Original Article

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 11:27 +0430 on Friday September 20th 2019

بررسی آزمایشگاهی حشره‌کش میکروبی تولید شده توسط باکتری *باسیلوس تورینژینسیس* از پساب کارخانه نشاسته به منظور کنترل بیولوژیک لارو کولکس پیپینس

علی اصغر قالچی‌ها[1*]، عبدالحسین دلیمی اصل[1]، حسن عسکری[2]

۱- گروه حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۲- موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، تهران، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۰۹/۰۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۱۲/۱۴

چکیده

زمینه و هدف: اپیدمی بیماری‌های خطرناک و آزار و اذیت ناشی از گزش *Culexpipiens*، اهمیت پزشکی این حشرات را بیشتر کرده است. امروزه، موفق‌ترین حشره کش‌های زیستی، توسط باکتری‌هایی از جنس *باسیلوس* تولید می‌شوند که در مرحله‌ی تشکیل اسپور، اندوتوکسین‌های پروتئینی کریستاله تولید کرده و هنگام ورود به روده حشرات، تحت شرایط قلیایی، فعال شده و باعث صدمه به غشای سلول‌های روده و تشکیل سوراخ در غشا می‌شوند. استفاده از پساب‌هایی که از کارخانجات مواد غذایی حاصل می‌شوند، راهی مناسب جهت تولید محصولات با ارزش، مانند حشره‌کش‌های زیستی است. هدف از این تحقیق، استفاده از پساب کارخانه تولید نشاسته برای تولید حشره‌کش زیستی توسط *B. thuringiensis* در سطح آزمایشگاهی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، باکتری *Bacillus thuringiensis*(H14) بر روی پساب کارخانه تولید نشاسته رشد داده شد و طی عمل تخمیر، پروتئین کریستاله با وزن مولکولی ۶۵ کیلو دالتون، تولید گردید. پروتئین حاصل، بر روی لارو حشره‌ی *Culex pipiens* اثر داده شد و میزان مرگ و میر بعد از گذشت ۲۴و ۴۸ ساعت، ارزیابی و با نمونه کنترل، مقایسه گردید.

نتایج: در این مطالعه، تعداد کل باکتری‌ها و اسپورهای تولید شده در مرحله تخمیر، شمارش شد که در محیط پلیت کانت آگار به ترتیب $۱۲/۵\times۱۰^{۸}$ و ۴۸×۱۰^{۷} کلنی در هر میلی‌لیتربود.

نتیجه‌گیری: این پژوهش نشان داد، تولید دلتا اندوتوکسین، با اسپورزایی، رابطه دارد و بیشترین میزان اثر سمیت پروتئین‌های کریستالی در بالاترین غلظت اسپورها می‌باشد.

کلمات کلیدی: **حشره‌کش‌های میکروبی، پساب، دلتا اندوتوکسین، *باسیلوس***

مقدمه

از نظر تاریخی، بخش عمده‌ی ضایعاتی که توسط انسان تولید می‌شود، مستقیما وارد محیط زیست می‌گردد. به دلیل افزایش روز افزون جمعیت، این مساله باعث آلودگی شدید منابع آب و خاک شده و سلامت انسان را تهدید می‌کند. در قرن نوزدهم، مشکل به حدی جدی شد که روش‌هایی برای تصفیه این ضایعات ارائه گردید و کمک کرد تا آب، از نظر شیمیایی و بیولوژیکی بی‌خطر شود (۱). در کشورهای پیشرفته، مقدار زیادی از فاضلاب‌های صنعتی و خانگی به روش بیولوژیکی تصفیه می‌شوند اما از پساب‌های خاص، به‌ویژه آن‌هایی که از کارخانجات مواد غذایی، حاصل می‌شوند، می‌توان با فرآوری‌هایی برای تولید محصولات با ارزش افزوده، استفاده کرده و از آن‌ها مواد قابل ارائه به بازار مانند پروتئین‌ها، چربی‌ها و یا حشره‌کش‌های بیولوژیکی را بازیافت نمود (۲، ۳). استفاده از تکنولوژی‌های نوین جهت تولید حشره‌کش‌های زیستی، باعث می‌شود که نیاز به حشره کش‌های مصنوعی و شیمیایی کاهش یابد. هزینه‌ی سالانه کنترل شیمیایی آفات کشاورزی و حشرات، که عامل بیماری‌ها را به انسان و دام منتقل می‌کنند، سالانه بیش از ۳۵۰ میلیون دلار برآورد شده است. علاوه بر هزینه‌ی زیاد، مصرف حشره‌کش‌های رایج، به علت عدم اختصاصیت این ترکیبات، بقاء در محیط زیست و تجمع آن‌ها که باعث بیماری‌های حیوانات، به ویژه پرندگان، می‌شود، مشکل آفرین است (۴). بدون شک، اگر از مسئله اپیدمی‌های ناشی از حشرات و بیماری‌های خطرناکی که این گروه از موجودات، جان آدمی را در معرض آن‌ها قرار می‌دهند، بحثی به میان نیاوریم، می‌بایست آزار و اذیتی را که ناشی از گزش این حشرات است را مورد توجه قرار دهیم. از آن جمله، وجود پشه‌های کولیسیده و نوعی از آن به‌نام *کولکس* و وفور فوق العاده آن در مناطق شهری است که علاوه بر انتقال برخی از بیماری‌ها نظیر فیلاریازیس و آنسفالیت‌های ویروسی، گزش آن در افراد حساس و به‌خصوص کودکان، موجب ناراحتی‌های موضعی، خارش، سوزش، ورم و عفونت‌های ثانوی می‌شوند و همچنین موجب عدم استراحت شبانه و در نتیجه ناراحتی روحی و تحریکات عصبی می‌گردد. موجودیت پشه‌های *Culexpipiens*Linnaeus 1758، از مدت‌ها پیش

* **نویسنده مسئول: علی اصغر قالچی‌ها**، گروه حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. تلفن: ۰۹۱۲۲۶۴۷۲۲۴
Email: A.Ghalchiha@gmail.com

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 11:27 +0430 on Friday September 20th 2019

مورد توجه قرار گرفته بود، اما از سال ۱۹۶۰ به دلیل طغیان و حمله به انسان‌ها و اهمیت آن در پزشکی، به عنوان مشکل جهانی مطرح شد. پراکندگی پشه‌های این کمپلکس از اروپا، نواحی جنب حاره‌ای در آسیا و آفریقا تا قسمت‌های مرکزی آمریکای شمالی، یک سوم جنوبی آمریکای جنوبی و استرالیا ادامه دارد (۵). وفور پشه‌های *کولکس پیپینس* رابطه نزدیکی با توسعه فعالیت‌های اقتصادی و قلمروهای جدید دارد. تغییر و تخریب تالاب‌ها، احیای قلمروهای خشک، همه این‌ها تاثیرات زیادی در فراوانی پشه‌ها در یک منطقه دارد. بر اساس مطالعات انجام شده بین گونه‌های مختلف جنس کولکس، فعالیت این گونه‌ها، از فروردین ماه شروع و تا اواسط و گاهی اواخر پائیز نیز ادامه دارد. همچنین، فرم *کولکس پیپینس مولستوس*، در فصل زمستان، به‌خصوص در منازلی که دارای دستگاه تهویه مطبوع می‌باشند، گاهی برای خونخواری به انسان حمله می‌کنند. این گونه در زهکش‌ها، آب‌های کثیف و چاه فاضلاب منازل، تخم‌گذاری کرده و پس از طی دوره لاروی و پوپ، به منظور خونخواری، از دهانه‌ی چاه‌ها، لوله‌ی هواکش و سایر منافذی که در کف حمام یا آشپزخانه وجود دارد، خارج می‌گردد. این‌گونه از پشه، بر طبق گزارش زعیم در بیشتر نواحی ایران پراکندگی دارد (۶). کنترل حشرات با استفاده از عوامل بیماریزای میکروبی (باکتری‌ها، قارچ‌ها، پروتوزواها و ویروس‌ها)، محاسن متعددی در مقایسه با سموم شیمیایی دارد. این عوامل، اختصاصی عمل کرده و به دلیل استفاده از سوبسترای ارزان قیمت، هزینه تولید آن‌ها نسبتا کم است. بسیاری از آن‌ها، دامنه فعالیت کمی دارند و بقایایی از خود در محیط باقی نمی‌گذارند. ایجاد مقاومت نیز در آن‌ها بسیار غیر محتمل است. البته بسیاری از این ارگانیسم‌ها، به سادگی در مقیاس وسیع قابل کشت نیستند (۷). والرو و همکاران بیان کردند که حشره‌کش‌های زیستی که توسط باکتری *B. thuringiensis* تولید می‌شوند، ترکیبات بیولوژیکی به‌شدت اختصاصی برای کنترل حشرات می‌باشند که باعث ایجاد محیط سالم‌تر، بهبود سلامت انسان‌ها و تولید غذای ایمن می‌شود (۸).

امروزه، موفق‌ترین حشره‌کش‌های زیستی، سموم حاصل از باکتری های گرم مثبت از جنس *باسیلوس* می‌باشند. باکتری *Bacillus thuringiensis*(H14) که برای حشرات اثر تخریبی دارد، جزء پروکاریوت‌ها است و برای رشد، به نور نیاز ندارد. این باکتری‌ها در بسیاری از محیط‌های کشت ساده‌ی آزمایشگاهی مانند محلول آب‌گوشت مغذی (Nutrient broth)، در شرایط هوازی و در دمای بین ۴۰-۱۵ درجه سانتی‌گراد (دمای بهینه ۳۰ درجه سانتی‌گراد) به راحتی رشد می‌کنند.

این باکتری، چندین توکسین تولید می‌کند که شامل موارد زیر است:

۱- آلفا اگزوتوکسین: این سم، علاوه بر حشرات، برای موش و دیگر مهره‌داران، سمی می‌باشد.

۲- بتا اگزوتوکسین: در برخی سویه‌های این باکتری، تولید می‌شود و بر روی پستانداران عوارض عمده‌ای دارد. این توکسین، برای همه موجودات زنده از جمله انسان (ایجاد صدمات ژنتیکی به سلول‌های خونی)، سمی و خطرناک بوده و وجود آن در فرآورده‌های تجاری، در برخی از کشورها ممنوع می‌باشد.

۳- گاما اگزوتوکسین: این توکسین، برای حشرات، سمی نمی‌باشد.

۴- دلتا اندوتوکسین: در مرحله مرگ باکتری و تشکیل اسپور تشکیل می‌شود (۹). امروزه در فرآورده‌های تجاری، سویه‌هایی از باکتری *B. thuringiensis* که دلتا اندوتوکسین تولید می‌نمایند، استفاده می‌شود (۱۰).

این باکتری‌ها در محل تشکیل اسپور، اندو توکسین‌های پروتئینی کریستاله تولید می‌کنند. این ترکیبات پروتئینی کریستاله، باعث ایجاد آسیب در غشای سلول‌های روده حشرات و تشکیل سوراخ در حشرات می‌شوند و عمل تجزیه کردن سلول‌های اپی‌تلیال را انجام می‌دهند (۱۱). این حشره‌کش‌ها، از نوع تماسی نیستند و باید توسط حشره مورد نظر مصرف شوند. پروتئین‌های کریستاله حشره‌کش، باید به صورت قابل حل درآیند تا بتوانند از نظر بیولوژیکی، به شکل سم فعال عمل کنند. عمل حل شدن سم کریستاله در قسمت میانی روده حشره، که یک محیط قلیایی است، صورت می‌گیرد و آنزیم‌های روده، از طریق عمل پروتئولیز، باعث فعال شدن آن‌ها می‌شوند (۱۲). ایمنی انسان و دام از این فرآورده‌ها به این علت است که شرایط روده انسان و دام بسیار اسیدی می‌باشد و برای این سموم نامساعد است؛ چرا که pH باعث دناتوره شدن محلول پروتئینی کریستاله حشره‌کش شده و آن‌ها را برای هیدرولیز به‌وسیله پروتئاز روده آماده می‌سازد. حشرات مسموم شده، ممکن است به سرعت تلف شوند یا به علت ناشی از مسمومیت خون، عمل تغذیه آن‌ها متوقف شده و در طی ۲ تا ۳ روز از بین بروند (۱۳).

برخی از فرآورده‌های حشره‌کش، نظیر سم، که حاصل از یک گونه یا زیرگونه خاص از باسیلوس هستند، می‌توانند برای راسته کامل حشرات سمی باشند، در حالی‌که برخی دیگر ممکن است تنها علیه چند گونه یا حتی فقط یک گونه، مؤثر واقع شوند. از دهه ۱۹۶۰، باکتری *B. thuringiensis*، از گسترده‌ترین حشره‌کش‌های میکروبی مورد استفاده می‌باشد. اغلب فرآورده‌های تجاری حاصل از *B. thuringiensis*، هم حاوی سم پروتئینی و هم اسپور می‌باشند، در حالی‌که برخی دیگر فقط حاوی ترکیب سمی هستند. مقدار مصرف این سموم، ۴ تا ۶ گرم در هر هکتار است که برای کنترل بیش از ۴۰ حشره مختلف که باعث خسارت به کشاورزی و جنگل‌ها شده و برخی، عامل بیماری‌های انسان هستند، به‌کار می‌روند. اندوتوکسین‌های تولید شده توسط *B. thuringiensis*، برای تعدادی از حشرات، به طور اختصاصی عمل کرده و هنگامی که در معرض نور ماوراء بنفش یا سایر عوامل محیطی قرار می‌گیرند، به‌سرعت به ترکیبات غیرسمی تبدیل می‌شوند. این ویژگی باعث شده است که فرآورده‌های موجود، به عنوان فرآورده مناسب برای محیط زیست شناخته شوند. البته، کاربرد آن به‌دلیل قیمت بالای تولید در مرحله تخمیر محدود شده است (۷). استندباری و همکاران، بیان کردند که ۵۹-۳۵ درصد از هزینه تولید، مربوط به محیط‌های تخمیر است بنابراین، تولید تجاری سم پروتئینی حاصل از *B. thuringiensis* با هدف بازده بالا و کمترین هزینه، باید از مواد خام قابل دسترس و ارزان قیمت استفاده کرد (۱۴).

عبدالحمید، گزارش‌هایی مبنی بر کاهش هزینه تولید سم میکروبی در اثر جایگزینی ترکیبات محیطی گران قیمت، مانند آرد سویا و یا پودر ماهی با ضایعات و پساب‌های صنعتی (نشاسته کاساوا، نشاسته ذرت، سبوس گندم، خیساب ذرت، ملاس و آب پنیر) ارائه داد (۱۵). این ترکیبات، حاوی عناصر مغذی ضروری برای رشد، تولید اسپور و تشکیل کریستال‌های پروتئینی توسط *B. thuringiensis* است (۱۶). پساب کارخانه تولید نشاسته، محیط کشت تخمیر مناسبی برای تولید پروتئین کریستاله توسط باکتری *B. thuringiensis* است، ولی فعالیت

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 11:27 +0430 on Friday September 20th 2019

حشره‌کشی پروتئین‌های سمی، فقط وابسته به نوع محیط کشت تخمیر نیست، بلکه میزان فعالیت حشره‌کشی آن‌ها، به عواملی همچون فعالیت کالچر باکتریایی، نوع ترکیبات محیط، منابع کربن و نیتروژن و نسبت آن‌ها (C/N) و میزان دلتا اندوتوکسین تولید شده، بستگی دارد. نتایج مشابه توسط کانگ و همکاران در سال ۱۹۹۲ بیان شد (۱۷).

هدف از این تحقیق، استفاده از پساب کارخانه تولید نشاسته برای تولید حشره‌کش زیستی توسط *B. thuringiensis* در سطح آزمایشگاهی می‌باشد که علاوه بر کاهش آلودگی محیط زیست، سبب تولید محصولاتی با ارزش افزوده می‌شود.

مواد وروش‌ها

میزبان: نمونه‌گیری بالغ به روش صید کلی، از فروردین لغایت آبان ماه ۱۳۸۸ و طی شش نوبت صورت گرفت. پشه‌های بالغ، از منطقه‌ای به نام جاجرود واقع در شرق شهر تهران، که وفور پشه *کولکس پیپینس* در آن زیاد است، صید گردید. از آن‌جا که پشه‌های بالغ *کولکس پیپینس*، درون خوار و درون دوست هستند و شب‌هنگام به منظور خون‌خواری و استراحت به داخل اماکن مسکونی وارد می‌شوند، صید آن‌ها توسط پشه بند، در طول شب و در داخل منازل مسکونی صورت گرفت. پشه‌های جمع آوری شده، ابتدا با استفاده از کلید کولکس‌های ایران که توسط زعیم و کرانستون تهیه شده است، شناسایی شدند که همگی آن‌ها *Culexpipienspipiens* بودند. پرورش *کولکس پیپینس*، در انسکتاریوم گروه حشره‌شناسی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، صورت پذیرفت. اولین تخم‌گذاری، پس از گذشت ۳ روز از قرار دادن پشه‌های نر و ماده در داخل قفس و خونخواری هر شب آن‌ها از هامستر صورت گرفت. تخم‌های جمع آوری شده، در داخل ظروف پرورش آزمایشگاهی قرار گرفتند. پس از گذشت ۵-۳ روز تفریخ، و لاروهای سن یک از آن خارج شدند.

محیط کشت: میزان عناصر موجود در پساب کارخانه تولید نشاسته ممتاز شیراز، در جدول ۱ نشان داده شده است. بر این اساس، پساب کارخانه تولید نشاسته تهیه و به عنوان محیط کشت استفاده شد.

جدول ۱ـ میزان عناصر موجود در پساب کارخانه تولید نشاسته

مواد جامد کل (گرم بر لیتر)	۱۷
مواد جامد سوپانسیون (گرم بر لیتر)	۱۱
(مواد جامد سوپانسیون فرار (گرم بر لیتر	۸
pH	۳/۸۱
کربن کل (٪ماده جامد خشک)	۵۱/۸۳
نیتروژن کل (٪ماده جامد خشک)	۸/۸۹
فسفر کل (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۱۴/۳۳

سویه باسیلوس تورینژینسیس: در این تحقیق، از باکتری *Bacillus thuringiensis*(H14)، استفاده شد. این باکتری، از بخش تحقیقات بیولوژیک آفات موسسه گیاه پزشکی کشور تهیه گردید. برای تهیه کالچر فعال، ابتدا باکتری در محیط محلول آب‌گوشت مغذی کشت داده شد و در ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت، گرم‌خانه‌گذاری و سپس در دمای ۴ درجه سانتی گراد، نگهداری گردید (۱۸، ۱۹).

آماده سازی ماده تلقیح شده: این عمل در دو مرحله صورت گرفت. ابتدا باکتری مورد نظر با ۱۰۰ میلی لیتر آب‌گوشت تریپتیکاز سوی که در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه سترون شده بود، مخلوط گشته و ۲۴ ساعت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. سپس، ۲٪ حجمی از محیط کشت تلقیح شده برداشته شده و با ۳۰۰ میلی لیتر دیگر از محیط کشت آب‌گوشت تریپتیکاز سوی سترون شده مخلوط گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و در نهایت، ۲٪ حجمی از محیط کشت تلقیح شده که حاوی سلول‌های رشد کرده بود، برداشته شده و به محیط کشت تخمیر منتقل گردید. pH محیط کشت برای تلقیح در تمام مراحل، برابر با ۷ تنظیم گردید (۱۹).

تخمیر: در ابتدا با افزون سود، pH محیط کشت (پساب کارخانه) بر روی ۷ تنظیم شد و محیط در ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۳۰ دقیقه سترون گردید. سپس محیط کشت تلقیح شده به میزان ۲٪ حجمی به محیط کشت تخمیر اضافه شده و عمل تخمیر به مدت ۳۵-۳۰ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در شرایط هوازی صورت پذیرفت. در این مرحله، پروتئین‌های کریستاله توسط باکتری تولید گردید (۲۰،۲۱).

شمارش تعداد باکتری و اسپورها: ابتدا، نمونه‌ها با روش رقیق‌سازی سریالی توسط کلرید سدیم ۰/۹ درصد، رقیق شده و این عمل تا رقت 10^{-7} ادامه داده شد. ۰/۱ میلی‌لیتر از نمونه‌های رقیق شده، به محیط پلیت کانت آگار منتقل شد و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری گردید. برای شمارش اسپورها، ابتدا نمونه‌ها در حمام آب ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه حرارت داده شدند و سپس سرد شده تا سلول‌های رویشی، از بین رفته و فقط اسپورها باقی بمانند. کشت، مشابه مراحل بالا انجام شد و در نهایت، کلنی‌های حاصل، شمارش شده و تعداد آن‌ها در هر میلی‌لیتر گزارش گردید (۲۲).

الکتروفورز SDS-PAGE بر روی نمونه حاوی پروتئین‌های کریستاله: برای بررسی پروتئین‌های کریستاله، الکتروفورز SDS-PAGE انجام شد (۲۳). برای ژل جدا کننده، گرادیان غلظت ۵٪ تهیه گردید. نشانگر فرمنتاز، به عنوان استاندارد، استفاده شد و وزن مولکولی پروتئین حاصل با استفاده از پروتئین‌های استاندارد، تعیین گردید.

ارزیابی زیستی: برای تعیین قدرت حشره‌کشی نمونه‌ها، مخلوطی از اسپور و کریستال‌های *B. thuringiensis*، بر لارو *C. pipiens* تاثیر داده شد و میزان مرگ و میر ارزیابی گردید. برای این منظور، غذای آن‌ها به حشره‌کش زیستی آلوده شد و در ۵ ظرف جداگانه قرار داده شدند. سپس ظرف‌های کوچکی از آب در محیط کشت آن‌ها قرار داده شد و در هر ظرف ۱۰ لارو اضافه گردید. سپس در دمای معمولی، تحت شرایط هوازی نگهداری شدند و میزان مرگ و میر آن‌ها بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت محاسبه گردید (۲۲).

آنالیز آماری: به منظور تجزیه و تحلیل نتایج، برنامه کامپیوتری SPSS نسخه ۱۹ و اطلاعات به‌دست آمده از آزمون ارزیابی زیستی با استفاده از T -test، تحلیل و برای تعیین اختلاف بین میانگین نمونه‌ها، آزمون دانکن بکار برده شد و مقایسه در سطح ۵ درصد صورت پذیرفت.

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 11:27 +0430 on Friday September 20th 2019

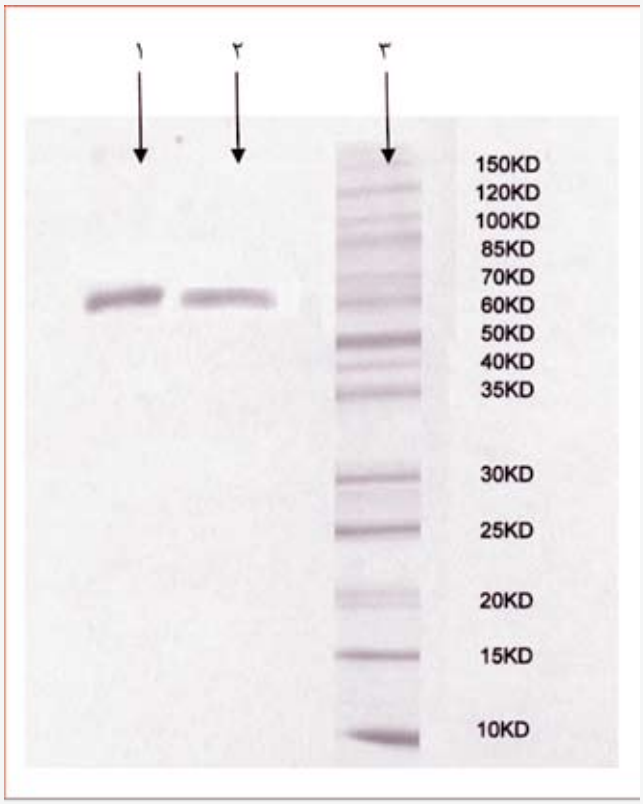
نتایج

رابطه شمارش اسپور و میزان پروتئین کریستالی: طبق نتایج بدست آمده در این تحقیق، تعداد کل باکتری‌ها و اسپورهای شمارش شده، با استفاده از محیط کشت پلیت آگار به ترتیب $۱۲/۵\times۱۰^{۸}$ و ۴۸×۱۰^{۷} کلنی در هر میلی‌لیتر بود (جدول۲).

جدول ۲ـ تعداد کل باکتری و اسپورهای حاصل از *Bacillus thuringiensis*(H14) در محیط کشت تخمیر بعد از ۲۴ ساعت

شمارش کل باکتری (cfu/ml)	$۱۲/۵\times۱۰^{۸}$
شمارش اسپور (cfu/ml)	۴۸×۱۰^{۷}
اسپورزایی (٪)	۳۸/۴

الکتروفورز: وزن مولکولی پروتئین کریستاله، با روش SDS-PAGE و با استفاده از پروتئین نشانگر اندازه‌گیری شد و حدود ۶۵ کیلو دالتون تعیین گردید (شکل ۱).



شکل ۱ ـ الگوی SDS-PAGE مربوط به پروتئین کریستاله تولید شده توسط باکتری *B. thuringiensis* (H14). ۱. پروتئین کریستاله ۲. پروتئین کریستاله (تکرار) ۳. نشانگر فرمنتاز

ارزیابی زیستی: نتایج بدست آمده حاکی از آن است که میزان مرگ و میر لاروهای *C. pipiens*، نسبت به نمونه‌های کنترل (فاقد سم پروتئینی حاصل از باکتری)، در سطح ۵ درصد به صورت معنی‌دار افزایش داشته است. البته میزان مرگ و میر لاروها در مدت زمان ۴۸ ساعت نگهداری در محیط حاوی غذای مصنوعی آغشته به سم پروتئینی، نسبت به ۲۴ ساعت، افزایش بیشتری داشته است (جدول ۳).

جدول ۳ـ مقایسه مرگ و میر لاروهای *C. pipiens* در اثر سم حاصل از باکتری *B. thuringiensis* (H14)

نمونه/زمان	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت
کنترل (بدون سم)	۰/۰۰a*	۰/۵۰a
پلیت‌های حاوی سم	۹/۰۰b	۹/۶۰b

*حروف متفاوت در هر ستون، نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشد ($p<0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری

Baum و همکاران نشان دادند که تولید دلتا-اندوتوکسین، با اسپورزایی *B. thuringiensis* رابطه دارد و بیشترین میزان اثر سمیت پروتئین‌های کریستالی در غلظت بالای اسپورها رخ می‌دهد (۲۴). تیرادو- مونتیل و همکاران بیان کردند حضور اسپورها در محیط کشت اثر تقویت‌کنندگی بر فعالیت کریستال‌های سم و اثر آن‌ها دارد (۲۵). البته تحقیقات یزا و همکارش نشان داد که دانسیته بالای اسپور نیز می‌تواند یک عامل ممانعت‌کننده برای تشکیل اندوتوکسین باشد (۱۳).

Lachhab و همکاران بیان کردند در محیط پساب نشاسته، باکتری *B. thuringiensis*، فاز تاخیری کوتاهی دارد و سریعا می‌تواند خود را با شرایط محیطی، وفق داده، آنزیم‌های ویژه برای کاهش مواد آلی موجود در پساب تولید کند و انرژی مورد نیاز خود را برای انجام اعمال سلولی تامین نماید. اما این باکتری، در محیط حاوی نشاسته، به‌دلیل دارا بودن میزان زیاد کربوهیدرات قابل دسترس و نیتروژن (جدول ۱)، مرحله رشد طولانی داشته و مرحله اسپورزایی آن اندکی به تاخیر می‌افتد (۲۶). *B. thuringiensis* در شروع مرحله اسپورزایی، برای هیدرولیز مواد آلی مورد نیاز خود چندین نوع پروتئاز تولید می‌کند که میزان تولید آنزیم پروتئاز بستگی به غلظت کربن و نیتروژن قابل دسترس در محیط دارد. هرچه میزان این ترکیبات آلی بیشتر باشد، تولید پروتئاز، کاهش می‌یابد. بنابراین، پساب کارخانه تولید نشاسته به‌دلیل دارا بودن ترکیبات آلی، محیط مناسبی برای تولید سم میکروبی حاصل از *B. thuringiensis* می‌باشد. چنان‌چه زمان تخمیر بیشتر شود، میزان فعالیت آنزیم پروتئاز بیشتر گردیده و باعث هیدرولیز پروتئین کریستاله تولیدی شده و فعالیت سم حاصل، کاهش می‌یابد. پس، مدت زمان مرحله تخمیر باید معین و حدود ۳۵-۳۰ ساعت در نظر گرفته شود (۱۹). نتایج به دست آمده در این تحقیق با نتیجه تانسی و همکاران که بر روی محیط کریستاله، SDS-PAGE انجام دادند مطابقت دارد. آن‌ها مشاهده کردند که پروتئین کریستاله دلتا اندوتوکسین حاصل از *B. thuringiensis* که در مرحله اسپورزایی باکتری تولید می‌شود، حدود ۱۳۰ کیلو دالتون می‌باشد که به دلیل فعالیت بالای آنزیم پروتئاز، این باکتری در محیط کشت شکسته شده و تولید دلتا اندوتوکسین با وزن مولکولی ۶۵ کیلو دالتون می‌کند (۱۱).

با استفاده از پساب کارخانه تولید نشاسته به عنوان محیط کشت تخمیر، و تلقیح آن با باکتری *B. thuringiensis*، سم پروتئینی به صورت

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 11:27 +0430 on Friday September 20th 2019

کریستاله با وزن مولکولی ۶۵ کیلو دالتون تولید شد که باعث از بین بردن لارو *C. pipiens* گردید. این نوع حشره‌کش زیستی، در مقایسه با سموم شیمیایی، علاوه بر این که مزایایی همچون هزینه تولید کم در نتیجه استفاده از سوبسترای ارزان قیمت و عملکرد اختصاصی دارد، باعث کاهش آلودگی محیط زیست و تولید غذای ایمن و سالم خواهد شد و می‌تواند با تحقیقات گسترده‌تر، کاربرد وسیعی در صنعت کشاورزی و بهداشت به‌ویژه در ایران داشته باشد.

جهت تکمیل مطالعه حاضر و مطالعات آینده، پیشنهاداتی به شرح زیر ارائه می شود:

۱- غلظت‌های مختلف از محیط‌های کشت مواد افزودنی، در شرایط صحرایی، در برابر دیگر گونه‌های کولکس مورد ارزیابی قرار گیرد.

۲- از محیط کشت دیگری مانند سبوس گندم برای ایجاد محیط کشت مناسب برای باکتری استفاده شود.

۳- تاثیرات این محیط کشت نیز بر روی باکتری *باسیلوس اسفریکوس* آزمایش شود.

References

1. Herzka A, Booth RG. Food industry wastes. 2nd ed. London: Applied Science Publishers; 1981. P. 210-214.
2. Crueger W, Crueger A. Biotechnology Industrial Microbiology. 1st ed. Boston: Kluwer Academic; 2000. P.571-584.
3. Lau D. Utilization of sewage sludge as a resource for protein extraction and recovery. CORE. 1981;4(3):193-200.
4. Fong K, Tan HM. Isolation of a microbial consortium from active sludge for the biological treatment of food waste. JOMB. 2000;16(1):441-443.
5. Vinogradova EB. The Culex p. pipiens, Golovatch SI, Culex p. pipiens Mosquitoes: Taxonomy, Distribution, Ecology, Physiology, Genetics And Control. 1st ed. Sofia of Bulgaria: PENSOFT; 2000. P. 250.
6. Zaim M, Cranston PS. Checklist and keys to the Culicinae of Iran (Diptera: Culicidae). Mosq Syst. 1986;18(1):45-233.
7. Waites MJ, Morgan NL, Rockey JS. Industrial Microbiology: An Introduction. 1st ed. New York: Academic press; 2001. P.425-430.
8. Valero JR, Mohammedi S, Payne NJ, Tyagi RD. Microbial control of defoliating forest insects. RRDM. 1999;3(1):455–464.
9. Zhong Ch, Edelson SG. Characterization of a Bacillus thuringiensis δ-Endotoxin Which Is Toxic to Insects in Three Orders. JIP. 2000;76(2):131-139.
10. Bravo A, Gill SS, Soberón M. Mode of action of Bacillus thuringiensis Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. TOX. 2007;49(4):423-435.
11. Curtis CF. Low-cost sanitation systems and the control of flies and mosquitoes. TRSTMH. 1984;78(1):298-304.
12. Knowles BH. In Advances in Insect Physiology. 1st ed. London: Academic press; 1994.P.245-308.
13. Yezza A, Tyagi RD. Correlation between entomotoxicity potency and protease activity produced by Bacillus thuringiensis var. kurstaki grown in wastewater sludge. PBIO. 2006;41(4):794-800.
14. Stanbury PF, Whitaker A, Hall SJ. Principles of Fermentation Technology. 2nd ed. New York: Elsevier Science Ltd; 1995.P.75-95.
15. Abdel Hameed A. Stirred tank culture of Bacillus thuringiensis H-14 for production of the mosquitocidal δ-endotoxin: mathematical modelling and scaling-up studies. JMBT. 2001;17(1):857–861.
16. Kroyer GT. Bioconversion of food processing wastes. AOME. 1993;2(1):30-34.
17. Kang BC, Lee SY, Chang HN. Enhanced spore production of Bacillus thuringiensis by fed batch culture. BTL. 1992;14(8):721–726.
18. Yezza A, Tyagi RD. Bioconversion of industrial wastewater and wastewater sludge into Bacillus thuringiensis based biopesticides in pilot fermentor .BRT. 2005;97(15):1850-1857.
19. Brar S, Verma M, Tyagi RD. Bacillus thuringiensis fermentation of hydrolyzed sludge – Rheology and formulation studies. JFUMS. 2007;67(4):674-683.
20. Brar SK, Stauffer KR. Sludge based Bacillus thuringiensis biopesticides: Viscosity impacts. WRS. 2005;39(13):3001-3011.
21. Adjalle KD, Brar SK, Verma M, Tyagi R, Valero JR, Surampalli RY. Ultrafiltration recovery of entomotoxicity from supernatant of Bacillus thuringiensis fermented wastewater and wastewater sludge. 1st ed. Kansas city: Process Biochemistry; 2007.P.1-39.
22. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. Nature.1970; 227(1): 680–685.
23. Mohammedi S, Subramanian S, Yan S, Tyagi RD, Valéro JR. Molecular screening of Bacillus thuringiensis strains from wastewater sludge for biopesticide production. PRBO. 2006;41(4):829-835.
24. Baum J, Malvar T. Regulation of insecticidal crystal protein production in Bacillus thuringiensis. MOM. 1995;18(1):1–12.
25. Tirado Montiel ML, Tyagi RD, Valero JR, Surampalli RY. Production biopesticides using wastewater sludge as a raw material- effect of process parameters. WSAT. 2003;48(8):239-246.
26. Lachhab K, Tyagi RD, Valero JR. Production of Bacillus thuringiensis biopesticides using wastewater sludge as a raw material. PRBO. 2001;37(2):197–208.

Original Article

Laboratory Study of Microbial Insecticide Produced by the Bacteria *Bacillus thuringiensis* of Starch Factory Sewage for Biological Control of Larvae *Culex pipiens*

Ghalchiha A[1*], Dalimiasl A[1], Askari H[2]

1- Department of Medical Entomology & vectors Control, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
2- Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran.

Received: 23 Nov 2012 Accepted: 04 Mar 2013

Abstract

Background & Objective: Epidemic of dangerous diseases caused by *Culex pipiens*' bites prompted us to focus on these groups of insects. Today, the most successful biological insecticides are produced by the bacteria of the genus *Bacillus*, which in the production phase of spores, makes crystalline endotoxin protein. This protein can be activated upon entering the insect's intestine in alkaline condition and damage the membranes of the intestine cells. Sewage obtained from food factories is required for the production of such valuable biological insecticides. We sought to utilize the sewage from a starch factory in order to produce biological insecticides by Bacillus thuringiensis in the lab.

Materials & Methods: In this study, Bacillus thuringiensis (H14) was grown on sewage from a starch factory. During fermentation, crystalline proteins with a molecular weight of 65 kDa were produced. The proteins, produced on the insect larvae of Culex pipiens, were thereafter tested, and mortality rates after 24h and 48h were evaluated and compared with those of control samples.

Results: The total numbers of bacteria and spores produced in agar plates during fermentation were 12/5×10 8 and 48×10 7 colonies per ml, respectively.

Conclusion: This study showed that the production of delta endotoxin is correlated with the phase of spore production, and the highest toxicity effect of crystal proteins is in the highest density of spores.

Keywords: **Microbial insecticides, *Bacillus thuringiensis, Culex pipiens*, Waste, Delta endotoxin**

*** Corresponding author: Ghalchiha Aliasghar,** Department of Medical Entomology & vectors Control, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
Tel: +98 912 2647224
Email: A.Ghalchiha@gmail.com

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 11:27 +0430 on Friday September 20th 2019