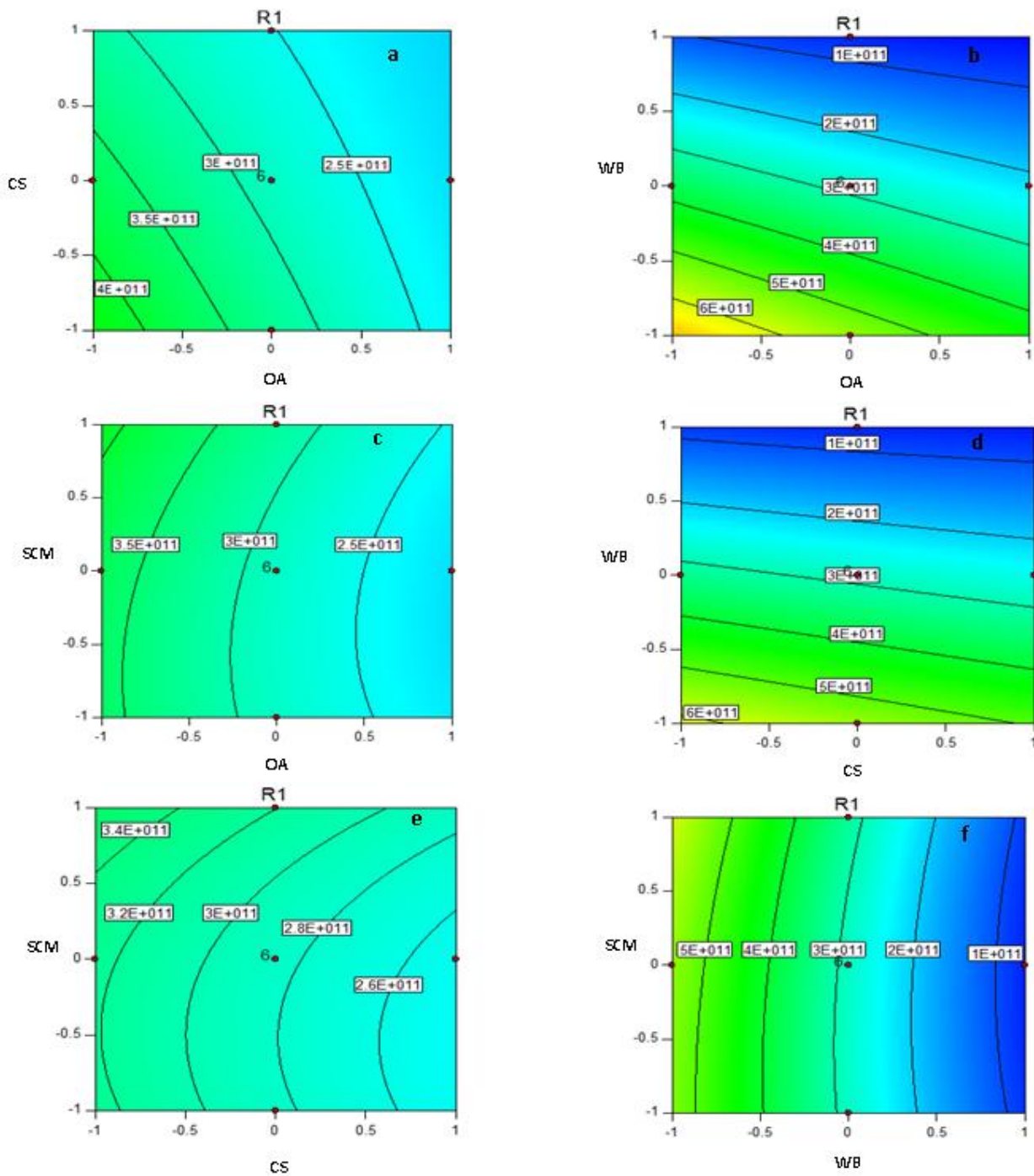
Figure 1. Comparison of experimental and model predicted values for CFU response



شکل ۲- نمودار برهمکنش تأثیر پارامترهای منابع کربنی و منبع نیتروژن با پاسخ CFU، جو دوسر (a)، شربت ذرت (b)، سبوس گندم (c) و ملاس نیشکر (d)

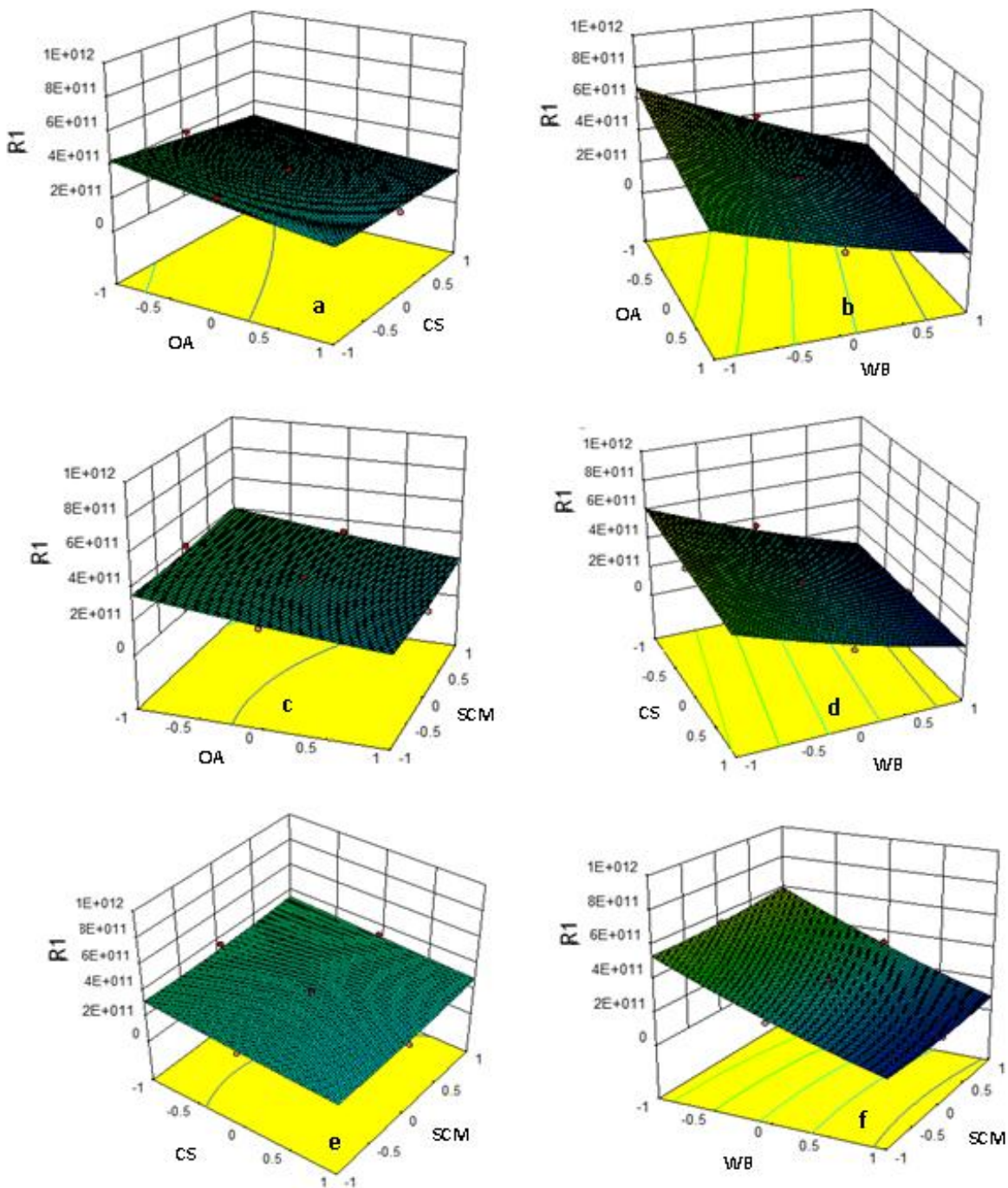
Figure 2. Interaction of the effect of carbon and nitrogen source parameters with CFU response a) oats, b) corn syrup, c) wheat bran and d) sugar cane molasse





شکل ۳- نمودار دوبعدی تأثیر پارامترهای منابع کربن و نیتروژن بر پاسخ CFU، (a) منبع کربن جو دوسر و منبع نیتروژن شربت ذرت، (b) منبع کربن سبوس گندم و منبع کربن ملاس نیشکر و منبع کربن جو دوسر، (c) منبع کربن سبوس گندم و منبع کربن ملاس نیشکر و منبع کربن جو دوسر، (d) منبع کربن سبوس گندم و منبع نیتروژن شربت ذرت، (e) ملاس نیشکر و شربت ذرت، (f) ملاس نیشکر و سبوس گندم

Figure 3. Two-dimensional diagram of the effect of carbon and nitrogen source parameters on CFU response, a) oat carbon source and corn syrup nitrogen source b) wheat bran carbon source and oat carbon source, c) sugar cane molasses carbon source and oat carbon source, d) wheat bran carbon source and corn syrup nitrogen source, e) sugar cane molasses and corn syrup, and f) sugar cane molasses and wheat bran



شکل ۴- نمودار سه بعدی تأثیر پارامترهای منابع کربن و نیتروژن بر پاسخ CFU (a)، منبع کربن جو دوسر و منبع نیتروژن شربت ذرت (b) منبع کربن سبوس گندم و منبع کربن ملاس نیشکر و منبع کربن جو دوسر، (c) منبع کربن ملاس نیشکر و منبع کربن جو دوسر، (d) منبع کربن سبوس گندم و منبع نیتروژن شربت ذرت، (e) ملاس نیشکر و شربت ذرت، (f) ملاس نیشکر و سبوس گندم

Figure 4. Three-dimensional diagram of the effect of carbon and nitrogen resource parameters on CFU response, a) oat carbon source and corn syrup nitrogen source b) wheat bran carbon source and oat carbon source, c) sugar cane molasses carbon source and oat carbon source, d) wheat bran carbon source and corn syrup nitrogen source, e) sugar cane molasses and corn syrup, and f) sugar cane molasses and wheat bran

## بحث

سوسک برگ‌خوار نارون مهمترین آفت درخت نارون در بسیاری از کشورهای جهان از جمله ایران است. معرفی یک روش غیرشیمیایی مؤثر برای این درختان با توجه به کاشت آن‌ها در فضای سبز شهری و محدودیت استفاده از سموم شیمیایی در این محیط‌ها (به دلیل اثرات سو در سلامتی انسان) بسیار مهم است. نتایج تحقیق حاضر حاصل از سویه محلی Btt برای کنترل این آفت امیدبخش بوده و می‌تواند به عنوان یک روش کنترل سازگار با محیط زیست مطرح گردد. در این مطالعه، به منظور دستیابی به عملکرد کارآمد در کنترل سوسک‌های برگ‌خوار نارون، محیط کشت با استفاده از پسماندهای کشاورزی بهینه شده است. استفاده از این سویه محلی (Btt (BN1 جدا شده از لاروهای برگ‌خوار نارون می‌تواند پتانسیل بسیار خوبی برای کنترل آفات ارائه دهد. از آنجا که این آفت هر ساله خسارت قابل توجهی به درختان نارون وارد می‌کند، ارائه روش مدیریت پایدار کنترل آفات می‌تواند قابل توجه باشد. نمودارهای ارائه شده در شکل‌های ۲ و ۳ نشان می‌دهند که در همه حالات پایین‌ترین غلظت منبع نیتروژن (شربت ذرت) بهترین پاسخ CFU را داشته است. از بین ۳ منبع کربنی آزمایش شده نیز جو دوسر و سبوس گندم در پایین‌ترین غلظت بهترین پاسخ را داشته‌اند و تنها ملاس نیشکر در بالاترین غلظت، ماکزیمم میزان CFU را داشته است. در شکل‌های ۳ (c) و ۳ (e)، که در هر یک ملاس نیشکر به ترتیب در ترکیب با جو دوسر و شربت ذرت می‌باشد، مشاهده می‌شود که غلظت ملاس نیشکر تأثیر چندانی روی پاسخ ندارد. علت آن را می‌توان بر اساس داده‌های جدول ۱، در کم بودن میزان کربن موجود در ملاس نیشکر در مقایسه با سایر منابع کربنی دانست که این موضوع توسط نمودار شکل ۲ د نیز تایید می‌شود. از بین منابع کربنی، بهترین پاسخ مربوط به سبوس گندم بوده است و این منابع کربنی در پایین‌ترین غلظت منبع نیتروژنی شربت ذرت به ترتیب زیر بهترین پاسخ CFU را داشته‌اند:

ملاس نیشکر > جو دوسر > سبوس گندم

آنچه که در نتایج فوق بدست آمده کاملاً منطبق بر نتایج آنالیز مقدار کربن منابع کربنی (جدول ۱) می‌باشد. همانطور که از جدول ۱ مشاهده می‌شود میزان کربن ملاس نیشکر کمتر از دو منبع دیگر است و این دلیلی است بر نتایج شکل‌های ۳ و ۴ که بیشترین پاسخ CFU در بیشترین غلظت ملاس نیشکر بدست آمده است تا به نوعی جبران کمبود محتوای کربنی این منبع شده باشد. نتایج بدست آمده در شرایط عملیاتی  $PH = 7$  و دمای  $30^\circ C$  درجه سلسیوس پس از ۷۲ ساعت برای ۲۵ آزمایش طراحی شده توسط روش پاسخ سطح نشان داد که حداکثر میزان CFU برای حداقل غلظت جو دوسر (۰/۳٪)، حداقل غلظت سبوس گندم (۰/۳٪)، حداکثر غلظت ملاس نیشکر (۱٪) و حداقل غلظت شربت ذرت (۱٪) معادل  $8.36^{11} \text{ spores.ml}^{-1}$  بدست آمد.

سایر مطالعات روی بستر رشد سویه‌های Bt نیز بیانگر اهمیت منابع کربن و نیتروژن در رشد باکتری است (Saber *et al.*, 2014). تحقیقات اندرسون و همکاران روی سویه *Galleriae* نشان داد که غلظت‌های بالای گلوکز باعث افزایش دانسیته سلولی می‌شود در صورتیکه غلظت‌های بالای مخمر موجب تأخیر در اسپورزایی شده است (Anderson and Jayaraman, 2003). در تحقیق دیگری صرفاً زاده نشان داد که شربت ذرت، استات سدیم و یون سولفات منگنز روی رشد سویه Bt-H14 به شدت مؤثر است (Sarrafzadeh, 2012). همچنین بخش دیگری از مطالعات به استفاده از منابع ارزان قیمت در کاهش هزینه‌های تولید نشان دادند هزینه تولید برای سویه *B. sv2* *thuringiensis* با آرد سویا به میزان ۲۳ برابر کاهش یافت (Chandrashekar Devidas *et al.*, 2014).

در نهایت نتایج حاصل از آزمون زیست‌سنجی سویه بومی باکتری باسیلوس تورنجینسیس (Btt-BN1) به خوبی توانمندی آفت‌کش بیولوژیک تولیدشده را نشان می‌دهد که می‌تواند در فرایند مدیریت کنترل پایدار آفات نقش بسزایی ایفا کند.

## References

- Anderson, R.K.I. & Jayaraman, K. 2003. Influence of carbon and nitrogen sources on the growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* var *Galleriae* for biopesticide production. *Chemical and Biochemical Engineering*, 17 (3): 225–231.
- Azmi, N.U., Ghafar, N.S.A., Yin, C.J., Yakubu, S., Adli, A.A. & Aziz, N.A.A. 2015. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* biopesticide produced in shrimp pond sludge as alternative culture medium against *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Acta Biology of Malaysia*, 4(5): 16–20.
- Ballardo, C., Barrena, R., Artola, A. & Sánchez, A. 2017. A novel strategy for producing compost with enhanced biopesticide properties through solid–state fermentation of biowaste and inoculation with *Bacillus thuringiensis*. *Waste Management*, 70: 53–58.
- Baur, R., Binder, S. & Benz, G. 1991. Nonglandular leaf trichomes as short–term inducible defence of the grey alder, *Alnus incana* (L.), against the chrysomelid beetle, *Agelastica alni* L. *Oecologie*, 87(2): 219–226.
- Brar, S.K., Verma, M., Tyagi, R.D., Valéro, J.R. & Surampalli, R.Y. 2005. Starch industry wastewater–based stable *Bacillus thuringiensis* liquid formulations. *Journal of Economic Entomology*, 98: 1890–1898.
- Cannon, R.J. 1993. Prospects and progress for *Bacillus thuringiensis*–based pesticides. *Pest Management Science*, 37(4): 331–335.
- Chandrashekhar Devidas, P., Hemant Pandit, B. & Satish Vitthalrao, P. 2014. Evaluation of different culture media for improvement in bioinsecticides production by indigenous *Bacillus thuringiensis* and their application against larvae of aedes aegypti. *Scientific World Journal*, 1: 1–7.
- Elleuch, J., Jaoua, S., Ginibre, C., Chandre, F., Tounsi, S. & Zghal, R.Z. 2016. Toxin stability improvement and toxicity increase against dipteran and lepidopteran larvae of *Bacillus thuringiensis* crystal protein Cry2Aa. *Pest Management Science*, 72(12): 2240–2246.
- Ferro, D.N., Yuan, Q.C., Slocombe, A. & Tuttle, A.F. 1993. Residual activity of insecticides under field conditions for controlling the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology*, 86: 511–516.
- Gnepe, J.R., Tyagi, R.D., Brar, S.K., Valéro, J.R. & Surampalli, R.Y. 2014. Corrosion and stability study of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* starch industry wastewater–derived biopesticide formulation. *Journal of Environment Science Health B*, 49(11): 889–896.
- Gorret, N., Rosli, S.K., Oppenheim, S.F., Willis, L.B., Lessard, P.A. & Rha, C.K. 2004. Bioreactor culture of oil palm (*Elaeis guineensis*) and effects of nitrogen source, inoculum size, and conditioned medium on biomass production. *Journal of Biotechnology*, 108: 253–63.
- Icgen, Y., Icgen, B. & Ozcengiz G. 2002. Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: II. Effects of carbon and nitrogen sources, *Research of Microbiology*, 153: 605–609.
- Kalantari M., Marzban R., Magollifard Z., & Abbasipour H. 2013. Study of virulence and molecular characteristics of some *Bacillus thuringiensis* isolates on cotton bollworm and diamondback moth. *Biocontrol in Plant Protection*, 2 (2): 17–26.
- Khanh Dang Vu, R.D., Tyagi, J.R. & Valéro, R.Y. 2009. Impact of different pH control agents on biopesticidal activity of *Bacillus thuringiensis* during the fermentation of starch industry wastewater. *Bioprocess and Biosystem Engineering*, 32 (4): 511–519.
- Langenbruch, G.A., Krieg, A., Huger, A.M. & Schmetter, W. 1985. Erste feldversuche zur bekämpfung der larven des kartoffelkäfers (*Leptinotarsa decemlineata*) mit *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. *Mededelingen Faculteit Landbouwkunde Rijksuniversiteit Gent*, 50: 441–449.
- Marrone, P.G. 1999. Microbial pesticides and natural products as alternatives. *Outlook on Agriculture*, 28(3): 149–154.
- Marzban R. 2012. Investigation on the suitable isolate and medium for production of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Biopesticides*, 5: 144–147.
- Marzban R., Saberi F., & Shirazi M.M. 2016. Microfiltration and ultrafiltration of *Bacillus thuringiensis* fermentation broth: Membrane performance and spore–crystal recovery approaches. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 33 (4): 783–791.
- Mazid, S. & Kalita, J.C. 2011. A review on the use of biopesticides in insect pest management. *International Journal of Science Advanced Technology*, 1: 169–178.
- Melo, A.L.d.A., Soccol, V.T. & Soccol, C.R. 2016. *Bacillus thuringiensis*: mechanism of action, resistance, and new applications: a review. *Critical Review of Biotechnology*, 36(2): 317–326.
- Oberemok, V.V., Laikova, K.V., Gninenko, Y.I., Zaitsev, A.S., Nyadar, P.M. & Adeyemi T.A. 2015. A short history of insecticides. *Journal of Plant Protection Research*, 55: 221–226.
- Osman, G., Already, R., Assaeedi, A., Organji, S., El–Ghareeb, D., Abulreesh, H. & Althubiani, A. 2015. Bioinsecticide *Bacillus thuringiensis* a comprehensive review. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 25(1): 271–288.

- Ozkan, M., Dilek, F.B., Yetis, U. & Ozcengiz, G. 2003. Nutritional and cultural parameters influencing antidipteran delta-endotoxin production. *Research of Microbiology*, 154 (1): 49–53.
- Rao, Y.K., Tsay, K.J., Wu, W.S. & Tzeng, Y.M. 2007. Medium optimization of carbon and nitrogen sources for the production of spores from *Bacillus amyloliquefaciens* B128 using response surface methodology. *Process Biochemistry*, 42: 535–541.
- Rodriguez, P., Cerda, A., Font, X., Sanchez, A. & Artola, A. 2019. Valorisation of biowaste digestate through solid-state fermentation to produce biopesticides from *Bacillus thuringiensis*. *Waste Management*, 93: 63–71.
- Saberi F., Marzban R. & Ardjmand M. 2014. Optimization of *Bacillus thuringiensis* production process in lab Fermenter. *Biological Control of Pests & Plant Diseases*, 3(2): 165–172.
- Sarrafzadeh, M.H. 2014. Nutritional requirements of *Bacillus thuringiensis* during different phases of growth, sporulation and germination evaluated by Plackett–Burman method. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 31(4): 131–136
- Sayed, A.M. & Behle, R.W. 2017. Evaluating a dual microbial agent biopesticide with *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* and *Beauveria bassiana* blastospores. *Biocontrol Science and Technology*, 27(4): 461–474.
- Schnepf, H.E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zigler, D.R. & Dean, D.H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62 (3): 775–806.
- Sezen, K., Muratoglu, H., Nalcacioglu, R., Mert, D., Demirbag, Z. & Kati, H. 2008. Highly pathogenic *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* from European shot-hole borer, *Xyleborus dispar* (Coleoptera: Scolytidae). *New Zealand Journal of Crop Horticulture Science*, 36:v77–84.
- Suchy, J. 1988. Note on the biology of the *Chrysomelid*, *Agelastica alni* (L.) and the predator *Hister helluo* Truqui. *Zpravy Muzei Zapadocees Kraj*, 93: 36–37.
- Thurston, G.S. 1998. Biological Control of Elm Leaf Beetle. *Journal of Arboriculture*, 24(3): 154–159.
- Tokcaer, Z., Bayraktar, E., Mehmetoglu, U., Ozcengiz, G. & Alaeddinoglu, N.G. 2006. Response surface optimization of antidipteran delta-endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* HD 500. *Process Biochemistry*, 41: 350–355.
- Urban, J. 1999. Results of the study of biology and harmfulness of alder leaf beetle (*Agelastica alni* L.) (Chrysomelidae: Coleoptera). *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 47: 47–71.
- Yezza, A., Tyagi, R.D., Valero, J.R. & Surampalli, R.Y. 2004. Scale-up of biopesticide production processes using wastewater sludge as a raw material. *Journal of Indian Microbiology and Biotechnology*, 31: 545–552.
- Zouari, N., Achour, O. & Jaoua, S. 2002. Production of delta-endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and overcoming of catabolite repression by using highly concentrated gruel and fishmeal media in 2- and 20-dm<sup>3</sup> fermenters. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 77: 877–882.

---

**Influence of carbon and nitrogen sources on the growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*****Fatemeh Saberi<sup>1</sup>, Rasoul Marzban<sup>2</sup>, Mehdi Ardjmand<sup>3</sup>, Farshid Pajoum Shariati<sup>1</sup>, Omid Tavakoli<sup>4</sup>**

1. Department of Chemical Engineering, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran
3. Department of Chemical Engineering, Tehran South Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
4. School of Chemical Engineering, College of Engineering, University of Tehran, Tehran 14176, Iran

Corresponding author: Rasoul Marzban: r.marzban@areeo.ac.ir

Received: Apr., 26, 2020

7(2) 49-62

Accepted: July, 26, 2020

---

**Abstract**

For knowledge localization of *Bacillus thuringiensis* (Bt) production as biological pest control, optimization of culture medium is necessary. In this study, *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*-BN1 (Btt-BN1) was used as a biological pesticide to control elm leaf beetles. The aim of optimizing the desire culture medium is to increase the production efficiency of Bt biopesticide using agricultural and food wastes as cheap raw materials. To optimize the parameters of the culture medium, experimental design of response surface methodology (RSM) was applied with a central composite design (CCD) approach. The parameters including the amount of carbon (sugar cane molasses, oats and wheat bran sources) and the amount of nitrogen (corn syrup source) at three levels (0.6 to 1 percent of sugar cane molasses, 0.3 to 0.9 percent of oat, 0.3 to 0.9 percent of wheat bran and 1 to 5 percent of corn syrup) were investigated with colony forming unit (CFU) response. The results obtained under operating conditions of pH = 7, temperature of 30°C after 72 hours. The results showed that the maximum CFU for the minimum concentration of oats (0.3%), the minimum concentration of wheat bran (0.3%), the maximum concentration of sugar cane molasses (1%) and the minimum concentration of corn syrup (1%) were equivalent to  $8.36 \times 10^{11}$  spores.ml<sup>-1</sup>. In addition, the results of Btt-BN1 bioassay survey on elm leaf beetle showed that two concentrations of 0.5 and 1.0 percent cause 67.7% and 80.0% of mortality, respectively.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*, elm leaf beetle, production efficiency, production substrate, growth conditions

---