

تحلیل آماری و مدل سازی فاز اسپورزایی در فرآیند تخمیر باکتری باسیلوس تورنژنسیس جهت تحلیل تأثیر اکسیژن و زمان کشت بر فعالیت حشره زدایی آن

اعظم نجف لو^۱، محمد حسین صراف زاده^{۲*} و عباس گرامی^۳

^۱ کارشناس ارشد بیوتکنولوژی - دانشگاه تهران

^۲ استادیار دانشکده مهندسی شیمی - پردیس دانشکده های فنی - دانشگاه تهران

^۳ دانشیار دانشکده ریاضی، آمار و علوم کامپیوتر - پردیس دانشکده علوم - دانشگاه تهران

(/ / / / / /)

با توجه به اهمیت باکتری باسیلوس تورنژنسیس به عنوان مؤثرترین عامل میکروبی موجود در مبارزه با آفات و حشرات، لازم است فرایند تولید آن مورد بهینه سازی قرار گیرد و تمام راه حل های ممکن جهت کاهش هزینه تولید بررسی شوند. تحلیل آماری نه تنها در بهینه سازی شرایط کشت به کار گرفته می شود بلکه این قابلیت را فراهم می نماید که بتوان رفتار یک فرایند تخمیری را توصیف و پیش بینی نمود و متناسب با خصوصیات محصول مورد نظر، شرایط مناسب را مهیا نمود. در تولید تخمیری یک حشره کش بیولوژیک یکی از فازهای مهم کشت فاز اسپورزایی است که در این تحقیق به صورت ویژه بررسی شده است و روند تغییر عواملی چون غلظت سلولی، سمیت و اسپورزایی تحت تأثیر دو فاکتور اکسیژن و زمان کشت که در هزینه تولید دخالت عمده ای دارند، بررسی شده است. تحلیل رگرسیون داده های حاصل از سه آزمایش انجام شده در شرایط مختلف هوادهی نشان داد که درصد کل اسپورزایی و اسپورهای بالغ در طول زمان صرف نظر از غلظت اکسیژن یک روند افزایشی می باشد که البته در غلظت های اکسیژن اشباع، نرخ افزایشی بسیار کند است ولی در غلظت های ناچیز اکسیژن نرخ افزایش سریع و در زمان ۴۴ ساعت از شروع تخمیر، فرایند اسپورزایی کامل شده است. سمیت و فعالیت حشره زدایی محصول تخمیر از همان ابتدای فاز اسپورزایی قابل توجه بوده و زمان تنها در غلظت های بالای اکسیژن تأثیر مثبت داشته است.

دارند، در مقابله با حشرات زیان آور کشاورزی، بهداشت و محیط زیست جایگاه مهمی دارد [۶-۳]. توکسین های این باکتری که به «دلتا اندوتوکسین» معروفند، در حقیقت پروتئین های کریستالی Cry4A و Cry4B و Cry11A و Cyt1A هستند که هنگام اسپورزایی این باکتری تولید می شوند [۸، ۷، ۲].

برای کاربردهای عملی در کنترل آفات توسط این باکتری، مقادیر زیادی اسپور با فعالیت حشره کشی بالا نیاز می باشد، بنابراین ضرورت وجود یک روش مهندسی مناسب برای رشد حداکثر سلول و تولید دلتا اندوتوکسین احساس می گردد و از آنجائی که اکسیژن برای تمام فرآیندهای هوازی ضروری می باشد. نگهداری غلظت اکسیژن در یک مقدار مناسب یک عامل مؤثر در تولید باسیلوس تورنژنسیس محسوب می گردد [۱۰، ۹، ۱].

مشکلات ناشی از مصرف سموم شیمیایی در مبارزه با آفات، متخصصین را بر آن داشت تا توجه بیشتری به روش های دیگر مبارزه، به خصوص مبارزه بیولوژیک بنمایند. یکی از معروفترین عوامل در مبارزه بیولوژیک، باکتری باسیلوس تورنژنسیس^۱ می باشد. از سال ۱۹۰۲ که «پیشی واتا» باکتری شناس ژاپنی، از بدن یک لارو مرده کرم ابریشم این باکتری را جدا کرد تاکنون قریب به یک قرن است که مطالعات گسترده ای در زمینه تأثیرات و نحوه عمل کرد این باکتری انجام می گیرد [۱]. باسیلوس تورنژنسیس به عنوان مؤثرترین عامل میکروبی موجود، نامی آشنا در کنترل آفات و حشرات است که در تولید بیش از ۹۰ درصد آفت کش های میکروبی و تعداد زیادی از گیاهان فراریخته مقاوم به حشرات کاربرد دارد [۲].

این باکتری یک باسیل گرم مثبت^۲ و اسپورزا است که به دلیل دارا بودن توکسین هایی که خواص حشره کشی

اگر چه مقالات و مطالب زیادی در رابطه با اثر اکسیژن روی غلظت بیومس و تولید توکسین موجود می‌باشد [۱۱،۱۲،۱۳]، اما در همه این تحقیقات شرایط اکسیژن رسانی یا هوادهی در طول کشت ثابت نگه داشته شده است. در صورتی که در حقیقت مقدار اکسیژن در طول کشت ثابت نبوده و به حالت فیزیولوژیکی جمعیت میکروبی غالب در محیط کشت وابسته می‌باشد. حداقل میزان اکسیژن در طول فاز رشد نمایی باکتری باسیلوس تورنژنسیس باید برابر با ماکزیمم تقاضای اکسیژن بوده و در فازهای دیگر رشد باکتری میزان نیاز به اکسیژن به سادگی تخمین زده نمی‌شود [۲]. اثر اکسیژن و زمان روی فاز اسپورزایی^۴ باکتری به میزان کافی بررسی نشده و نقش اکسیژن و زمان در سنتز دلتا اندوتوکسین و سمیت و سایر رفتار این باکتری به شایستگی درک نگردیده است. از آن جایی که بسیاری از تحقیقات انجام شده در حوزه علوم، مهندسی و صنعت به صورت تجربی بوده و از عملیات آزمایشگاهی در سطح وسیعی استفاده می‌شود، روش های آماری می‌تواند به طور مؤثری کارایی آزمایش ها را افزایش داده و این امکان را فراهم نماید که با حداقل ممکن تعداد آزمایش ها حداکثر نتایج را به دست آورد. با استفاده از تحلیل آماری بر روی داده های حاصل از آزمایش، می‌توان معنی دار بودن اثرها بر روی پاسخ را بررسی نمود، به بیان دیگر در صورت تغییر مقدار یک متغیر، تغییری در نتیجه آزمایش انجام می‌شود اما بدون تحلیل آماری نمی‌توان ادعا نمود که آیا این متغیر اثر معنی داری را بر روی نتیجه آزمایش دارد یا خیر، زیرا که

ممکن است تغییر ایجاد شده در نتیجه آزمایش ناشی از خطاهای آزمایشی باشد. پس از یافتن اثرات معنی دار می‌توان با انجام تحلیل رگرسیون، مدل آماری پیش بینی کننده رفتار سیستم را به دست آورد.

در این تحقیق ما به مدل سازی و آنالیز آماری اثر اکسیژن و زمان کشت روی فاز اسپورزایی، سمیت و سایر عمل کردهای باکتری باسیلوس تورنژنسیس در سطح اطمینان ۹۵ درصد پرداخته‌ایم، که هدف آن افزایش تولید حشره‌کش بیولوژیک با پایه باسیلوس تورنژنسیس در زمان کمتر و راندمان بیشتر و در نتیجه کاهش هزینه تولید می‌باشد.

در این تحقیق جهت تحلیل آماری، از داده ها و نتایج منتشر شده قبلی استفاده شده است [۲،۳،۱۴]، که در این جا علاوه بر تشریح روش آماری به کار گرفته شده، مختصری نیز در مورد شرایط آزمایشگاهی به دست آمدن این داده ها توضیح داده می‌شود.

باکتری باسیلوس تورنژنسیس H14 در یک فلاسک پیش‌کشت حاوی ۵۰۰ میلی لیتر محیط کشت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد روی یک تکان‌دهنده چرخشی برای ۹ ساعت نگه‌داری گردید. این محیط برای تلقیح فرمانتور و از محیط های پیش‌کشت، کشت و خوراک‌دهی ارائه شده در جدول (۱) در طول تخمیر استفاده به عمل آمد.

H14.

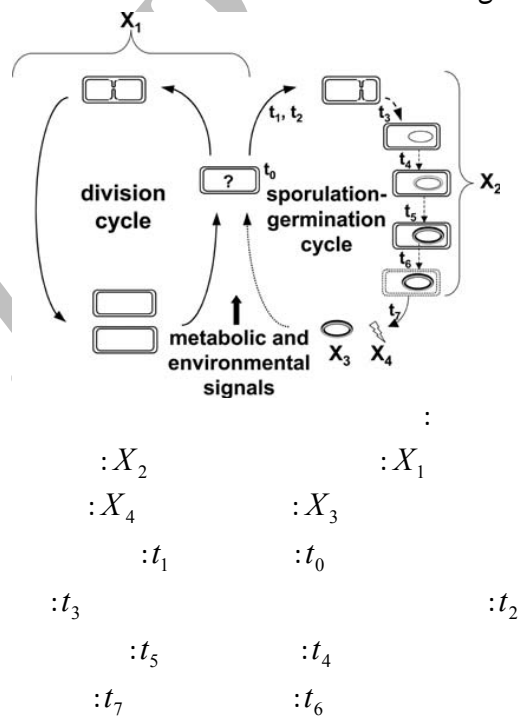
اجزا (گرم بر لیتر)	پیش کشت	کشت	خوراک دهی	محلول نمک
گلوکز	۱۰	۵	۲۴۰	—
کازئین هیدرولیز شده	—	۴/۵	۱۵۵	—
مخمر نانویی	۲	۰/۵	۲۵	—
سولفات آمونیوم	۱/۴۷	۶	—	۱۰۸
K ₂ HPO ₄	۱/۵	۱/۴	—	۲۵
KH ₂ PO ₄	۱/۵	۱/۴	—	۲۵
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	۰/۵	۰/۶۱	—	۱۰
CaCl ₂	۰/۰۶	۰/۳۳۲	—	۶
MnSO ₄ . H ₂ O	۰/۰۵	۰/۰۰۶	—	۰/۱

متغیری است که تغییرات آن در اختیار مجری آزمایش نمی باشد، اما روی متغیرهای پاسخ مورد بررسی در این تحقیق تاثیر گذار بوده است.

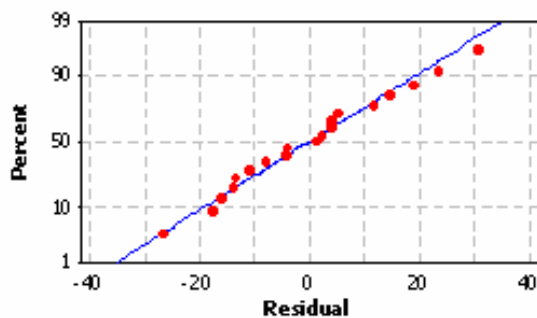
پس از نمونه‌گیری از هر تخمیر کننده (فرمانتور) در شرایط اکسیژن‌رسانی متفاوت و در زمان‌های مختلف (۲۴ تا ۴۸ ساعت)، میزان اسپور تولیدی، سمیت و سایر متغیرها در هر نمونه اندازه‌گیری گردیدند که نتایج آن در جدول (۲) آورده شده است [۱۴،۲،۳]. برای یافتن معنی دار بودن اثرات اصلی و متقابل متغیرها و رابطه بین آنها از رگرسیون استفاده می شود. مناسب بودن روش رگرسیون با استفاده از روش تحلیل واریانس^{۱۱} مورد ارزیابی قرار گرفته و در ابتدا یک مدل آماری درجه دوم کامل (تمام متغیرها، توان دوم آنها و اثرات متقابل آنها) در نظر گرفته شد، سپس با انجام تحلیل واریانس و تعیین سطح احتمال معنی دار بودن^{۱۲} در نرم افزار MINITAB اثرات معنی دار شناسایی و اثرات بی معنی حذف گردید (آنهايي که مقدار سطح احتمال آنها کوچکتر از ۰،۰۵ است، اثر معنی دار دارند). در جداول (۳)، (۵)، (۷)، (۹) و (۱۱) با حذف اثرات بی معنی، نتیجه نهایی تحلیلی رگرسیون با استفاده از نرم‌افزار MINITAB آورده شده است که حاصل آن معادلات (۱) تا (۶) می‌باشد. هم چنین تحلیل واریانس توسط نرم افزار MINITAB برای هر یک از متغیرهای پاسخ انجام شد که نتیجه کار در جداول (۴)، (۶)، (۸)، (۱۰) و (۱۲) آورده شده است. لازم به ذکر می باشد که برای مدل های مورد استفاده در این مقاله، تحلیل باقی مانده ها، به منظور آزمون نرمال بودن توزیع خطاها صورت گرفته که نرمال بودن توزیع خطاها مورد تأیید قرار گرفت، که برای نمونه نتایج مربوط به اسپورهای بالغ در شکل (۲) آورده شده است که نمودار سمت چپ آن نشان می دهد که توزیع متغیر پاسخ یا وابسته، تقریباً با توزیع نرمال انطباق داشته ضمن این که نمودار سمت راست بر تصادفی بودن خطاها دلالت دارد.

جدول (۳) اثرات معنی دار در رابطه با درصد اسپور تولیدی کل را مشخص می کند با توجه به اینکه مقدار سطح احتمال برای هر دو متغیر زمان و درصد اکسیژن کوچک تر از ۰،۰۵ می باشد بنابراین هر دو متغیر زمان و اکسیژن دارای اثر معنی دار می باشند، که البته توان

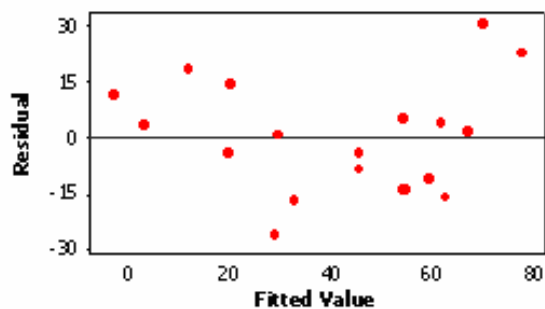
بررسی تغییرات عواملی هم چون سمیت^۵ (T) درصد اسپورهای نا بالغ یا اسپورانژیوم^۶ (S₂)، درصد اسپورهای بالغ^۷ (S₃)، درصد کل اسپورزایی^۸ (S)، تعداد کل سلولها^۹ (N) انجام شد. برای اندازه گیری سمیت از روش ارائه شده توسط سازمان بهداشت جهانی استفاده شده است [۳]. برای تفکیک و شمارش سلول های اسپور نشده (X₁)، اسپور شده (X₃) و در حال اسپور شدن (X₂)، از یک میکروسکوپ مجهز به قابلیت تمایز فاز و هموستیومتر شمارش سلولی Thoma استفاده به عمل آمده است (شکل ۱) [۳].



طراحی آماری آزمایش ها روشی برای مطالعه میزان تأثیر یک یا چند متغیر مستقل در پیش بینی متغیر وابسته یا پاسخ براساس نتایج حاصله به کمک تحلیل رگرسیون می باشد جهت ارائه مدل آماری مناسب می توان استفاده نمود که در این تحقیق نیز از آن جهت ارائه مدل مناسب برای بررسی عمل کرد باکتری باسیلوس تورنژنسیس استفاده گردید. هم چنین نرم افزار MINITAB جهت انجام تحلیل رگرسیون به کار گرفته شد. این آزمایش در شرایط کاملاً تصادفی^{۱۳} اجرا شده است که تیمارهای (آزمودنی ها) آن را سطوح ۰، ۵۰ و ۱۰۰ اکسیژن تشکیل می دهند. از طرف دیگر زمان



ب



الف

جدول ۲: جزئیات مربوط به عوامل و سطوح آنها و نتایج حاصل در مورد هر پاسخ در هر آزمایش.

				()	(%)	
1.16000E+10	46	1.700	44.000	24.550	0	1
5.07000E+09	72	15.000	46.000	26.483	0	2
6.05000E+09	56	40.000	50.000	36.683	0	3
4.35000E+09	38	65.000	69.250	40.033	0	4
4.95000E+09	41	100.000	100.000	44.033	0	5
3.44000E+09	88	100.000	100.000	47.533	0	6
6.32500E+09	110	15.217	45.059	25.967	50	7
5.50000E+09	142	30.000	55.000	30.500	50	8
4.98750E+09	143	40.602	63.659	38.367	50	9
4.73000E+09	95	58.721	75.291	42.117	50	10
4.92727E+09	96	68.450	83.948	48.183	50	11
9.60000E+09	151	8.300	38.300	24.200	100	12
9.60000E+09	177	6.500	36.500	27.000	100	13
1.10000E+10	192	30.000	46.000	31.000	100	14
9.20000E+09	182	34.000	48.000	35.000	100	15
8.90000E+09	150	44.000	44.000	47.000	100	16
6.00000E+09	153	40.000	43.000	51.000	100	17
8.90000E+09		48.000	44.000	53.500	100	18
7.20000E+09		46.000	46.000	55.000	100	19

جدول ۳: نتایج حاصل از انجام تحلیل رگرسیون برای متغیر پاسخ درصد کل اسپورزایی S در برابر عوامل زمان و اکسیژن .

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	-28.328	12.416	-2.281	0.039
t	2.641	0.329	8.017	0.000
O	0.952	0.217	4.371	0.001
O*O	-0.003	0.001	-2.165	0.048
t*O	-0.023	0.004	-5.753	0.000

R-Sq = 88.9% R-Sq(adj) = 85.7%

جدول ۴: نتایج حاصل از انجام تحلیل واریانس در متغیر پاسخ درصد کل اسپورزایی S.

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	4	6174.07	6174.07	1543.52	28.01	0.000
Linear	2	3978.46	3546.90	1773.45	32.18	0.000
Square	1	371.67	258.29	258.29	4.69	0.048
Interaction	1	1823.94	1823.94	1823.94	33.10	0.000
Residual Error	14	771.56	771.56	55.11		
Total	18	6945.64				

S₃

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	-102.488	12.361	-8.291	0.000
t	4.281	0.328	13.028	0.000
O	0.895	0.160	5.574	0.000
t*O	-0.032	0.004	-7.748	0.000

R-Sq = 94.2% R-Sq(adj) = 93.0%

S₃

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	3	13308.7	13308.7	4436.23	80.84	0.000
Linear	2	10014.0	12983.8	6491.92	118.29	0.000
Interaction	1	3294.7	3294.7	3294.74	60.04	0.000
Residual Error	15	823.2	823.2	54.88		
Total	18	14131.9				

S₂

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	74.436	8.055	9.240	0.000
t	-1.637	0.213	-7.661	0.000
O	0.009	0.141	0.069	0.946
O*O	-0.003	0.001	-2.839	0.013
t*O	0.008	0.002	2.981	0.010

R-Sq = 89.3% R-Sq(adj) = 86.2%

S₂

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	4	2697.93	2697.93	674.48	29.08	0.000
Linear	2	2331.88	2052.75	1026.37	44.25	0.000
Square	1	159.89	186.90	186.90	8.06	0.013
Interaction	1	206.16	206.16	206.16	8.89	0.010
Residual Error	14	324.75	324.75	23.20		
Total	18	3022.68				

سطح احتمال (P-value) صفر برای رگرسیون در جدول (۴) نشان دهنده آن است که مدل ارائه شده مدل معنی داری می باشد. که البته مقدار R² در مدل معادل ۸۸,۹٪ می باشد. این مدل از سه قسمت خطی، درجه دوم و اثر متقابل تشکیل شده است که با توجه به مقدار سطح

دوم درصد اکسیژن دارای اثر کمتری نسبت به بقیه عوامل است. بر مبنای ضرایب حاصل در جدول (۳) می توان معادله (۱) را که بیان کننده مدل تأثیر عوامل زمان و اکسیژن بر میزان اسپورزایی کل می باشد ارائه نمود.

$$S = -28.328 + 2.641 \times t + 0.952 \times O - 0.003 \times O^2 - 0.023 \times t \times O \quad (1)$$

متقابل اکسیژن و زمان در رابطه با درصد اسپوره‌های نابالغ تولیدی معنی دار هستند متغیر درصد اکسیژن از جدول حذف نشده است، بنابراین از معادله (۳) که بیان کننده مدل تأثیر عوامل زمان و اکسیژن بر میزان اسپوره‌های نابالغ می باشد حذف نخواهد شد:

$$S_2 = 74.436 - 1.637 \times t + 0.009 \times O - 0.003 \times O^2 + 0.008 \times t \times O \quad (3)$$

این مدل که از سه قسمت خطی، درجه دوم و اثر متقابل تشکیل شده است که با توجه به مقدار سطح احتمال برای این سه قسمت، دو قسمت اثر متقابل زمان و اکسیژن و اثر خطی زمان و اثر توان دوم اکسیژن مهم می باشد. R^2 حاصل از این مدل ۸۸,۳٪ است.

جدول (۹) اثرات معنی دار در رابطه با سمیت تولیدی را مشخص می کند که در آن تنها متغیر اکسیژن اثر معنی دار روی سمیت تولیدی دارد زیرا مقدار سطح احتمال برای متغیر اکسیژن کوچکتر از ۰,۰۵ می باشد. بر مبنای ضرایب حاصل در جدول (۹) می توان معادله ۴ را که بیان کننده مدل تأثیر عامل اکسیژن بر میزان سمیت می باشد ارائه نمود:

$$T = 58.314 + 1.107 O \quad (4)$$

سطح احتمال (P-value) صفر برای رگرسیون در جدول (۱۰) نشان دهنده آن است که مدل ارائه شده مدل معنی داری می باشد. R^2 حاصل از آن معادل ۸۶٪ است.

احتمال برای این سه قسمت اثر متقابل و خطی مدل معنی دارتر از اثر درجه دوم مدل می باشد. جدول (۵) اثرات معنی دار در رابطه با درصد اسپوره‌های بالغ تولیدی را مشخص می کند با توجه به اینکه مقدار سطح احتمال برای هر دو متغیر زمان و درصد اکسیژن کوچک تر از ۰,۰۵ می باشد بنابراین هر دو متغیر زمان و اکسیژن دارای اثر معنی دار می باشند. همچنین اثر متقابل اکسیژن و زمان در رابطه با درصد اسپوره‌های بالغ تولیدی معنی دار بوده که حاصل این نتایج معادله ۲ است که بیان کننده مدل تأثیر عوامل زمان و اکسیژن بر میزان اسپوره‌های بالغ می باشد:

$$S_3 = -102.488 + 4.281 \times t + 0.895 \times O - 0.032 \times t \times O \quad (2)$$

این مدل که از دو قسمت خطی و اثر متقابل تشکیل شده است با توجه به مقدار سطح احتمال برای این دو قسمت، می توان گفت که دارای اثر معنی دار می باشند. R^2 در این مدل معادل ۹۴,۲٪ می باشد که نشان دهنده دقت بالای مدل بر داده های آزمایشی است.

جدول (۷) اثرات معنی دار در رابطه با درصد اسپوره‌های نابالغ تولیدی را مشخص می کند با توجه به اینکه مقدار سطح احتمال برای متغیر زمان کوچکتر از ۰,۰۵ می باشد بنابراین متغیر زمان دارای اثر معنی دار بوده، اما مقدار سطح احتمال برای درصد اکسیژن بزرگتر از ۰,۰۵ است بنابراین متغیر درصد اکسیژن دارای اثر معنی دار نمی باشد اما چون توان دوم درصد اکسیژن و اثر

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	58.314	7.527	7.747	0.000
O	1.107	0.115	9.601	0.000

R-Sq = 86.0% R-Sq(adj) = 85.1%

Source	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	36741	36741	92.18	0.000
Residual Error	15	5979	399		
Total	16	42720			

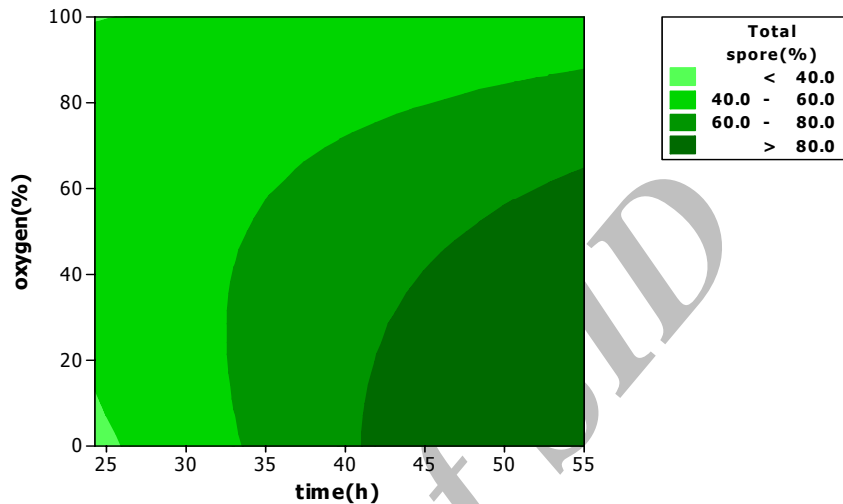
Term	Coef*E-9	SE Coef*E-9	T	P
Constant	10.199	1.448	7.040	0.000
t	-0.117	0.036	-3.285	0.005
O	-0.056	0.033	-1.666	0.117
O*O	0.001	0.000	2.788	0.014

R-Sq = 67.3% R-Sq(adj) = 60.8%

.N

:

Source	DF	Seq SS*E-18	Adj SS*E-18	Adj MS*E-18	F	P
Regression	3	73.059	73.059	24.353	10.31	0.001
Linear	2	54.706	31.423	15.711	6.65	0.009
Square	1	18.353	18.353	18.353	7.77	0.014
Residual Error	15	35.428	35.428	2.362		
Total	18	108.487				



عامل و توان دوم درصد اکسیژن نیز بستگی دارد. به منظور فهم بهتر اثر متقابل دو عامل اکسیژن و زمان بر میزان کل اسپورزایی نمودار تراز مربوطه در شکل (۳) ارائه شده است. بارسم نمودار تراز امکان تحلیل پیوسته تأثیر این دو عامل بر مبنای داده های گسسته موجود فراهم می گردد و نواحی مختلف عمل کردی جهت رسیدن به درصد اسپورزایی کل مورد نظر، مشخص می گردد. با استفاده از معادله (۱) و شکل (۳) مشاهده می شود که با افزایش زمان و کاهش اکسیژن، میزان کل اسپور تولیدی افزایش می یابد، هم چنین از شکل (۳) می توان فهمید که در مقدار درصد بالای اکسیژن حتی با افزایش زمان تخمیر تا ۴۸ ساعت نیز میزان کل اسپورهای تولیدی به ۱۰۰٪ نمی رسد و تنها در زمان بیشتر از ۴۵ ساعت و غلظت اکسیژن کمتر از ۳۰٪ ما می توانیم به میزان کل اسپور تولیدی ۱۰۰٪ دست یابیم.

در مورد درصد اسپورهای بالغ با توجه به معادله (۲) هر دو عامل زمان و اکسیژن و اثرات متقابل آنها می باید در نظر گرفته شوند، اما در مورد درصد اسپورهای نابالغ با توجه به معادله (۳) مشخص است که علاوه بر این عوامل، توان دوم اکسیژن نیز مؤثر خواهد بود. در این دو مورد نیز

جدول (۱۱) اثرات معنی دار در رابطه با تعداد کل سلول ها را مشخص می کند با توجه به اینکه مقدار سطح احتمال برای متغیر زمان کوچک تر از ۰,۰۵ می باشد بنابراین متغیر زمان دارای اثر معنی دار می باشد، اما مقدار سطح احتمال برای درصد اکسیژن بزرگ تر از ۰,۰۵ بوده بنابراین متغیر درصد اکسیژن دارای اثر معنی دار نمی باشد اما چون توان دوم درصد اکسیژن معنی دار است متغیر درصد اکسیژن از جدول حذف نشده و مدل ارائه شده به صورت معادله (۵) به دست می آید:

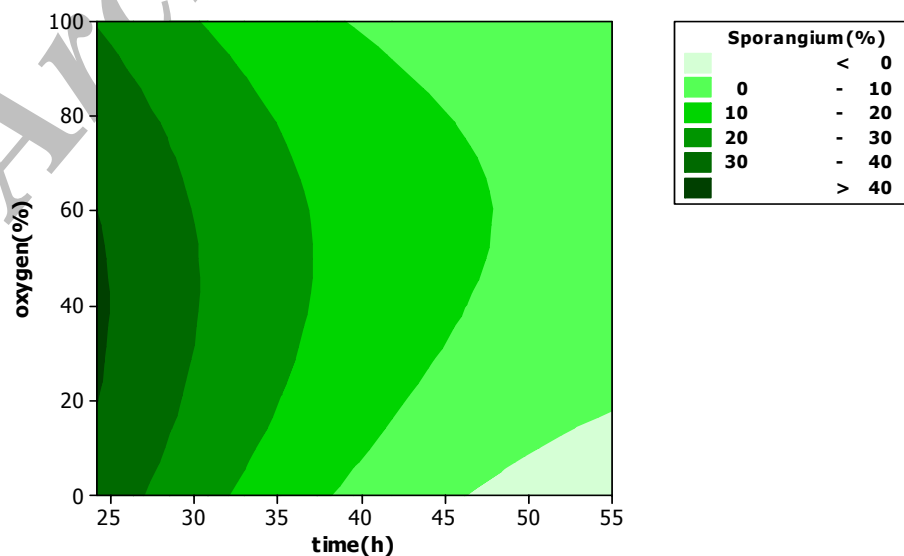
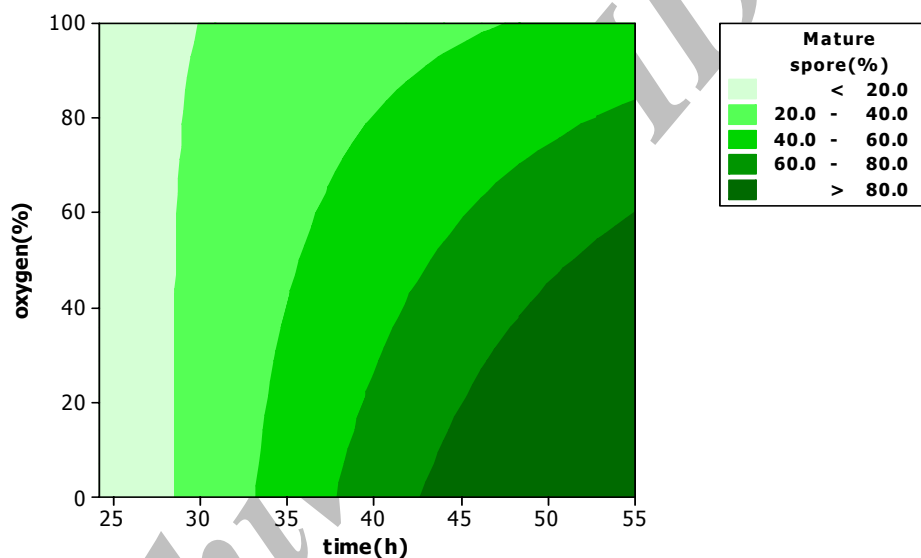
$$N \times 10^{-9} = 10.199 - 0.117 t - 0.056 O + 0.001 O^2 \quad (5)$$

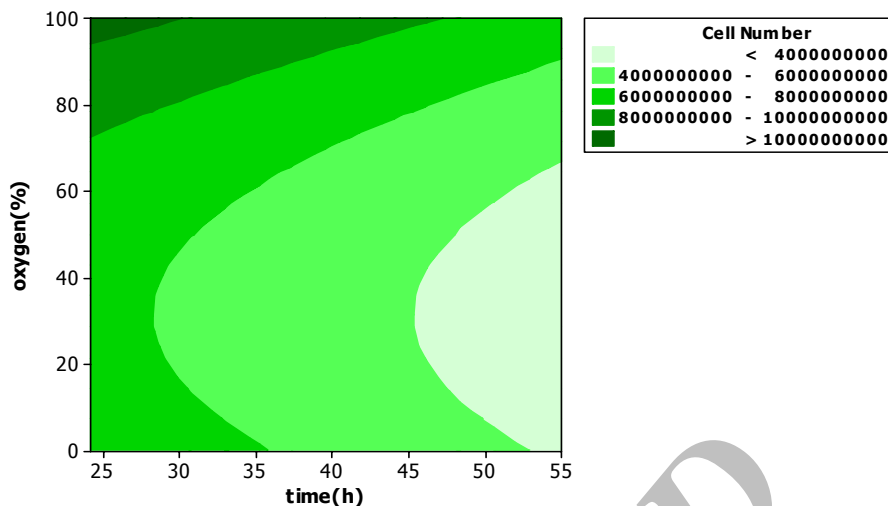
مقدار سطح احتمال صفر برای رگرسیون در جدول (۱۲) نشان دهنده آن است که مدل ارائه شده مدل معنی داری می باشد. این مدل که از دو قسمت خطی، درجه دوم تشکیل شده است، با توجه به مقدار سطح احتمال برای این دو قسمت، قسمت درجه دوم مدل نسبت به اکسیژن مهم تر از اثر خطی اکسیژن است.

در معادله (۱) میزان کل اسپور تولیدی به هر دو عامل زمان و اکسیژن و هم چنین به اثر متقابل این دو

اکسیژن بر روی اسپوره‌های بالغ و میزان کل اسپورها می‌توان انتظار داشت که اثر اکسیژن بر روی میزان اسپوره‌های نابالغ ناچیز باشد لذا به همین دلیل است که اثر اکسیژن در رابطه با درصد اسپور نابالغ تولیدی بی‌معنی می‌باشد که این مطلب در شکل (۵) به خوبی دیده می‌شود. به علاوه در معادله (۴) ملاحظه می‌گردد که میزان سمیت تولیدی تنها به عامل اکسیژن بستگی داشته و زمان در مقدار آن تأثیر ندارد و ضمن این که میزان سمیت تولیدی با افزایش مقدار درصد اکسیژن افزایش می‌یابد.

بارسم نمودار تراز، شکل‌های (۴) و (۵) حاصل می‌شود که با مشاهده شکل (۴) می‌توان گفت که با افزایش زمان و کاهش اکسیژن میزان تولید اسپوره‌های بالغ افزایش می‌یابد. تنها در زمان‌های خیلی بالا و درصد اکسیژن خیلی پایین ما به اسپوره‌های بالغ ۱۰۰٪ می‌رسیم اما همان گونه که در شکل (۵) دیده می‌شود با کاهش زمان و کاهش اکسیژن میزان اسپوره‌های نابالغ افزایش می‌یابد. لازم به ذکر است که میزان اسپوره‌های نابالغ حاصل تفاضل میزان کل اسپورها و اسپوره‌های بالغ بوده و به همین دلیل معادله (۳) از تفاضل معادلات (۱) و (۲) نیز می‌تواند به دست آید. با توجه به این مطلب و تأثیر مشاهده شده از





شکل ۶: نمودار تراز تعداد سلول کل بر حسب درصد اکسیژن و زمان.

می تواند به درصد بالایی از اسپورهای بالغ و سمیت مناسب، منتج شود و ضرورتی به هوادهی نامحدود آن گونه که مورد نیاز فاز رشد است، نمی باشد. از طرف دیگر کاهش زمان تخمیر نیز در کاهش هزینه های تولید و افزایش سرعت و میزان تولید نیز تأثیر به سزایی دارد که بر مبنای نمودارهای تراز حاصل از تحلیل های آماری به راحتی می توان زمان لازم برای رسیدن به حد مشخصی از اسپورزایی و یک سمیت قابل قبول را در یک غلظت مشخص از اکسیژن تعیین نمود و زمان تخمیر را از ۴۸ ساعت به کمتر از ۳۰ ساعت تقلیل داد.

این پژوهش با استفاده از اعتبارات شورای پژوهشی دانشگاه تهران طرح شماره ۸۱۰۴۹۵۶/۱/۰۱ انجام گردیده است.

از معادله (۵) این نتیجه به دست می آید که تعداد سلول ها به هر دو عامل زمان و اکسیژن بستگی دارد که البته تأثیر زمان از تأثیر اکسیژن بیشتر می باشد. تعداد سلول های کل با زمان رابطه خطی و با اکسیژن رابطه درجه دوم دارد. از شکل (۶) چنین بر می آید که تعداد سلول ها با کاهش زمان و افزایش اکسیژن، افزایش می یابد.

در تولید تخمیری یک حشره کش بیولوژیک هدایت فرآیند به منظور تولید بهینه محصول با حداکثر فعالیت و هزینه کمتر از اهمیت به سزایی برخوردار است. هوادهی در یک فرآیند تخمیر از موارد هزینه بر می باشد که با بهینه سازی میزان آن می توان از افزایش هزینه ناشی از هوادهی بی مورد جلوگیری نمود. با توجه به تحلیل آماری صورت گرفته روشن گردید که در فاز اسپورزایی حفظ اکسیژن محلول در حوالی ۳۰ درصد غلظت اشباع

- 1 - Avignone-Rossa, C. and Mignone, C. F. (1995). "Bacillus thuringiensis growth and toxicity – basic applied considerations." *Molecular Biotechnology*, Vol. 4, PP. 55–71.
- 2 - Sarrafzadeh, M. H. and Navarro, J. M. (2006). "The effect of oxygen on the sporulation, delta-endotoxin synthesis and toxicity of Bacillus thuringiensis H14." *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, Vol. 22, PP. 305–310.
- 3 - Sarrafzadeh, M. H., Guiraud, J. P., Lagneau, C., Gaven, B., Carron, A. and Navarro, J. M. (2005). "Growth, sporulation, delta-endotoxin synthesis and toxicity during culture of Bacillus thuringiensis H14." *Current Microbiology*, Vol. 51, PP. 75–81.

-
- 4 - Aronson, A. I. (1993). "The two faces of *Bacillus thuringiensis*: insecticidal proteins and post-exponential survival." *Mol Microbiol*, Vol. 7, PP. 489–496.
 - 5 - Buchanan, R. G. and Gibbon, N. E. (1974). *Endospore forming rods and cocci*. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed. Baltimore: Williams & Wilkins Co., PP. 529–545.
 - 6 - Schnepf, E., Crickmore, N., van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R. and Dean, D. H. (1998). "*Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins." *Microbiol Mol Biol Rev*, Vol. 62, PP. 775–806.
 - 7 - Hofte, H. and Whiteley, H. R. (1989). "Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*." *Microbiological Reviews*, Vol. 53, PP. 242–255.
 - 8 - Dulmage, H. T., Correa, J. A. and Gallegos-Morales, G. (1990). Potential for improved formulations of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* through standardization and fermentation development. In *Bacterial Control of Mosquitoes and Blackflies: Biochemistry, Genetics and Applications of Bacillus thuringiensis israelensis and Bacillus sphaericus*, eds. De Barjac H. & Sutherland D.J., pp. 110–133. New Burnswick, NJ: Rutgers University Press. ISBN 004445984X.
 - 9 - Morris, O. N., Converse, V., Kanagaratnam, P. and Davies, J. S. (1996). "Effect of cultural conditions on spore-crystal yield and toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp *aizawai* (HD133)." *Journal of Invertebrate Pathology*, Vol. 67, PP. 129–136.
 - 10 - Flores, E. R., Perez, F. and De la Torre, M. (1997). "Scale-up of *Bacillus thuringiensis* fermentation based on oxygen transfer." *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Vol. 83, PP. 561–564.
 - 11 - Liu, W. M., Bajpai, R. and Bihari, V. (1994). "High-density cultivation of sporeformers." *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 721, PP. 310–325.
 - 12 - Foda, M. S., Salama, H. S. and Selim, M. (1985). "Factors affecting growth physiology of *Bacillus thuringiensis*." *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 22, PP. 50–52.
 - 13 - Maldonado-Blanco, M. G., Solis-Romero, G. and Galan-Wong, L. J. (2003). "The effect of oxygen tension on the production of *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis* toxin active against *Aedes aegypti* larvae." *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 19, PP. 671–674.
 - 14 - Sarrafzadeh, M. H., Belloy, L., Esteban, G., Navarro, J. M. and Ghommidh, C. (2005). "Dielectric monitoring of the growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis*." *Biotechnology Letters*, Vol. 27, PP. 511–517.

- 1 - *Bacillus Thuringiensis*
- 2 - Positive Gram
- 3 - Delta-Endotoxin
- 4 - Sporulation Phase
- 5 - Toxicity
- 6 - Sporangium
- 7 - Mature Spore
- 8 - Total Spore
- 9 - Cell Number
- 10 - Completely Randomize Design
- 11 - ANOVA
- 12 - P-value