دانشگاه تهران
پردیس دانشکده های فنی
دانشکده مهندسی شیمی

عنوان پایان نامه :

# آنالیز آماری و مدلسازی فاز اسپرولاسیون در فرایند تخمیر باکتری باسیلوس تورنژنسیس جهت تحلیل تاثیر اکسیژن بر فعالیت حشره زدایی آن

دانشجو:

**اعظم نجف لو**

استاد راهنما:

**آقای دکتر صراف زاده**

استاد مشاور:

**آقای دکتر گرامی**

**پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد**
**در رشته مهندسی شیمی – بیوتکنولوژی**

۱۳۸۷ /۷/ ۱۰۱۱

۹۶۲۱۲

بنام خدا

دانشگاه تهران

پردیس دانشکده فنی

دانشکده مهندسی شیمی

معاونت تحصیلات تکمیلی
پردیس دانشکده های فنی
دانشگاه تهران

## گواهی دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد

هیأت داوران پایان نامه کارشناسی ارشد خانم اعظم نجف‌لو به شماره دانشجویی ۸۱۰۴۸۵۰۲۴ رشته مهندسی شیمی-بیوتکنولوژی با عنوان "آنالیز آماری و مدلسازی فاز اسپرولاسیون در فرآیند تخمیر باکتری تورنژنسیس جهت تحلیل تأثیر اکسیژن بر فعالیت حشره‌زدایی آن " را در تاریخ ۸۷/۰۶/۲۰

| | به عدد | به حروف |
|---|---|---|
| با نمره نهایی : | ۱۹/۵ | نوزده و پنج |

و درجه : عالی ارزیابی نمود .

| ردیف | مشخصات هیات داوران | نام و نام خانوادگی | مرتبه دانشگاهی | دانشگاه یا موسسه | امضاء |
|---|---|---|---|---|---|
| ۱ | استاد راهنمای اول | محمدحسین صراف‌زاده | استادیار | دانشگاه تهران | |
| ۲ | استاد راهنمای دوم | عباس گرامی | دانشیار | پردیس علوم دانشگاه تهران | |
| ۳ | استاد مدعو داخلی | محمدرضا مهرنیا | استادیار | دانشگاه تهران | |
| ۴ | استاد مدعو خارجی | فیروزه حقیقی | استادیار | پردیس علوم دانشگاه تهران | |
| ۵ | نماینده کمیته تحصیلات تکمیلی دانشکده مهندسی شیمی | حسین بهمنیار | دانشیار | دانشگاه تهران | |

تذکر : این برگه پس از تکمیل توسط هیات داوران در نخستین صفحه پایان نامه درج می گردد .

## تعهد نامه اصالت اثر

اینجانب اعظم نجف لو تائید می کنم که مطالب مندرج در این پایان نامه حاصل کار پژوهشی اینجانب است و به دستاوردهای پژوهشی دیگران که در این نوشته از آنها استفاده شده است مطابق مقررات ارجاع گردیده است. این پایان نامه قبلاً برای احراز هیچ مدرک هم سطح یا بالاتر ارائه نشده است.

کلیه حقوق مادی و معنوی این اثر متعلق به دانشکده فنی دانشگاه تهران می باشد.

نام و نام خانوادگی دانشجو :اعظم نجف لو

امضای دانشجو :

پدر

ای کعبه عشق

مادر

ای الهه مقدس

گرچه تلاش ابدی برای الطاف بی حد شما، ناچیز به نظر می رسد، لیکن من نهایت جهد خود را در جهت رضایت و شادمانی شما به کار خواهم بست.

امید است مورد قبول آید.

و تقدیم به همسر و فرزندم

# چکیده

با توجه به اهمیت باکتری باسیلوس تورنژنسیس به عنوان مشهورترین 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 با پایه باکتری باسیلوس تورنژنسیس یکی از فازهای مهم کشت فاز اسپورزایی است که در این تحقیق به صورت ویژه بررسی شده است و روند تغییر پارامترهایی چون غلظت سلولی، سمیت و اسپورزایی تحت تاثیر دو فاکتور اکسیژن و زمان کشت که در هزینه تولید دخالت عمده ای دارند، بررسی شده است. با توجه به آنالیز آماری صورت گرفته روشن گردید که در فاز اسپورزایی حفظ اکسیژن محلول در حوالی ۳۰ درصد غلظت اشباع می تواند به درصد بالایی از اسپورهای بالغ و سمیت مناسب، منتج شود و نیازی به هوادهی نامحدود مانند فاز رشد نمی باشد. از طرف دیگر کاهش زمان تخمیر نیز در کاهش هزینه های تولید و افزایش سرعت و میزان تولید نیز تاثیر بسزایی 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.

# تقدیر و تشکر

در آغاز لازم می دانم از زحمات بی دریغ اساتید راهنما و ارجمندم جناب آقای دکتر محمد حسین صراف زاده و جناب آقای دکتر عباس گرامی که راهنمایی های ارزنده آنها همواره راهگشای من بوده است، تقدیر و تشکر نمایم.

| فهرست مطالب | شماره صفحه |
|---|---|
| فصل اول) باکتری باسیلوس تورنژنسیس | ۱ |
| ۱-۱- مبارزه بیولوژیک | ۲ |
| ۱-۱-۱- باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis*) | ۲ |
| ۱-۱-۲-باسیلوس سرئوس (*Bacillus cereus*) | ۳ |
| ۱-۲- استفاده های صنعتی باسیلوس تورنژنسیس | ۴ |
| ۱-۲-۱- مکانیسم مرگ حشره توسط *Bt* | ۵ |
| ۱-۲-۲- کشف و استفاده از *Bt* | ۵ |
| ۱-۲-۳- نیاز های غذایی باسیلوس تورنژنسیس | ۶ |
| ۱-۲-۳-۱- منبع کربن | ۶ |
| ۱-۲-۳-۲- منبع نیتروژن | ۶ |
| ۱-۲-۳-۳- اکسیژن | ۷ |
| ۱-۲-۳-۴- مواد معدنی | ۸ |
| ۱-۳- فرایند تخمیر | ۸ |
| ۱-۴- تاریخچه توسعه صنعت تخمیر | ۸ |
| ۱-۵- انواع محصولات تخمیری | ۹ |

| فهرست مطالب | شماره صفحه |
|---|---|
| ۱-۶- بخش های اصلی فرایند های تخمیری | ۹ |
| ۱-۷- اسپورزایی باکتری باسیلوس تورنژنسیس | ۱۱ |
| ۱-۷-۱- اهمیت صنعتی باسیلوس تورنژنسیس به عنوان یک باکتری اسپورزا | ۱۴ |
| **فصل دوم) آمار ابزاری ضروری در تحلیل فرایندهای تخمیری** | ۱۵ |
| ۲-۱- مقدمه | ۱۶ |
| ۲-۲- تجزیه واریانس | ۱۶ |
| ۲-۲-۱- مدل ریاضی | ۱۶ |
| ۲-۲-۲- تجزیه واریانس یک طرفه | ۱۷ |
| ۲-۲-۳- تجزیه مجموع مربعات کل | ۱۸ |
| ۲-۲-۴- امید ریاضی اجزاء مجموع مربعات کل | ۱۹ |
| ۲-۲-۵- تجزیهٔ واریانس در گروه‌بندی یک طرفه با استفاده از مدل دوم | ۲۵ |
| ۲-۲-۶- مدل ثابت و مدل تصادفی | ۲۵ |
| ۲-۲-۷- حداقل اختلاف معنی دار | ۲۸ |
| ۲-۳- رگرسیون | ۲۹ |
| ۲- ۳-۱- تاریخچه | ۲۹ |
| ۲-۳-۲-نمودار پراکندگی | ۳۰ |

| فهرست مطالب | شماره صفحه |
|---|---|
| ۲-۳-۳- متغیر ها و خطا | ۳۱ |
| ۲-۳-۴- فرضیات | ۳۲ |
| ۲-۳-۵- روش های رگرسیون | ۳۲ |
| **فصل سوم)داده های تجربی** | ۳۴ |
| ۳-۱- مقدمه | ۳۵ |
| ۳-۲- مبنای آزمایش | ۳۵ |
| ۳-۳-شرایط آزمایش | ۳۵ |
| ۳-۳-۱- محیط های کشت | ۳۵ |
| ۳-۳-۲- میکروارگانیسم | ۳۶ |
| ۳-۳-۳- فرآیند تخمیر | ۳۶ |
| ۳-۴- روش های اندازه گیری | ۳۶ |
| **فصل چهارم) نتایج و بحث** | ۳۸ |
| ۴-۱- مقدمه | ۳۹ |
| ۴-۲- تعیین متغیرهای پاسخ | ۳۹ |
| ۴-۳- انتخاب عوامل و شناسایی فاکتورها | ۳۹ |
| ۴-۴- مطالعه اثر پارامترهای فرایند بر روی پاسخ ها | ۴۱ |

| فهرست مطالب | شماره صفحه |
|---|---|
| ۴-۵- تجزیه و تحلیل آماری مربوط به اسپور کل | ۴۵ |
| ۴-۵-۱- بررسی کفایت مدل اسپور کل | ۴۵ |
| ۴-۵-۲- نتیجه گیری موردی اول | ۴۷ |
| ۴-۶- تجزیه و تحلیل آماری مربوط به اسپور بالغ | ۴۷ |
| ۴-۶-۱- بررسی کفایت مدل اسپور بالغ | ۴۸ |
| ۴-۶-۲- نتیجه گیری موردی دوم | ۵۰ |
| ۴-۷- تجزیه و تحلیل آماری مربوط به سمیت | ۵۰ |
| ۴-۷-۱- نتیجه گیری موردی سوم | ۵۱ |
| ۴-۸- تجزیه و تحلیل آماری مربوط به تعداد کل سلول ها | ۵۱ |
| ۴-۸-۱- بررسی کفایت مدل تعداد کل سلول ها | ۵۲ |
| ۴-۸-۲- نتیجه گیری موردی چهارم | ۵۳ |
| ۴-۹- بدست آوردن جواب های بهینه | ۵۴ |
| ۴-۱۰- نتیجه گیری | ۵۴ |
| منابع | ۵۵ |
| ضمیمه | ۶۰ |

| فهرست جدول ها | شماره صفحه |
|---|---|
| جدول ۲-۱) تجزیهٔ مجموع مربعات کل برای گروه بندی یکطرفه | ۲۱ |
| جدول ۲-۲) تجزیهٔ واریانس برای گروه‌بندی یک طرفه تحت مدل $x_{ij} = \mu + \tau_j + \varepsilon_{ij}$ | ۲۲ |
| جدول ۲-۳) تجزیهٔ واریانس داده‌های حاصل از گروه بندی یک طرفه | ۲۵ |
| جدول ۲-۴) مقایسهٔ مدل ثابت و مدل تصادفی در تجزیهٔ واریانس یک طرف | ۲۶ |
| جدول۳-۱) ترکیب محیط کشت | ۳۶ |
| جدول ۴-۱) نتایج حاصل از آزمایش ها | ۴۱ |
| جدول۴-۲) نتایج حاصل از انجام تحلیل رگرسیون برای متغیر پاسخ درصد کل اسپورزاییST | ۴۵ |
| جدول۴-۳) نتایج حاصل از انجام تحلیل واریانس در متغیر پاسخ درصد کل اسپورزایی | ۴۵ |
| جدول۴-۴) نتایج حاصل از انجام تحلیل رگرسیون برای متغیر پاسخ درصد اسپورهای بالغ | ۴۸ |
| جدول ۴-۵) نتایج حاصل از انجام تحلیل واریانس در متغیر پاسخ درصد اسپورهای بالغ | ۴۸ |
| جدول۴-۶)نتایج حاصل از انجام تحلیل رگرسیون برای متغیر پاسخ سمیتT | ۵۱ |
| جدول ۴-۷) نتایج حاصل از انجام تحلیل واریانس در متغیر پاسخ سمیتT | ۵۱ |
| جدول۴-۸) نتایج حاصل از انجام تحلیل رگرسیون برای متغیر پاسخ تعداد کل سلول ها | ۵۱ |
| جدول ۴-۹) نتایج حاصل از انجام تحلیل واریانس در متغیر پاسخ تعداد کل سلول ها | ۵۲ |

| فهرست شکل ها | شماره صفحه |
|---|---|
| شکل۱-۱) جمعیت سلولی حاضر در پایان کشت باکتری باسیلوس تورنژنسیس در شرایط اکسیژن رسانی مختلف در طول فاز اسپورزایی | ۷ |
| شکل۱-۲) چرخه زیستی یک باکتری اسپورزا | ۱۱ |
| شکل ۱-۳) مراحل مختلف رشد یک باکتری اسپورزا و جزئیات فاز اسپورزایی | ۱۲ |
| شکل۱-۴) مراحل مختلف رشد و تبدیلات سلولی یک باکتری اسپورزا | ۱۳ |
| شکل۴-۱) اثرات اصلی بر روی اسپور کل تولیدی | ۴۲ |
| شکل۴-۲) اثرات اصلی بر روی اسپور بالغ تولیدی. | ۴۳ |
| شکل۴-۳) اثرات اصلی بر روی سمیت تولیدی. | ۴۳ |
| شکل۴-۴) اثرات اصلی بر روی تعداد سلول های کل | ۴۴ |
| شکل ۴-۵) نمودار نقطه ای احتمال نرمال مانده ها برای متغیر پاسخ اسپور کل | ۴۶ |
| شکل۴-۶) نمودار تراز میزان اسپور تولیدی کل بر حسب درصد اکسیژن و زمان | ۴۶ |
| شکل۴-۷) نمودار رویه پاسخ میزان اسپور تولیدی کل بر حسب درصد اکسیژن و زمان | ۴۷ |
| شکل ۴-۸) نمودار مانده ها برای متغیر پاسخ اسپور بالغ | ۴۹ |
| شکل ۴-۹) نمودار تراز میزان اسپور تولیدی بالغ بر حسب درصد اکسیژن و زمان | ۴۹ |
| شکل ۴-۱۰) نمودار رویه پاسخ میزان اسپور تولیدی بالغ بر حسب درصد اکسیژن و زمان | ۵۰ |
| شکل ۴-۱۱) نمودار مانده ها برای متغیر پاسخ تعداد کل سلول ها | ۵۲ |

| فهرست شکل ها | شماره صفحه |
| --- | --- |
| شکل ۴-۱۲) نمودار تراز تعداد سلول کل بر حسب درصد اکسیژن و زمان | ۵۳ |
| شکل ۴-۱۳) نمودار رویه پاسخ تعداد سلول کل بر حسب درصد اکسیژن و زمان | ۵۳ |

# فصل اول

# باکتری باسیلوس تورنژنسیس

## ۱-۱- مبارزه بیولوژیک

مشکلات ناشی از مصرف سموم شیمیائی درمبارزه با آفات متخصصین را بر آن داشت تا توجه بیشتری به روشهای دیگر مبارزه بنمایند که یکی از مهمترین این روشها مبارزه بیولوژیک می باشد. در اواخر قرن ۱۹ آفت شپشک استرالیایی در ایالت کالیفرنیای آمریکا به درختان پرتقال خسارت فراوانی وارد ساخت. در آن زمان عدم وجود حشره کشهای قوی و موثر موجود و همچنین بدلیل وجود پوشش مومی روی حشرات آفت حشره کشهای موجود موثر واقع نشدند. دانشمندان آمریکایی بر مبنای این اصل که شپشک استرالیایی در کشور اصلی خود یعنی استرالیا آفت چندان مهم و زیان آوری نیست نتیجه گرفتند که دشمنان طبیعی این آفت در استرالیا از تکثیر زیاد آن جلوگیری می کنند. لذا عده ای دانشمند آمریکایی برای تحقیقات در این مورد به استرالیا رفته و در میان حشراتی که بر روی این آفت فعالیت داشتند کفشدوزک کوچکی جلب توجه کرد. این کفشدوزک را به مقدار زیادی پرورش داده و در باغات پرتقال آلوده به شپشک رها کردند که نتایج بسیار مطلوبی عاید شد. در ایران نیز در سال ۱۳۱۳ همین آفت شپشک استرالیایی در مازندران خسارت زیادی به باغات مرکبات وارد کرد که اداره فلاحت وقت با وارد کردن تنها ۴۰۰ عدد کفشدوزک توانست در مدت سه سال آفت مذکور را کنترل و از ادامه خسارت آن جلوگیری کند. این سرآغازی بر مبارزه بیولوژیک بود که در آن علاوه بر شکارگرها و پارازیت ها از میکروارگانیسم ها به عنوان اصلی ترین ابزار استفاده میشود. تا کنون سه گروه حشره کش میـــــــکروبی به بازار عرضه شده که شامل حشره کشهای قارچی، ویروسی و باکتریایی می شود که نوع آخر آن رایجتر است. در طبیعت باکتریهایی وجود دارند که حشرات را در مراحل مختلف رشدشان بیمار نموده و آنها را نابود می سازند. مهمترین خانواده این باکتری ها که دارای خاصیت اسپورزایی فراوان می باشند، خانواده باسیلاسه است که گونه های مختلف آن در تولید حشره کشهای بیولوژیک اهمیت فراوانی دارند که نمونه هایی از مهم ترین این این گونه ها در ادامه آمده است [۱].

### ۱-۱-۱- باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis*)

آنها میله‌ای شکل می‌باشند. اندازه اسپورهای آن ۰/۸ در۱/۸-۱/۵ میکرومتر می‌باشد. سطح اسپورهای آزادشان بسیار ضعیف است. با مساعد شدن شرایط و رخ دادن رشد مجدد اسپورها قشر خارجی اسپور شکسته می شود. کلونی آنها بر روی محیط کشت آگار ضخیم و کدر و گاهی چین خورده و کرم یا قهوه‌ای رنگ می‌باشد. خصوصیات کلونی‌ها با توجه به ترکیب محیط کشت متنوع می‌باشد. زیر کلونی خاصیت اسیدی ضعیف و روی سطح آن حالت خنثی دارد، غالب انرژی خود را از اکسیژن بدست می‌آورند و در محیط های کشت غیر هوازی رشد و فرآیند تخمیری ضعیفی دارند. به کارگیری اکسیژن به آنها توانایی رشد و تولید ۲و۳- بوتان دی ال و $CO_2$ را به عنوان محصولات اصلی می‌دهند. هم چنین آنتی بیوتیک پلی پپتید را نیز تولید می‌نمایند. یک محیط کشت برای رشد این نوع باسیل می‌بایست حداقل شامل گلوکز و یک نوع آمونیوم باشد. pH لازم در حدود ۵/۵ الی ۸/۵ می‌باشد [۱].

### ۱-۱-۲-باسیلوس سرئوس (*Bacillus cereus*)

زمانی که اسپور این باسیل آزاد می‌شود، خود داخل پوششی قرار دارد. با مساعد شدن شرایط محیطی و دوباره شروع به رشد نمودن اسپور، این پوشش به سرعت از بین رفته و سلول زنده خارج می‌شود. کلونی‌های حاصل شده در این مورد به شکلهای متفاوت می‌باشند. محصولات فرآیند تخمیر آن در کنار گلوکز شامل ۳و ۲- بوتان دی ال، گلیسرول، اسید سوسینیک، اسید فرمیک، اسید استیک و $CO_2$ می‌باشند. بر روی محیط کشت نشاسته چنانچه حاوی یونهای کافی باشد کلونی حاصل قرمز رنگ می‌باشد و بر روی محیط کشت مغذی آگار تجمع کلونی‌های این نوع باسیل باعث تیره رنگ شدن محیط کشت می‌شوند. معمولاً برای رشد آن یک یا چند نوع آمینواسید لازم است ولی هیچ گونه ویتامینی مورد نیاز نمی‌باشد. رشد بی‌هوازی آنها نیازمند حضور گلوکز و یا نیترات می باشد [۱].

باکتری باسیلوس تورنژنسیس (*Bacillus thuringiensis* ≈ *Bt*) زیر مجموعه ای از این گروه می باشد. این باکتری یک باسیل گرم مثبت و اسپورزا میله‌ای شکل با اندازه ۱/۲-۱ در ۳/۵ میکرون می‌باشد که توسط تولید یک پروتئین کریستالی در ضمن فرآیند تولید اسپور قابل تمایز از سایرین می

باشد. پروتئین در خارج قشری که اسپورها در آن وجود دارند، تشکیل می‌شود و پس از آزاد شدن اسپورها از این قشر جدا می‌شوند.

این باسیل محصولاتی از قبیل آنزیم‌های پروتولیتیک و آنزیم اوره و اسیدهای ساکاروز و سالیسین و مواد سمی حشره کش را تولید می‌نمایند [۲]. با توجه به موضوع این پایان نامه در مورد این باکتری و کاربردهای آن توضیحات مشروح در بخش های بعدی می آید.

## ۱-۲- استفاده های صنعتی باسیلوس تورنژنسیس

باسیلوس تورنژنسیس به عنوان موثرترین عامل میکروبی موجود، نامی آشنا در کنترل آفات و حشرات است که در تولید بیش از ۹۰ درصد آفت‌کش‌های میکروبی و تعداد زیادی از گیاهان فراریخته مقاوم به حشرات کاربرد دارد [۶-۳]. این باکتری به دلیل دارا بودن توکسین‌هایی که خواص حشره‌کشی دارند، در مقابله با حشرات زیان آور کشاورزی، بهداشت و محیط زیست جایگاه مهمی دارد [۱۱-۷]. توکسین‌های این باکتری که به «دلتا-اندوتوکسین» معروفند، در حقیقت پروتئین‌های کریستالی هستند که هنگام اسپورزایی این باکتری تولید می‌شوند و با نامهایی همچون Cry1A و Cry4B و Cry11A و Cyt1A و ..... معرفی میشوند [۱۳و۱۲]. هنگامی که این توکسین ها توسط حشره بلعیده می شود، پروتئین کریستالی در محتویات و شیره قلیایی سیستم هاضمه حشره حل شده و تحت تاثیر آنزیم های پروتئاز به قطعات کوچک تر تبدیل می شود. در اثر واکنش هایی که این قطعات با سلولهای اپی تلیال روده میانی حشره انجام می دهند، دیواره روده حشره سوراخ شده و محتویات روده با هموسل مخلوط می گردد که این امر موجب بروز یک عدم تعادل بیوشیمیایی در بدن لارو می شود که برای حشره کشنده است. پس از جذب میزان کافی از توکسین و صورت پذیرفتن فعل و انفعالات مذکور ، لارو دست از تغذیه می کشد، در نتیجه ظرف چند روز از گرسنگی می میرد.

باسیلوس تورنژنسیس به عنوان یک حشره‌کش بیولوژیک اثر تخریبی روی محیط زیست و سلامت انسان ندارد [۱]. برای آن که این حشره‌کش مفید واقع شود، می‌بایست در مرحله لاروی حشره مورد استفاده قرار گیرد، زیرا *Bt* بر روی حشره‌های بالغ بی‌اثر می‌باشد [۱۴].

در طول فرآیند تخمیر، در فاز رشد *Bt* شروع به تکثیر شدن می‌نماید. زمانی که با کمبود یک سری از مواد غذایی اساسی مواجه شود، وارد مرحله اسپورزایی میشود و در نهایت پروتئین سمی کریستالی در طول این فاز تولید می‌گردد. این ماده بسیار فعال و محلول در محیط قلیایی است [۱۴].

پروتئین‌های تولید شده در فرآیند اسپورزایی که در ساخت حشره‌کش‌ها به کار می‌روند، شامل پروتئین‌های کریستالی (ICP)[1] و یا دلتا اندوتکسین می‌باشند. خاصیت اصلی حشره‌کش بودن *Bt* به ICP مربوط میشود. به طوری که باعث شده این باکتری به عنوان ماده اولیه و فعال بیش از ۹۰٪ حشره‌کش‌های دنیا مورد استفاده قرار گیرد.

### ۱-۲-۱- مکانیسم مرگ حشره توسط *Bt*

به طور کلی می توان مکانیسم مرگ حشره توسط *Bt* را به مراحل زیر دسته بندی کرد:

- بلعیده شدن اسپورها و ICP ها توسط لارو حشره.
- حل شدن ICP در مجرای هاضمه قلیایی حشره.
- فعال شدن ICP توسط پرتوآزها.
- پیوند ICP فعال با قسمتهای مخصوصی از غشای سلولهای مجرای هاضمه حشره.
- اثر سم فعال شده بر روی غشاء سلولها باعث ایجاد سوراخها و کانالهایی در این غشاها می‌شود. در نتیجه باعث تخریب سلولهای مخاطی و در نهایت سیستم هاضمه حشره می‌شود.
- رشد مجدد اسپورها یا جوانه زنی (Germination) و عفونت در داخل بدن حشره.
- مرگ لارو در اثر گرسنگی و یا عفونت در طی مدتی به اندازه یک ساعت تا چند روز [۱].

### ۱-۲-۲- کشف و استفاده از *Bt*

*Bt* اولین بار توسط یک باکتریولوژیست ژاپنی به نام ایشی واتا در سال ۱۹۰۱ در مزارع کرم ابریشم کشف شد. خصوصیت حشره‌کش بودن آن در سال ۱۹۱۱ توسط برلینر شناخته شد. اولین بار

[1] Insecticidal crystal protein

به عنوان حشره‌کش در سال ۱۹۲۰ مورد استفاده قرار گرفت. فرمول تجاری آن در سال ۱۹۵۰ تهیه شد. اولین بار در ایالت متحده به عنوان حشره‌کش در سال ۱۹۶۱ ثبت گردید.

هم‌اکنون بیش از ۶۷ گونه از آن شناسایی شده است[۱۷-۱۵]. با کنترل بیولوژیکی آفات مزارع توسط این حشره‌کش، مطالعه در مورد فرآیند تخمیر $Bt$ در سرتاسر دنیا رایج شده است. این حشره‌کش موفقیت‌های بسیاری در مورد کنترل آفات و نیز مصرف حشره‌کش‌های شیمیایی داشته است. این نوع حشره‌کش برای محصولات متنوعی از جمله: سبزیجات، سیب‌زمینی، پنبه، ذرت و . . . استفاده شده است.

برای کارخانه‌های سازنده این حشره‌کش دستیابی به بازدهی بالای فرآیندهای مربوط به $Bt$ به جهت کاهش هزینه‌ها و نیز رقابت با حشره‌کش‌های شیمیایی در بازار، بسیار مهم می‌باشد [۱۴].

### ۱-۲-۳- نیاز های غذایی باسیلوس تورنژنسیس

#### ۱-۲-۳-۱- منبع کربن

کربن به عنوان ماده سلولی، تقریبا ۵۰ درصد از وزن خشک باکتری ها را تشکیل می دهد. از منابع کربنی مورد استفاده در تخمیر $Bt$ می توان به گلوکز، فروکتوز، لاکتوز و ساکاروز اشاره کرد. ولی در مقیاس صنعتی به دلیل کاهش هزینه از گلوکز استفاده می‌شود. مقدار زیادی از گلوکز ($\frac{g}{l}<۴۰$) باعث ایجاد ممانعت در رشد می‌شود. به همین جهت غلظت گلوکز با کوتاه نمودن فاز تاخیری و باقی نگاه داشتن فاز رشد، می‌بایست کنترل شود. زمانی که در محیط کشت پروتئین نیز وجود داشته باشد، کمبود گلوکز ممانعتی برای رشد ایجاد نمی‌کند. یعنی با کاهش گلوکز، از پروتئین به عنوان منبع کربنی استفاده می‌شود [۱].

#### ۱-۲-۳-۲- منبع نیتروژن

نیتروژن ۸ تا ۱۴ درصد از وزن خشک باکتری ها را تشکیل میدهد. طیف وسیعی از ترکیبات آلی و معدنی را می توان برای برآورددن نیاز باکتری به نیتروژن به کار برد. ترکیبات آمونیوم نظیر $(NH_4)_2SO_4$ منابع کافی برای رشد نیستند. منابع نیتروژن آلی برای رشد سریع لازم می‌باشند. در

صنعت و استفاده از $Bt$ انتخاب منابع نیتروژنی بسیار مهم می‌باشد. زیرا نیتروژن گران قیمت‌ترین ماده اولیه محیط کشت می‌باشد.

### ۱-۲-۳-۳- اکسیژن

اکسیژن برای تمام فرایندهای هوازی ضروری است. نگه‌داری غلظت اکسیژن در یک مقدار مناسب یک فاکتور مؤثر در تولید باسیلوس تورنژنسیس می‌باشد [۲۰-۱۸]. اگر چه مقالات و مطالب زیادی در رابطه با اثر اکسیژن روی غلظت بیومس [۲۱] و تولید توکسین موجود می‌باشد [۲۳و۲۲] ، اما درهمه این تحقیقات شرایط اکسیژن‌رسانی یا هوادهی در طول کشت ثابت نگه داشته شده است. در صورتی که در واقعیت مقدار اکسیژن در طول کشت ثابت نمی باشد 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 باشد ولی در فازهای دیگر رشد باکتری میزان نیاز به اکسیژن به سادگی تخمین زده نمی‌شود [۲۴]. مثلا در شکل (۱-۱) دیده می شود که اگر در طول فاز اسپورزایی شرایط اکسیژن رسانی متفاوت باشد چگونه ترکیب جمعیتی سلول ها در فازهای مختلف رشد، متفاوت خواهد بود و بر فرایند تخمیر تاثیر گذار خواهد شد.