مقاله تحقیقی

بهینه‌سازی تولید آفت‌کش بیولوژیک *Bacillus thuringiensis* به روش تاگوچی

وهاب دست پاک [۱]، رسول مرزبان [۲]، سهراب ایمانی [۳]، مریم کلانتری [۴]

۱، ۳–دکتری، استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲، ۴–دانشیار، کارشناس ارشد، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.
مسئول مکاتبات: رسول مرزبان، ایمیل: r.marzban@areeo.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۱۳ ۱۰(۱) ۱۴۳–۱۵۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۴/۲۱

چکیده

پس از دست‌یابی به استرین‌های برتر Bt از لحاظ قدرت بیمارگری و دامنه میزبانی، تهیه محیط‌های کشت ارزان‌قیمت برای تولید اسپور و کریستال در فرمانتور آزمایشگاهی به‌عنوان مدل اولیه، و تولید انبوه آن در بیوراکتورهای با مقیاس صنعتی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در این تحقیق سعی شده است تا با استفاده از نهاده‌های ارزان قیمت مانند پسماندها و فرآورده‌های فرعی صنایع کشاورزی بستر غذایی مناسب و بهینه‌ای برای رشد Bt فراهم شود و میزان تولید این باکتری با استفاده از این مواد مورد ارزیابی قرار گیرد. در این تحقیق پسماندها و فرآورده‌های فرعی صنایع کشاورزی به عنوان محیط کشت غذایی به‌صورت عصاره و به‌صورت مایع برای تکثیر Bt kurstaki سویه بومی 6R مورد بررسی قرار گرفت محیط‌های کشت به‌صورت تلفیقی از دو و سه محیط کشت با درصدهای متفاوت مورد ارزیابی قرار گرفتند و فرایند بهینه‌سازی با روش تاگوچی و با استفاده از نرم‌افزار Qualitek–4 انجام شد. نتایج آزمایشات و تجزیه تحلیل داده‌ها نشان داد که در محیط‌های کشت دوتایی سبوس گندم (منبع کربن) همراه با شربت ذرت با $۳/۴۴ \times ۱۰^{۱۰}$ CFU/ml، سبوس گندم(منبع کربن) همراه با پودر ماهی با $۵/۵ \times ۱۰^{۹}$ CFU/ml و محیط‌های ترکیب سه‌تایی شامل سویا، شربت ذرت، پودر ماهی $۳/۹۸ \times ۱۰^{۱۶}$ CFU/ml، سویا، شربت ذرت، ملاس نیشکر $۹/۸۹ \times ۱۰^{۱۶}$ CFU/ml و سبوس گندم، شربت ذرت و ملاس چغندرقند $۹/۲۹ \times ۱۰^{۱۶}$ CFU/ml بهترین محیط کشت‌هایی بودند که بیشترین میزان تولید باکتری Bt را در شرایط آزمایشگاه داشتند. نتایج نشان داد، Bt حاصل از بسترهای دوتایی سبوس گندم و پودرماهی، سبوس گندم و شربت ذرت و بسترهای سه‌تایی سویا، شربت ذرت و پودرماهی؛ شربت ذرت، سویا و ملاس نیشکر؛ شربت ذرت، سبوس گندم و ملاس چغندر قند روی لارو سن سه برگخوار مصری *Spodoptera littoralis* صد درصد تلفات داده است.

واژه‌های کلیدی: بهینه‌سازی، محیط کشت، بی‌تی، برگخوارمصری

مقدمه

یکی از فاکتورهای مهم تولید تجاری موفق آفت‌کش‌های میکروبی، بهینه کردن محیط تکثیر آن‌ها است. با توجه به اینکه میکروارگانیسم‌ها 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 میکروارگانیسم و شرایط فیزیولوژیک مورد نظر تنظیم می‌گردد، لذا تعیین هر کدام از عوامل مذکور در محیط کشت و استفاده از مواد ارزان قیمت بدست 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.

بنابراین، جستجوی ضایعات کشاورزی، پساب‌های صنعتی و شهری و انواع منابع ارزان که حاوی منابع مناسب کربنی، نیتروژنی و املاح باشند جهت استفاده به‌صورت منفرد و یا ترکیبی مطلوب بوده و مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است. علاوه براین محیطی که برای تولید اسپور و کریستال به‌کار می‌رود باید به‌گونه ای طراحی شود که تولید توده زنده (بیوماس) و اسپورزایی را به نحو احسن تضمین نموده و طراحی آزمایشات بهینه‌سازی نیز باید به‌گونه‌ای برنامه‌ریزی شود که در فاصله زمانی کم بتوان اثرات متقابل فاکتورهای مختلف نیز بررسی نماید (Kraemer–Schafhalter & Moser, 1996).

طی سالهای اخیر در کشورهای مختلف تحقیقات وسیعی در زمینهٔ بررسی بسترهای غذایی Bt با استفاده از ضایعات و فرآورده‌های فرعی محصولات کشاورزی و دانه‌های روغنی مانند آفتابگردان، کلزا، بادام‌زمینی و گرامینه‌ها و مواد مختلف دیگر، جهت تولید آن صورت گرفته است (Amin *et al*., 2008). پلی‌ساکاریدها و کربوهیدراتهای موجود در محصولات جانبی بدست آمده از گیاهان زراعی (مانند ملاس، پودر دانه غلات) محصولات جانبی فراوری دانه غلات یا نشاسته هیدرولیز شده را می‌توان به‌عنوان منبع کربن استفاده نمود (Brar *et al*., 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 (Berbert–Molina, Prata *et al*., 2008) . 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 میگیرد (Alotaibi *et al*., 2008). در انتخاب منابع کربن و نیتروژن فاکتورهای در دسترس بودن، ارزان و غنی بودن بسیار حائز اهمیت است.

Dulmage & Rhodes. (1971) روش‌های تولید Bt را بصورت توصیفی به رشته تحریر در آوردند 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 نیمه صنعتی استفاده شده است. طبق گزارش Tianjin (1994) در چین از پسماند محصولات کشاورزی مانند سویا، پنبه‌دانه و بادام‌زمینی روغن‌کشی شده به‌عنوان ماده اصلی تولید Bt استفاده شده است. در برزیل از روش فرمانتاسیون جامد برای تولید Bt به‌طور موفقیت‌آمیزی استفاده شده است (Obeta, 1984; Capalbo *et al*., 2001).

lachhab (2001) پسماندهای آب فاضلاب را به عنوان بسترغذایی 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).

Fernando Hercos (2008) در آزمایشات خود با استفاده از تفاله سویا، گلوکز و ذرت، نتیجه گرفت که ترکیبی از گلوکز و تفاله سویا را می‌توان به‌عنوان بستر غذایی جهت تولید Bt در نظر گرفت. همچنین فرناندو در آزمایش دیگری در سال ۲۰۱۰ از تفاله سویا و گلوکز، ذرت و فضولات (کود) خوک به‌عنوان منبع غنی نیتروژن برای تولید Bt استفاده کرد.

Soccoll *et al*. (2009) تفاله سویا و ملاس چغندرقند را برای تولید Bt در نظر گرفت. 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 میکروارگانیزم‌ها وابسته به تامین ویتامین‌ها و املاح معدنی مثل پتاسیم، منیزیم، فسفر، سولفور و مقادیر کمی از کلسیم، روی، آهن و غیره می‌باشد (Saberi *et al*., 2020; 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 فرمانتور 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. رشد مطلوب اکثر باکتریها در pH برابر ۷ صورت می‌پذیرد و متابولیسم سلولی و مواد حاصل از آن، pH محیط را دستخوش تغییراتی می‌نماید، بدین‌ترتیب که 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 پیش‌بینی می‌نماید. معمولا pH توسط بافر یا افزودن تدریجی مواد اسیدی یا قلیایی به محیط تنظیم می‌گردد (Kraemer– Yezza & Tyagi. *et al.*, 2005) . در این تحقیق نهاده‌های ارزان قیمت مانند پسماندها و فرآورده‌های فرعی صنایع کشاورزی شامل ملاس چغندرقند، ملاس و باگاس نیشکر، شربت ذرت، شیره‌ی خرما، سبوس گندم، تفاله سویا، پودر ذرت و پودر ماهی، به‌عنوان بستر غذایی ترکیبی دوتایی و سه‌تایی برای تولید بهینه Bt مورد ارزیابی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

تکثیر Bt در ترکیب دو منبع غذایی

در این مرحله از آزمایش، تمام مواد جامد عصاره‌گیری شده و محیط کشت‌های تلفیقی به‌صورت ترکیبی از دو محیط که در جدول (شماره ۱) آورده شده است و با نسبت مساوی به میزان ۵ درصد در ارلن‌های ۵۰۰ml مورد آزمون قرار گرفتند. برای تهیه بذر و تلقیح باکتری از محیط غذایی مایع (Nutrient Broth) استفاده شد. به این منظور در یک ارلن ۵۰۰ml به مقدار ۳۰۰ml محیط کشت NB تهیه شد و پس از استریل کردن یک لوپ از Bt (سویه 6R) در آن کشت داده، سپس ارلن به مدت ۱۶ ساعت روی شیکر با دور ۱۹۰rpm در دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. همچنین تمامی محیط‌های کشت اصلی بعد از آماده‌سازی، استریل شده و در زیر هود بیولوژیک، pH آن‌ها روی ۷ تنظیم شد. سپس به‌منظور تلقیح بذر باکتری، از محیط کشت NB به نسبت ۵ درصد به حجم محیط کشت‌های تلفیقی در ارلن اضافه شد، تیمار شاهد به‌صورت جداگانه با استفاده از محیط کشت NB جهت مقایسه با تیمارهای آزمایش مورد بررسی قرار گرفت. تمامی ارلن‌ها روی شیکر با دور ۱۹۰rpm در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۹۶ ساعت قرار داده شدند. جهت ارزیابی تولید باکتری در این محیط‌ها و بررسی روند تغییرات pH در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از فرایند تخمیر نمونه‌گیری به عمل آمد و CFU و تغییرات pH آن‌ها ثبت گردید. همچنین به‌منظور آزمایش زیست‌سنجی در تلفیق دو ماده غذایی از لارو سن سوم *Spodoptera. litturalis* استفاده شد. در این روش لاروها روی غذای مصنوعی پرورش داده شدند و در نهایت آزمون زیست‌سنجی با آغشته کردن غذای مصنوعی با Bt تکثیر شده انجام شد. مرگ و میر لاروها به مدت یک هفته ثبت گردید. تیمار شاهد و تیمار کنترل در این آزمایش نیز به ترتیب Nutrient Broth و آب مقطر استریل در نظر گرفته شدند.

موادی که به عنوان 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 که‌به صورت شیره غلیظ فرآوری شده بودند (شربت ذرت، ملاس چغندرقند، شیره خرما، ملاس نیشکر) به میزان ۵ درصد با آب مقطر مخلوط شدند. همچنین مواد جامد (سبوس گندم، تفاله سویا، پودر ماهی، پودر ذرت، باگاس نیشکر) نیز به میزان ۵ درصد با آب مقطر مخلوط شده و از آن‌ها عصاره‌گیری به عمل آمد. برای این منظور هر عصاره به مدت 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 فوق الذکر هر کدام جداگانه، در حجم ml ۴۰ 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 ۱ ± ۴۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت خشک شد. در نهایت رسوب خشک شده به‌وسیله ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم وزن شد و بر حسب درصد محاسبه و ثبت گردید. همچنین وزن خشک تیمار شاهد NB نیز محاسبه شد.

جدول ۱– محیط کشت‌های تلفیقی از دو منبع غذایی

Table 1. Integrated cultures medium from two food sources

Number	Media	Number	Media	Number	Media
1	Soybean+ wheat bran	11	wheat bran+ beet molasses	21	corn powder+beetmolasses
2	Soybean+ fish powder	12	wheat bran+ sugarcane molasses	22	corn powder+sugarcanemolasses
3	Soybean+ corn powder	13	wheat bran+bagass	23	bagass+corn steep
4	Soybean+ beet molasses	14	wheat bran+ corn steep	24	corn powder+corn steep
5	Soybean+ sugarcane molasses	15	wheat bran+ date juice	25	beet molasses+sugarcane molasses
6	Soybean+ bagass	16	fish powder+ corn powder	26	beet molasses+corn steep
7	Soybean+ corn steep	17	fish powder+ beet molasses	27	beet molasses+date juice
8	Soybean+ date juice	18	fish powder+sugarcane molasses	28	sugarcane molasses+bagass
9	wheat bran+fish powder	19	fish powder+corn steep	29	sugarcane molasses+wheat bran
10	wheat bran+ corn powder	20	fish powder+date juice	30	sugarcane molasses+ date juice

تکثیر Bt در ترکیب سه منبع غذایی و بهینه‌سازی آن با روش تاگوچی

در این بررسی طبق روش آماری تاگوچی طراحی آزمایشی انجام شد. پیش از طراحی، فاکتورهای موثر شناسایی شده و سطوح مورد نظر آن‌ها تعیین شدند. در بررسی‌های انجام شده، شش ماده برای ترکیب محیط‌های کشت، انتخاب شدند به‌طوری که، شربت ذرت، ملاس چغندرقند، ملاس نیشکر، پودر ماهی، تفاله سویا و سبوس گندم در غلظت‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین تهیه محیط کشت‌های تلفیقی، در نهایت با ترکیب ۳ ماده از مواد فوق انجام شد. لذا سه آزمایش مجزا و مستقل از هم انجام شد و برای طراحی هر آزمایش ۳ فاکتور و هرکدام در ۳ سطح در نظر گرفته شد، به عبارتی برای تهیه یک محیط کشت، تلفیقی از سه ماده در سه غلظت مورد بررسی قرار گرفت که درجدول شماره (۲) آمده است. با وارد کردن داده‌ها در نرم‌افزار تاگوچی، آرایه متعامد مناسب (L 9–) بدست آمد، و در نهایت برای تهیه یک محیط کشت تلفیقی شامل ۳ متغیر (ماده) و در ۳ سطح (غلظت)، ۹ آزمایش و در مجموع ۲۷ آزمایش طراحی و در ۳ تکرار انجام شد.

طراحی آزمایش

به منظور طراحی آزمایش برای هر یک از محیط‌های کشت تلفیقی سه‌تایی، از نرم افزار Qualitek–4 استفاده شد. با وارد کردن داده‌های عددی در این نرم‌افزار، آزمایش‌های زیر به‌صورت آرایه‌های متعامد طراحی شدند. در جداول زیر انواع محیط کشت‌های تلفیقی مورد آزمون، ترکیبات آن‌ها و درصد اختلاط آن‌ها بر اساس طراحی آزمایش به روش تاگوچی به تفکیک شرح داده شده است.

ارزیابی کیفیت Bt تولیدی در محیط تلفیقی سه‌تایی

در آزمایش های تلفیق سه ماده غذایی ، حجم محیط کشت‌ها به میزان ml ۱۵۰ در ارلن های ۵۰۰ سی سی در نظر گرفته شد، روش آماده سازی و انجام آزمایش مانند تلفیق دو ماده غذایی انجام شد و بعد از انجام تلقیح، همه ارلن‌ها روی شیکر با دور ۱۹۰rpm، در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت قرار گرفتند. به‌منظور ارزیابی تولید باکتری در این محیط کشت‌ها، میزان واحد کلنی‌ساز (CFU) محاسبه شد. همچنین آزمایش زیست‌سنجی جهت ارزیابی تولید دلتا اندوتوکسین، در بهترین فرآوردهٔ بدست آمده روی لارو سن سوم *S. litturalis* انجام شد. در نهایت تجزیه

و تحلیل نتایج در تمام مراحل با استفاده از نرم‌افزار Qualitek–4 انجام شد.

جدول ۲– تیمارهای ۱–۹ مربوط به تلفیق سه ماده سویا، شربت ذرت، پودر ماهی با درصدهای مختلف (a)، تیمارهای ۱۰–۱۸ مربوط به تلفیق سه ماده سویا، شربت ذرت، ملاس نیشکر با درصدهای مختلف (b) تیمارهای ۱۹–۲۷ مربوط به تلفیقی سبوس گندم، شربت ذرت، ملاس چغندرقند با درصدهای مختلف (c) است.

Table 2. Treatments 1 – 9 related to the combination of three ingredients soy, corn steep, fish powder with different percentages (a), treatments 10 – 18 related to the combination of three ingredients soy, corn steep, sugar cane molasses with different percentages (b) and treatments 19 – 27 are related to the combination of wheat bran, corn steep, sugar beet molasses with different percentages (c).

a

The amount of ingredients combined as a percentage			
number Test	soybean	corn steep	fish powder
1	0.2	3	0.2
2	0.2	4	0.5
3	0.2	5	1
4	0.5	4	0.2
5	0.5	5	0.5
6	0.5	3	1
7	0.9	5	0.2
8	0.9	3	0.5
9	0.9	4	1

b

The amount of ingredients combined as a percentage			
number Test	corn steep	soybean	sugarcane mol.
10	3	0.2	0.2
11	4	0.2	0.5
12	5	0.2	0.8
13	4	0.5	0.2
14	5	0.5	0.5
15	3	0.5	0.8
16	5	0.9	0.2
17	3	0.9	0.5
18	4	0.9	0.8

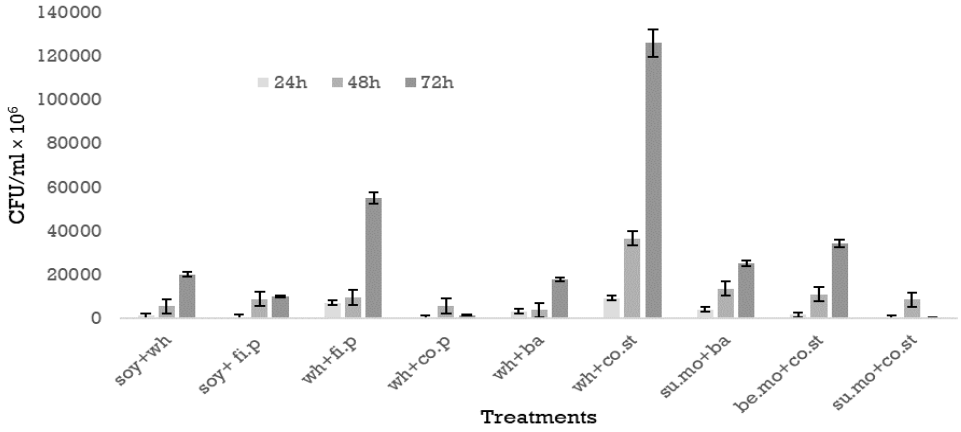
c

The amount of ingredients combined as a percentage			
number Test	wheat bran	corn steep	beet molasses
19	0.2	3	0.2
20	0.2	4	0.5
21	0.2	5	0.9
22	0.6	4	0.2
23	0.6	5	0.5
24	0.6	3	0.9
25	1	5	0.2
26	1	3	0.5
27	1	4	0.9

نتایج

اثر تلفیق محیط کشت‌های دوتایی در تولید Bt

نتایج آزمایشات نشان داد که در محیط‌های کشت دوتایی سبوس گندم همراه با شربت ذرت با $۳/۴۴ \times ۱۰^{۱۰}$ CFU/ml و سبوس گندم همراه با پودر ماهی با $۵/۵ \times ۱۰^{۹}$ CFU/ml بهترین محیط کشت‌هایی بودند که بیشترین میزان تولید باکتری Bt را در شرایط آزمایشگاه داشتند.



شکل ۱– میزان واحد کلنی‌ساز (CFU/ml) در برخی از محیط کشت‌های تلفیقی دوتایی در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تخمیر

Fig. 1. The amount of colony–forming units (CFU/ml) in some combined double cultures at 24, 48 and 72 hours after fermentation.

ارزیابی تولید دلتا اندوتوکسین در تلفیق دو ماده غذایی به روش زیستی

به منظور ارزیابی میزان دلتااندوتوکسین Bt در تلفیق دو ماده غذایی که بیشترین مقدار CFU را در پایان فرمانتاسیون داشتند تست زیست‌سنجی انجام شد که نتایج

آن در جدول ۳ آمده است. نتایج نشان داد، Bt حاصل از بسترهای دوتایی سبوس گندم و پودر ماهی، سبوس گندم و شربت ذرت روی لارو سن سه برگخوار مصری *Spodoptera littoralis* صد درصد تلفات داده است.

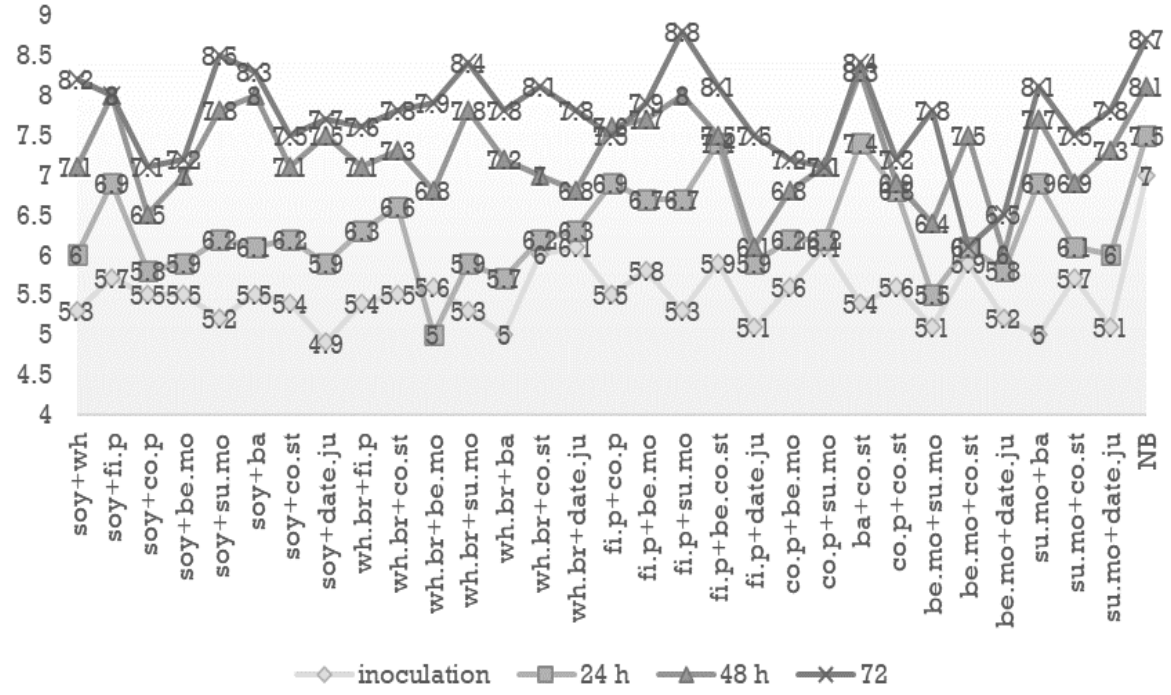
نتایج تغییرات PH در محیط های کشت تلفیقی دوتایی

بررسی روند تغییرات pH نشان داد (شکل ۲) که در ابتدای تخمیر و همراه با آغاز رشد لگاریتمی، pH افزایش می‌یابد، همچنین بررسی‌ها نشان داد که ملاس چغندرقند وشیره خرما بعنوان بستر رشد Bt کمترین تغییرات pH را در 72 ساعت نشان دادند. در محیط‌هایی که شیره خرما بوده در زمان تلقیح، pH محیط کمترین و در فاز لگاریتمی باکتری تغییرات زیادی نسبت به سایر تیمارها نداشته است. در محیط‌هایی که ملاس نیشکر بوده pH محیط بعد از تلقیح بیشترین تغییرات را داشته است. تغییرات pH محیط با توجه به منابع کربن و ازت و درصد آن‌ها و همچنین نوع قندهاتی موجود در محیط ارتباط مستقیم دارد.

جدول ۳– نتایج زیست‌سنجی Bt تولیدی در برترین محیط کشت‌های تلفیقی دوتایی روی لارو سن سوم برگخوار مصری *Spodoptera littoralis*

Table 3. Bioassay results of Bt produced in the best combined two cultures on the third instar larvae of the cotton leafworm *Spodoptera littoralis*

Number	Treatments	CFU/ml	Mortality
1	Wheat bran + fish powder	5.5×10^{9}	100%
2	Wheat bran + corn steep	3.44×10^{10}	100%
3	control	0	0

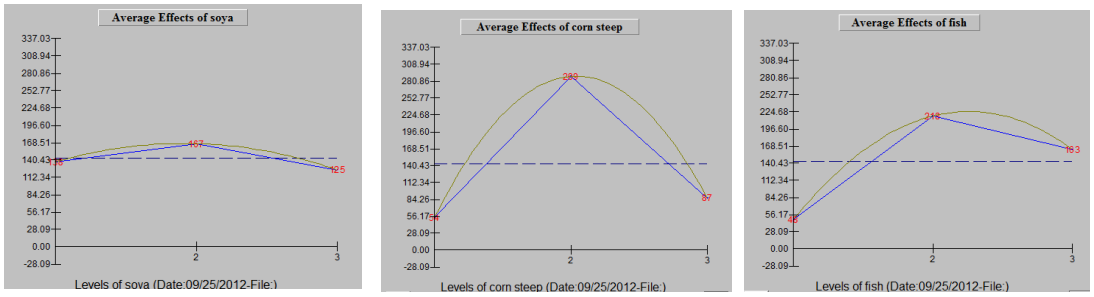


شکل ۲– تغیرات میزان pH در محیط‌های کشت تلفیقی دوتایی در لحظه تلقیح و در زمان‌های ۲۴–۴۸–۷۲ ساعت بعد از فرمانتاسیون

Fig. 2. Changes in the pH level in two integrated culture media at the moment of inoculation and at 24–48–72 hours after fermentation

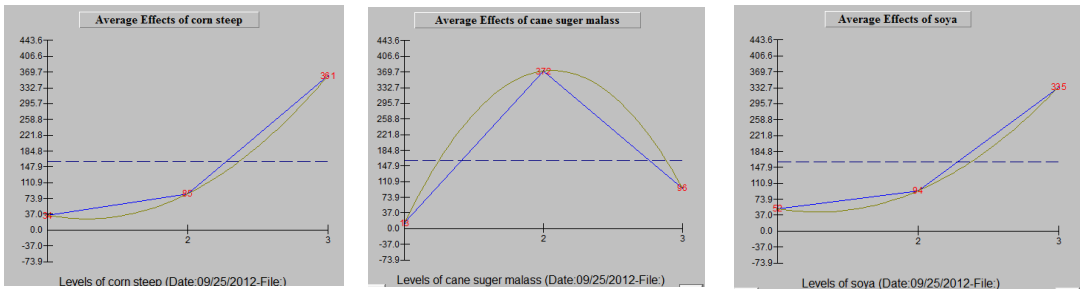
نتایج تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Qualitek–4

تاثیر غلظت شربت ذرت، پودر ماهی و تفاله سویا در تلفیق سه‌تایی آن‌ها روی میزان واحد کلنی‌ساز Bt (CFU) در شکل ۳ آمده است. بر اساس پیش‌بینی نرم‌افزار Qualitek–4 و بر اساس تاثیر هر ماده و درصد ترکیب هر کدام از آن‌ها (تلفیق سه‌تایی تیمارهای ۱–۹) برای بهینه‌سازی شرایط تولید Bt، میزان واحد کلنی‌ساز CFU/ml ۳/۹۸×۱۰^۱۶ حاصل شد. تاثیر غلظت شربت ذرت، ملاس نیشکر، تفاله سویا در تلفیق سه‌تایی آن‌ها روی میزان واحد کلنی ساز Bt (CFU/ml) در شکل ۴ آمده است.



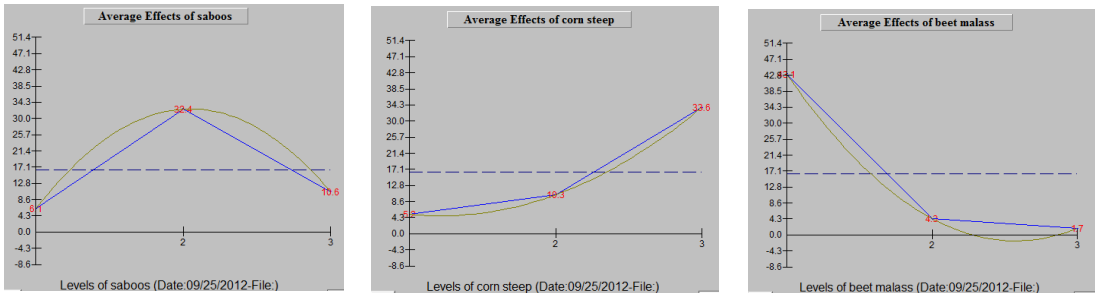
شکل ۳– غلظت بهینه شربت ذرت، پودر ماهی و تفاله سویا در تلفیق سه تایی آن‌ها روی میزان واحد کلنی ساز Bt (CFU/ml)

Fig. 3. The optimal concentration of corn steep, fish powder and soybean powder in their triple combination on the amount of colony–forming unit (CFU/ml) of Bt



شکل ۴– غلظت بهینه شربت ذرت، ملاس نیشکر، تفاله سویا در تلفیق سه‌تایی آن‌ها روی میزان واحد کلنی‌ساز Bt (CFU/ml)

Fig. 4. Optimum concentration of corn steep, sugar cane molasses, soybean powder in their three combinations on the amount of colony–forming unit (CFU/ml) of Bt.



شکل ۵– غلظت بهینه ملاس چغندرقند، شربت ذرت، سبوس گندم در تلفیق سه‌تایی آن‌ها روی میزان واحد کلنی‌ساز (CFU/ml) Bt

Fig. 5.The optimal concentration of sugar beet molasses, corn steep, and wheat bran in their triple combination on the amount of colony–forming unit (CFU/ml) Bt.

ارزیابی دلتا اندوتوکسین در محیط کشت‌های تلفیقی سه‌تایی

نتایج نشان داد، Bt حاصل از بسترهای سه‌تایی سویا، شربت ذرت و پودرماهی؛ شربت ذرت، سویا و ملاس

نیشکر؛ شربت ذرت، سبوس گندم و ملاس چغندر قند روی لارو سن سه برگخوار مصری *Spodoptera littoralis* صد درصد تلفات داده است.

جدول ۴– نتایج زیست‌سنجی Bt تولیدی در برترین محیط کشت‌های تلفیقی سه‌تایی روی لارو سن سوم برگخوار مصری *Spodoptera littoralis*

Table 4. Bioassay results of Bt produced in the best combined three–way cultures on the third instar larvae of the *Spodoptera littoralis.*

Number	Treatments	CFU/ml	Mortality%
1	4	9.29×10^{16}	100%
2	18	9.89×10^{16}	100%
3	5	3.98×10^{16}	100%
4	Control	0	0

بحث

همانطور که اشاره شد در این تحقیق با استفاده از محصولات فرعی صنایع کشاورزی، سویه بومی Bt 6R در شرایط آزمایشگاهی تولید شد، و محیط بهینه آن با استفاده از روش تاگوچی بدست آمد. طبق بررسی‌های انجام شده تا کنون بیشتر محیط‌هایی که در حال حاضر برای تولید Bt به‌کار می‌روند حاوی محصولات طبیعی به‌عنوان منبع کربن، نیتروژن و املاح معدنی هستند. منابع نیتروژن به‌کار رفته در تولید Bt عبارتند از: پودر ماهی، آرد پنبه دانه، شربت ذرت، سویا، عصاره نیشکر و چغندر و انواع ملاس. محصولات جانبی ذرت، نشاسته و دکستروز نیز به‌عنوان منابع کربوهیدرات در محیط‌های کشت به‌کار می‌روند. به‌طور کلی محیطی که برای تولید اسپور و کریستال به‌کار می‌رود باید به‌گونه‌ای طراحی شود که تولید زیست توده 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 تحیق 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 تفاله سویا، پودر ماهی و سبوس گندم برای تامین بستر غذایی مناسب مورد نیاز Bt استفاده کرد.

به‌طور کلی بهینه‌سازی محیط‌های کشت در مقیاس صنعتی جهت تولید میکروارگانیسم‌ها از اهمیت فوق‌العاده ای برخوردار است طبق نتایج بدست آمده در این تحقیق، فراورده تولید شده از اثر مطلوب و پتانسیل قابل توجهی برخوردار است که پیشنهاد می‌شود از روش آزمایش فوق در شرایط نیمه‌صنعتی و در مقیاس بالاتر به منظور انجام آزمایشات تکمیلی برای دست‌یابی به دانش فنی هرچه بهتر در صنایع تولید حشره‌کش‌های بیولوژیک Bt استفاده شود.

Dang *et al*. (2009) موفق شدند یکی از سویه‌های Bt را در شرایط فرمنتاسیون ناپیوسته (Batch) و نیمه پیوسته (Fed–Batch) با استفاده از ضایعات مایع صنایع نشاسته به‌عنوان تنها منبع غذایی تولید کنند. آن‌ها موفق شدند در شرایط fed–Batch در دو زمان متناوب وارد سازی محیط کشت (زمان ۱۰ و ۲۰ ساعت از زمان شروع کشت) به حداکثر میزان تولید اسپور و کریستال برسند (۱۶۷۲ میلی گرم در لیتر) که این میزان سه برابر حالت Batch بود و نشان داد که در حالت Fed–Batch میزان تولید بسیار بالاتر است. جالب اینکه در شرایط ۳ بار وارد سازی محیط کشت در حالت Fed–Batch میزان تولید اسپور و کریستال بسیار کاهش نشان داد.

Foad *et al*. (2002) در تحقیقی موفق شدند با استفاد ه از روش فرمنتاسیون جامد (Solid state) تولید مناسب اسپور و کریستال یک سویه Bt را داشته باشند. در این کار آن‌ها شرایط مختلف فیزیولوژیک و محیطی موثر در شرایط فرمنتاسیون جامد را بر میزان رشد سویه و تولید اسپور و کریستال بررسی نمودند. آن‌ها مشخص نمودند که پودر تالک به عنوان یک عامل حامل در این نوع فرمنتاسیون بهترین تاثیر را دارد. علاوه براین به عنوان مواد مغذی بهترین

رشد را محیط کشت جامد حاوی ضایعات سویا نشان داد. بالاترین میزان رشد باکتری در شرایط ۴۰ درصد رطوبت مشاهده شده و با بالا رفتن میزان رطوبت، میزان تولید و رشد باکتری کاهش یافت. مرزبان (2012) Marzban گزارش کرده که در محیط نیمه جامد، سبوس گندم کارایی خوبی در تکثیر Bt داشته است. Saberi *et al*. (2014) نشان دادند که شرایط بهینه رشد برای سویه Bt 6R در دمای ۲۸ درجه سلسیوس، pH ۷/۵ و اکسیژن محلول ۸۰ درصد است. Saberi *et al*. (2020) در بررسی بهینه سازی محیط رشد *B. thuringiensis* v. *tenebrionis* دریافتند که در شرایط عملیاتی ۳۰ درجه سلسیوس و pH ۷ پس از ۷۲ ساعت حداکثر میزان CFU (spore/ ml $۸/۳۶\times۱۰^{۱۱}$) با غلظت ۰/۳ درصد جودوسر، ۰/۳ درصد سبوس گندم، یک درصد ملاس نیشکر و غلظت یک درصد شربت ذرت بدست آمد. Dastpak *et al*. (2021) گزارش کردند که درصد منابع کربن و ازت در رشد و نهایتا تولید اسپور و کریستال بسیار موثرند و سبوس گندم (منبع کربن) و شربت ذرت (منبع ازت) به عنوان دو منبع غذایی در دسترس و ارزان نقش مهمی در تولید اسپور و کریستال Bt 6R دارند.

Gharibi *et al*. (2006) با استفاده از محیط کشت اقتصادی حاوی نشاسته و آرد سویا و نمک دریا موفق شدند در شرایط فرمانتور با اکسیژن دهی مناسب و بهینه‌سازی شرایط رشدی تولید اسپور و کریستال را در سویه های مورد مطالعه خود بالا ببرند.

از آنجا که برای تولید Bt معمولا شرایط هوازی در محیط مایع با سیستم هوادهی و همزنی خوب نقش کلیدی دارند، در آن مطالعه میزان اکسیژن مناسب قابل حل در منابع مورد استفاده خود شامل نشاسته، آرد سویا و نمک دریا را در فرمانتور بررسی کردند. در تحقیق مذکور مشاهده شد که وجود اکسیژن کافی حل شده در محیط مخصوصا در ۶ ساعت اول فرمنتاسیون برای شروع ساخت و ساز کریستال‌های پروتئینی بسیار مهم می‌باشد. همچنین در آن تحقیق، نشان دادند که وجود حدود ۶۰٪ اکسیژن حل شده در طول فرایند بالاترین میزان تولید زیست توده را باعث می‌شود بدون اینکه میزان تولید کریستال کاهش یابد. در حالیکه در بیش از ۸۰٪، تولید زیست توده بالا می‌رود ولی میزان تولید توکسین (کریستال) کاهش می‌یابد. Zuoari (1999) در مطالعه ای که در سطح فرمانتور انجام دادند مشاهده نمودند که برای تولید *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* با استفاده از محیط‌های کشت اقتصادی مبتنی بر ضایعات کشاورزی مثل هوادهی کافی نقش بسیار مهمی را در تولید اسپور و کریستال دارد. در این مطالعه مشخص گردید که وجود منبع کربنی مناسب و هوادهی مناسب می تواند باعث کاهش میزان ممانعت کاتابولیتی کربن (carbon catabolite repression) در فرایند سنتز کریستال‌های پروتئینی شود.

اهمیت بهینه‌سازی فرایند تولید آفت‌کش‌های بیولوژیکی از این جهت است که فراوردهٔ تولیدی از نظر اقتصادی به صرفه بوده و هزینه‌های تولید را کاهش دهد. لذا دستیابی به محیط کشت بهینه برای تولید باکتری بی‌تی در این تحقیق می‌تواند راه را برای مطالعات تکمیلی از جمله بهینه‌سازی محیط کشت در فرمانتورهای نیمه‌صنعتی و در نهایت کاربردی نمودن آن در مقیاس صنعتی هموار کند. در پایان می‌توان گفت از آن‌جا که فراورده‌های بیولوژیک اثر زیانباری روی محیط زیست و سلامت انسان ندارند، می‌توانند در برنامه‌های کنترل آفات گیاهی، بهداشتی و منابع طبیعی استفاده شوند و جایگزین مناسبی برای آفت‌کش‌های شیمیایی هستند.

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.

Berbert–Molina, M.A., Prata, A.M.R., Pesssanha, L.G. & Silveria, M.M. 2008. Kinetics of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* growth on high glucose concentrations. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 35(11): 1397–1404.

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., 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.

Dastpak, V., Marzban, R., Imani, S. & Kalantari, M. 2021: The effect of some food industrial wastes and byproducts on the development and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis*. Biocontrol in Plant Protection, 9(1): 1–12.

Dulmage, H.T. 1971. Production of delta–endotoxin by eighteen isolates of *Bacillus thuringiensis* serotype 3 in fermentation media. Journal Invertebrate. Pathology, 18: 353–358.

Fernando, H., Valicente, F.H. & Andre, H.C. 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.

FODA, M.S., ABU–SHADY, M.R., PRIEST, F.G. & EL–BENDARY, M.A. 2000. Physiological studies on pathogenic strains of *Bacillus sphaericus*. In: 10th Microbial conference, 12–14 November 2000, Cairo, Egypt.

Foda, M.S., Ismail, I.M., K. Moharam, M.E. & Sadek, K.H. H.A. 2002. A novel approach for production of *Bacillus thuringiensis* by solid state fermentation. Egypt. Microbiol, 37: 135–156.

Gharibi, D., Zouari, N., Trabelsi, H. & Jaoua, S. 2007. Improvement of *Bacillus thuringiensis* delta–endotoxin production by overcome of carbon catabolite repression through adequate control of aeration. Enzyme. Microbiology Technology, 40: 614–622.

Jayaraman, R. 2003. Influence of Carbon and Nitrogen Sources on the Growth and Sporlution of *Bacillus thuringiensis* var *Galleriae* for Biopesticide production. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly, 17(3): 225–231.

Khanh Dang Vu, R.D., Tyagi, J.R., Valéro, R.Y. & Surampalli, J. 2009. Impact of different pH control agents on biopesticidal activity of *Bacillus thuringiensis* during the fermentation of starch industry wastewater. Bioprocess and Biosystems Engineering, 4: 511–519.

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. 2012. Investigation on the suitable isolate and medium for production of *Bacillus thuringiensis*. Journal of Biopesticids, 5: 144–147.

Obeta, J.A.N. & Okafor, N. 1984 Medium for the production of primary powder of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis. Applied Environmental Microbiology, 47: 863–867.

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, P: 349–358.

Saberi, F., Marzban, R., Ardjmand, M., Pajoum Shariati, F. & Tavakoli, O. 2023: Optimization of the Culture Medium, Fermentation Process and Effectiveness of Biopesticide from an Iranian *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* (BN2). Journal of Agricultural Science and Technology, 25(2): 469–484.

Saberi, F., Marzban, R. & Ardjmand, M. 2014: Optimization of Bacillus thuringiensis production process in lab. fermenter. Biological Control of Pests and Plant Diseases, 3(2): 165–172.

Saberi, F., Marzban, R., Ardjmand, M., Pajoum Shariati, F. & Tavakoli, O. 2020: Optimization of Culture Media to Enhance the Ability of Local *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 19(7): 468–475.

Saberi, F., Marzban, R., Ardjmand, M., Pajoum Shariati, F. & Tavakoli, O. 2020: Influence of carbon and nitrogen sources on the growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* var. t*enebrionis*. Biocontrol in Plant Protection, 7(2): 49–62.

Soccoll, C.R., Teresinha, E.V.P., Fendrich, R.C., Prochmannl, F.A., Radijiskumar, M., Blaskowski, M.M., de Almeidamelo, A.L., Barros, C.J. & Soccol, V.T. 2009. Development of a low–cost bioprocess for endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* intended for biological control of Aedes aegypti. Brazilian archives of biology and technology, 52: 121–130.

Tianjian, X. 1995. Industrial production of Bt production and application. Wuhan, China.

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.

Yezza, A. & Tyagi, R.D. 2005. Production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides in barch and fed batch cultures using wastewater sludge as a raw material. Journal of chemical technology and biotechnology, 80(5): 502–510.

Zuoari, N. & Jaoua, S. 1999. Production and characterization of metalloproteases synthesized concomitantly with d–endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain grown on gruel–based media. Enzyme Microbiology Technology, 25: 364–371.

Optimizing the production of biological pesticide *Bacillus thuringiensis* by Taguchi method

Vahab Dastpak [1], Rasoul Marzban [2], Sohrab Imani [3], Maryam Kalantari [4]

1., 3. Ph.D., Assistant Professor, Department of Plant Protection, Islamic 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.amarzban@areeo.ac.ir

Received: May., 03, 2023 10(1) 143–153 Accepted: Jul., 12, 2023

Abstract

After obtaining the superior Bt strains in terms of pathogenicity and host range, it is of particular importance to provide low–cost culture media for the production of spores and crystals in laboratory and mass production in industrial–scale bioreactors. In this research, an attempt has been made to provide a suitable and optimal food substrate for the growth of Bt by using cheap inputs such as waste and by–products of agricultural industries, and to evaluate the production rate of this bacterium using these materials. In this research, the waste and by–products of agricultural industries were investigated as culture medium in the form of extract and in liquid form for the propagation of native Bt strain (6R). The culture media were evaluated as a combination of two and three media with different percentages and the optimization process was done with Taguchi method and using Qualitek–4 software. The results of the experiments and data analysis showed that in the culture medium with two substance, and wheat bran combined with corn steep with 3.44×10^{10} CFU/ml, and wheat bran combined with fish powder with 5.5×10^{9} CFU/ml the culture medium with tree substance including soy, corn steep, fish meal 3.98×10^{16} CFU/ml, soy, corn steep, sugar cane molasses 9.89×10^{16} CFU/ml and wheat bran, corn steep, sugar beet molasses 9.29×10^{16} CFU/ml were the best culture media that had the highest production of Bt in laboratory conditions. The results showed that Bt obtained from culture medium with two substance of wheat bran and fish powder, wheat bran and corn steep and culture medium with tree substance of soybean, corn steep and fish meal; corn steep, soybean and sugarcane molasses; corn steep, wheat bran and sugar beet molasses caused 100% mortality on the 3 instar larvae of *Spodoptera littoralis*.

Keywords: *optimizing, culture media, Bt, Spodoptera littoralis*