Archive of SID

نشریه کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دوره۳، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۳ (۱۷۲-۱۶۵)

بهینه‌سازی فرآیند تولید جدایهٔ بومی (6R) باکتری *Bacillus thuringiensis* در فرمانتور آزمایشگاهی

۱. فاطمه صابری*؛ ۲. رسول مرزبان؛ ۳. مهدی ارجمند

۱. فارغ‌التحصیل کارشناسی ارشد مهندسی شیمی ـ بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد، واحد علوم و تحقیقات
۲. استادیار پژوهش، مؤسسهٔ تحقیقات گیاه‌پزشکی سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ولنجک، تهران
۳. دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران جنوب، گروه مهندسی شیمی، تهران

(تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۱۲ - تاریخ تصویب: ۹۳/۱۲/۱۵)

چکیده

امروزه، کنترل بیولوژیک جایگاه بسیار مهمی در مدیریت کنترل آفات به خود اختصاص داده است. یکی از موارد کنترل بیولوژیک استفاده از باکتری *Bacillus thuringiensis Ber.* است که در تولید بیش از ۶۰ درصد آفت‌کش‌های میکروبی و تعداد زیادی از گیاهان تراریختهٔ (Bt-crops) مقاوم به حشرات کاربرد دارد. به‌طور کلی عملکرد خوب و مناسب برخی فرآورده‌های تجاری باکتری Bt در کنترل حشرات آفت، به‌دلیل غلظت مناسب دلتا اندوتوکسین و اسپور در فرآوردهٔ نهایی است. میزان غلظت این دو پارامتر وابستگی شدیدی به ترکیب محیط کشت و شرایط محیطی تولید باکتری دارد. در این تحقیق بهینه‌سازی شرایط محیطی باکتری Bt شامل pH، دما و میزان هوادهی، بررسی شد. برای کاهش تعداد آزمایش‌ها از روش آماری تاگوچی و نرم‌افزار Qualitek 4 استفاده شد. نتایج نشان داد که شرایط بهینه برای این جدایه شامل دمای ۲۸ درجهٔ سلسیوس، pH ۷/۵ و میزان اکسیژن ۸۰ درصد اشباع است. در این شرایط بهینه، میزان اسپور باکتری $۱/۵\times۱۰^{۱۲}$ اسپور در میلی‌لیتر به‌دست آمد. آنالیز تأثیر متقابل پارامترهای مؤثر در فرآیند بر یکدیگر نشان داد که دما و میزان هوادهی با مقدار ۳۹/۹۲ درصد و دما و pH با مقدار ۰/۲۵ درصد به‌ترتیب بیشترین و کمترین تأثیر متقابل را داشتند.

کلیدواژگان: **اکسیژن، دما، شرایط بهینه، *Bacillus thuringiensis*، pH.**

مقدمه

پس از دستیابی به بهترین جدایه‌های باکتری Bt از لحاظ قدرت کشندگی، دامنهٔ میزبانی و تهیهٔ محیط‌های کشت مناسب برای تولید انبوه، لازم است تا شرایط رشد باکتری و تولید اسپور و کریستال در شرایط فرمانتور به‌عنوان مدل اولیه برای تولید انبوه آن در فرمانتورهای با مقیاس صنعتی بهینه‌سازی شود (Huang *et al.* 2007). خوشبختانه، با توجه به سابقهٔ طولانی شناسایی Bt به‌عنوان یک فرآوردهٔ بیولوژیک حشره‌کش و تولید انبوه آن در چند دههٔ اخیر، تحقیقات خوبی دربارهٔ بهینه‌سازی شرایط رشد، شامل pH، میزان اکسیژن‌دهی، دما و غیره برای تولید حداکثری اسپور و کریستال در حداقل زمان و کاهش عوامل منفی متابولیکی با استفاده از تکنولوژی‌های فرمانتاسیون انجام شده است (Sikdar *et al.* 1991). به‌طور کلی عملکرد خوب و مناسب برخی فرآورده‌های تجاری باکتری Bt در کنترل حشرات آفت، به‌دلیل غلظت مناسب دلتا اندوکسین و اسپور در فرآوردهٔ نهایی فرموله شده است که میزان غلظت این دو

* تلفن: ۰۲۱-۲۲۲۵۶۱۸۶
E-mail: Bnazanin_saberi@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

پارامتر به ترکیب محیط کشت و شرایط محیطی تولید باکتری بستگی دارد. بنابراین، با تغییر محتویات محیط کشت و شرایط کشت می‌توان میزان تولید اسپور و کریستال را بهینه کرد (Holmberg *et al*. 2004).

تاکنون، فرآورده‌های Bt در مقیاس صنعتی اکثراً در شرایط فرمانتاسیون ناپیوسته تولید شده‌اند، اما امکان افزایش میزان تولید اسپور و کریستال در این نوع فرمانتاسیون وجود دارد و تحقیقاتی نیز دربارهٔ این موضوع انجام شده است (Yezza *et al*. 2004). از آنجا که برای تولیدBt معمولاً شرایط هوازی در محیط مایع با سیستم هوادهی و هم‌زنی خوب نقش کلیدی دارند، در تحقیقات قریبی و همکاران میزان اکسیژن مناسب قابل حل در منابع مورد استفادهٔ خود شامل نشاسته، آرد سویا و نمک دریا را در فرمانتور بررسی کردند (Ghribi *et al*. 2007). در تحقیق مذکور مشاهده شد که وجود اکسیژن کافی در محیط مخصوصاً در ۶ ساعت اول فرمانتاسیون برای شروع ساخت‌وساز کریستال‌های پروتئینی بسیار مهم است. همچنین، در آن تحقیق، قریبی و همکاران نشان دادند که وجود حدود ۶۰ درصد اکسیژن حل‌شده در طول فرآیند بالاترین میزان تولید زیست‌توده را باعث می‌شود، بدون اینکه میزان تولید کریستال کاهش یابد. در حالی که، بیش از ۸۰ درصد، تولید زیست‌توده بالا می‌رود، ولی میزان تولید توکسین (کریستال) کاهش می‌یابد (Ghribi *et al*. 2007). زواری و جاوآ در تحقیقی که در سطح فرمانتور انجام دادند، مشاهده کردند که هوادهی نقش بسیار مهمی در تولید اسپور و کریستال دارد. در این مطالعه مشخص شد که وجود منبع کربن مناسب و هوادهی مناسب می‌تواند باعث کاهش میزان ممانعت کاتابولیتی کربن[1] در فرآیند سنتز کریستال‌های پروتئینی شود. همچنین، در مطالعهٔ مذکور مشخص شد که با توجه به نقش واکنش‌های اکسیداتیو در سنتز کریستال‌های پروتئینی، عرضهٔ کافی اکسیژن و هوادهی می‌تواند باعث تولید حداکثری اسپور و کریستال شود (Zuoari & Jaoua 1999). دانگ و همکاران موفق شدند یکی از سویه‌های Bt را در شرایط فرمانتاسیون ناپیوسته[2] و نیمه‌پیوسته[3] با استفاده از ضایعات صنایع نشاسته به‌عنوان تنها منبع غذایی تولید کنند. آن‌ها موفق شدند در شرایط نیمه‌پیوسته در دو زمان متناوب واردسازی محیط کشت (زمان ۱۰ و ۲۰ ساعت از زمان شروع کشت) به حداکثر میزان تولید اسپور و کریستال برسند (۱۶۷۲ میلی‌گرم در لیتر) که این میزان سه برابر حالت ناپیوسته بود و نشان دادند که در حالت نیمه‌پیوسته میزان تولید بسیار بالاتر است. جالب اینکه در شرایط سه‌بار واردسازی محیط کشت در حالت ناپیوسته میزان تولید اسپور و کریستال کاهش نشان داد (Dang *et al*. 2009). برار و همکاران تأثیر استفاده از توین ۸۰[4] را که یک مادهٔ سورفکتانت است بر میزان تولید Bt در فرمانتور حاوی لجن مایع[5] (هیدرولیزشده و هیدرولیزنشده) بررسی کردند. در حالت عادی، هیدرولیز لجن مایع باعث افزایش میزان تولید اسپور و کریستال شد. افزودن توین ۸۰ به محیط‌های حاوی لجن هیدرولیزشده و هیدرولیزنشده باعث افزایش میزان تولید سلول و اسپور شد. البته این میزان افزایش در محیط حاوی لجن هیدرولیزنشده بیشتر مشاهده شد. در طول فرآیند فرمانتاسیون نیز بسته به میزان رشد سلولی، هوادهی، لیزشدن سلول‌ها و تولید اسپور و سایر شرایط میزان ویسکوزیتی تغییر کرد (Brar *et al*. 2005). رو و همکاران نشان دادند که میزان جذب اکسیژن (نرخ تنفس) باکتری Bt در شرایط فرمانتاسیون ناپیوسته در ابتدای مرحلهٔ رشد بسیار بالا است (۸-۱۰mmol/g h) و در ادامه در دورهٔ رشد رویشی و فاز انتقال این میزان به‌طور یکنواختی کاهش می‌یابد (۲mmol/g h). همچنین، آن‌ها نشان دادند که با کنترل pH و استفاده از غلظت پایین EDTA طول فاز رویشی کاهش یافت و در نتیجه، در ۱۰ ساعت اولیه میزان تودهٔ زیستی کاهش یافت (Rowe and Margaritis 1987). رو و مارگاریتیس برای تولید یکی از سویه‌های Bt، (HD1) فرآیند زیستی تولید و آنالیز اقتصادی با جزئیات تعریف کردند که شامل فرمانتاسیون ناپیوسته جایگزین[6]، فرمانتاسیون نیمه‌پیوسته با تراکم کم[7] و فرمانتاسیون نیمه‌پیوسته با

1. Carbon catabolite repression
2. Batch
3. Fed-Batch

4. Tween 80
5. Liquid Sludge
6. Alternative Batch
7. Low density Fed-Batch

www.SID.ir

Archive of SID

تراکم بالا[1] بود. در این تحقیق آن‌ها همهٔ هزینه‌های مورد نیاز برای عملیات تولید و در نهایت، میزان سودرسانی را مقایسه کردند (Rowe & Margaritis 2004). در این تحقیق تلاش شده است، بهینه‌سازی محیط رشد برای جدایهٔ بومی 6R در شرایط فرمانتور بررسی و عوامل مؤثر در تولید انبوه بحث شود.

مواد و روش‌ها

مواد

در این تحقیق از جدایهٔ 6R باکتری *Bacillus thuringiensis* برای انجام آزمایش‌ها استفاده شد (Izadyar *et al*. 2005; Marzban and Salehi Jozani 2006). محیط کشت به‌کاررفته شامل شربت ذرت (شرکت گلوکوزان قزوین) و نمک‌های $MnSO_4.7H_2$، $ZnSO_4.7H_2O$، $FeSO_4.7H_2O$، $MgSO_4.7H_2O$ به‌ترتیب به‌میزان ۰/۰۲، ۰/۰۲، ۰/۰۰۳ و ۰/۰۲ درصد بود (شرکت Merck آلمان). برای تنظیم pH محیط کشت از NaOH و HCL استفاده شد (شرکت Merck آلمان). مایهٔ تلقیح به‌کار رفته شامل شربت ذرت ۳ درصد و نمک‌های مورد استفاده در محیط کشت اصلی بود که به‌مدت ۱۸ ساعت روی شیکر با دور ۱۸۰ rpm در دمای ۳۰°C قرار داده شد و میزان مایهٔ تلقیح آن (V/V) ۵ درصد بود. از فرمانتور مجهز به هم‌زن مکانیکی، ساخت کشور آلمان مدل Medorex, FCU/PU05، با حجم عملیاتی ۴ لیتر استفاده شد.

بهینه‌سازی شرایط تولید

هدف اصلی از انجام این تحقیق بهینه‌سازی شرایط عملیاتی فرآیند فرمانتاسیون باکتری Bt بود. بنابراین، در طی انجام آزمایش‌ها تأثیر ۳ پارامتر pH، دما و میزان اکسیژن بررسی شد. دور هم‌زن مکانیکی مخزن فرمانتور در مقدار ثابت ۲۵۰rpm تنظیم شد. هر یک از پارامترهای عملیاتی در سه سطح ۶/۵، ۷ و ۷/۵ برای pH; ۲۸، ۲۹ و ۳۰ درجهٔ سلسیوس برای دما و ۵۰، ۶۵ و ۸۰ درصد برای میزان هوادهی بررسی شدند. به‌منظور بهینه‌سازی شرایط عملیاتی و بررسی اینکه کدام‌یک از پارامترها بیشترین تأثیر را داشته و این میزان چقدر بوده است از روش طراحی آزمایش تاگوچی استفاده شد.

1. High Density Fed Batch

روش تاگوچی نشان می‌دهد که تأثیر هریک از پارامترها روی پارامتر هدف (میزان زیست‌توده) چقدر و همچنین، برهم‌کنش هریک از پارامترها روی یکدیگر چقدر بوده است. یک مزیت دیگر استفاده از روش تاگوچی کاهش تعداد آزمایش‌ها لازم برای دستیابی به شرایط بهینه است. این مورد به‌ویژه در مواردی که مواد مورد استفاده گران‌قیمت و کمیاب یا هزینه‌های انجام آزمایش‌ها بالا باشد، اهمیت بیشتری پیدا می‌کند. طبق روش تاگوچی یک آرایهٔ اورتوگونال L9 (سه پارامتر در سه سطح) طراحی و طبق جدول ۱ برای انجام آزمایش‌ها استفاده شد. همچنین، هریک از آزمایش‌ها حداقل سه‌بار تکرار شد و مقادیر متوسط به‌عنوان نتیجه گزارش شدند. پس از ۷۲ ساعت، فرآیند فرمانتاسیون در شرایط استریل نمونه‌گیری و ضمن مشاهدهٔ نمونهٔ میکروسکوپی برای بررسی وضعیت باکتری از دو فاکتور میزان اسپور و تودهٔ زیستی تولیدی برای بهینه‌سازی فرآیند استفاده شد. برای اندازه‌گیری میزان اسپور از روش سری رقت استفاده شد (Marzban 2002). برای محاسبهٔ زیست‌توده، ابتدا ۴۰ میلی‌لیتر از نمونهٔ ۷۲ ساعته با دور ۱۰۰۰۰ rpm و به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ و سپس، به‌مدت ۲ تا ۳ روز در دمای ۵۰ درجهٔ سلسیوس در آون قرار گرفت و وزن آن پس از خشک‌شدن محاسبه شد.

نتایج و بحث

جدول ۱ نتایج به‌دست‌آمده براساس روش تاگوچی را نشان می‌دهد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود، بیشترین میزان اسپور و تودهٔ زیستی مربوط به آزمایش شمارهٔ ۷ است که در آن مقادیر pH، دما و میزان هوادهی به‌ترتیب ۷/۵، ۲۸ و ۸۰ درصد قرار دارند.

در شکل ۱ تأثیر تغییرات pH در سه سطح روی میزان اسپور نشان داده شده است. در تحقیقات قبلی محدودهٔ رشد باکتری Bt بین ۵/۵ تا ۸/۵ گزارش شده است (Rowe and Margaritis 1987)، ولی طبق نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق، بهترین سطح pH برای رشد بهینهٔ Bt برابر ۷/۵ تعیین شد. تأثیر پارامتر دما نیز در شکل ۱ نشان داده شده است. در محدودهٔ دمایی انتخاب‌شده برای انجام آزمایش‌ها (۲۸ تا ۳۰ درجهٔ سلسیوس)، تغییرات محسوس در میزان اسپور مشاهده

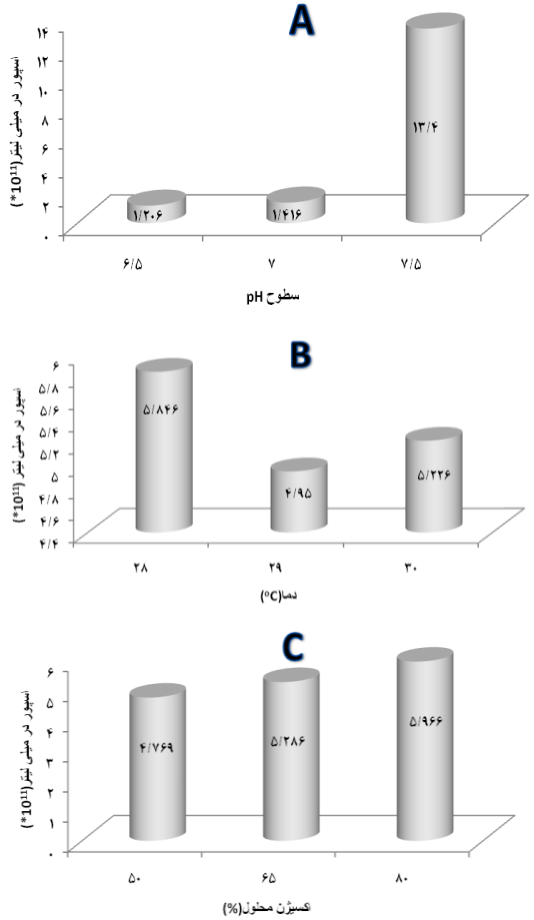
www.SID.ir

Archive of SID

نشد. پارامتر بعدی که بررسی شد، میزان هوادهی بود. از آنجاکه Bt باکتری هوازی است، بنابراین، میزان هوادهی می‌تواند روی رشد باکتری Bt و افزایش مقدار اسپور مؤثر باشد (Foda *et al*. 1985). در این تحقیق سه سطح هوادهی ۵۰، ۶۵ و ۸۰ درصد اشباع انتخاب شد. شکل ۱ تأثیر میزان هوادهی روی میزان اسپور را نشان می‌دهد، همان‌طور که ملاحظه می‌شود افزایش هوادهی از ۶۵ تا ۸۰ درصد تأثیر بیشتری نسبت به افزایش آن از ۵۰ تا ۶۵ درصد داشته است. میزان ۸۰ درصد هوادهی مقدار اسپور را تا $۰/۵۹\times۱۰^{۱۲}$ افزایش داد.

جدول ۱. نتایج مقدار اسپور و تودهٔ زیستی پس از ۷۲ ساعت تخمیر Bt، طبق طراحی تاگوچی

شمارهٔ آزمایش	pH	دما (°C)	اکسیژن محلول (٪)	اسپور در میلی‌لیتر ($\times۱۰^{۱۱}$)	تودهٔ زیستی mg/ml
۱	۶/۵	۲۸	۵۰	۱/۱۱	۰/۸۱
۲	۶/۵	۲۹	۶۵	۱/۲۳	۱/۰۲
۳	۶/۵	۳۰	۸۰	۱/۲۸	۱/۵۳
۴	۷	۲۸	۶۵	۱/۴۳	۰/۷۱
۵	۷	۲۹	۸۰	۱/۶۲	۰/۹۹
۶	۷	۳۰	۵۰	۱/۲۰	۰/۵۵
۷	۷/۵	۲۸	۸۰	۱۵	۱/۶۱
۸	۷/۵	۲۹	۵۰	۱۲	۱/۰۵
۹	۷/۵	۳۰	۶۵	۱۳/۲	۱/۱۱



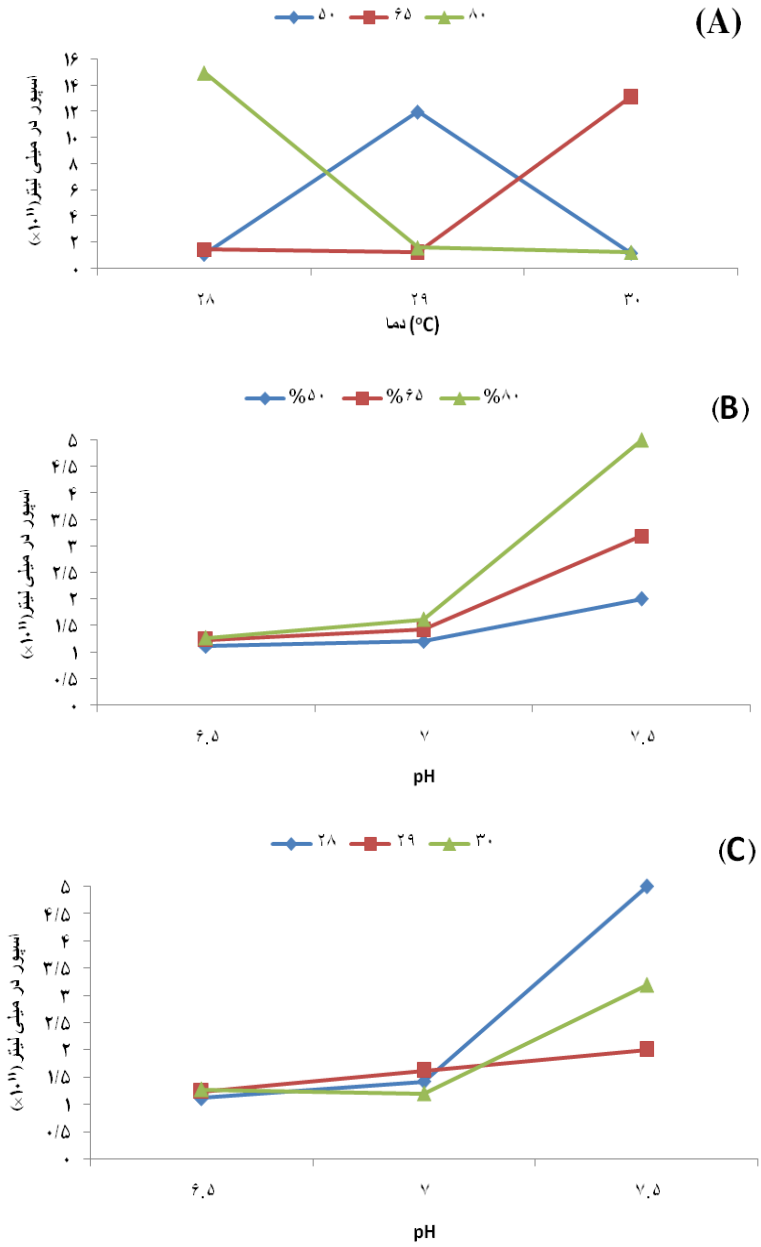
شکل ۱. تأثیر پارامترهای مختلف (pH، دما و هوادهی) بر اسپوردهی Bt در فرآیند تخمیر پس از ۷۲ ساعت

www.SID.ir

Archive of SID

میزان برهم‌کنش پارامترهای عملیاتی T×DO، DO×pH، T×pH نشان می‌دهد که بیشترین میزان برهم‌کنش پارامترهای دما و میزان هوادهی برابر با ۳۹/۹۹ درصد بوده است. طبق قوانین ترمودینامیکی تغییرات دما بر میزان هوادهی تأثیر معکوس دارد به این ترتیب که افزایش دما باعث کاهش حلالیت اکسیژن در محیط مایع می‌شود. کمترین میزان برهم‌کنش بین پارامترهای pH و دما با مقدار ۰/۲۵ درصد بود. این نتایج در شکل ۲a تا ۲c قابل مشاهده است. بعد از بررسی تأثیر هر پارامتر روی مقدار اسپور، آنالیز تأثیرات متقابل پارامترهای فرآیندی روی یکدیگر بررسی شد و مورد توجه قرار گرفت.

بررسی تأثیر متقابل پارامترها، این امکان را می‌دهد که بتوان در آزمایش‌ها بعدی سطوح پارامترهای مورد بررسی را در محدودهٔ بهتری انتخاب کرد و به علاوه نشان می‌دهد که روند تداخل اثر پارامترهای مختلف در یکدیگر چگونه است. شکل ۲ تأثیرات متقابل پارامترها را به‌صورت گراف نشان می‌دهد.



شکل ۲. نمودارهای تفکیکی برهم‌کنش پارامترهای عملیاتی، A: اثر دما بر هوادهی، B: اثر pH بر هوادهی، C: اثر pH بر دما

www.SID.ir

Archive of SID

همان‌طور که مشاهده می‌شود pH و میزان هوادهی در سطوح مختلف خود تداخلی نسبت به پاسخ سیستم ندارند. همچنین، این مورد برای pH و دما نیز صادق است. با توجه به قانون انحلال‌پذیری گازها در مایع با توجه به شکل ۲ (A) می‌توان دید که دما و میزان اکسیژن محلول در پاسخ سیستم نسبت به هم تداخل دارند. این مورد را می‌توان با توجه به قانون انحلال گازها در سیستم‌های مایع که در علم ترمودینامیک بررسی می‌شود، توضیح داد. جدول ۲ تجزیهٔ واریانس نتایج آزمایش‌ها در این تحقیق را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، درجهٔ آزادی هر آزمایش برابر با ۲ و درجهٔ آزادی کل برابر با ۸ است. مجموع کل مربعات برابر با ۲۹۶/۹۸۵ و مقدار واریانس برای pH که بیشترین تأثیر را روی اسپور دارد، برابر با ۱۴۶/۱۶ است. مقدار F یک پارامتر آماری است که مقدار آن برای هر آزمایش نباید بیشتر از مقادیر موجود در جداول مرجع آماری در طراحی آزمایش‌ها شود. همان‌گونه که مشاهده می‌شود این پارامتر برای همهٔ آزمایش‌ها دارای مقدار صفر است که حاکی از نتایج بسیار خوب آزمایش‌ها دارد و اینکه همهٔ پارامترهای مورد بررسی در نتیجهٔ کار (میزان اسپور) مؤثر بوده‌اند. با توجه به نتایج، pH و T بیشترین و کمترین تأثیر را بر تولید اسپور داشتند.

جدول ۲. نتایج تجزیهٔ واریانس تحقیق انجام‌شده

منابع تغییر	درجهٔ آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	P (%)
pH	۲	۲۹۲/۳۲۱	۱۴۶/۱۶	۲۳۶/۲۴۷	۹۸/۰۱۳
دما	۲	۱/۲۶۴	۰/۶۳۲	۱/۰۲۲	۰/۰۰۹
اکسیژن محلول	۲	۲/۱۶۱	۱/۰۸	۱/۷۴۶	۰/۳۱۱
خطا	۷				
کل	۸	۲۹۶/۹۸۵			

در تولید صنعتی باکتری Bt معمولاً pH محیط تخمیر را روی ۷ تنظیم می‌کنند که در زمان رشد باکتری ممکن است این فاکتور مقداری تغییر کند و در انتهای فاز رویشی، به حدود ۸ برسد. در کل، محدودهٔ رشد این باکتری در pH حدود ۶ تا ۸ است (Icgen *et al*. 2002; Ozkan *et al*. 2003; Rowe and Margaritis 1987). یوستن و والیس گزارش کردند که pH نقش بسزایی در سنتز توکسین توسط باکتری *Bacillus sphaericus* در داخل فرمانتور دارد (Yousten and Wallis, 1987). درجهٔ حرارت نرمال برای رشد و تولید توکسین در باکتری Bt ۳۰ درجهٔ سلسیوس است که می‌تواند این مقدار با توجه به زیرگونه و جدایه باکتری مذکور مقداری تغییر کند (El-Bendary, 2006). ازکان و همکاران دریافتند که سنتز توکسین‌های باکتری Bt با توجه به نوع توکسین می‌تواند متفاوت باشد؛ اما دامنهٔ دمایی آن‌ها بین ۲۵ـ۳۰ درجه خواهد بود (Ozkan *et al*. 2003). یوستن و همکاران گزارش کردند که دامنهٔ دمایی رشد باکتری *Bacillus sphaericus*، ۲۵ـ۴۰ درجهٔ سلسیوس است که در دمای ۳۵ درجهٔ سلسیوس تولید اسپور و توکسین متوقف می‌شود (Yousten *et al*. 1987). هوادهی و اکسیژن قابل دسترس فاکتور بسیار مهمی در تخمیر باکتری Bt در فرمانتور است (El-Bendary 2006). فودا و همکاران ناتوانی باکتری Bt در اسپورزایی تحت شرایط میزان هوادهی پایین را ذکر کردند (Foda *et al*. 1985). در تحقیقات اخیر، مشخص شده است که باکتری Bt در حین رشد و اسپورزایی نیاز به اکسیژن و هوادهی شایان توجهی دارد (Rowe, 1990). در این تحقیق میزان اکسیژن محلول بهینه برای جدایهٔ مذکور ۸۰ درصد اشباع به‌دست آمد که بیانگر اهمیت این فاکتور در رشد و تولید تودهٔ زیستی این باکتری است. دمای بهینه در این پژوهش ۲۸ درجهٔ سلسیوس تعیین شد. شرایط محیطی رشد باکتری علاوه بر نوع فنوتیپ و ژنوتیپ باکتری به نوع محیط کشت نیز بستگی دارد و هر چه محیط غنی‌تر باشد، رشد باکتری سریع‌تر و نیاز به اکسیژن افزایش می‌یابد. از طرفی فاکتورهای محیطی نیز روی همدیگر تأثیر دارند،

www.SID.ir

Archive of SID

به‌عنوان مثال هر چه دما به شرایط بهینهٔ دمای رشد باکتری نزدیک‌تر باشد، نیاز به اکسیژن باکتری افزایش می‌یابد، چرا که رشد باکتری سریع‌تر و نیاز به اکسیژن زیاد می‌شود و همان‌طور که نتایج نشان‌می‌دهد، دما و میزان هوادهی با مقدار ۳۹/۹۲ درصد بیشترین اثر متقابل را داشتند.

جدول ۳. عملکرد و شرایط بهینهٔ فرآیند در مدل تاگوچی

منابع تغییر	سطوح	سطوح توصیفی	مشارکت
pH	۳	۷/۵	۸/۰۵۸
دما	۱	۲۸	۰/۵۰۵
اکسیژن محلول	۳	۸۰	۰/۶۲۵
مشارکت کامل همهٔ عوامل			۹/۱۸۸
میانگین کلی اجرا در وضعیت کنونی			۵/۳۴۱
نتیجهٔ مورد انتظار در شرایط بهینه			۱۴/۵۲۹

نتیجه‌گیری

جدول ۳ نشان می‌دهد که روش تاگوچی به‌ترتیب در سطوح پارامترهای عملیاتی ۳، ۱ و ۳ که با مقادیر ۲۸°C، ۷/۵، ۸۰ درصد برابر است، به‌عنوان شرایط بهینه در نظر گرفته شده است. با توجه به جدول روش تاگوچی می‌توان پیش‌بینی کرد که با استفاده از این سطوح از پارامترها میزان اسپور باید برابر با $۱/۴۵۲۹\times۱۰^{۱۲}$ باشد. برای اطمینان از نتیجهٔ پیش‌بینی آزمایش مورد نظر با سطوح پیشنهادشدهٔ آزمایش با شرایط بهینه تکرار شد و نتیجهٔ حاصل برابر با $۱/۵۲\times۱۰^{۱۲}$ به‌دست آمد که نشان‌دهندهٔ تطابق خوب میان نتایج آزمایشگاهی و نتیجهٔ حاصل از مدل تاگوچی است.

REFERENCES

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

El-Bendary MA (2006) *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* biopesticides production. Journal of Basic Microbiology 46(2): 158-170.

Foda MS, Salama HS, Selim M (1985) Factors affecting growth and physiology of *Bacillus thuringiensis.* Applied Microbiology and Biotechnology 22: 50-52.

Ghribi D, Zouari N, Trabelsi H, Jaoua S (2007) Improvement of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin production by overcome of carbon catabolite repression through adequate control of aeration. Enzyme and Microbial Technology 40(4): 614-622.

Holmberg A, Sievänen R, Carlberg G (1980) Fermentation of *Bacillus thuringiensis* for exotoxin production: Process analysis study. Biotechnology and Bioengineering 22(8): 1707–1724.

Huang KM, Badger, 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(2): 325-330.

Icgen Y, Icgen B, Ozcengiz G (2002) Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis:* I. Effects of mineral elements and pH. Research in Microbiology 153(9): 599-604.

Izadyar S, Askari H, Talebi KH, Rezapanah M (2005) Bioassay of some Iranian strains of *Bacillus thuringiensis* (Bacteria: Bacillaceae) (Lep.:Noctuidae), Applied Entomology and Phytopathology 73(1): 93-104. (In Persian)

Marzban R (2002) Comparative bioassay of native Isolates of *Bacillus thuringiensis* and *B. thuringiensis* subsp. Kurstaki on Indian meal moth. Applied Entomology and Phytopathology 70(1): 83-90. (In Persian)

Marzban R, Salehi JG (2006) Distribution of *Bacillus thuringiensis* in the Agricultural soils of Iran. Biotechnology, Agriculture and the Food Industry (ISBN: 1-60021-040-6), Nova Science Publishers, Inc. (New York) USA: 95-100.

Ozkan M, Dilek, FB, Yetis,U, Ozcengiz G (2003) Nutritional and cultural parameters influencing antidipteran delta-endotoxin production. Research in Microbiology 154(1): 49-53.

Rowe GE (1990) Central metabolism of *Bacillus thuringiensis* during growth and sporulation. Ph.D. thesis, The University of Western Ontario, London, Ontario, Canada.

Rowe GE, Margaritis A (1987) Bioprocess developments in the production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*. CRC Critical Reviews in Biotechnology 6(1): 87-127.

www.SID.ir

Archive of SID

Rowe GE, Margaritis A (2004) Bioprocess design and economic analysis for the commercial production of environmentally friendly bioinsecticides from *Bacillus thuringiensis* HD-1 kurstaki. Biotechnology and Bioengineering 86(4): 377-388.

Sikdar DP, Majumdar MK, Makumdar SK (1991) Effect of minerals on the production of the delta endotoxin by *Bacillus thuringiensi*. Biotechnology Letters 13(7): 511- 514.

Yezza A, Tyagi RD, Vale´ro JR, Surampalli RY (2005) Production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides in batch and fed-batch cultures using wastewater sludge as a raw material. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 80(5): 502-510.

Yousten AA, Wallis DA (1987) Batch and continuous culture production of the mosquito larval toxin of *Bacillus sphaericus* 2362. Journal of Industrial Microbiology 2: 277-283.

Zuoari N, Jaoua S (1999) Production and characterization of metalloproteases synthesized concomitantly with d-endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki strain grown on gruel-based media. Enzyme and Microbial Technology 25(3): 364-371.

www.SID.ir