

مقاله تحقیقی

تأثیر برخی ضایعات و فرآورده‌های جانبی صنایع غذایی بر رشد و فعالیت حشره‌کشی *Bacillus thuringiensis*وهاب دست پاک^۱، رسول مرزبان^۲، سهراب ایمانی^۳، مریم کلانتری^۴

۱ و ۳- دانش آموخته دکتری، استادیار، گروه حشره شناسی، دانشگاه آزاد، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.

۲ و ۴- دانشیار، کارشناس ارشد، موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

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

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۲۵

۹(۱) ۱-۱۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۰۲

چکیده

امروزه دانش مدیریت آفات کشاورزی و بهداشتی در قالب کنترل بیولوژیک در حال گسترش است، و در این میان میکروارگانسیم‌های بیمارگر حشرات *Bacillus thuringiensis* به‌عنوان یک آفت‌کش زیستی با کارایی و ایمنی بالا نقش عمده‌ای در کنترل آفات دارد. در حالی که به‌دلیل هزینه‌های بالای تولید هنوز نتوانسته جایگزین آفت‌کش‌های شیمیایی شود. در مطالعه حاضر، برای ارتقاء فعالیت حشره‌کشی و کشت ارزان و مقرون به‌صرفه Bt سویه بومی 6R زیرگونه *kurstaki*، ضایعات و فرآورده‌های جانبی صنایع غذایی شامل سبوس گندم، تفاله‌سویا، پودرذرت، شربت‌ذرت، پودرماهی، شیره‌خرما، ملاس چغندرقد و ملاس و باگاس نیشکر به‌عنوان محیط تخمیر خام مورد ارزیابی قرار گرفت. فاکتورهای میزان تولید اسپور و کریستال طی فرآیند تخمیر در محیط کشت‌های مختلف طی ۷۲ ساعت که شامل زیست‌سنجی روی لاروهای سن سه *Helicoverpa armigera* Hübner، وزن خشک توده زنده، میزان اسپور و تغییرات pH، می‌باشد اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد، Bt حاصل از بسترهای سبوس گندم، ملاس نیشکر و کورن‌استیپ (عصاره خیسانده ذرت) روی لارو سن سه *H. armigera* ۱۰۰٪ تلفات داده است. بیشترین وزن خشک توده زنده Bt بعد از پایان تخمیر مربوط به پودر ذرت، سبوس گندم و کورن استیپ به ترتیب ۰/۷۸۰۴، ۰/۵۵۹ و ۰/۵۵۹ گرم در صد میلی‌لیتر سوسپانسیون کشت بود. نتایج نشان داد که محیط کشت کورن‌استیپ با بیشترین میزان تولید Bt در شرایط آزمایشگاه ($10^{12} \times 2/8$ CFU/ml) بیشترین کارایی را داشت. در محیط‌های کشت دوتایی ملاس چغندر(منبع کربن) همراه با کورن‌استیپ (منبع ازت) با $10^{12} \times 4/22$ CFU/ml و سبوس گندم (منبع کربن) همراه با کورن‌استیپ با $10^{12} \times 3/44$ CFU/ml، هر دو با تلفات ۱۰۰٪ روی لارو سن سه *H. armigera* بهترین کارایی را داشتند. در مجموع، یافته‌های ما یک استراتژی جدید برای استفاده از ضایعات و فرآورده‌های جانبی صنایع غذایی با اثرات زیست محیطی کمتر و کاهش هزینه تولید ارائه می‌کند.

واژه‌های کلیدی: آفت‌کش بیولوژیک، تخمیر، *Bacillus thuringiensis*، ضایعات صنایع غذایی

مقدمه

یافته سالانه میلیون‌ها هکتار از اراضی کشاورزی و جنگلی زیر پوشش آفت‌کش‌های میکروبی به ارزش صدها میلیون دلار قرار می‌گیرد. امروزه فرمولاسیون‌های متعددی از زیرگونه‌های Bt برای کنترل آفات مختلف به‌صورت

تولید آفت‌کش بیولوژیک (*Bt*) *Bacillus thuringiensis* به‌عنوان موفق‌ترین عامل کنترل میکروبی آفات، در کشورهای در حال توسعه متأسفانه محدود به چند کشور است، این در حالی است که در کشورهای توسعه

آمده از گیاهان زراعی (مانند ملاس، پودر دانه‌غلات) محصولات جانبی فراوری دانه غلات یا نشاسته هیدرولیز شده را می‌توان به عنوان منبع کربن استفاده نمود (Brar & Verma, 2005). پساب‌های صنایع غذایی (مانند آب پنیر و پرمیت)، انواع پساب‌های شهری و خانگی و دکستروز نیز به‌عنوان منابع کربوهیدرات در محیط‌های کشت به کار می‌روند. علاوه بر این رشد باکتری و تولید کریستال نیاز به برخی املاح معدنی با غلظت خاص دارد (Salehi *et al.*, 2015). تامین نیتروژن نیز از طریق نمک‌های آمونیوم، آمینواسیدها یا مواد غنی از پروتئین از منشاء حیوانی یا گیاهی شامل محصولات جانبی فراوری سویا و ذرت (شربت ذرت)، آرد بذر پنبه عاری از روغن، عصاره مخمر و پروتئین‌های آب پنیر، پودر ماهی و کازئین صورت می‌پذیرد (Amin & Alotaibi, 2008). در انتخاب نوع منبع کربن و نیتروژن در دسترس بودن، ارزان و غنی بودن بسیار حائز اهمیت است.

علاوه بر این‌ها تاکنون برای تولید انبوه Bt به عنوان یک فرآورده بیولوژیک حشره‌کش روش‌های مختلف تخمیر، از محیط کشت‌های جامد (solid state)، نیمه جامد (semi-solid state) و مایع (submerged) استفاده شده است (Capablo, 1995)، که هر کدام از این روش‌ها دارای مزایا و معایب خاص خود هستند. به طوری که دولمیچ و رادس (Dulmage, 1971) روش‌های تولید Bt را بصورت توصیفی به رشته تحریر درآوردند و متذکر شدند که این باکتری می‌تواند هم در محیط کشت نیمه‌جامد و هم در محیط کشت مایع تولید شود. در چین مطالعات گسترده‌ای از سال ۱۹۶۰ جهت تولید و استفاده از Bt انجام گرفته و از روش‌های مختلفی جهت تکمیل و توسعه تکنولوژی فرمانتاسیون و تولید نیمه‌صنعتی استفاده شده است. طبق گزارش تیان‌جین (Tianjin, 1994) در چین از پسماند محصولات کشاورزی مانند سویا، پنبه‌دانه و بادام زمینی روغن کشتی شده به عنوان ماده اصلی تولید Bt استفاده شده است. در برزیل از روش فرمانتاسیون جامد برای تولید Bt به طور موفقیت‌آمیزی استفاده شده است (Capalbo *et al.*, 2001). اوبتا (Obeta, 1984) برخی دانه‌های لگومینوز و

تجاری در دنیا تولید می‌شود (Dipel, Biobit, Javelin, Mosquito, Attack Vectobac, Skeetal).

یکی از کلیدهای تولید تجاری موفق آفت‌کش‌های میکروبی، بهینه کردن محیط تکثیر است. با توجه به اینکه میکروارگانیسیم‌ها جهت فرایندهای بیوسنتز و تامین انرژی خود به آب، کربن، ازت، مواد آلی و معدنی و دیگر فاکتورهای رشدی نیازمندند و میزان دقیق و بالانس بین این مواد بسته به نوع میکروارگانیسیم و شرایط فیزیولوژیک مورد نظر تنظیم می‌گردد، لذا تعیین هر کدام از عوامل مذکور در محیط کشت و استفاده از مواد ارزان قیمت به‌دست آمده از محصولات جانبی کشاورزی برای تولید Bt به منظور استحصال اسپور و کریستال بسیار مهم می‌باشد. بیشتر محیط‌هایی که در حال حاضر برای تولید Bt به کار می‌روند حاوی محصولات طبیعی به‌عنوان منبع کربن، نیتروژن و املاح معدنی هستند. با این وجود با توجه به قیمت نسبتاً ارزان آفت‌کش‌های بیولوژیک دستیابی به محیط کشت اقتصادی جهت تولید انبوه بسیار مورد توجه می‌باشد. از اینرو، جستجوی ضایعات کشاورزی، پساب‌های صنعتی و شهری و انواع منابع ارزان که حاوی منابع مناسب کربنی، نیتروژنی و املاح باشند جهت استفاده به صورت منفرد و یا ترکیبی مطلوب بوده و مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است. علاوه بر این محیطی که برای تولید اسپور و کریستال به کار می‌رود باید به گونه‌ای طراحی شود که تولید توده زنده (بیوماس) و اسپورزایی را به نحو احسن تضمین نموده و طراحی آزمایشات بهینه‌سازی نیز باید به گونه‌ای برنامه ریزی شود که در فاصله زمانی کم بتوان اثرات متقابل فاکتورهای مختلف را نیز بررسی کرد (Kraemer-Schafhalter & Moser, 1996).

طی سالهای اخیر در کشورهای مختلف تحقیقات وسیعی در زمینه بررسی بسترهای غذایی مختلف با استفاده از ضایعات و فرآورده‌های فرعی محصولات کشاورزی و دانه‌های روغنی مانند آفتابگردان، کلزا، بادام‌زمینی و گرامینه‌ها و مواد مختلف دیگر، جهت تولید Bt صورت گرفته است (Amin & Alotaibi, 2008). پلی‌ساکاریدها و کربوهیدرات‌های موجود در محصولات جانبی به‌دست

محیط‌های کشت، ترکیباتی را تولید می‌کنند که می‌تواند pH را تغییر دهد. تغییرات pH یعنی تغییر غلظت یون هیدروژن در محیط زندگی باکتری‌ها که بر روند رشد باکتری‌ها موثر است. اصولاً باکتری‌ها به غلظت یون هیدروژن در محیط کشت حساس هستند و در اثر تغییرات زیاد غلظت یون هیدروژن شکل آنها تغییر می‌کند (دنا توره می‌شوند) و اغلب باعث تغییر بارهای یونی روی مولکول‌ها می‌شود. معمولاً خواص کاتالیزوری آنزیم‌ها از بین می‌رود و متابولیسم باکتری متوقف می‌شود. بطور کلی هر باکتری خواهان یکسری شرایط ایتیم برای رشد است که در صورت عدم تامین آن شرایط، زیست آن با مشکل مواجه شده و از بین خواهد رفت. pH محیط کشت باکتری‌ها ارتباط مستقیمی با مقدار یون هیدروژن در محیط کشت دارد. pH هر محیط بیانگر مقدار غلظت یون هیدروژن در آن محیط است. مقدار غلظت یون هیدروژن که افزایش یابد به سمت اسیدی و وقتی کاهش یابد به سمت بازی تغییر می‌کند. بطور معمول مصرف کربوهیدرات‌ها pH را کاسته و مصرف پروتئین‌ها آن را افزایش می‌دهد. در نتیجه میزان پروتئین یا کربوهیدرات‌ها در محیط‌های کشت حدود تغییرات pH محیط را پیش بینی می‌نماید. معمولاً pH توسط بافر یا افزودن تدریجی مواد اسیدی یا قلیایی به محیط تنظیم می‌گردد (Kraemer & Mosert, 1996). در این تحقیق نهاده‌های ارزان قیمت مانند پسماندها و فرآورده‌های فرعی صنایع کشاورزی شامل ملاس چغندر قند، ملاس و باگاس نیشکر، کورن‌استیپ (عصاره خیسانده ذرت)، شیرۀ خرما، سبوس گندم، پودر سویا، پودر ذرت و پودر ماهی، به‌عنوان بستر غذایی مناسب در جهت تولید بهینه Bt مورد ارزیابی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

انتخاب سویه Bt

سویه 6R مورد استفاده در این پژوهش، از کلکسیون بخش تحقیقات کنترل بیولوژیک، موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور انتخاب شد (Marzban & Salehi

بادام‌زمینی، نخودفرنگی، پودر دانه سویا و عدس را به‌عنوان بستر غذایی مناسب جهت تولید باکتری Bt معرفی کرد. بلاک (Black, 1991)، با استفاده از بسترهای مختلف غذایی شامل پودر دانه پنبه، پودر ذرت، ملاس چغندر قند و نشاسته، توانست Bt تولید کند.

در سال ۲۰۰۱ لچهاب و همکاران (Lachhab *et al.*, 2001) پسماندهای آب فاضلاب را به‌عنوان بستر غذایی بسیار غنی، برای تولید Bt معرفی نمود. استفاده از سبوس گندم در بستر نیمه جامد برای تولید باکتری Bt موفقیت آمیز بوده است (Vimala Devi, 2005; Marzban, 2012). فرناندو و همکاران (Fernando *et al.*, 2008) در آزمایشات خود با استفاده از پودر سویا، گلوکز و ذرت، نتیجه گرفت که ترکیبی از گلوکز و پودر سویا را می‌توان به‌عنوان بستر غذایی جهت تولید Bt در نظر گرفت. همچنین در آزمایش دیگری در سال ۲۰۱۰ با استفاده از پودر سویا و گلوکز، ذرت و فضولات (کود) خوک به‌عنوان منبع غنی نیروژن توانست Bt را تولید کند.

پودر سویا و ملاس چغندر قند برای تولید Bt در تخمیر نیمه جامد استفاده شده است (Pandey *et al.*, 2008). پوپاتی (Poopathi, 2010)، با استفاده از سبوس برنج و ضایعات طیور توانست Bt را تولید کند و سبوس برنج را منبع غذایی مناسبی برای تکثیر Bt معرفی کرد.

حداکثر رشد و تکثیر میکروارگانیسم‌ها وابسته به تامین ویتامین‌ها و املاح معدنی مثل پتاسیم، منیزیم، فسفر، سولفور و مقادیر کمی از کلسیم، روی، آهن و غیره می‌باشد (Jayaraman, 2003). تامین این املاح می‌تواند از طریق آب‌های طبیعی، آب دریا و نمک‌های متفاوت صورت پذیرد. انتخاب منبع املاح نیز باید به‌گونه‌ای باشد که در دسترس، ارزان و غنی بوده و رشد بهینه و تولید کریستال را تضمین نماید. بنابراین تعیین ترکیب ارزان و مناسب محیط کشت برای تولید اسپور و کریستال در فرماتور میزان هزینه تولید را کاهش داده و علاوه بر آن کارایی را نیز بالا می‌برد. عوامل دیگری که در رشد باکتری تاثیر دارند، مناسب بودن pH محیط کشت، اکسیژن و دما می‌باشد. باکتری‌ها اکثراً در pH بین ۶-۸ قادر به رشد هستند. اصولاً باکتری‌ها در

موادی که به‌عنوان محیط کشت در این تحقیق استفاده شده‌اند قبل از هر چیز، از نظر درصد وزن خشک به‌طور جداگانه مورد بررسی قرار گرفتند. برای محاسبه وزن خشک مقدار مشخصی از هر ماده با آب مقطر مخلوط شد. موادی که به صورت شیره غلیظ فرآوری شده بودند (کورن‌استیپ، ملاس چغندر قند، شیره خرما، ملاس نیشکر) به‌میزان ۵ درصد با آب مقطر مخلوط شدند. همچنین مواد جامد (سبوس گندم، پودرسویا، پودر ماهی، پودر ذرت، باگاس نیشکر) نیز به‌میزان ۵ درصد با آب مقطر مخلوط شده و از آن‌ها عصاره‌گیری به‌عمل آمد. برای این منظور هر عصاره به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. بعد از آن با استفاده از یک کیسه نخی تحت فشار تفاله‌ها از عصاره جدا شد و برای جداسازی دیگر ذرات احتمالی از الک با مش ۱۸۰ میکرون استفاده گردید. سپس عصاره خالص جهت اندازه‌گیری وزن خشک مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌های فوق‌الذکر هر کدام جداگانه، در حجم ۴۰ ml در دستگاه سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سلسیوس قرار گرفت. سپس مایع رویی یا سوپرناتانت دور ریخته و رسوب در دمای 45 ± 1 درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت خشک شد. در نهایت رسوب خشک‌شده به‌وسیله ترازوی دیجیتال با دقت 0.0001 گرم وزن و بر حسب درصد ماده خشک محاسبه و ثبت گردید. همچنین وزن خشک تیمار شاهد (NB) نیز محاسبه شد.

(2006). سویه مذکور در محیط Nutrient broth کشت داده شد و به‌عنوان بذر اولیه جهت انجام آزمایشات استفاده شد.

مواد مصرفی در محیط‌های کشت

مواد مصرفی که به‌عنوان محیط کشت استفاده شد، شامل ۹ فرآورده از پسماند صنایع غذایی و کشاورزی بود. این مواد شامل سبوس گندم (رقم نوید، شهرستان شهرکرد)، تفاله سویا (تهیه شده از کارخانه سویای سبحان)، پودر ماهی (تهیه شده از شرکت تعاونی مرغداران شهرستان دزفول)، ملاس نیشکر (کشت و صنعت نیشکر هفت‌تپه)، باگاس (تفاله ساقه نیشکر، کشت و صنعت نیشکر هفت‌تپه)، ملاس چغندر قند (کارخانه قند کهریزک)، کورن‌استیپ (شرکت گلوکوزان قزوین)، پودر ذرت خشک‌شده و شیره خرما (تهیه شده از شهرستان دزفول) بود. بررسی‌های انجام شده در این محیط‌کشت‌ها برای تولید Bt به‌صورت تأثیر تغییرات pH در محیط کشت بر میزان تولید باکتری انجام شد. در این بخش از آزمایش‌ها ارزیابی تولید Bt با محاسبه میزان اسپور زنده (CFU) و همچنین میزان توده زنده (Biomass) صورت گرفت. همچنین به‌منظور ارزیابی تولید پروتئین دلتا اندوتوکسین، بهترین محیط کشت از نظر مقدار اسپور زنده برای انجام آزمون زیست‌سنجی مورد استفاده قرار گرفت.

انجام بررسی‌های اولیه روی محیط‌های کشت

جدول ۱- مقدار وزن خشک توده زنده Bt در محیط‌های کشت

Table 1. Dry weight of test substances and control (Nutrient Broth) as Culture media

Culture media	Dry weight (g)	Culture media	Dry weight (g)
Wheat bran	0.9031	Sugarcane molasses	0.0902
Soybean	1.2524	Beet molasses	0.1111
Fish powder	0.1302	Corn steep	0.0017
Corn powder	0.8721	Date juice	0.0984
Sugarcane bagasse	0.018	Nutrient Broth	0.0296

آماده‌سازی محیط‌های کشت

تمام مواد مورد استفاده برحسب درصد در فاز مایع، محلول در آب و یا به صورت سوسپانسیون مورد بهره‌برداری قرار گرفتند. به طوری که سبوس گندم، تفاله سویا، باگاس، پودر ماهی و پودر ذرت، مواد جامدی بودند که از آن‌ها با غلظت خاص عصاره تهیه شد، بدین صورت که مواد مذکور بعد از توزین به میزان ۵ درصد، در ارلن‌های یک لیتری با آب مخلوط شده سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری و سپس توسط پارچه نخی تحت فشار قرار گرفته تا عصاره آن‌ها جدا شود سپس برای جداسازی ذرات ریز از الک با مش ۱۸۰ میکرون استفاده شد. دیگر مواد مانند کورن‌استیپ، ملاس چغندر، شیر خرم و ملاس نیشکر که خود به صورت شیر غلیظ بودند به میزان ۵ درصد وزنی (۵ گرم عصاره ۹۵+ میلی لیتر آب) با آب مخلوط شده و استفاده شدند.

تهیه بذر باکتری (Seed culture)

برای تهیه بذر باکتری و جهت تلقیح در محیط کشت‌های اصلی یک لوپ از باکتری را از روی محیط کشت Nutrient Agar برداشته و در محیط Nutrient Broth به میزان ۲۰۰ میلی لیتر، در یک ارلن ۵۰۰ میلی لیتری که از قبل آماده و استریل شده بود، قرار داده شد و به مدت ۱۶ ساعت روی شیکر با دور ۱۹۰ rpm در دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار گرفت.

تلقیح باکتری به محیط کشت اصلی

به منظور تلقیح باکتری از محیط کشت NB به محیط‌های کشت اصلی بوسیله سمپلر به میزان ۵ درصد به حجم ۱۵۰ میلی لیتر محیط‌های اصلی اضافه گردید. این کار تحت شرایط استریل و زیر هود بیولوژیک انجام شد. پس از آن درب ارلن‌ها را به وسیله پنبه استریل محکم و روی شیکر، با دور ۱۹۰ rpm با دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت قرار داده شدند.

ارزیابی میزان رشد باکتری

برای محاسبه میزان رشد باکتری در هر یک از محیط‌های کشت از روش رقیق‌سازی و شمارش کلنی استفاده شد. بدین منظور در زمان‌های معین به ترتیب ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از انجام تخمیر ارلن‌ها را به هود بیولوژیک انتقال داده و به وسیله سمپلر ۱ ml از محیط‌های کشت برداشته و در میکروتیوب‌های استریل قرار داده شد. سپس برای ایجاد شک حرارتی میکروتیوب‌ها در بن‌ماری، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند. سپس برای تهیه سری رقت یا serial dilution به ترتیب زیر عمل شد.

برای رقیق‌سازی هر یک از محیط‌های کشت حاوی باکتری از آب مقطر استریل و Tween 80 (به نسبت ۰/۰۴ درصد) استفاده شد. بدین منظور ۱۰ لوله آزمایش را که از قبل در آن استریل شده بودند، را آماده کرده و بعد از شماره‌گذاری داخلی هر کدام ۹ ml از محلول آب مقطر استریل و Tween80 ریخته شد. سپس ۱ ml محیط کشت حاوی Bt هر میکروتیوب را به وسیله سمپلر برداشته و درون لوله‌ی اول ریخته شد و حجم آن به ۱۰ ml رسید، با این کار باکتری‌های موجود ۱۰ برابر رقیق و غلظت 10^{-1} تهیه شد، سپس این لوله روی دستگاه ورتکس قرار داده شد. بعد از میکس کردن محتویات، ۱ ml از لوله اول برداشته و به لوله دوم اضافه شد، این کار تا لوله هفتم ادامه داده و غلظت 10^{-7} تهیه شد. در مرحله بعد به وسیله سمپلر مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از لوله هفتم را برداشته و روی سطح محیط نوترینت آگار ریخته و بوسیله لوله‌های استریل پیت پاستور به طور یک نواخت پخش شد و برای هر کدام سه تکرار در نظر گرفته شد. سپس پتری‌ها در انکوباتور در دمای ۲۷ درجه سانتیگراد نگهداری شده و بعد از مدت ۲۴ ساعت تعداد کلنی‌ها ثبت شدند. برای محاسبه CFU، میانگین تعداد کلنی‌های شمارش شده در ۳ تکرار مربوط به هر رقت، در عکس ضرب رقت لوله مربوط به آن ضرب شد. در این صورت مقدار اسپور در هر میلی لیتر در هر کدام از محیط‌های کشت و تیمار شاهد NB به صورت جداگانه بر حسب CFU/ml محاسبه و نتایج ثبت شد. دو آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۹ بستر کشت (سبوس گندم،

شد و رسوب آن در دمای 45 ± 1 سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت خشک و به‌وسیله ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم وزن شد. مقدار وزن خشک در هر تیمار در نهایت بر حسب گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت محاسبه گردید. آزمون مقدار وزن خشک توده زنده Bt در قالب طرح کاملا تصادفی در محیط‌های کشت سیوس‌گندم، تفاله‌سویا، باگاس، پودرماهی، پودرذرت، کورن‌استیپ، ملاس‌چغندر، شیره‌خرما و ملاس‌نیشکر بعد از پایان تخمیر، در دو آزمون با و بدون تنظیم pH بر حسب گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون Bt محاسبه و ثبت شد هر آزمون با ۹ تیمار در سه تکرار انجام و داده‌ها با نرم‌افزار SPSS تجزیه و با آزمون دانکن گروه‌بندی تیمارها انجام شد.

ارزیابی تولید کریستال‌های پروتئینی (دلناندوتوکسین)

به منظور ارزیابی تولید پروتئین دلنا اندوتوکسین یا کریستال‌های سمی در تیمارهای مورد آزمایش، از روش زیست‌سنجی روی لارو سن سوم *H. armigera* استفاده شد. در این آزمایش تیمارهایی که از نظر تولید، بیشترین میزان تولید اسپور برحسب CFU/ml را داشتند برای ارزیابی تولید توکسین مورد ارزیابی قرار گرفتند.

آزمون زیست‌سنجی (Bioassay)

برای انجام این آزمون برای هر تیمار تعداد ۱۵ عدد لارو و در ۳ تکرار، در مجموع ۴۵ لارو در نظر گرفته شد، هر لارو در یک ظرف به‌صورت جداگانه قرار گرفته و غذای مصنوعی به اندازه یکسان (۰/۵ سانتیمتر مکعب) برای هر کدام از لاروها قرار داده شد. سپس قطعات غذای مصنوعی را با تیمارها آلوده کرده، به‌طوری که آلوده‌سازی آنها با استفاده از سمپلر و به‌میزان ۱۰۰ میکرولیتر به ازاء هر قطعه انجام شد. پس از خشک‌شدن نسبی سطح غذا، لاروهای مورد نظر درون ظروف آزمایش رها شده و درب ظرف‌ها بسته شد. ظرف‌ها پس از نامگذاری در انکوباتور در دمای ۲۷ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۶۰ درصد به‌مدت یک هفته نگهداری شده و مرگ‌ومیر لاروها در تیمارهای

تفاله سویا، باگاس، پودرماهی، پودرذرت، کورن‌استیپ، ملاس‌چغندر، شیره‌خرما و ملاس‌نیشکر) با تنظیم pH و ۹ تیمار فوق بدون تنظیم pH در سه تکرار انجام و داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار SPSS تجزیه و با آزمون دانکن گروه‌بندی تیمارها انجام شد.

بررسی تغییرات pH محیط‌های کشت

تغییرات pH (تغییر غلظت یون هیدروژن در محیط) بر رشد باکتری موثر است. تراکم یون هیدروژن رشد باکتری و فعالیت آن را به شدت تحت تأثیر قرار می‌دهد. به این ترتیب فقط در حد معینی از pH می‌تواند رشد کند و سریع‌ترین رشد در ناحیه محدودی از pH انجام می‌شود. برای بررسی روند تغییرات pH محیط‌های کشت، از زمان تلقیح باکتری تا پایان تخمیر از pH متر مدل Denver استفاده شد. بدین منظور برای جلوگیری از آلوده شدن محیط‌کشت به‌وسیله سمپلر مقداری از محتوای ارلن‌ها برداشته و به‌طور جداگانه pH آنها ثبت شد.

در ابتدای آزمایش pH تمامی تیمارها با اضافه کردن NaOH و یا HCL یک مولار روی عدد ۷ تنظیم شد. با توجه به رشد باکتری و فرایندهای تخمیری در حین تخمیر در محیط‌کشت، pH محیط به‌طور تدریجی در حال تغییر است، لذا در زمان‌های نمونه‌برداری تغییرات آن ثبت و در صورت لزوم به آن‌ها اسید یا باز اضافه شد. در آزمایشی دیگر، تأثیر عدم تنظیم pH در تمام محیط‌های کشت به‌طور مستقل بررسی شد برای این‌منظور تمامی مراحل آماده‌سازی محیط‌های کشت انجام شد، ولی میزان pH آن‌ها در ابتدای آزمایش و قبل از تلقیح باکتری بدون تغییر گذاشته شد و فقط روند تغییرات آن از ابتدا تا پایان تخمیر ثبت گردید.

محاسبه وزن خشک توده زنده

به منظور اندازه‌گیری وزن خشک سلولی در هر یک از محیط‌های کشت، در پایان تخمیر مقدار ۴۰ میلی‌لیتر از هر ارلن برداشته و در دستگاه سانتریفیوژ مدل Vision با دور rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. سپس مایع بالای (سوپرناتانت) دور ریخته

مقدار وزن خشک توده زنده Bt در محیط‌های کشت بعد از پایان تخمیر، با و بدون تنظیم pH بر حسب گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون Bt اندازه‌گیری شد که در شکل ۱ آمده است.

نتایج ارزیابی میزان تولید پروتیین دلتا اندوتوکسین سویه 6R در محیط‌های کشت با بیشترین مقدار اسپور زنده را به روش زیست‌سنجی روی لارو سن سه کرم قوزه‌پنبه در شکل ۲ آمده است.

موردآزمون، به صورت جداگانه ثبت گردید. همچنین تیمار شاهد (Nutrient Broth) لحاظ و با تیمارهای آزمایش مقایسه شد. داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار SPSS تجزیه و با آزمون دانکن گروه‌بندی تیمارها انجام شد.

نتایج

بررسی تولید Bt در محیط‌های کشت

نتایج آزمایش تأثیر محیط‌های کشت روی میزان اسپور زنده، (CFU) در محیط‌های مختلف در طی فرایند تخمیر در طول ۷۲ ساعت با و بدون تنظیم pH بررسی شد که نتیجه آن در جدول ۲ آمده است.

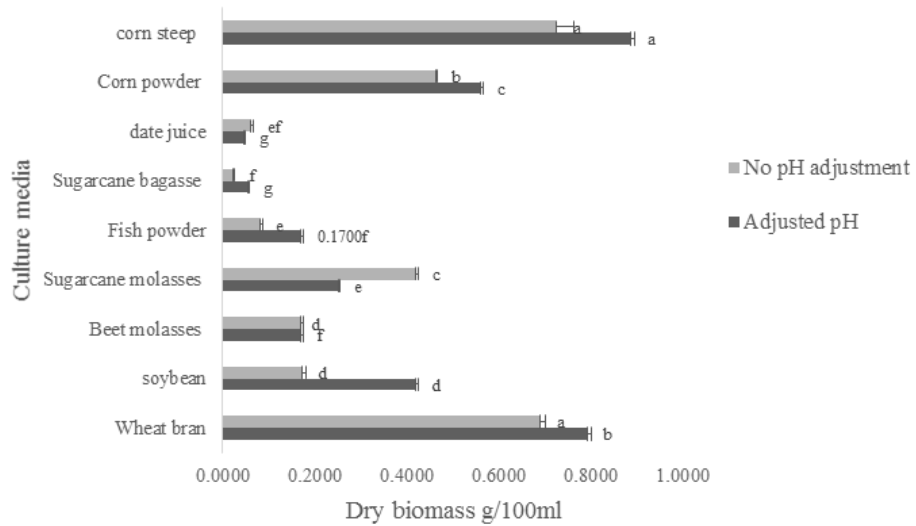
جدول ۲- میزان اسپور زنده *Bacillus thuringiensis* در محیط‌های کشت مختلف در زمان‌های معین با و بدون تنظیم pH

Table 2. The CFU of *Bacillus thuringiensis* in different culture media at certain times with and without pH adjustment

Culture media	CFU ± SE					
	Adjusted pH			No pH adjustment		
	24 hours	48 hours	72 hours	24 hours	48 hours	72 hours
Wheat bran	662.33 ± 4.5 _c	1300.67 ± 1.8 d	79006 ± 3.1 b	51.1 ± 1.3 c	104.7 ± 2.9 e	204.7 ± 2.9 e
Soybean	589.33 ± 2d	1120.67 ± 1.2 e	22402.7 ± 3.2 c	3.9 ± 0.3 f	20.3 ± 0.9 h	104.3 ± 2.7 e
Beet molasses	12.00 ± 0.6 g	231.67 ± 1.2 f	899.7 ± 2 f	33.3 ± 1.2 d	398.3 ± 0.9 c	1500.7 ± 1.7 e
Sugarcane molasses	960.33 ± 14 b	3704.67 ± 2.6 b	6963.3 ± 2 d	88.5 ± 0.8 b	1851.7 ± 2.2 b	52808.6 ± 6.3 e
Fish powder	54.77 ± 0.8 f	141.67 ± 1.8 g	6232.7 ± 2.2 e	3.3 ± 0.2 f	4.5 ± 0.3 i	7.3 ± 0.3 e
Sugarcane bagasse	2.23 ± 0.1 g	410 ± 1.2 i	85.3 ± 1.2 h	6.8 ± 0.1 f	63.3 ± 2.3 f	164.3 ± 2.7 e
Date juice	11.53 ± 0.3 g	51.13 ± 1.3 h	110 ± 0.6 g	17.3 ± 0.4 e	35 ± 1.1 g	230.7 ± 1.7 e
Corn steep	4755.67 ± 12.7a	414004.33 ± 2.6 a	1230006.7 ± 29.7 a	632 ± 3 a	77103 ± 1.7 a	8900006 ± 3 e
Corn powder	295.33 ± 3.3 e	1704 ± 2.6 c	22402 ± 3.4 c	32.6 ± 2 d	302.3 ± 3.4 d	1810.7 ± 6.7 e
DF	8	8	8	8	8	8
F	52212.1	5228881872.6	1703631879.1	20958.6	161841069.6	638418270017.4
P	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000

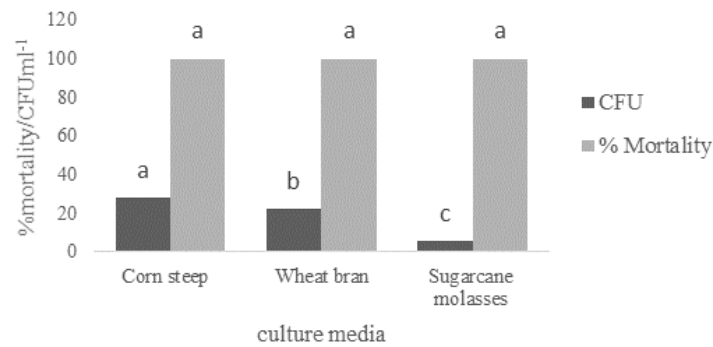
حروف غیر مشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشد

Non-identical letter in each column indicate a significant difference at the 5% level based on Duncan's test

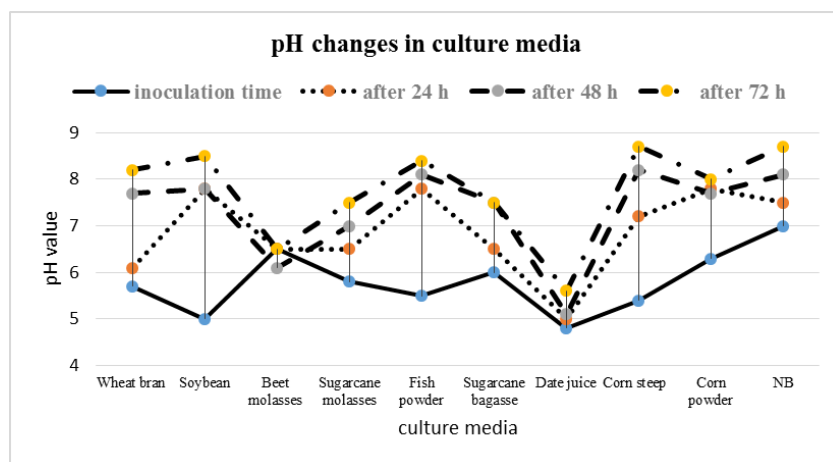


شکل ۱- وزن خشک توده زنده Bt در محیط کشت

Figure 1. Dry weight of Bt biomass in culture media



شکل ۲- درصد مرگ‌ومیر Bt و میزان اسپور زنده استخراج شده از محیط‌های کشت انتخابی روی لارو *Helicoverpa armigera*
 Fig. 2. Mortality percentage and CFU of Bt extracted from selective culture media on *Helicoverpa armigera* larvae



شکل ۳- روند تغییرات pH در محیط کشت، از زمان تلقیح تا پایان تخمیر

Fig. 3. The process of pH changes in culture media, from the inoculation time to the end of fermentation

بحث

در این تحقیق با استفاده از محصولات فرعی صنایع غذایی و کشاورزی، باکتری Bt در شرایط آزمایشگاه تولید، و تغییرات pH محیط‌های کشت بررسی شد. طبق بررسی‌های انجام شده بیشتر محیط‌هایی که در حال حاضر برای تولید Bt به کار می‌روند حاوی محصولات طبیعی به‌عنوان منبع کربن، نیتروژن و املاح معدنی هستند. منابع نیتروژن به کار رفته در تولید Bt عبارتند از: پودر ماهی، آرد پنبه‌دانه، کورن‌استیپ، سویا، عصاره نیشکر و چغندر و انواع ملاس، محصولات جانبی ذرت، نشاسته و دکستروز نیز به‌عنوان منابع کربوهیدرات در محیط‌های کشت به کار می‌روند. به‌طور کلی محیطی که برای تولید اسپور و کریستال به کار می‌رود باید به گونه‌ای طراحی شود که تولید توده زنده و اسپورزایی را به نحو احسن تضمین نماید. طراحی آزمایشات باید به گونه‌ای باشد که در فاصله زمانی کم بتوان فرایند تولید را از نظر کیفی و کمی و اقتصادی بهینه کرد. در این تحقیق نتایج نشان داد می‌توان با استفاده از محیط‌های ارزان‌قیمت مانند ملاس چغندر قند، و ملاس نیشکر به‌عنوان منابع کربن، شربت ذرت به‌عنوان منبع ازت و دیگر مواد مانند پودر تفاله سویا، پودر ماهی و سبوس گندم برای تامین بستر غذایی مورد نیاز Bt و بهینه سازی شرایط تولید و تخمیر آفت کش بیولوژیک بر پایه Bt در شرایط آزمایشگاهی تولید نمود. بررسی مطالعات نشان می‌دهد که به‌طور کلی در مراحل اولیه بسیاری از فرایندهای تخمیری، قند گلوکز و عصاره مخمر به ترتیب به‌عنوان منبع تامین کربن و نیتروژن مورد استفاده قرار گرفته‌اند ولی از آنجایی که هدف تولید انبوه براساس استفاده از ترکیبات ارزان‌قیمت می‌باشد، مطالعات گسترده‌ای جهت تولید منابع جایگزین صورت گرفته است (Amin, Alotaibi *et al.*, 2008).

با توجه به نتایج بدست آمده مشخص شد کورن‌استیپ به‌عنوان ماده پایه در محیط‌های کشت، منبع مناسب و ارزان‌قیمتی برای تامین نیاز نیتروژنی برای تولید Bt است. به‌طور کلی عصاره مخمر به‌عنوان منبع ازت مورد استفاده قرار می‌گیرد، که بیشترین کاربرد را در تحقیقات آزمایشگاهی دارد ولی بدلیل گران بودن این منبع، می‌بایست

محیط‌های کشت دوتایی ملاس چغندر (منبع کربن) همراه با کورن‌استیپ (منبع ازت) با 1.012×10^{12} CFU/ml و $4/22 \times$ سبوس گندم (منبع کربن) همراه با کورن‌استیپ (منبع ازت) با 1.012×10^{12} CFU/ml و $3/44 \times$ دو بستر کشت تلفات صددرصدی روی لاروسن سه *H. armigera* داشتند.

با توجه به نتایج به‌دست آمده کورن‌استیپ به‌عنوان ماده پایه در محیط‌های کشت و منبع مناسب و ارزان‌قیمت برای تامین نیاز نیتروژن برای تولید Bt تشخیص داده شد. علاوه بر این مشخص شد که درصد منابع کربن و ازت در رشد و نهایتاً تولید اسپور و کریستال بسیار موثرند. بیشترین میزان تولید اسپور و کریستال در pH اپتیمم رشد بدست آمد و علاوه بر این بررسی روند تغییرات pH و مصرف اسید و باز نشان داد که در ابتدای تخمیر و همراه با آغاز رشد، pH محیط کاهش یافته و پس از فاز لگاریتمی رشد، pH افزایش می‌یابد، همچنین بررسی‌ها نشان داد که عدم تنظیم pH بطور نسبی در برخی تیمارها در میزان تولید باکتری تأثیر چشمگیری دارد (شکل ۳)، در تیمار ملاس نیشکر تنظیم نشدن pH با افزایش میزان اسپور زنده همراه است، ممکن است دلیل رشد بیشتر باکتری در این محیط کشت به‌علت پایین بودن pH در آن باشد، در این صورت مواد مغذی موجود در ملاس نیشکر که برای رشد باکتری مورد نیاز است در pH پایین در دسترس باکتری قرار گیرد. ملاس چغندر قند و شیره خرما به‌عنوان بستر رشد Bt کمترین تغییرات pH را در ۷۲ ساعت نشان دادند. در شیره خرما در زمان تلقیح، pH محیط کمتر از پنج و در فاز لگاریتمی باکتری به شش نرسیده است. در ملاس چغندر قند pH محیط در زمان تلقیح شش و نیم و ۴۸ ساعت بعد از تلقیح کاهش و به شش رسیده است. در پودر سویا pH محیط در زمان تلقیح پنج بوده و ۴۸ ساعت بعد از تلقیح به حدود هشت افزایش داشته است. در تیمارهایی که pH محیط در زمان تلقیح روی هفت تنظیم شده بود میزان اسپور و توده زنده نسبت به زمانی که اینکار انجام نشده بود تفاوت چشمگیری نشان داد که حاکی از تأثیر pH روی میزان رشد Bt دارد. لذا تنظیم pH محیط رشد Bt آیتمی مهم و ضروری است.

می‌بایست در آزمون‌های بهینه‌سازی مدنظر قرار گیرد. به‌طوری‌که طی مطالعات انجام شده منابع کربن (ملاس‌نیشکر، ملاس‌چغندر، شیره‌خرما و سبوس‌گندم) و منابع نیتروژن (عصاره‌ذرت و سویا، پودرماهی و باگاس) و اثرات متقابل آنها بر میزان رشد باکتری مورد ارزیابی قرار گرفتند. ملاس‌ها و سبوس‌گندم به‌عنوان منبع کربنی اقتصادی بودند که در حضور منابع ازتی مانند کورن‌استیپ، پودرسویا و پودرماهی به‌طور موثری مورد استفاده قرار گرفتند. این تحقیق می‌تواند راه را برای مطالعات تکمیلی از جمله بهینه‌سازی شرایط تولید در فرمانتورهای آزمایشگاهی و همچنین فرمولاسیون فرآورده و در نهایت کاربردی نمودن آن در مقیاس نیمه‌صنعتی و صنعتی هموار کند. در پایان می‌توان گفت از آنجا که فرآورده‌های بیولوژیک اثر نامطلوبی روی محیط‌زیست و انسان ندارند، می‌توان از آنها در برنامه‌های کنترل بیولوژیک و مدیریت تلفیقی آفات (IPM) کشاورزی استفاده کرد.

آن را با منابع ارزاتر مانند ضایعات کشاورزی و پساب‌های صنعتی جایگزین کرد (Prabakaran, Hoti *et al.*, 2009). پن و همکاران (Pan *et al.*, 2021) نشان دادند که محیط‌های حاصل از پسماند صنایع غذایی نسبت به محیط‌کشت‌های استاندارد سبب افزایش کارایی بیشتر Bt می‌شوند که با نتایج حاضر مطابقت دارد.

در تحقیقی که توسط والیسن و مورائو صورت گرفت ترکیب گلوکز ذرت یک درصد به عنوان منبع کربن و آرد سویا سه درصد به عنوان منبع ازت، دارای بیشترین مقدار تولید اسپور و کریستال بودند (Valicente & Mourao, 2008). پیتون، پودرسویا و پروتئین سویا نیز به‌عنوان منابع ازت در تولید انبوه این باکتری مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند. ترکیب Tapoica و پیتون دارای اثر معنی‌داری در افزایش تولید اسپور و کریستال بوده‌اند (Rao, Tsay *et al.*, 2007).

با توجه به اینکه در کشور ما سویا در سطح وسیع کشت نشده و وارداتی است دسترسی به آن مشکل بوده و فرآورده‌ها و ضایعات ذرت منابع مناسب‌تری به نظر می‌رسند.

علاوه بر این مشخص شد که درصد منابع کربن و ازت نیز در رشد و نهایتاً تولید اسپور و کریستال بسیار موثرند و

References

- Amin, G. & Alotaibi, S. 2008. Optimization of a fermentation process for bioinsecticide production by *Bacillus thuringiensis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(11): 2465–2471.
- Black, K.G. & Snyman, S.J. 1991. Biomass yield and insecticidal activity of a local *Bacillus thuringiensis* isolate in six fermentations. *Proceedings of the south African Sugar Technologists Association*, 77–79.
- Brar, S.K. & Verma, M. 2005. Starch industry wastewater based stable *Bacillus thuringiensis* liquid formulation. *Journal of economic entomology*, 98(6): 1890–1404.
- Capalbo, D.M.F. 1995. *Bacillus thuringiensis*: fermentation process and risk assessment: a short review. *Memrias do instituto Oswaldo Cruz*, 90:135–138.
- Capalbo, D.M.F. Valicente, F.H. Marcus, I.O. & Pelizer. L. H. 2001. Solid–state fermentation of *Bacillus thuringiensis* var. *tolworthi* to control fall armyworm in maize, *Journal of Biotechnology*, 4(2): 155–168.
- Dulmage, H.T. 1971. Production of delta–endotoxin by eighteen isolates of *Bacillus thuringiensis* serotype in fermentation media. *Journal. Invertebrate Pathology*, 18: 353–358.
- Fernando, H. Valicente & Andre, H.C. Mourao. 2008. Use of By–Products Rich in Carbon and Nitrogen as a Nutrient Source to Produce *Bacillus thuringiensis* (Berliner)–Based Biopesticide *Neotropical Entomology*, 37(6): 702–708 .
- Jayaraman, R. 2003. Influence of Carbon and Nitrogen Sources on the Growth and Sporulation of *Bacillus thuringiensis* var *Galleriae* for Biopesticide production. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 17(3): 225–231.
- Kraemer–Schafhalter, A. & Moser, A. 1996. Kinetic study of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in lab–scale batch process. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 14(3): 139–144.
- Lachhab, K. Tyag R.D. & Valero, J.R. 2001. Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides using wastewater sludge as a raw material: effect of inoculum and sludge solids concentration. *Process Biochemistry*, 37: 197–208.

- Marzban, R. & Salehi, J.G. 2006, Isolation of native *Bacillus thuringiensis* Berliner isolates from the agricultural soils of Iran. *Journal of New Agricultural Sciences*, 1(2): 47–54.
- Marzban, R. 2012. Investigation on the suitable isolate and medium for production of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Biopesticides*, 5: 144–147.
- Obeta, J.A.N. & Okafor, N. 1984 Medium for the production of primary powder of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis. *Journal of Applied Environmental Microbiology*, 47: 863–867.
- Pan X., Huang T., Fang Y., Rao W., Guo X., Nie D., Zhang D., Cao F., Guan X. & Chen, Z. 2021. Effect of *Bacillus thuringiensis* biomass and insecticidal activity by cultivation with vegetable wastes. *Journal of Royal Society Open Science*, 8: 1–8.
- Pandey, A. Soccol C.R. & Larroche C. 2008. *Current Developments in Solid-state Fermentation*. Springer, New York, NY, P. 517.
- Poopathi, S. 2010. Novel Fermentation media for the production of mosquito pathogenic bacilli in mosquito control. *Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 349–358.
- Prabakaran, G. Hoti, S.L. & Paily, K.P. 2009. Development of cost-effective medium for the large-scale production of a mosquito pupicidal metabolite from *Pseudomonas fluorescens* Migula. *Biological Control*, 48(3): 264–266.
- Rani, R. Singhanian, R. 2009. Recent advances in solid-state fermentation. *Journal of Biochemical Engineering*, 44 (1): 13–18
- Rao, Y.K. Tsay, 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(4): 535–541.
- Salehi Jouzani, G., Moradali, M.F. & Abbasalizadeh, S. 2015. Optimization of economic medium and fermentation process of a lepidopteran active native *Bacillus thuringiensis* strain to enhance Spore/Crystal production. *Journal of agricultural biotechnology*, 17: 1183–1196.
- Tianjian, X. 1994. *Industrial production of BT production and application*. Wuhan, China.
- Valicente, F.H. & Mourao, A.H. 2008. Use of by-products rich in carbon and nitrogen as a nutrient source to produce *Bacillus thuringiensis* (Berliner)-based biopesticide. *Tropical Entomology*, 37: 702–708.
- Vimala Devi, P.S. Ravinder, T. & Jaidev, C. 2005. Cost-effective production of *Bacillus thuringiensis* by solid-state fermentation. *Journal of Invertebrate Pathology*, 88(2): 163–168.

The effect of some food industrial wastes and byproducts on the development and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis*

Vahab Dastpak¹, Rasoul Marzban², Sohrab Imani³, Maryam Kalantari⁴

1, 3. PhD. student, Assistant Professor, Department of Entomology, Research and Science Azad University, Tehran, Iran.

2, 4. Associate Professor, M.Sc., Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

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

Received: Nov., 23, 2021

9(1) 1–12

Accepted: Feb., 14, 2022

Abstract

Today, the knowledge of agricultural and health pest management in the method of biological control is expanding, and among these, *Bacillus thuringiensis* as a bio-pesticide with high efficiency and safety have a major role in pest control. However, due to high production costs, it has not yet been able to replace chemical pesticides. In the present study, to promote pesticide and cost-effective cultivation Bt subspecies kurstaki native strain 6R food waste and by-products including wheat bran, soybean pulp, corn powder and corn steep, fish meal, date juice, sugar beet molasses and sugarcane bagasse were evaluated as raw fermentation medium. In this study, the above substances were studied as food culture medium as an extract and as a liquid for propagation. Factors of spore and crystal production were measured during the fermentation process in different cultures for 72 hours, including bioassay on *Helicoverpa armigera* larval stage three, dry biomass weight, spore content and the effect of pH. The results showed that Bt from wheat bran, sugarcane molasses and corn steep substrates on *H. armigera* larval stage three has 100% mortality. The highest dry biomass of Bt after the end of fermentation was related to corn powder, wheat bran and corn steep, respectively 0.903, 0.7804 and 0.559 g per 100 ml of suspension culture. The results showed that Corn steep culture medium with the highest Bt production in laboratory conditions (2.8×10^{12} C CFU / ml) was the most efficient. In combination of two culture media, beet molasses (carbon source) with corn steep (nitrogen source) with 4.22×10^{12} CFU / ml and wheat bran (carbon source) with corn steep with 3.44×10^{12} CFU / ml, each two had the best performance with 100% mortality on *H. armigera* larvae. Overall, our findings provided a new strategy for using food waste and by-products with less environmental impact and reduced production costs.

Keywords: food industrial wastes, *Bacillus thuringiensis*, bio-pesticide, fermentation