Archive of SID.ir

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 گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

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

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۰۲ ۹(۱) ۱۲-۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۲۵

چکیده

امروزه دانش مدیریت آفات کشاورزی و بهداشتی در قالب کنترل بیولوژیک درحال گسترش است، و در این میان میکروارگانیسم‌های 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، ملاس‌چغندرقند 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 سبوس‌گندم، ملاس‌نیشکر 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 ۰/۹۰۳، ۰/۷۸۰۴ 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 ($۲/۸ \times ۱۰^{۱۲}$ CFU/ml) بیشترین کارایی را داشت. در محیط‌های کشت دوتایی ملاس چغندر(منبع کربن) همراه با کورن‌استیپ (منبع ازت) با $۴/۲۲ \times ۱۰^{۱۲}$ CFU/ml و سبوس‌گندم (منبع کربن) همراه با کورن‌استیپ با $۳/۴۴ \times ۱۰^{۱۲}$ 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: آفت کش بیولوژیک، تخمیر، *Bacillus thuringiensis*، ضایعات صنایع غذایی

مقدمه

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

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

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 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 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 براین محیطی که برای تولید اسپور و کریستال به کار می‌رود باید به گونه ای 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 زمینهٔ 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 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 به‌کار 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 فراورده 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. به‌طوری که دولمیج 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 روغن‌کشی 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

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

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 چغندرقند 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 نیتروژن توانست Bt را تولید کند.

پودر سویا و ملاس چغندرقند 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 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 محیط‌کشت، اکسیژن و دما می‌باشد. باکتری‌ها اکثراً در pH بین ۸–۶ قادر به رشد هستند. اصولا باکتری‌ها در 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. اصولا باکتری‌ها به غلظت یون هیدروژن در محیط‌کشت حساس هستند و در اثر تغییرات زیاد غلظت یون هیدروژن شکل آنها تغییر می‌کند (دناتوره 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 اپتیمم 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 محیط‌کشت 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 می نماید. معمولا 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 چغندرقند، ملاس و باگاس نیشکر، کورن‌استیپ (عصاره خیسانده ذرت)، شیرهٔ 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 گیاه‌پزشکی کشور انتخاب شد (Marzban & Salehi,

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

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)، ملاس‌چغندرقند (کارخانه قند کهریزک)، کورن‌استیپ (شرکت گلوکوزان قزوین)، پودر ذرت خشک‌شده و شیره‌ی خرما (تهیه شده از شهرستان دزفول) بود. بررسی‌های انجام شده در این محیط‌کشت‌ها برای تولید Bt به‌صورت تاثیر 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

موادی که به‌عنوان محیط‌کشت 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، ملاس‌چغندرقند، شیره‌خرما، ملاس‌نیشکر) به‌میزان ۵ درصد با آب‌مقطر مخلوط شدند. همچنین مواد جامد (سبوس‌گندم، پودرسویا، پودرماهی، پودرذرت، باگاس‌نیشکر) نیز به‌میزان ۵ درصد با آب‌مقطر مخلوط شده و از آن‌ها عصاره‌گیری به‌عمل آمد. برای این‌منظور 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 فوق الذکر هر کدام جداگانه، در حجم ۴۰ml 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 خشک‌شده به‌وسیله ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم وزن و بر حسب درصد ماده خشک محاسبه و ثبت گردید. همچنین وزن خشک تیمار شاهد (NB) نیز محاسبه شد.

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

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

آماده‌سازی محیط‌های کشت

تمام مواد مورد استفاده برحسب درصد در فاز مایع، محلول در آب و یا به‌صورت سوسپانسیون مورد بهره‌برداری قرار گرفتند. به‌طوری که سبوس گندم، تفاله‌سویا، باگاس، پودرماهی و پودرذرت، مواد جامدی بودند که از آن‌ها با غلظت خاص عصاره تهیه شد، بدین‌صورت که مواد مذکور بعد از توزین به‌میزان ۵ درصد، در ارلن‌های یک لیتری با آب مخلوط شده سپس به‌مدت 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، ملاس‌چغندر، شیره‌خرما و ملاس‌نیشکر که خود به‌صورت شیره غلیظ بودند به میزان ۵ درصد وزنی (۵ گرم عصاره +۹۵ میلی‌لیتر 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 محیط‌کشت Nutrient Agar برداشته و در محیط Nutrient Broth به میزان ۲۰۰ میلی‌لیتر، در یک ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری 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 محیط‌کشت اصلی

به‌منظور تلقیح باکتری از محیط‌کشت NB به محیط‌های کشت اصلی بوسیله سمپلر به‌میزان ۵ درصد به حجم ۱۵۰ میلی‌لیتر محیط‌های اصلی اضافه گردید. این کار تحت شرایط استریل و زیر هود بیولوژیک انجام شد. پس از آن درب ارلن‌ها را به‌وسیله پنبه استریل محکم و روی شیکر، با دور ۱۹۰ rpm با دمای ۳۰ درجه سلسیوس به‌مدت 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. بدین‌منظور در زمان‌های معین به‌ترتیب ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از انجام تخمیر ارلن‌ها را به هود بیولوژیک انتقال داده و به‌وسیله سمپلر ۱ ml از محیط‌های کشت برداشته و در میکروتیوب‌های استریل قرار داده شد. سپس برای ایجاد شک حرارتی میکروتیوب‌ها در بن‌ماری، به‌مدت ۱۵دقیقه در دمای ۸۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند. سپس برای تهیه سری رقت یا serial dilution به‌ترتیب زیر عمل شد.

برای رقیق‌سازی هر یک از محیط‌های کشت حاوی باکتری از آب‌مقطر استریل و Tween 80 (به نسبت۰/۰۴درصد) استفاده شد. بدین‌منظور ۱۰ لوله آزمایش را که از قبل در آون استریل شده بودند، را آماده کرده و بعد از شماره‌گذاری داخل هر کدام ۹ ml از محلول آب‌مقطر استریل و Tween80 ریخته شد. سپس ۱ ml محیط‌کشت حاوی Bt هر میکروتیوب را به‌وسیله سمپلر برداشته و درون لوله‌ی اول ریخته شد و حجم آن به ۱۰ml 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 به‌وسیله سمپلر مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از لوله هفتم را برداشته و روی سطح محیط نوترینت آگار ریخته و بوسیله لوله‌های استریل پیپت پاستور به‌طور 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 محاسبهٔ CFU، میانگین تعداد کلنی‌های شمارش شده در ۳ تکرار مربوط به هر رقت، در عکس ضریب رقت لولهٔ مربوط به آن ضرب شد. در این‌صورت مقدار اسپور در هر میلی‌لیتر در هر کدام از محیط‌های کشت و تیمار شاهد NB به‌صورت جداگانه بر حسب CFU/ml محاسبه و نتایج ثبت شد. دو آزمون در قالب طرح کاملا تصادفی با ۹ بستر کشت (سبوس‌گندم،

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

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 تاثیر قرار می‌دهد. به این‌ترتیب 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، تاثیر 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 تغیرات 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 میلی لیتر از هر ارلن برداشته و در دستگاه سانتریفیوژ مدل Vision با دور ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. سپس مایع بالایی (سوپرناتانت) دور ریخته شد و رسوب آن در دمای ۱± ۴۵ 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 در۱۰۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت محاسبه گردید. آزمون مقدار وزن خشک توده زنده Bt در قالب طرح کاملا تصادفی در محیط‌های کشت سبوس‌گندم، 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 میلی لیتر 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 (دلتااندوتوکسین)

به منظور ارزیابی تولید پروتئین دلتا اندوتوکسین یا کریستال های 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

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

موردآزمون، به‌صورت 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.

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 دلتااندوتوکسین 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.

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

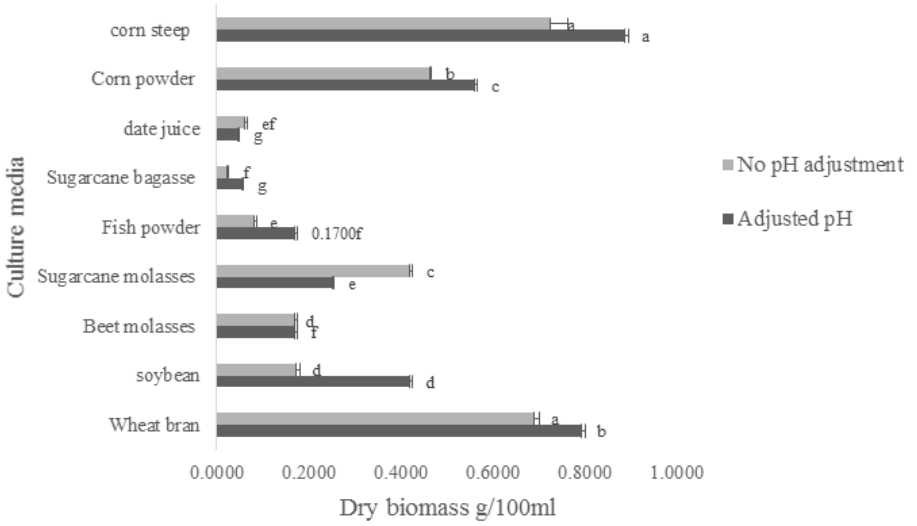
	CFU ± SE					
Culture media	Adjusted pH			No pH adjustment		
	24 hours	48 hours	72 hours	24 hours	48 hours	72 hours
Wheat bran	662.33 ± 4.5 c	1300.67± 1.8 d	79006± 3.1 b	51.1± 1.3 c	104.7± 2.9 e	204.7± 2.9 e
Soybean	589.33 ± 2d	1120.67± 1.2 e	22402.7± 3.2 c	3.9± 0.3 f	20.3± 0.9 h	104.3± 2.7 e
Beet molasses	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

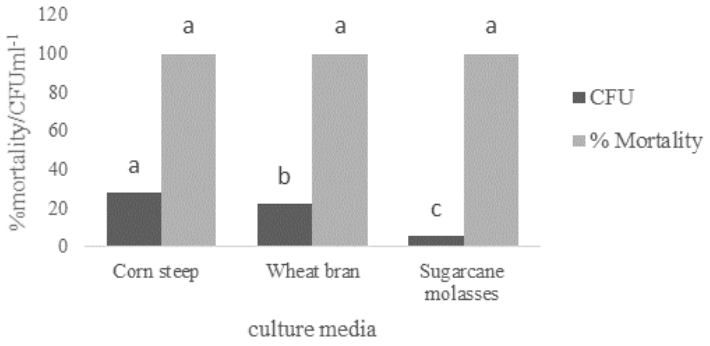
Archive of SID.ir

Archive of SID.ir



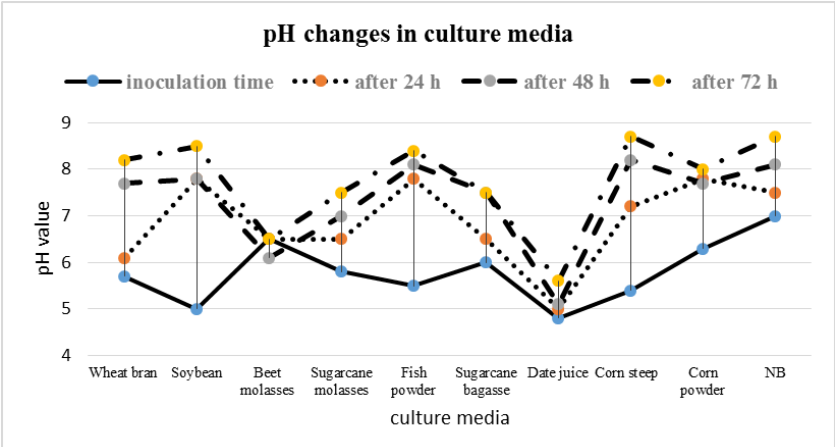
شکل ۱– وزن خشک توده زنده Bt در محیط کشت

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

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

محیط‌های کشت دوتایی ملاس‌چغندر (منبع کربن) همراه با کورن‌استیپ (منبع ازت) با CFU/ml ۱۰۱۲ ×۴/۲۲ و سبوس‌گندم (منبع کربن) همراه با کورن‌استیپ (منبع ازت) با CFU/ml ۱۰۱۲ ×۳/۴۴ دو بستر کشت تلفات صددرصدی روی لارو سن 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 نهایتا" تولید اسپور و کریستال بسیار موثرند. بیشترین میزان تولید اسپور و کریستال در pH اپتیمم رشد بدست آمد و علاوه براین 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 ملاس‌نیشکر تنظیم نشدن pH با افزایش میزان اسپور زنده همراه است، ممکن است دلیل رشد بیشتر باکتری در این محیط‌کشت به‌علت پایین بودن pH در آن باشد، در این‌صورت مواد مغذی موجود در ملاس‌نیشکر که برای رشد باکتری مورد نیاز است در pH پایین در دسترس باکتری قرار گیرد. ملاس‌چغندرقند وشیره‌خرما بعنوان بستر رشد Bt کمترین تغییرات pH را در ۷۲ ساعت نشان دادند. در شیره‌خرما در زمان تلقیح، pH محیط کمتر از پنج و در فاز لگاریتمی باکتری به شش نرسیده است. در ملاس‌چغندر قند pH محیط در زمان تلقیح شش و نیم و ۴۸ ساعت بعد از تلقیح کاهش و به شش رسیده است. در پودرسویا 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.

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 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 پنبه‌دانه، کورن‌استیپ، 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 به گونه‌ای طراحی شود که تولید توده زنده و اسپورزایی را به نحو احسن تضمین نماید. طراحی آزمایشات باید به‌گونه‌ای 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 ملاس‌چغندرقند، و ملاس‌نیشکر به‌عنوان منابع کربن، شربت ذرت به‌عنوان منبع ازت و دیگر مواد مانند پودر تفاله‌سویا، پودر ماهی و سبوس‌گندم برای تامین بستر غذایی مورد نیاز Bt و بهینه سازی شرایط تولید و تخمیر آفت‌کش بیولوژیک بر پایه Bt در شرایط آزمایشگاهی تولید نمود. بررسی مطالعات نشان می‌دهد که بطورکلی در مراحل اولیه بسیاری از فرایندهای تخمیری، قند گلوکز و عصاره مخمر به‌ترتیب به‌عنوان منبع تامین کربن و نیتروژن مورد استفاده قرار گرفته‌اند ولی از آنجایی که هدف تولید انبوه براساس استفاده از ترکیبات ارزان‌قیمت می باشد، 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

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

آن را با منابع ارزانتر 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 صنایع‌غذایی نسبت به محیط‌کشت‌های استاندارد سبب افزایش کارایی بیشتر Bt می‌شوند که با نتایج حاضر مطابقت دارد.

در تحقیقی که توسط والیسن و موراثو 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). پپتون، پودرسویا و پروتئین سویا نیز به‌عنوان منابع ازت در تولید انبوه این باکتری مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند. ترکیب Tapoica و پپتون دارای اثر معنی‌داری در افزایش تولید اسپور و کریستال بوده اند (Rao, Tsay *et al*., 2007). با توجه به‌اینکه در کشور ما سویا درسطح وسیع کشت نشده و وارداتی است دسترسی به آن مشکل بوده و فرآورده ها و ضایعات ذرت منابع مناسب‌تری به نظر می‌رسند.

علاوه بر این مشخص شد که درصد منابع کربن و ازت نیز در رشد و نهایتا" تولید اسپور و کریستال بسیار موثرند و 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 برمیزان رشد باکتری مورد ارزیابی قرار گرفتند. ملاس‌ها و سبوس‌گندم به‌عنوان منبع کربنی اقتصادی بودند که درحضور 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 فراورده و در نهایت کاربردی نمودن آن در مقیاس نیمه‌صنعتی و صنعتی هموار کند. در پایان می‌توان گفت از آنجا که فراورده‌های بیولوژیک اثر نامطلوبی روی محیط‌زیست و انسان ندارند، می‌توان از آنها در برنامه‌های کنترل بیولوژیک و مدیریت تلفیقی آفات (IPM) کشاورزی استفاده کرد.

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 fermentation. 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 Sporlution 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.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

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 Biopesticids, 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. Singhania, 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. &. Moourao, A.H. 2008. Use of by–products rich in carbon and nitrogen as a nutrient source to produce *Bacillus thuringiensis* (Berliner)–based biopesticide. Notropical 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.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

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

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

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

Archive of SID.ir