Archive of SID

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

بهینه سازی محیط کشت اقتصادی و فرمنتاسیون برای تولید اسپور و کریستال‌های یک سویه بومی *Bacillus thuringiensis* موثر بر آفات پروانه‌ای

غلامرضا صالحی جوزانی*[1]، محمدفتی مرادعلی[2]، سعید عباسعلیزاده[2]

[1] دانشیار بخش تحقیقات بیوتکنولوژی میکروبی و ایمنی زیستی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII).
[2] کارشناسان ارشد بخش تحقیقات بیوتکنولوژی میکروبی و ایمنی زیستی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۱٤، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۹/۱۵

چکیده

هدف از تحقیق حاضر، بهینه سازی محیط کشت اقتصادی و فرایند فرمنتاسیون برای یک سویه بومی باکتری *Bacillus thuringiensis* (سویه YD5) موثر بر آفات پروانه‌ای بود. در ابتدا pH و دمای بهینه رشد سویه در شرایط ارلن مورد بررسی قرار گرفت که نتایج نشان داد pH بهینه آن ۷ و دمای بهینه برای رشد آن ۳۰ درجه سلسیوس می باشد. بمنظور بهینه‌سازی محیط کشت از پسماندهای ارزان قیمت کشاورزی شامل ملاس (ساکارز)، پرمیت شیر (لاکتوز) و پسماند نشاسته (پلی‌ساکارید) به عنوان منبع کربن، آب استیپ (خیسانده) ذرت به عنوان منبع ازت، و آب دریا به عنوان منبع نمک‌های معدنی استفاده شد. میزان رشد و تولید اسپور و کریستال (دلتا اندوتوکسین) سویه در محیط های حاوی مواد اشاره شده در شرایط ارلن مورد ارزیابی قرار گرفت. بالاترین میزان رشد و تولید اسپور و کریستال زمانی بدست آمد که از ترکیب نشاسته هیدرولیز شده (۳ درصد)، آب استیپ ذرت (۳ درصد) و نمک دریا با غلظت ۰/۰۰۳ درصد استفاده شد. در ادامه تاثیر فاکتورهای محیطی از قبیل pH، میزان تلقیح اولیه، غلظت اکسیژن بر سینتیک رشد و تولید اسپور و کریستال سویه در شرایط فرمانتور غیر پیوسته آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان تلقیح اولیه ۲ درصد و غلظت اکسیژن اشباع ۹۰٪ موجب تولید بالاترین میزان اسپور و اندوتوکسین شدند. نهایتاً در نتیجه فرایندهای بهینه شده در این تحقیق میزان اسپور و کریستال نهایی تولید شده برابر $۵/۵ \times ۱۰^{۹}$ اسپور (CFU/ml) و ۷٤۰ میلی‌گرم پروتئین در میلی‌لیتر بود.

واژه‌های کلیدی: *محیط کشت اقتصادی، بهینه سازی رشد، آفات پروانه‌ای، فرمانتور، Bacillus thuringiensis.*

* نویسنده مسئول: غلامرضا صالحی جوزانی تلفن: ۰۲٦۳۲۷۰۱۰۳۸ Email: gsalehi@abrii.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

کاربرد سموم شیمیایی برای کنترل آفات کشاورزی، موجب خسارات جبران ناپذیری بر سلامت انسان، سایر موجودات زنده و محیط زیست می شود. در همین راستا طی دو ده اخیر استفاده از عوامل میکروبی کنترل کننده آفات که زیان های کمتری داشته و دامنه اثر محدود و اختصاصی‌تری بر روی حشرات هدف دارند، بسیار مورد توجه واقع شده اند. از میان عوامل کنترل کننده میکروبی، باکتری *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) از دهه ۱۹۲۰، به علت تنوع گونه ای زیاد و دامنه اثر اختصاصی تر بر آفات مختلف و همچنین ایمنی زیستی بالا جایگاه ویژه ای پیدا کرد و همچنان ۹۰٪ سموم بیولوژیک مورد کاربرد در دنیا را شامل می شود (Schnepf *et al*., 1998; Salehi Jouzani *et al*., 2008 a, b). این باکتری در طول مرحله‌ی اسپورزایی، پروتئین های کریستالی حاوی دلتا اندوتوکسین های حشره کش تولید می کنند. پروتئین‌های کریستالی سویه‌های مختلف این باکتری به شکل اختصاصی تنها بر گروه های خاصی از حشرات موثر می‌باشند و بطور معمول هر کدام از سویه های *Bt* بر روی یک راسته از حشرات موثر می-باشد (Seifinejad *et al*., 2007).

پس از دست یابی به بهترین سویه‌های باکتری *Bt* با قدرت کشندگی بالا و همچنین دامنه میزبانی مناسب، تلاش برای تولید انبوه و مقرون به صرفه آنها صورت می گیرد. اکثر انواع سلول های میکروبی جهت فرایندهای بیوسنتز و تامین انرژی خود به آب، کربن، ازت مواد غیر آلی و فاکتورهای رشد نیازمندند و میزان دقیق و متعادل بین این مواد بسته به نوع ریزسازواره و شرایط فیزیولوژیک مورد نظر تنظیم می‌شود (Capalbo, 1995; Huang *et al*., 2007). تاکنون تحقیقات متعددی در خصوص بهینه‌سازی محیط های کشت بویژه منابع کربن و ازت و یافتن محیط‌های کشت ارزان قیمت و قابل دسترس بمنظور افزایش تولید اسپور و کریستال *Bt* انجام گرفته است. باید توجه نمود که بر حسب نوع سویه و مواد اولیه به کار رفته در هر محیط کشت نتایج متفاوتی حاصل می شود (Brar *et al*., 2005a,b; Ouhib *et al*., 2006; Rao *et al*., 2007; Amin *et al*., 2008; Berbert-Molina *et al*., 2008). تاکنون پساب‌های صنایع غذایی (مانند آب پنیر و پرمیت)، انواع پساب‌های شهری و خانگی و دکستروز به عنوان منابع کربن و ازت در محیط های کشت به کار برده شده اند. علاوه بر این رشد باکتری و تولید کریستال نیاز به برخی املاح معدنی با غلظت خاص دارد که می توان این نیاز را نیز از طریق منابع ارزان قیمت معدنی تامین نمود. در انتخاب نوع منبع کربن، ازت و نمک‌های معدنی در دسترس بودن، ارزان بودن و غنی بودن آن بسیار حائز اهمیت می‌باشد (Anderson and Jayaraman, 2003; Brar *et al*., 2005a,b; Berbert-Molina *et al*., 2008; Wu *et al*., 2014). همچنین باید توجه نمود که تعادل در میزان ترکیبات مورد استفاده به عنوان منابع کربن، ازت و مواد معدنی بر روی تولید اندوتوکسین و همچنین میزان تولید پروتئازها که

www.SID.ir

Archive of SID

اثر منفی بر میزان اندوتوکسین تولیدی دارند، دارد (Ennouri *et al*., 2013).

علی رغم اهمیت بسیار زیاد باکتری *Bt* به عنوان سم حشره کش زیستی، متاسفانه در کشور ما در زمینه فرایند اقتصادی تولید این باکتری تحقیقات بسیار اندکی صورت گرفته است (Keshavarzi *et al*., 2005; Shojaaedini *et al*., 2010). در تحقیقات قبلی ما، تعداد ۷۰ سویه بومی *Bt* که از مزارع مناطق مختلف کشور جداسازی شده بودند، از نظر ژنتیکی و خصوصیات حشره کشی مورد بررسی قرار گرفتند. شناسایی سویه ها بر اساس محتویات ژنی و نوع پروتئین‌های کریستالی موجود در آنها صورت پذیرفت. همچنین احتمال وجود ژن ها و توالی های جدید در سویه ها بررسی گردید. سپس بر اساس طبقه بندی ژنی و پروتئینی برای راسته پروانه‌ای، سخت بال پوش و دوبالان دسته بندی شدند و زیست سنجی بر علیه حشراتی از قبیل سوسک برگخوار نارون، کرم غوزه پنبه و نماتدها صورت پذیرفت. نهایتا از بین سویه های مورد مطالعه سه سویه موثر بر آفات به ترتیب پروانه ای، سخت بال پوش و نماتد ها انتخاب شدند (Salehi Jouzani *et al*., 2008 a,b; Nazarian *et al*., 2009; Seifinejad *et al*., 2008; Marzban and Salehi Jouzani, 2006).

یکی از سویه‌های منتخب، سویه YD5 بود که دارای محتویات ژنی متنوعی برای کنترل آفات پروانه‌ای بود. این سویه حاوی ژن‌هایی از قبیل *cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1C, cry1D, cry1F, cry1I, cry2Aa, vip3Aa* بود که اکثریت آنها بر آفات پروانه ای موثر می باشند. همچنین این سویه در آزمایشات زیست سنجی در سطح آزمایشگاه اثرات آفت کشی بسیار خوبی بر علیه کرم غوزه پنبه نشان داده بود (کشندگی ۱۰۰ درصد با LC50 حدود ۱٤۱ نانوگرم بر سانتی متر مربع برگ پنبه) (Seifinejad *et al*., 2008). در این راستا در تحقیق حاضر سعی شده است تا شرایط رشد یک سویه بومی موثر بر آفات پروانه-ای (YD5) بهینه سازی شود. بهینه سازی با استفاده از پسماندهای کشاورزی و غذایی ارزان قیمت و قابل دسترس در کشور و در سطح ارلن و فرمانتور انجام شد.

مواد و روشها

سویه مورد استفاده

در این تحقیق، سویه بومی *Bt* به نام YD5 که در تحقیقات قبلی تاثیر کشندگی آن بر آفات پروانه‌ای مشخص شده بود، استفاده شد (Salehi Jouzani *et al*., 2008a; Seifinejad *et al*., 2008). سویه مورد استفاده در محیط کشت تجاری LB حاوی ۲۰٪ گلیسرول در دمای ۸۰°C – نگهداری شد.

آزمون تعیین دما و اسیدیته بهینه سویه

دما و اسیدیته سویه نامبرده در محیط کشت مایع PGSM تعیین شد. در آزمون‌های مجزا میزان ۲۰۰ میلی لیتر از محیط کشت استریل شده در سه تکرار و تلقیح شده به میزان ۳ درصد حجمی با محیط کشت حاوی مایه تلقیح باکتری

www.SID.ir

Archive of SID

تهیه شد. در بررسی دمای اپتیمم سه دمای ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سلسیوس در نظر گرفته شد. همچنین در بررسی اسیدیته بهینه، اسیدیته محیط-ها در دامنه ٦/۵، ۷ و ۷/۵ تنظیم و مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان رشد باکتری در مدت ١٦ ساعت انکوباسیون بر روی شیکر ۱۵۰ دور در دقیقه ارزیابی شد.

بهینه سازی منبع کربن در بررسی کینتیک رشد سویه

از کربوهیدرات‌های گلوکز (به عنوان شاهد)، نشاسته (هیدرولیز شده بوسیله اسید کلریدریک در pH ۲ و دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه)، ملاس (بریکس ٦٦ و pH ٤/۹) و پرمیت شیر (لاکتوز حاصل از اولترافیلتراسیون شیر با بریکس ۱۵، لاکتوز ۱۵٪ و pH ٦/٤) به عنوان منبع کربن استفاده شد. آماده سازی محیط کشت با توجه به میزان قند موجود در پساب و رقیق سازی آن جهت تنظیم میزان درصد منبع کربن ۱/۵ درصد انجام شد. دیگر اجزای محیط کشت شامل عصاره مخمر به عنوان منبع ازت به میزان (۲٪) و املاح معدنی بودند.

محیط‌های کشت به میزان ۲۰۰ میلی لیتر درون ارلن مایر با ۳ تکرار تهیه شدند. pH هر محیط بر اساس اسیدیته مناسب سویه (۷) تنظیم شد و نمونه ها پس از استریل کردن در دمای ۱۲۱ درجه و خنک شدن در دمای محیط به میزان ۳ درصد از حجم کل محیط (٦ میلی لیتر) با پیش کشت (دارای شرایط یکسان تلقیح شده) و سپس در دمای۳۰ درجه سلسیوس درون شیکر انکوباتور با دور rpm ۲۰۰ کشت داده شدند. در طی کشت سینتیک رشد باکتری در فواصل زمانی معین با برداشت میزان ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت بررسی شد. جهت اندازه‌گیری میزان رشد از تعیین دانسیته نوری بوسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر در ٦۰۰ نانومتر استفاده شد. بررسی میزان اسپور و پروتئین کل نیز پس از ۷۲ ساعت انجام شد(Kraemer-Schafhalter and Moser, 1996).

بهینه سازی منبع ازت در بررسی کینتیک رشد سویه

از آب استیپ ذرت (Corn Steep Liquor) که یک منبع نیتروژنی بسیار ارزان و قابل دسترس می باشد به عنوان منبع ازت برای رشد سویه مورد مطالعه استفاده شد. بهترین منابع کربن شامل گلوکز و نشاسته هیدرولیز شده برای باکتری انتخاب شدند و آب استیپ ذرت به میزان ۱، ۲ و ۳ درصد حجمی به آنها اضافه شد. میزان قند نیز با توجه به نتایج بهینه سازی منبع کربن و میزان املاح بر اساس مقدار مصرف قبلی در لیتر در نظر گرفته شد. هر تیمار در ۳ تکرار انجام شد. بررسی کینتیک رشد باکتری طبق روش گفته شده در بالا انجام شد.

www.SID.ir

Archive of SID

استفاده از نمک دریا به عنوان منبع املاح جایگزین و بهینه سازی میزان آن

از نمک آب دریا (نمک مارین سالت، شرکت سرا (Sera)، هینزبرگ، آلمان) به عنوان جایگزین املاح جهت کشت سویه مورد نظر به عنوان منبع املاح برای رشد *Bt* استفاده شد. به این منظور ابتدا نمک آب دریا به میزان ۳۰ گرم در لیتر در آب حل گردید (مشابه آب دریا) و کارایی غلظت‌های مختلف آن شامل ۰/۳ ، ۰/۰۳ و ۰/۰۰۳ درصد جهت رشد و تولید کریستال با نمک‌هایی (محیط کشت GYS) که به طور معمول جهت کشت مورد استفاده قرار می گیرند مقایسه شد. میزان قند ۱/۵ درصد و میزان عصاره مخمر ۲ درصد در نظر گرفته شد و هر تیمار در ۳ تکرار انجام شد. بررسی کینتیک رشد باکتری طبق روش های قبلی انجام شد.

تعیین تعداد اسپور و میزان دلتا اندوتوکسین

جهت تعیین میزان اسپور از روش شمارش کلنی (CFU) استفاده شد. ابتدا نمونه ها در دمای ۸۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه حرارت داده شدند و پس تهیه رقت های مناسب بر روی محیط کشت LB در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت۱٦ ساعت کشت داده شدند. پس از پایان مدت انکوباسیون، تعداد کلنی تشکیل شده شمارش و میزان تولید اسپور با واحد CFU گزارش شد. جهت تعیین میزان تولید دلتا اندوتوکسین، ابتدا ۱ میلی لیتر از محیط کشت حاوی اسپور و کریستال به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریوفیوژ شد و پلت تشکیل شده دو بار با محلول نمک ۱ مولار و دو بار با آب مقطر شستشو داده شد. سپس پلت در ۱ میلی لیتر محلول ۵۰ میلی مولار هیدروکسید سدیم(pH= ۱۲/۵) سوسپانسیون شد و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس میزان پروتئین کل سوپرناتانت به روش برادفورد اندازه‌گیری شد (Zouari *et al.*, 2002).

بهینه سازی شرایط رشد در فرمانتور غیر پیوسته

ترکیب نشاسته هیدرولیز شده (۳ درصد)، آب استیپ ذرت (۳ درصد حجمی) و نمک دریا با غلظت ۰/۰۰۳ درصد برای رشد بهینه سویه در مراحل پیش کشت و کشت نهایی در فرمانتور مورد استفاده قرار گرفتند. برای هر فرمانتاسیون، ۱/۵ میلی لیتر از کشت فعال باکتری به ۱۵۰ میلی لیتر محیط کشت تلقیح اضافه گردید. جهت تلقیح هر فرمانتاسیون از محیط کشت یکسان با محیط کشت اصلی فرمانتاسیون استفاده شد و به مدت ۱۲ ساعت در گرمخانه همزن‌دار با دمای ۳۰ درجه سلسیوس و سرعت چرخشی ۲۰۰ دور بر دقیقه نگهداری شد. کلیه فرایندهای فرمانتاسیون انجام شده جهت بررسی تاثیر پارامترهای رشد به حجم ۱/۵ لیتر، درون فرمانتور ۲ لیتری (BIOFLO 2000, Newbruwnswick Scientific, USA) بصورت ناپیوسته (بچ)، هوازی و با ۳ بار تکرار انجام شدند. به این منظور، محیط کشت در دمای ۱۲۱°C به مدت ۱۵ دقیقه درون مخزن بیوراکتور تیمار حرارتی شدند. جهت تلقیح فرمانتاسیون

www.SID.ir

Archive of SID

۱۵، ۳۰ و ٤٥ میلی لیتر (درصدهای مختلف) از محیط کشت تلقیح به محیط درون فرمانتور (حجم نهایی ۱/۵ لیتر) اضافه شد. کلیه مراحل انتقال محیط کشت و تلقیح تحت شرایط استریل انجام شدند.

فرمانتاسیون برای سویه در دمای ۳۰ درجه سلسیوس، pH های مختلف (٦/٥، ۷ و ۷/۵) و میزان اکسیژن مختلف ۵۰، ۷۰ و ۹۰ درصد اشباع انجام شد. سرعت همزدن نیز بصورت اتوماتیک بر اساس میزان اکسیژن تعیین شده بوسیله کنترل کننده اکسیژن بیوراکتور متغیر بود. کنترل دما نیز بصورت خودکار انجام شد و جهت کنترل pH از اضافه کردن خودکار هیدروکسیدسدیم و اسید کلریدریک ۲ نرمال استریل بوسیله پمپ‌های پریستالتیک فرمانتور استفاده شد. همچنین کف تولیدی نیز از طریق افزودن اتوماتیک ضد کف سیلیکونی به محیط کشت کنترل شد و سرعت هوادهی نیز برابر VVM ۱ در نظر گرفته شد. نمونه برداری نیز به صورت استریل و در ساعت‌های ۲، ٤، ٦، ۸، ۱۲، ۱٦، ۲۰، ۲٤، ٤۸ و ۷۲ انجام شد. سینتیک رشد باکتری در هر نمونه برداری و بررسی میزان تولید اسپور و اندوتوکسین نیز به روش اشاره شده در مراحل قبل انجام شد.

بررسی میزان درصد تلقیح و اثر غلظت اکسیژن

جهت بررسی تاثیر میزان درصد تلقیح برسینتیک رشد، میزان تلقیح اولیه سویه ۱، ۲ و ۳ درصد حجمی محیط کشت فرمانتور در نظر گرفته شد و تاثیر این میزان بر روی سینتیک رشد سویه بررسی شد. جهت بررسی تاثیر غلظت اکسیژن محلول، غلظت اکسیژن محلول در سه سطح ۵۰، ۷۰ و ۹۰٪ اشباع بر رشد و تولید اسپور و کریستال مورد مطالعه قرار گرفت. به این منظور میزان هوای ورروردی به بیوراکتور در VVM ۱ ثابت در نظر گرفته شد و میزان غلظت اکسیژن بوسیله تغییر دور همزدن در محدوده ۱۰۰ الی ۷۰۰ دور بر دقیقه بصورت اتوماتیک تنظیم شد.

ارزیابی کینتیک رشد براساس Online OD در فرمانتور

جهت ارزیابی سینتیک رشد در فرمانتور از اندازه گیری پیوسته و همزمان OD660 محیط کشت بوسیله سنسور کدورت سنج مجهز به فیبر نوری (Turbidity transmitter, Trb 8300, Mettler-toledo) که درون محفظه بیوراکتور قرار داده شد، استفاده شد. داده‌های حاصل از ترانسمیتر از طریق نرم افزار دستگاه ثبت و جهت مشخص نمودن کینتیک رشد باکتری مورد استفاده قرار گرفتند. تجزیه تحلیل نتایج تحقیق از طریق مقایسه میانگین بر اساس آزمون دانکن (در سطح ۱٪ و ۵٪) صورت پذیرفت.

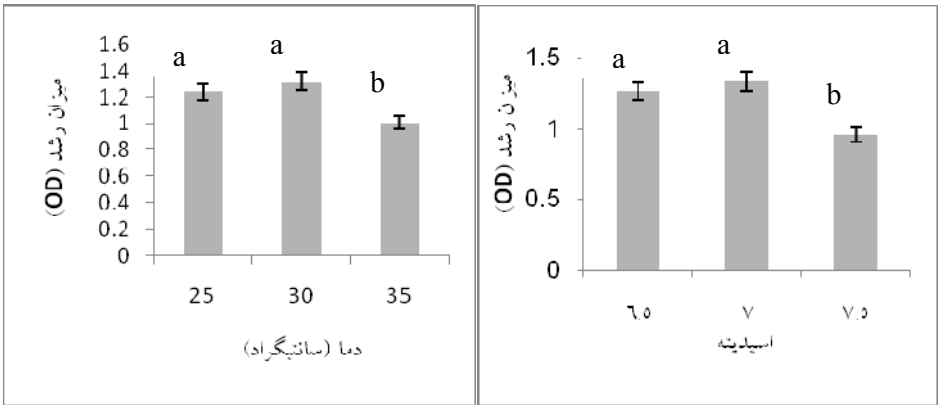
نتایج و بحث

بر اساس آزمایشات تعیین دما و اسیدیته بهینه رشد سویه YD5، دمای مطلوب رشد ۳۰ درجه سلسیوس (شکل ۱- الف) و اسیدیته مطلوب ۷

www.SID.ir

Archive of SID

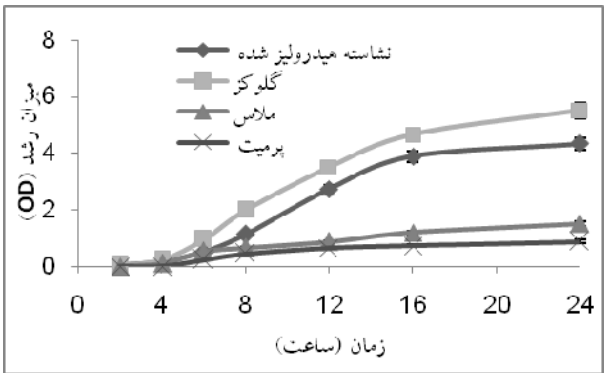
بود (شکل ۱- ب). شکل ۲ مقایسه سینتیک رشد سویه مورد مطالعه را در منابع کربنی مختلف و گلوکز به عنوان منبع شاهد (محیط بهینه GYS) نشان می‌دهد. همانطور که در شکل نشان داده شده است کارایی منابع مختلف در رشد سویه متفاوت بوده است.



ب الف

شکل ۱- میزان رشد سویه YD5 در دما (الف) و اسیدیته های (ب) مختلف.

Figure 1- The growth rate of the strain YD5 in different temperatures and pH.



شکل ۲- سینتیک رشد سویه YD5 در منابع کربنی مختلف.

Figure 2- The growth kinetics of the strain YD5 in different carbon sources.

نتایج آزمایشات نشان داد که سویه YD5 رشد خوبی را در منابع کربنی حاوی ساکارز (ملاس) و لاکتوز (پرمیت) ندارد ولی در محیط حاوی نشاسته هیدرولیز شده و گلوکز به خوبی رشد نمود. میزان تولید اسپور و اندوتوکسین سویه مورد آزمون در منابع کربنی مختلف نیز در شکل ۳ ارائه شده است. بیشترین میزان تولید اسپور و اندوتوکسین کاملاً با سینتیک رشد مطابق بوده و بهترین منبع کربنی اقتصادی برای سویه مذکور نشاسته هیدرولیز شده بوده است. نتایج

www.SID.ir

Archive of SID

بدست آمده نشان می دهند که سویه مذکور احتمالا قادر است از منابع مختلف کربنی شامل منوساکارید، دی ساکارید و پلی‌ساکارید جهت رشد و تکثیر استفاده نماید (Avignone-Rossa and Mignone, 1995). بررسی مطالعات مشابه نیز نشان می‌دهد که بطور کلی در مراحل اولیه بسیاری از آزمون های بهینه سازی قند گلوکز و عصاره مخمر به ترتیب به عنوان منابع تامین کربن و نیتروژن مورد استفاده قرار گرفته اند. ولی از آنجایی که هدف تولید انبوه بر اساس استفاده از ترکیبات ارزان قیمت تر می باشد، مطالعات گسترده‌ای جهت توسعه منابع جایگزین صورت گرفته است (Amin *et al*., 2008). به عنوان مثال در تحقیقی دو منبع کربن و ازت از طریق استفاده از نشاسته و سویا تامین شد. نتایج تحقیق مذکور نشان داد که نشاسته به میزان ۱۵ گرم در لیتر و سویا به مقدار ۳۰ گرم در لیتر به میزان قابل توجهی تولید سلول زنده، میزان اسپور و پروتئین کریستال را افزایش داد (Ghribi *et al*., 2007a,b).

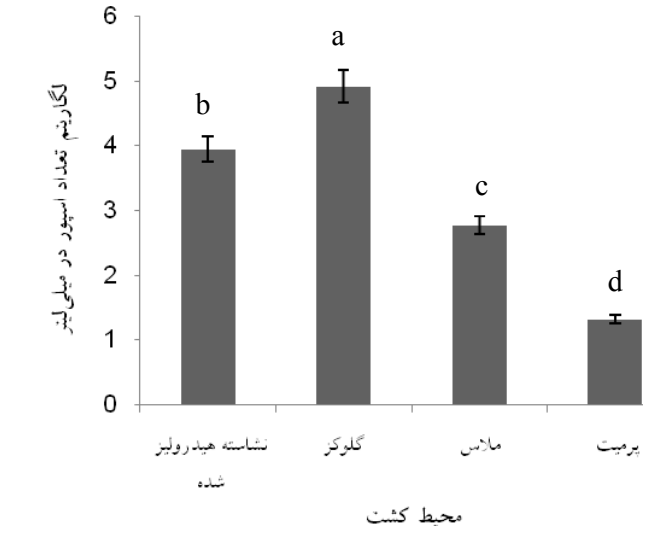
همانطور که در شکل ٤ مشاهده می شود، میزان تولید اندوتوکسین و اسپور در سویه مورد مطالعه تحت تاثیر غلظت منبع کربنی بوده و بهترین درصد نشاسته هیدرولیز شده برای سویه ۳ درصد شناخته شد. مطالعات دیگر نشان می‌دهند که این تاثیر با توجه به منابع کربنی مختلف متفاوت است. به عنوان مثال استفاده از غلظت‌های بالای گلوکز و پوره جو باعث ایجاد محدودیت‌ها در تولید این توکسین شده ولی هنگامیکه که از نشاسته به عنوان منبع کربنی استفاده شده است، غلظت‌های بالای آن محدودیتی در تولید دلتا اندوتوکسین ایجاد نکرده است (Ghribi et al., 2007a). همچنین منابع مختلف نشاسته، گلوکز، گلیسرول، لاکتوز، مالتوز، ساکارز، آرد ارزن، آرد نیشکر و کربوهیدرات‌های فاضلاب‌های شهری از دیگر منابع کربنی هستند که در بهینه سازی تولید *Bt*، اسپور و توکسین و نیز ارزیابی تولید آنزیم های مختلف آن در آزمون‌های مجزا مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Avignone-Rossa *et al*., 1992; Ouhib *et al*., 2006; Adjalle *et al*., 2007; Rao *et al*., 2007; Amin *et al*., 2008; Khodair *et al*., 2008).

به‌منظور بهینه سازی منبع ازت برای رشد سویه اشاره شده از آب استیپ ذرت استفاده گردید. با توجه به نتایج آزمون بهینه سازی منبع کربن، در این آزمون سینتیک رشد و کارایی ترکیب آب استیپ ذرت با بهترین منبع کربن (نشاسته هیدرولیز شده) با عصاره مخمر مقایسه گردید (شکل ۵). بررسی سینتیک رشد باکتری در محیط کشت حاوی آب استیپ ذرت نشان داد که سویه YD5 به خوبی قادر است که از آب استیپ ذرت به عنوان منبع نیتروژن استفاده کند و نتایج سینتیک رشد در محیط حاوی این منبع ازتی در تطابق با منبع عصاره مخمر می باشد. احتمالا علت این امر غنی بودن آب استیپ از منابع نیتروژنی مانند اسیدهای آمینه و پروتئین های محلول می‌باشد (Liggett and Koffler, 1948). میزان تولید اسپور و همچنین اندوتوکسین توسط سویه مورد مطالعه در محیط حاوی آب استیپ و

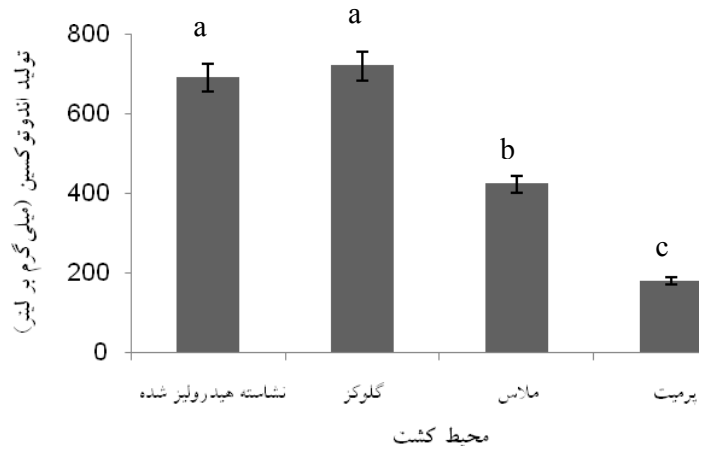
www.SID.ir

Archive of SID

عصاره مخمر نیز تفاوت معنی داری نشان نداد ($p\leq$ ۰/۰۵) و میزان آنها به ترتیب ۵×۱۰^{۹} اسپور در میلی لیتر و ۷۰۰ میلی گرم در لیتر اندوتوکسین بود (داده ها نشان داده نشده است). سالاما و همکاران نیز نتایج مشابهی را گزارش کرده‌اند و آب استیپ ذرت به عنوان منبع مناسب نیتروژن جهت کشت باکتری *Bt* معرفی شده است (Salama *et al*., 1983).



الف (A)



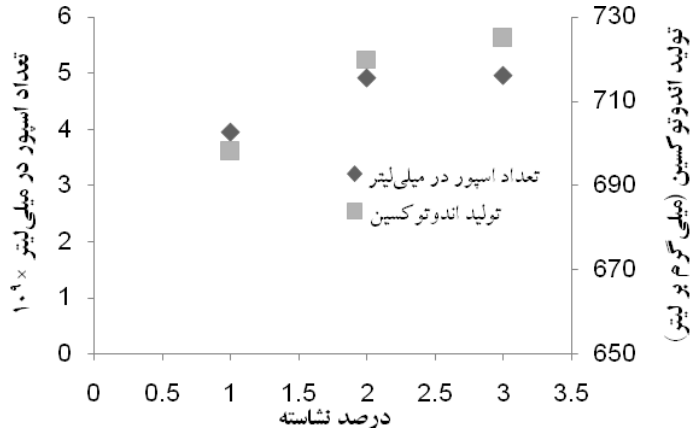
ب (B)

شکل ۳- میزان تولید اسپور (الف) و اندوتوکسین (ب) سویه YD5 در منابع کربنی مختلف.

Figure 3- The spore (A) and endotoxin (B) production of the strain in different carbon sources.

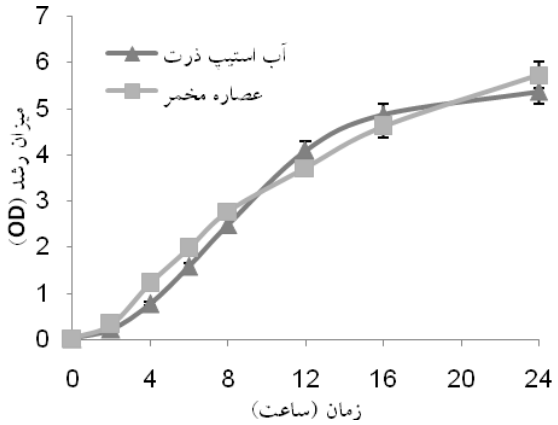
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ٤- تاثیر غلظت های مختلف نشاسته هیدرولیز شده (منبع کربن) بر میزان تولید اسپور و توکسین توسط سویه مورد مطالعه

Figure 4- The effect of different concentrations of hydrolyzed starch (carbon source) on spore and endotoxin production rate of the strain.



شکل ٥- مقایسه سینتیک رشد سویه در منبع آب استیپ ذرت و عصاره مخمر به عنوان منبع ازت.

Figure 5- Comparison of the growth kinetics of the strain in corn liquor and yeasts extract as nitrogen source.

همچنین با توجه به تاثیر غلظت منبع ازت بر روی رشد و تولید کریستال و اسپور، تاثیر غلظت درصد آب استیپ ذرت بر روی فاکتورهای ذکر شده مورد بررسی قرار گرفت (شکل ٦). با توجه به نتایج بدست آمده بهترین میزان آب استیپ ذرت برای سویه ۳ درصد حجمی شناخته شد.

بطور کلی استفاده از عصاره مخمر به عنوان منبع ازت دارای بیشترین کاربرد در تحقیقات آزمایشگاهی بوده است ولی بدلیل گران بودن این منبع می بایست آن را با منابع ارزانتر مانند ضایعات کشاورزی و پساب‌های صنعتی جایگزین کرد (Prabakaran *et al*., 2009). در

www.SID.ir

Archive of SID

تحقیقی، استفاده از ترکیب گلوکز ذرت ۱ درصد به عنوان منبع کربن و آرد سویا ۳ درصد به عنوان منبع ازت، منجر به تولید بیشترین مقدار اسپور و پروتئین کریستالی شد (Valicente and Mourao, 2008). پپتون، پودر سویا، پروتئین سویا نیز به عنوان منابع ازت در تولید انبوه این باکتری مورد ارزیابی قرار گرفته اند. با توجه به اینکه در کشور ما سویا در سطح وسیع کشت نشده و وارداتی است دسترسی به آن مشکل بوده و فرآورده ها و ضایعات ذرت منابع مناسب تری به نظر می رسند.

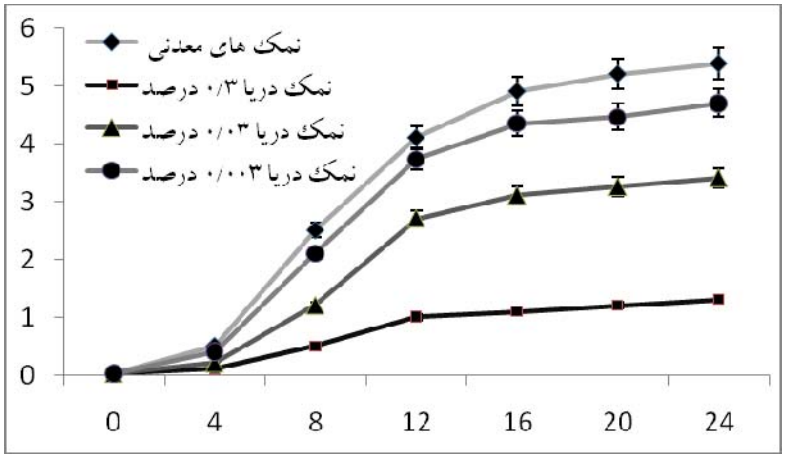
به منظور بررسی امکان استفاده از نمک دریا به عنوان جایگزین نمک های معدنی تجاری مورد استفاده در تولید انبوه سویه های *Bt*، در این بررسی از نمک آب دریا با رقت های متفاوت به عنوان منبع املاح برای رشد سویه استفاده شد. آب دریا به طور طبیعی و متوسط به میزان ۳۰ گرم در لیتر از املاح معدنی تشکیل شده است و در این آزمون کارایی غلظت‌های مختلف آن شامل ۰/۳، ۰/۰۳ و ۰/۰۰۳ درصد با املاح معدنی بهینه که در سطح آزمایشگاهی و صنعتی جهت کشت باکتری *Bt* مورد استفاده قرار می گیرند، مقایسه شد. در این آزمون نشاسته هیدرولیز شده (۳ درصد) و آب استیپ ۳ درصد به عنوان منابع کربن و نیتروژن استفاده شدند. جهت بررسی کارایی املاح آب دریا جهت رشد سویه‌های مورد نظر، سینتیک رشد در محیط های ذکر شده بررسی شد. نتایج حاصل این آزمون نشان داد که رقت ٤ برابر برای سویه مورد مطالعه بیشترین میزان رشد را حاصل می کند اما در مقایسه با نمک های معدنی میزان رشد سویه مورد مطالعه کمتر بود (شکل ۷).

شکل ٦- تاثیر غلظت های مختلف آب استیپ ذرت بر میزان تولید اسپور و توکسین توسط سویه مورد مطالعه.

Figure 6- The effects of different concentrations of corn liquor on spore and endotoxin production rate of the strain.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۷- سینتیک رشد سویه در محیط کشت حاوی نمک دریا به عنوان منبع املاح معدنی.

Figure 7- The growth kinetics of the strain in the medium containing sea salt as mineral salt source.

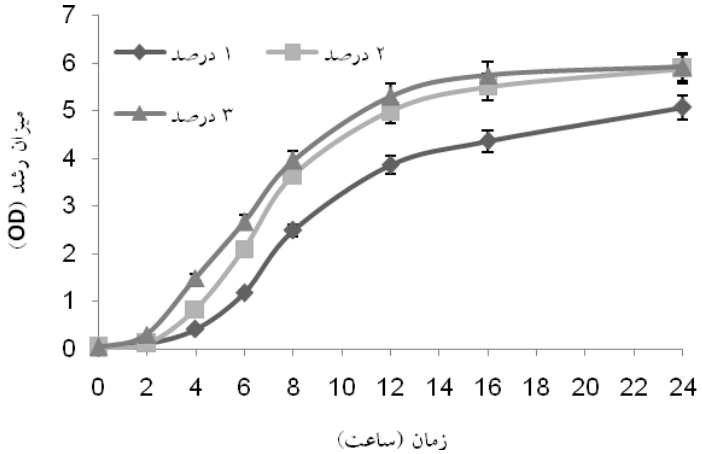
مقایسه میزان تولید اسپور و اندوتوکسین سویه YD5 در غلظت ۰/۰۰۳ درصد نمک دریا به عنوان منبع با نمک‌های معدنی نشان داد که میزان تولید اندو توکسین توسط سویه در دو محیط کشت حاوی آب دریا (۵۵۰ میلی گرم در لیتر) و نمک‌های معدنی (٥٦٠ میلی گرم در لیتر) معنی دار نبود در حالیکه میزان تولید اسپور در دو محیط معنی دار بود ($p\leq$ ۰/۰۵) و میزان آن در محیط حاوی نمک دریا $۲/۲\times ۱۰^{۹}$ ولی در محیط حاوی نمک‌های معدنی $۲/٦\times ۱۰^{۹}$ بود. در مطالعات دیگر نیز نتایج مشابهی ارائه شده است. به عنوان مثال در دو تحقیق مختلف ترکیبی از املاح معدنی مختلف به عنوان منبع املاح مورد استفاده قرار گرفتند (Zouri *et al.*, 2002; Ghribi *et al.*, 2007). نمک دریا یکی از منابعی بود که برای تامین املاح در تولید انبوه این باکتری به عنوان منبعی ارزان قیمت مورد استفاده قرار گرفت و کارایی بالایی را در رشد و تولید توکسین نشان داد. جالب توجه آن است که نمک دریا توانست فعالیت آنزیم‌های پروتئولیتیک در محیط کشت را که باعث ناپایدار شدن توکسین تولید شده توسط باکتری می‌گردد کاهش دهد (Ghribi *et al.*, 2007a). این تحقیق نشان داد نمک دریا تاثیر معنی داری در تولید توکسین این باکتری داشته است و می تواند به عنوان یک منبع بسیار ارزان قیمت در تولید انبوه *Bt* مورد استفاده قرار گیرد. همچنین نمک دریا در ترکیب با نشاسته باعث افزایش میزان CFU شد که نشان دهنده این است که حضور نمک دریا منجر به تحریک رشد باکتری مورد مطالعه شده است. افزایش درصد نشاسته تا ۱۰ درصد و نمک دریا تا ۷ درصد باعث بالا رفتن کیفیت محصول تولید شده شد. لذا آنها نتیجه گیری نمودند که ترکیب نشاسته، سویا و نمک دریا می تواند به شکل کارایی برای تولید انبوه و ارزان قیمت اسپور و

www.SID.ir

Archive of SID

کریستال سویه‌های *Bt* موثر بر دوبالان و پروانه ها استفاده شود (Ghribi *et al*., 2007a).

جهت بررسی تاثیر میزان درصد تلقیح برسینتیک رشد سویه در شرایط فرمانتور، میزان مایه تلقیح سویه به میزان ۱، ۲ و ۳ درصد حجمی محیط کشت فرمانتور در نظر گرفته شد و تاثیر این میزان بر روی سینتیک رشد سویه بررسی شد. همانطور که در شکل ۸ مشاهده می شود با افزایش درصد تلقیح، فاز تاخیری رشد سویه مورد مطالعه کاهش یافته ولی میزان رشد افزایش پیدا کرده است.



شکل ۸- سینتیک رشد سویه در میزان تلقیح مختلف درون فرمانتور.

Figure 8- The growth kinetics of the strain in different preculture concentrations in the fermentor.

علاوه براین، افزایش میزان مایه تلقیح از ۲ به ۳ درصد باعث تاثیر مثبت ناچیزی در رشد شده است ($P \leq$ ۰/۰۵). عموماً افزایش درصد مایه تلقیح تا حدی موجب ارتقاء رشد میکروارگانیسم می‌شود، به عبارتی دیگر مقدار کم مایه تلقیح منجر به تعداد کم سلول‌ها در محیط کشت می‌شود. درحالی که افزایش بیشتر نیز به دلیل محدودیت منابع غذایی باعث کاهش فعالیت ریزسازواره‌ها خواهد شد. گزارش‌های مختلفی بر تأثیر بسیار مهم عوامل محیطی ازجمله درصد مایه تلقیح در تولید اسپور و کریستال تأکید دارند (Kraemer-Schafhalter and Moser, 1996; Yezza *et al*., 2004).

شکل ۹ تاثیر درصد تلقیح بر تولید اسپور و اندوتوکسین را نشان می دهد. همانطور که مشاهده می‌شود در مورد سویه افزایش درصد تلقیح از ۲ به ۳ درصد تأثیر معنی‌داری را بر تولید اسپور و اندوتوکسین نشان نمی دهد($P \leq$ ۰/۰۵). لذا با ملاحظه عامل صرفه اقتصادی مقدار ۲٪ تلقیح به عنوان درصد بهینه مایه تلقیح جهت هر دو سویه درنظرگرفته شد.

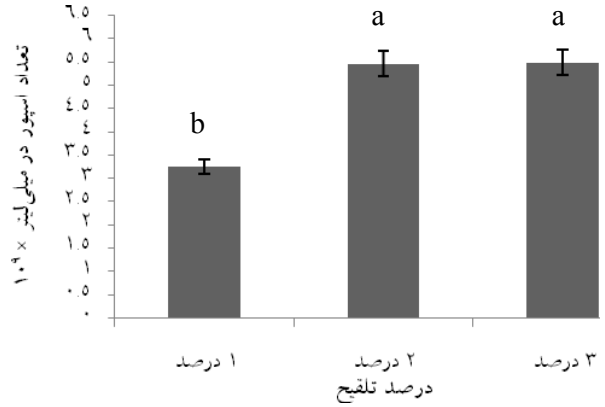
در بررسی pH بهینه، pH محیط‌ها در دامنه ٦/٥، ۷ و ۷/٥ به طور اتوماتیک تنظیم و

www.SID.ir

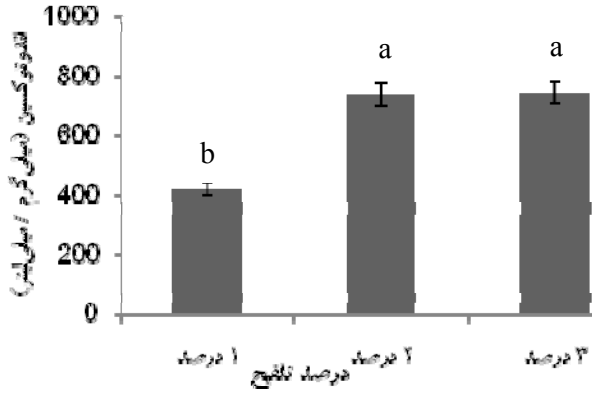
Archive of SID

تاثیر آن بر میزان رشد و سینتیک رشد سویه مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که pH بهینه محیط کشت برای رشد سویه ۷ می باشد (شکل ۱۰). نتایج بدست آمده در این تحقیق با نتایج محققین دیگر که نشان دادند در شرایط فرمنتاسیون جامد (Solid state) برای تولید مناسب اسپور و کریستال سویه *Bt* مورد تحقیق، بهترین pH در شروع کشت بین ۵ تا ۵/۷ می باشد و با افزایش pH میزان رشد سویه مذکور کاهش می یابد تا حدودی اختلاف دارد (Foda *et al.*, 2002). شاید این موضوع به ماهیت و نوع سویه بر می گردد.

همچنین نتایج حاصل از تولید اسپور و اندوتوکسین پیش از پایان فرمانتاسیون نیز با نتایج حاصل از رشد همخوانی داشت و بیشترین میزان تولید اسپور و کریستال در pH بهینه رشد بدست آمد (شکل ۱۱). علاوه بر این بررسی روند تغییرات pH و مصرف اسید و باز نشان داد که در ابتدای فرمانتاسیون و همراه با آغاز رشد pH محیط کاهش یافته و پس از فاز لگاریتمی رشد pH افزایش می‌یابد.



الف (A)



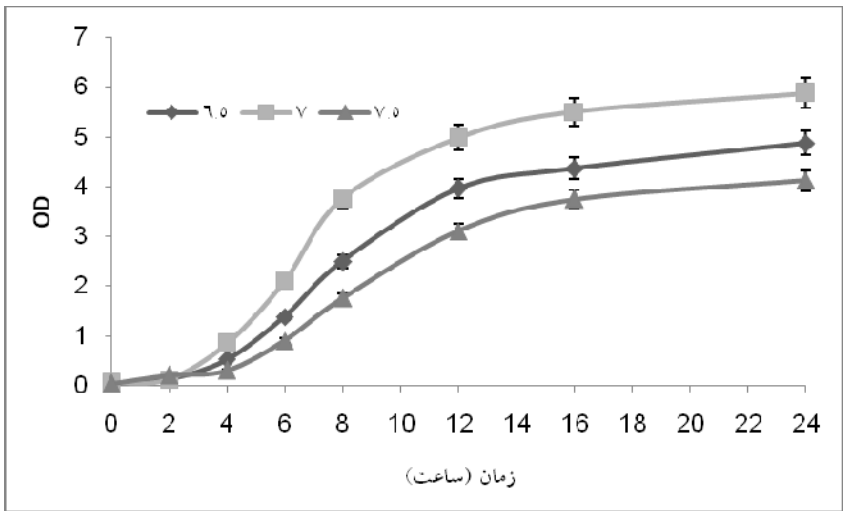
ب (B)

شکل ۹- میزان تولید اسپور (الف) و توکسین (ب) توسط سویه در میزان تلقیح مختلف.

www.SID.ir

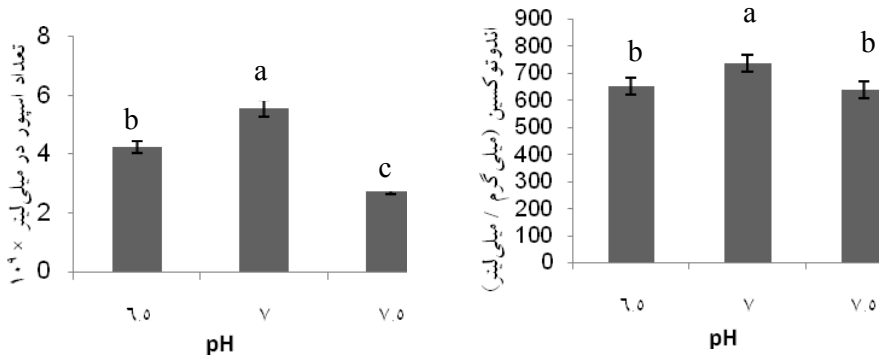
Archive of SID

Figure 9- The spore (A) and endotoxin (B) production by the strain when at different preculture concentrations.



شکل ۱۰- سینتیک رشد سویه در pH های مختلف درون فرمانتور.

Figure 10- The growth kinetics of the strain in different pHs at fermentor level.



ب (B) **الف (A)**

شکل ۱۱- میزان تولید توکسین (الف) و اسپور (ب) توسط سویه مورد مطالعه در میزان pH های مختلف.

Figure 11- The endotoxin (A) and spore (B) production rate by the strain in different pHs at fermentor level.

با توجه به اینکه رشد و تولید اسپور و کریستال در باکتری *Bt* طی یک فرآیند تخمیر هوازی صورت می‌گیرد، تأمین مقدار کافی اکسیژن محلول طی فرآیند تولید اهمیت دارد. از جمله عملکردهای مهم بیوراکتور تأمین مقدار کافی اکسیژن محلول برای رفع نیاز ریزسازواره می‌باشد. با توجه به اینکه درصد اکسیژن محلول طی فرآیند به واسطه تنظیم سرعت هم‌زن کنترل می‌شود و شدت هوادهی در طی دوره تخمیر ثابت بود، الگوی مصرف اکسیژن به صورت

www.SID.ir

Archive of SID

سرعت همزن نشان داد که افزایش تقاضای اکسیژن طی ٤ تا ۸ ساعت پس از تلقیح در دو تیمار ۵۰ و ۷۰٪ اکسیژن محلول و ۲ تا ۱۲ ساعت در مورد تیمار سوم (۹۰٪) رخ داد و به هنگام تولید اسپور و اندوتوکسین سرعت همزن در تمامی سطوح اکسیژن روند کاهشی را پشت سر گذاشت. اگرچه شدت کاهش در طی زمان و البته در سطوح مختلف اکسیژن محلول متفاوت بود.

شکل ۱۲ سینتیک رشد سویه را تحت غلظت‌های مختلف اکسیژن نشان می دهد. با افزایش میزان غلظت اکسیژن میزان رشد نیز افزایش می‌یابد که با توجه به ماهیت فیزیولوژیک باکتری باسیلوس افزایش رشد کاملاً توجیه پذیر است (Holmberg *et al*., 1980; Avignone-Rossa and Mignone, 1995; Kraemer-Schafhalter and Moser, 1996).

مقایسه بین میزان تولید اسپور و اندوتوکسین سویه بین سه سطح اکسیژن محلول مورد بررسی در این مطالعه در شکل ۱۳ ارائه شده است. افزایش غلظت اکسیژن در کشت سویه YD5 باعث افزایش تولید اسپور و پروتئین شده است. مطالعات گذشته نیز نشان داده است که میزان اشباع اکسیژن در طول فرآیند بر میزان رشد و نمو سلولی و همچنین تولید نهایی اسپور و کریستال نقش بسزایی دارد و بسته به نوع محتویات محیط کشت میزان مطلوب اکسیژن دهی متفاوت می باشد. از طرف دیگر میزان تاثیر اکسیژن بر حسب نوع سویه و محیط کشت مورد استفاده متفاوت بوده و میزان مصرف اکسیژن در حین تولید اسپور و اندوتوکسین کاهش می‌یابد (Wu *et al*., 2002; Ghribi *et al*., 2007b).

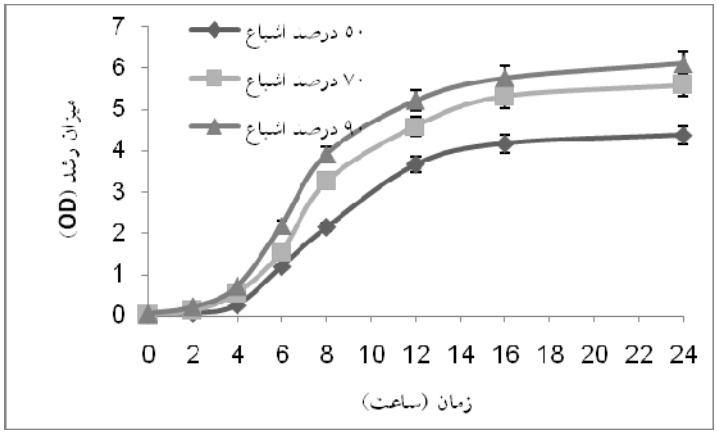
در نهایت می توان نتیجه گیری نمود که در تحقیق حاضر شرایط رشد یک سویه بومی شامل اسیدیته (pH ۷)، دما (۳۰ درجه سلسیوس)، محیط کشت اقتصادی مبتنی بر ترکیبات ارزان قیمت (شامل ترکیب نشاسته هیدرولیز شده (۳ درصد)، آب استیپ ذرت (۳ درصد) و نمک دریا (۰/۰۰۳ درصد) و شرایط فرمنتاسیون (شامل میزان تلقیح اولیه (۲ درصد) و غلظت اکسیژن اشباع (۹۰ درصد) بهینه سازی شد که منجر به تولید بالاترین میزان اسپور ($۵/۵ \times ۱۰^{۹}$ اسپور در میلی لیتر) و دلتا اندوتوکسین (۷٤۰ میلی‌گرم پروتئین در میلی‌لیتر) شد.

سپاسگزاری

این تحقیق در قالب یک پروژه تحقیقاتی مورد حمایت پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران به شماره ۲-۰۱۳-۱٤۰۰۰۰-۰۵-۸۵۱۲-۸۵۰۰٤ انجام شد. نویسندگان مقاله از کلیه همکاران بخش تحقیقات بیوتکنولوژی میکروبی و ایمنی زیستی پژوهشکده بخاطر همکاری های فنی طی اجرای تحقیق تشکر و قدردانی می نمایند.

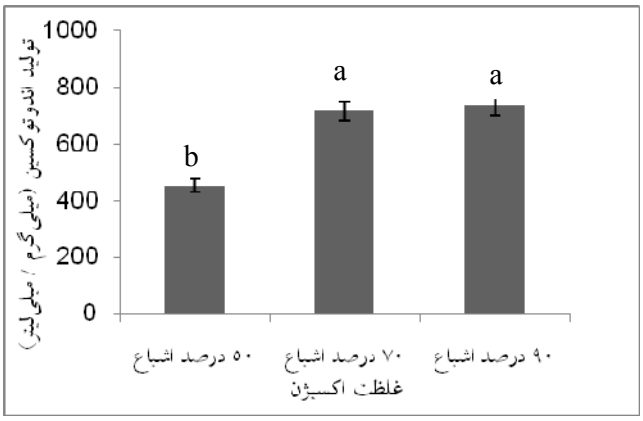
www.SID.ir

Archive of SID

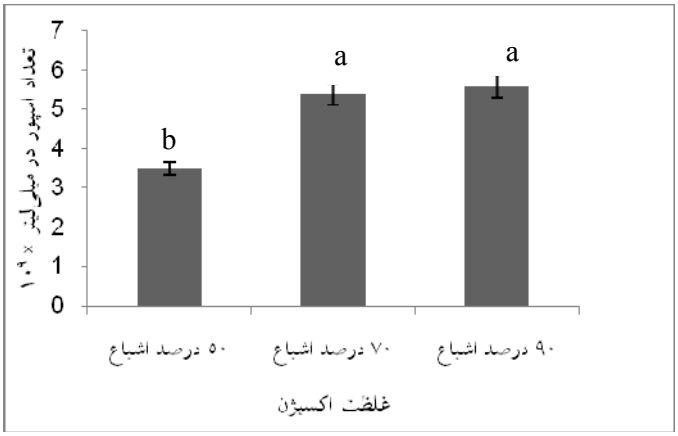


شکل ۱۲- سینتیک رشد سویه در غلظت اکسیژن مختلف درون فرمانتور.

Figure 12– The growth kinetics of the strain at different oxygen saturation concentrations at fermentor level.



الف (A)



ب (B)

شکل ۱۳- میزان تولید اسپور (الف) و توکسین (ب) توسط سویه در غلظت های مختلف اکسیژن.

Figure 13- The spore (A) and endotoxin (B) production rate by the strain in different oxygen saturation concentrations.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

Seifinejad A, Salehi Jouzani Gh, Bihamta MR (2007). Functional Genomics of *Bacillus thuringiensis* and *cry* genes. Journal of Modern Genetics (Majaleh Genetic Novin) 2: 17-23.

Marzban R, Salehi Jouzani Gh (2006). Isolation of native *Bacillus thuringiensis* from Iranian fields. Journal of Daneshe Novine Keshavarzi 2: 47-54.

Adjalle KD, Brar SK, Verma M, Tyagi RD, Valero JR, Surampalli RY (2007). Ultrafiltration recovery of entomotoxicity from supernatant of *Bacillus thuringiensis* fermented wastewater and wastewater sludge. Process Biochemistry 42: 1302-1311.

Amin G, Alotaibi S, Youssef Narmen A, Saleh WD (2008). Optimization of a fermentation process for bioinsecticide production by *Bacillus thuringiensis.* World Journal of Microbiology and Biotechnology 24(11): 2465-2471.

Anderson RKI, Jayaraman K (2003). Influence of carbon and nitrogen sources on the growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* var galleriae for biopesticide production. Chemical and Biochemical Engineering 17: 225-232.

Avignone-Rossa C, Arcas J, Mignone C (1992). *Bacillus thuringiensis* sporulation and d-endotoxin production in oxygen limited and non-limited cultures. World Journal of Microbiology and Biotechnology 8:301–304.

Avignone-Rossa C, Mignone CF (1995). *Bacillus thuringiensis* growth and toxicity. Molecular Biotechnology 4: 55-71.

Berbert-Molina MA, Prata AMR, Pessanha LG, Silveira MM (2008). Kinetics of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis growth on high glucose concentrations. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 35: 1397-1404.

Brar SK, Verma M, Barnabéa S, Tyagi RD (2005a). Impact of Tween 80 during *Bacillus thuringiensis* fermentation of wastewater sludges. Process Biochemistry 40: 2695-2705.

Brar SK, Verma M, Tyagi RD, Valéro JR, Surampalli RY (2005b). Starch industry wastewater-based stable *Bacillus thuringiensis* liquid formulations. Journal of Economic Entomology 98: 1890-1898.

Capalbo DMF(1995). *Bacillus thuringiensis*: fermentation process and risk assessment: a short review. Memŕias do Instituto Oswaldo Cruz 90: 135-138.

Ennouri K, Hassen HB, Khedher SB, Zouari N (2013). Concomitant production of delta-endotoxins and proteases of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in a low-cost medium: effect of medium components. Acta Biologica Szegediensis 57: 13-19.

Foda MS, Ismail IMK, Moharam ME, Sadek KHA (2002). A novel approach for production of *Bacillus thuringiensis* by solid state fermentation. Egyptian Journal of Microbiology 37: 135-155.

Ghribi D, Zouari N, Trigui W, Jaoua S (2007a). Use of sea water as salts source in starch and soya bean-based media, for the production of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticides. Process Biochemistry 42: 374-378.

www.SID.ir

Archive of SID

Ghribi D, Zouari N, Trabelsi H, Jaoua S (2007b). Improvement of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin production by overcome of carbon catabolite repression through adequate control of aeration. Enzyme and Microbial Technology 40: 614-622.

Holmberg A, Sievanen R, Carlberg G (1980). Fermentation of *Bacillus thuringiensis* for exotoxin production: Process analysis study. Biotechnology and Bioengineering 22: 1707-1724.

Huang K, Badger M, Haney K, Evans SL (2007). Large scale production of *Bacillus thuringiensis* PS149B1 insecticidal proteins Cry34Ab1 and Cry35Ab1 from *Pseudomonas fluorescens.* Protein Expression and Purification 53: 325-330.

Keshavarzi M, Salimi H, Mirzanamadi F (2005). Biochemical and physical requirements of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* for high biomass yield production. Journal of Agricultural Science and Technology 7: 41-47.

Khodair TA, Abdelhafez AAM, Sakr HM, Ibrahim MMM (2008). Improvement of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide production by fed-batch culture on low cost effective medium. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences 4: 923-935.

Kraemer-Schafhalter A, Moser A (1996). Kinetic study of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis in lab-scale batch process. Bioprocess and Biosystems Engineering 14: 139-144.

Liggett RW, Koffler H (1948). Corn steep liquor in microbiology. Microbiology and Molecular Biology Reviews 12: 297.

Nazarian Amirani A, Jahangiri R, Salehi Jouzani Gh, Seifinejad A, Soheilivand S, Bagheri O, Keshavarzi M, Alamisaeid K (2009). Coleopteran-specific and putative novel *cry* genes in Iranian native *Bacillus thuringiensis* collection. Journal of Invertebrate Pathology 102: 101–109.

Ouhib O, Clavel T, Schmitt P (2006). The production of *Bacillus cereus* enterotoxins is influenced by carbohydrate and growth rate. Current Microbiology 53: 222-226.

Prabakaran G, Hoti SL, Paily KP (2009). Development of cost-effective medium for the large-scale production of a mosquito pupicidal metabolite from *Pseudomonas fluorescens* Migula. Biological Control 48: 264-266.

Rao YK, Tsay KJ, Wu WS, Tzeng YM (2007). Medium optimization of carbon and nitrogen sources for the production of spores from *Bacillus amyloliquefaciens* B128 using response surface methodology. Process Biochemistry 42: 535-541.

Salama HS, Foda MS, Dulmage HT, El-Sharaby (1983). Novel fermentation media for production of delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis.* Journal of Invertebrate Pathology 41: 8-19.

Salehi Jouzani G, Pourjan Abad A, Seifinejad A, Marzban A, Kariman R, Maleki B (2008a). Distribution and diversity of Dipteran-specific *cry* and *cyt* genes in native *Bacillus thuringiensis* strains obtained from different ecosystems of Iran. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 35(2): 83-94.

Salehi Jouzani Gh, Seifinejad A, Saeedizadeh A, Nazarian A, Yousefloo M, Soheilivand S, Mousivand M, Jahangiri R, Yazdani M, Maali Amiri R, Akbari S (2008b). Molecular detection of nematicidal crystalliferous *Bacillus thuringiensis* strains of Iran and

www.SID.ir

Archive of SID

evaluation of their toxicity on free living and plant parasitic nematodes. Canadian Journal of Microbiology 54: 812–822.

Schnepf E, Crickmore N (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62(3): 77-806.

Seifinejad A, Salehi Jouzani GR, Hosseinzadeh A, Abdmishani C (2008). Characterization of Lepidoptera-active *cry* and *vip* genes in Iranian *Bacillus thuringiensis* strain collection. Biological Control 44: 216-226.

Shojaaddini M, Moharramipour S, Khodabandeh M, Talebi A (2010). Development of a cost effective medium for production of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide using food barley. Journal of Plant Protection Research 50: 9-14.

Valicente FH, Mourao AHC (2008). Use of by-products rich in carbon and nitrogen as a nutrient source to produce *Bacillus thuringiensis* (Berliner)-based biopesticide. Neotropical Entomology 37: 702-708.

Wu WT, Hsu YL, Ko YF, Yao LL (2002). Effect of shear stress on cultivation of *Bacillus thuringiensis* for thuringiensin production. Applied Microbiology and Biotechnology 58:175–177

Wu S, Lan Y, Huang D, Peng Y, Huang Z, Xu L, Zou S (2014). Use of spent mushroom substrate for production of *Bacillus thuringiensis* by solid-state fermentation. Journal of Economic Entomology 107: 137-143.

Yezza A, Tyagi RD, Valero JR, Surampalli RY (2004). Scale-up of biopesticide production processes using wastewater sludge as a raw material. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 31: 545-552.

Zouari N, Achour O, Jaoua S (2002). Production of delta-endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp kurstaki and overcoming of catabolite repression by using highly concentrated gruel and fish meal media in 2- and 20-dm 3 fermenters. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 77: 877-882.

www.SID.ir

Archive of SID

Optimization of economic medium and fermentation process of a lepidopteran active native *Bacillus thuringiensis* strain to enhance spore/crystal production

Salehi Jouzani Gh.[*1], Moradali M.F.[2], Abbasalizadeh S.[2]

[1]Associate Professor of Microbial Biotechnology and Biosafety Department, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII).

[2]Researchers of Microbial Biotechnology and Biosafety Department, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII).

Abstract

The objective of the present study was to design and optimize an economic fermentation process for mass production of a previously isolated native lepidopteran active *Bacillus thuringiensis* strain (YD5). Firstly, optimum pH and temperature of the strain were studied at Erlenmeyer flask level (incubator). The results showed that the optimum pH and temperature were 7 and 30° C, respectively. To optimize economic medium culture for mass production of the strain, different kinds of available agricultural and food industry wastes were used. This included molasses (sucrose), milk permeate (lactose) and starch liquor (polysaccharide) as carbon source, corn steep liquor as nitrogen source, and sea minerals as mineral sources. The experiments at Erlenmeyer flask level showed that the maximum growth and spore/crystal production by the strain was observed when medium containing 3% hydrolyzed starch, 3% corn steep liquor and 0.003 % sea minerals were used. In the next experiments the optimized economic medium and growth conditions of the strain were evaluated in a batch bioreactor. Also, the effects of primary inoculation concentration, aeration and pH on growth rate, and spore/crystal production were evaluated. The results showed that the maximum growth and spore/crystal production was achieved when 2% preculture concentration and 90% oxygen saturation were used. As result of the designed bioprocess in the present study, the spore/crystal and δ-toxin production were achieved to 5.5×10^9 CFU/ml and 740 mg/l, respectively.

Keywords: *Bacillus thuringiensis, Economic growth media, Fermentation, Growth optimization, Lepidoptera.*

* Corresponding Author: Salehi Jozani Gh. Tel: 02632701038 Email: gsalehi@abrii.ac.ir

www.SID.ir