تحديد الظروف المختبرية المثلى لإنتاج البللورات البروتينية لبكتريا *Bacillus thuringiensis* KS3 المعزولة من الترب العراقية

خلود عبد الاله محمد الخفاجي[*(1)] وسميرة عودة خليوي[(2)] وصفاء عبد الرحيم محمود[(1)] وشيماء رجب فرحان[(1)] وصابرين عبد الهادي صالح[(2)] ومحمد عبد الرحيم عبد الله[(1)]

(1). قسم الاحياء المجهرية التطبيقية، مركز التقانات، دائرة البحوث الزراعية، وزارة العلوم والتكنولوجيا، العراق.

(2). قسم المكافحة البيولوجية، مركز المكافحة المتكاملة، دائرة البحوث الزراعية، وزارة العلوم والتكنولوجيا، العراق.

(*للمراسلة: خلود عبد الاله محمد الخفاجي. البريد الإلكتروني: khloodalkhafaji@yahoo.com).

تاريخ الاستلام: 2018/03/15 تاريخ القبول: 2018/09/25

الملخص

هدف البحث الى تحديد الظروف المثلى لإنتاج بروتين الذيفان البلوري القاتل للحشرات من بكتريا *Bacillus thuringiensis* KS3 المعزولة من الترب العراقية، من حيث المواد التغذوية للمستنبت الغذائي (مواد سكرية، ومواد بروتينية معقدة، وأملاح معدنية، والرقم الهيدروجيني)، والظروف البيئية (الحرارة، والتهوية، والوقت اللازم للإنتاج). أُنجز البحث في مختبرات الدائرة الزراعية لوزارة العلوم والتكنولوجيا خلال الفترة من 2016 ولغاية 2017 حيث تم تعديل الوسط التصنيعي "لوريا برتاني" للوصول إلى الظروف المثلى لإنتاج البروتين البللوري. أعطى استخدام السكروز أفضل النتائج، حيث وصل معدل الإنتاج إلى 4.490 ملغ/مل مقارنةً مع 1.97 ملغ/مل لوسط المقارنةً، كما أدى استخدام الببتون كمصدر نتروجيني معقد بديلاً عن التريبتون إلى ارتفاع ملحوظ في الإنتاج، بينما لم تلاحظ فروق معنوية بين التريبتون والسويتون ومستخلص اللحم والكازايين. كما وجد أن نسبة C:N الأفضل للإنتاج هي 2% ببتون، و1.5% سكروز، حيث وصل الإنتاج الى 5.252 ملغ/مل. وقد ارتفع إنتاج البروتين البللوري إلى 7.92 ملغ/مل عند إضافة ملح كبريتات المغنيسيوم، ولم توجد فروق معنوية بين كبريتات المغنيسيوم، وملح كلوريد المنغنيز. وقد سجل الرقم الهيدروجيني 7.5 أعلى إنتاج للبروتين البللوري مقارنةً مع الأرقام الهيدروجينية 6.5 و7 و8، كما وجد أنّ الوقت اللازم للإنتاج الأعلى هو 72 ساعة بتهوية 120 دورة/دقيقة وبدرجة حرارة 30 سليزيوس لحضن المزروع البكتيري.

الكلمات المفتاحية: *Bacillus thuringiensis*, البللورات البروتينية، السكروز، ببتون، رقم هيدروجيني.

المقدمة:

يعد استخدام مبيدات الآفات الحشرية أحد أهم الاستراتيجيات في زيادة إنتاج المحاصيل الزراعية، ولجأ العديد من الباحثين إلى البحث عن مبيدات حشرية صديقة للبيئة وتطويرها لاستخدامها في مجال المكافحة الأحيائية بديلاً عن المبيدات الكيميائية، والتي تسبب بعض المشكلات، منها تلوث التربة، ومصادر المياه، والمحاصيل نفسها ببقايا المبيدات، مما يؤثر في التوازن البيئي الطبيعي في الحقول المعاملة، إضافة إلى التأثير السام والمطفر لمعظم هذه المبيدات. ومن أهم الأحياء المجهرية المستخدمة في مجال المكافحة الأحيائية هي بكتريا *Bacillus thuringiensis* أحد الأنواع البكتيرية الموجبة لصبغة غرام والمكونة للأبواغ/للسبورات الداخلية، إضافة لإنتاجها لاجسام ضمينة خارج سبورية parasporal inclusion تتكون من بروتينات بللورية ذات أشكال مختلفة تسمى بروتين كراي cry protein والذي يكون على أنواع منها سموم دلتا الداخلية delta endotoxin ذات السمية العالية لمعظم حرشفيات الأجنحة (Lepidoptera) ورتبة غمديات الأجنحة (Coleoptera)، ورتبة ذات الجناحين (Diptera) ،وبعض اللافقاريات وعدم تأثيره في الحيوانات الحقلية والإنسان (Feitelson, 1993) و(Feitelson *et al.,* 1992) مما أهّل تلك البكتريا لاستخدامها في مجال إنتاج وتطوير مبيدات للمكافحة الأحيائية. ويسعى العاملون في مجال المكافحة الأحيائية، وبصورة مستمرة، إلى عزل سلالات/عتر جديدة للنوع *B. thuringiensis* (*B.t*) وتحديد أنواع السموم المنتجة لمعرفة مجموعة الحشرات التي تستهدفها تلك السموم (Schnepf 1998) و(Mendoza *et al.,* 2012) بالإضافة إلى تحديد الظروف المثلى لإنتاج تلك الذيفانات السامة للحشرات، من خلال تحديد ظروف التنمية الفضلى للإنتاج من حيث المواد السكرية، والبروتينات المعقدة، وبعض الأملاح المعدنية، وتحديد الظروف البيئية الأخرى من حيث درجة الحرارة المناسبة للإنتاج، والوقت اللازم للوصول إلى أعلى تركيز للذيفانات، والتهوية المناسبة للمزروع البكتيري، حيث تخضع هذه البكتريا إلى أنظمة التنظيم الخاصة بالأحياء المجهرية والتي قد تؤثر إيجاباً او سلباً في إنتاج الذيفان المطلوب (Hassan *et al.,* 2011) و(Valicente *et al.,* 2010) و(Gonzalez *et al*., 2013).

يهدف البحث الحالي إلى تحديد الظروف المثلى لإنتاج البللورات البروتينية من العزلة *B. thuringiensis* KS3 حيث تم دراسة تأثير وجود السكريات وأنواعها وبعض المدعمات من المواد النتروجينية المعقدة وتأثير وجود بعض الأملاح المعدنية في الإنتاج وتحديد الرقم الهيدروجيني/درجة الحموضة الأمثل للإنتاج، كما تم تحديد تأثير كل من درجة الحرارة والتهوية والوقت اللازم للإنتاج الأمثل من البروتين البللوري. وقد تم تقويم كفاءة خليط أبواغ البروتين البللوري المنتج ضد يرقات حشرة عث التين (walker) *Ephestia cautella*.

مواد البحث وطرائقه:

تنشيط العزلة *B. thuringiensis* KS3 :

نشطت العزلة المحلية KS3 وتم التأكد من صفاتها المظهرية، وبعض الصفات البيوكيمياوية الأخرى، من خلال تنميتها وزرعها على مستنبت المرق المغذي الصلب nutrient agar، كما تم التأكد من خصائصها السمية ضد يرقات حشرة عث التين *Ephestia cautella* (Walker) كما جاء في (الخفاجي وآخرون، 2017). وتم استعمال واعتماد مستنبت لوريا برتاني (1% تريبتون، و0.5% مستخلص خميرة، و0.5% ملح NaCl) كمستنبت شاهد، وقد تمت الإضافات والتعديل عليه للوصول إلى أعلى إنتاج للبروتين البللوري وتحديد تركيزه في كل تجربة (Somerville and Hazel, 1975).

تغذية يرقات حشرة (walker) *Ephestia cautella* وفحص السمية:

تم الحصول على يرقات حشرة عث التين *Ephestia cautella* (walker) في بداية الطور الثاني من مختبرات قسم المكافحة الأحيائية/دائرة البحوث الزراعية، وغذيت اليرقات على مستنبت (81% جريش، و12% غليسيرين، و6% دبس، و1%خميرة)، ونميت عند درجة حرارة 25 °س ±2. تم وزن 5 غرام من وسط التغذية ووضع في أنبوب زجاجي واستخدمت 10 يرقات لكل مكرر وبثلاثة مكررات لكل معاملة، إضافة لمكررات الشاهد (حشرات بدون إضافة الذيفان). تم تثفيل 4 مل من المزروع البكتيري بسرعة 10000 دورة/دقيقة ولمدة 10 دقائق (خليط الأبواغ الداخلية/السبورات والبللورات السامة)، وإذابة الراسب بوساطة 0.5 مل من الماء المقطر، وإضافته وخلطه مع وسط تغذية اليرقات، لتضاف اليرقات بعدها وتحضن 96 ساعة، ثم تحسب عدد اليرقات الميتة والحية. تم إجراء فحص السمية لمقارنةً فعالية البروتين البللوري المنتج من قبل العزلة البكتيرية *B. thuringiensis* KS3 في الوسط الأساس والوسط ذي الظروف المثلى.

تقدير تركيز البروتين البللوري:

تم استخلاص البللورات البروتينية من المزروع البكتيري السائل، وقياس تركيزها وفق Someorville and Hazel (1975) مع بعض التعديل، من خلال ترسيب 1 مل من المزروع البكتيري بسرعة 4000 دورة/دقيقة لترسيب الأبواغ الحليى، ثم أخذ الراشح وترسيبه بسرعة 10000 دورة/دقيقة ولمدة 10 دقائق وإذابة الراسب بوساطة هيدروكسيد الصوديوم 0.5 نورمال، وقراءة تركيز البروتين عند موجة بطول 280 نانومتر، باستعمال جهاز(nanodrop 2000 thermo scientific) حيث تعد قراءة مؤشر الكثافة الضوئية OD1 مساوية لتركيز 1 ملغ/مل وتم اعتماده في تحديد الظروف المثلى للإنتاج.

تحديد الظروف التغذوية المثلى لإنتاج الذيفان:

لتحديد الظروف التغذوية والبيئية الفضلى المؤثرة في إنتاج البروتين البللوري، تم استخلاص البروتين البللوري وقياس تركيزه واعتماده كأساس للمقارنةً بين المسنبتات ولثلاثة مكررات لكل معاملة.

تم دراسة تأثير إضافة عدد من السكريات في إنتاج الذيفان حيث أضيف 1% من الغلوكوز، والفركتوز، والغليسرول، والمانيتول، والسكروز، والنشاء، والمالتوز، والكزايلوز،و السوربيتول، والكاربوكسي ميثيل سيليلوز إلى وسط لوريا برتاني، وحضنت المزارع عند درجة 30 °س وسرعة 120 دورة/دقيقة ولمدة 72 ساعة.

تم دراسة استبدال التريبتون بمصادر نتروجينية معقدة أخرى شملت البيبتون، والكازايين، والسويتون، ومستخلص اللحم، حيث أضيفت بتركيز 1% إلى الوسط الأساس، وتم تحديد تركيز الذيفان المنتج، كما تمت دراسة تأثير نسبة C:N بأخذ تراكيز مختلفة لكل من السكروز والببتون.

تمت إضافة بعض الأملاح المعدنية بصورة منفصلة لتحديد تأثيرها في الإنتاج وشملت كلاً من كبريتات الحديد، وكلوريد الكالسيوم, وكبريتات النحاس، ومولبيدات الصوديوم، وكلوريد الحديد، وكبريتات المنغنيزن وكلوريد المنغنيز، وكبريتات المغنيسيوم، وكلوريد المغنيسيوم حيث أضيفت بتركيز 0.0025% إلى مستنبت الزرع.

تم تحديد الرقم الهيدروجيني الأفضل لوسط الإنتاج من خلال اختبار عدة أرقام هيدروجينية لوسط الإنتاج شملت 6.5، 7، 7.5، و8 وقد تم قياس تركيز البروتين المنتج لكل مستنبت زرع.

تحديد تأثير الظروف البيئية في الإنتاج:

تم تحديد درجة الحرارة الأفضل لإنتاج البروتين البللوري حيث تم حضن المزروع البكتيري عند درجات حرارية مختلفة شملت 25 و30 و35 °س، وبعد تحديد درجة الحرارة اللازمة، تم تحديد الوقت اللازم للإنتاج الأفضل من البروتين البللوري من خلال حضن المزارع البكتيرية السائلة لفترات 24، 48، و72 ساعة، وقياس تركيز البروتين البللوري بعد نهاية كل فترة زمنية، كما حدد نوع حضن المزارع حيث حضنت المزارع البكتيرية بصورة ثابتة (دون تهوية) وأخرى مع التهوية باستخدام الحاضنة الهزازة بسرعة 120 دورة/دقيقة.

التحليل الاحصائي:

أجري التحليل الإحصائي للبيانات بمعدل ثلاثة مكررات في كل معاملة وباستخدام قيمة أقل فرق معنوي LSD لمعرفة معنوية الاختلاف بين المعاملات عند مستوى 0.01% باستعمال برنامج التحليل GeneStat.

النتائج والمناقشة:

بينت النتائج وجود تأثير لنوع السكر المستخدم في مستنبت الزرع في تركيز بروتين البللورات القاتلة للحشرات، حيث أعطى كلاً من سكر السكروز، والمالتوز، والغلوكوز، نتائج متفوقة معنوياً في تركيز البللورات البروتينية مقارنةً مع المستنبت الشاهد، ومع السكريات الأخرى البديلة كما هو واضح في الجدول (1). تعد الظروف التغذوية والبيئية للمزارع البكتيرية من أهم العوامل المؤثرة في إنتاج مواد الأيض من تلك الأحياء المجهرية والتي تعتمد فيها آليات مختلفة للتنظيم والإنتاج.

الجدول 1. تأثير مصادر الكربون في إنتاج البللورات البروتينية لبكتريا *B. thuringiensis* KS3

المعاملة	معدل تركيز البروتين (ملغ مل$^{-1}$)
المستنبت الشاهد	1.970
غلوكوز	2.620
سوربيتول	1.466
كزايلوز	2.239
فركتوز	2.965
سكروز	4.490
مالتوز	2.287
الغليسرول	2.242
المانيتول	2.186
النشاء	2.305
كاربوكسي ميثيل سيلليلوزCMC	1.252
LSD= 0.5047	

مستنبت الشاهد =(لوريا برتاني)، ظروف تنمية المزروع البكتيري (30° س ,120 دورة/دقيقة ,72 ساعة)

أوضحت النتائج أنّ استخدام الببتون أعطى أفضل النتائج وبفارق معنوي مقارنةً مع مستنبت الشاهد والمستنبتات الأخرى، بينما لم تلاحظ فروق معنوية بين مستنبت الشاهد والمستنبتات ذات السويتون أوالكازايين أومستخلص اللحم، كما هو مبين في الجدول (2).

الجدول 2. تأثير نوع البروتين العضوي المعقد في إنتاج بروتين الذيفان البللوري لبكتريا *B. thuringiensis* KS3

المعاملة	معدل تركيز البروتين (ملغ/مل)
مستنبت الشاهد	3.367
ببتون	3.706
سويتون	3.358
كازايين	3.450
مستخلص اللحم	3.336
$LSD_{0.01}$=0.2031	

مستنبت الشاهد (تريبتون 1%، سكروز1%): درجة الحرارة 30 س° حضن المزروع البكتيري 72 ساعة بسرعة 120 دورة/دقيقة.

أظهرت نتائج دراسة نسبة C:N وجود اختلافات معنوية في الإنتاج وقد وجد أن أفضل تركيز للسكروز 1.5% مع تركيز 2% من الببتون، ولم يظهر فرقاً معنوياً مع معاملة 2% سكروز، و1.5% ببتون، بينما كان الفرق معنوياً مع تركيب مستنبت الشاهد (1% سكروز و1% ببتون) ،وتراكيب المستنبتات الأخرى، والتي انخفض فيها تركيز البروتين البللوري بصورة كبيرة، كماهو واضح في الجدول (3). وقد تعزى تلك الاختلافات إلى تراكم المواد الحامضية في مستنبت الزرع نتيجة تخمر سكر السكروز عند وجوده بتراكيز غير متناسقة مع المواد النتروجينية المعقدة.

الجدول 3. تأثير تراكيز من السكروز والببتون في إنتاج البروتين البللوري لبكتريا *B. thuringiensis* KS3

معدل تركيز البروتين (ملغ/مل^{1})	المعاملة	
	سكروز%	ببتون %
1.352	**1**	**0**
3.450	**1**	**1**
1.560	**1.5**	**1**
1.823	**2**	**1**
1.651	**1**	**1.5**
1.840	**1.5**	**1.5**
5.010	**2**	**1.5**
1.440	**1**	**2**
5.252	**1.5**	**2**
1.8483	**2**	**2**
$LSD_{0.01}$= 0.3019		

ظروف التحضين: درجة الحرارة 30° س حضن المزروع البكتيري 72 ساعة بسرعة 120 دورة/دقيقة.

كما أظهرت النتائج اختلاف تأثير إضافة بعض الأملاح المعدنية الى المزروع البكتيري في قابلية البكتريا على إنتاج الذيفانات البكتيرية، حيث وجدت زيادة معنوية في إنتاج بروتين الذيفان البللوري عند إضافة الأملاح المعدنية تحت الدراسة عدا كبريتات النحاس، التي انعدم الإنتاج بوجودها في مستنبت الزرع. وقد تبين أنّ أكثر الأملاح تأثيراً في الإنتاج هو كبريتات المغنيسيوم، حيث وصلت الإنتاجية الى 7.92 ملغ/مل مقارنةً مع مثيلتها في مستنبت الشاهد (5.168 ملغ/مل) والمستنبتات الحاوية على أملاح أخرى. ومن خلال التحليل الإحصائي لم توجد فروقاً معنويةً بين إنتاج البكتريا للبروتين البللوري عند إضافة كلوريد المنغنيز وكبريتات المغنيسيوم، كما هو واضح في الجدول (4).

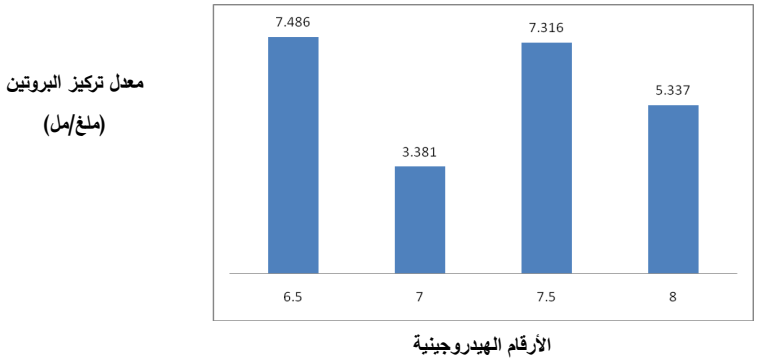
يعد وجود الأملاح في مستنبت الزرع أحد أهم العوامل المؤثرة في إنتاج البروتينات بصورة عامة والبروتين البللوري بصورة خاصة، حيث تعمل المعادن على تحفيز المورثات المنتجة أو المنظمة للإنتاج أو تثبيطها من خلال آليات تنظيم معقدة, كما تعرف أيونات المنغنيز بصورة خاصة في تحفيز الأنواع المختلفة لبكتريا *Bacillus* على إنتاجها للأبواغ/للسبورات الداخلية، والتي تكون مهمة لإنتاج ما يعرف parasporal inclusion وإنتاج البروتين البللوري.

الجدول 4. تأثير بعض الأملاح المعدنية في إنتاج بروتين الذيفان البللوري لبكتريا *B. thuringiensis* KS3

المعاملة	معدل تركيز البروتين (ملغ/مل)
مستنبت الشاهد	5.168
$FeSO_4$	5.431
$FeCl_3$	6.512
$CuSO_4$	0.001
$CaCl_2$	5.624
NaMoO4.2H2O	5.312
$MnSO_4$	7.583
$MnCl_2$	7.724
$MgSO_4$	7.921
$MgCl_2$	7.214
$LSD_{0.01}$=0.2789	

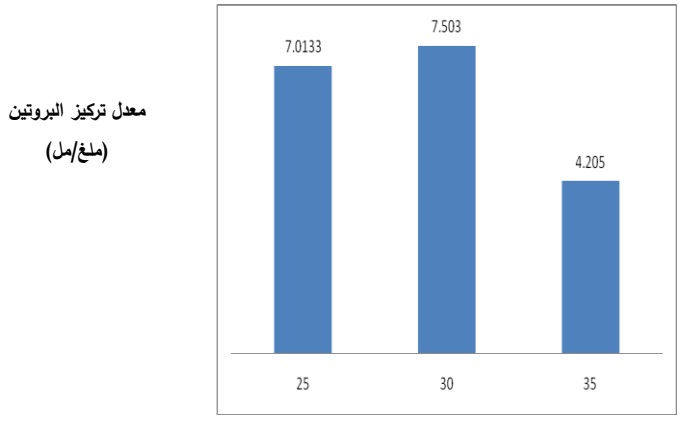
مستنبت شاهد (ببتون 2%، سكروز1.5%): درجة الحرارة 30° س حضن المزروع البكتيري 72 ساعة بسرعة 120 دورة/دقيقة

وقد وجد ان لدرجة حموضة المستنبت دورً في إنتاج الذيفان من عزلة البكتريا *B. thuringiensis* KS3 حيث تبين أن درجتي 6.5 و7.5 لمستنبت الزرع كانتا الأفضل في الإنتاج بدون فروق معنوية بينهما، بينما لوحظ انخفاض في إنتاج البروتين البللوري عند درجات الحموضة الأخرى (الشكل 1).



الشكل 1. تأثير درجات الحموضة/الارقام الهيدروجينية في إنتاج البروتين البللوري لبكتريا *B. thuringiensis* KS3
(2% ببتون، 1.5% سكروز، 0.0025 كبريتات المنغنيز، درجة الحرارة 30س، حضن المزروع البكتيري 72 ساعة بسرعة 120 دورة/دقيقة)، LSD= 0.3472

كما وجد أن لدرجة الحرارة تأثيراً كبيراً في الإنتاج، حيث لوحظ انخفاض الإنتاج بشكل كبير عند تنمية البكتريا عند درجة حرارة 35° س أو 25° س وأن أفضل إنتاج كان عند درجة حرارة 30° س (الشكل 2) وباستخدام التهوية بحضن المزروع البكتيري بالحاضنة الهزازة بسرعة 120 دورة/دقيقة مقارنةً مع حضن المزروع البكتيري بدون تهوية (2.63 ملغ/مل)، وهذا يتناسب مع Sikadar *et al.*, (1993) الذين أشاروا إلى أهمية التهوية في نمو البكتريا وتكوينها للبروتين البللوري. كما وجد أنّ أفضل وقت تحضين بالظروف المثلى هو 72 ساعة مقارنةً مع انخفاض الإنتاج عند 48 ساعة ليصل الى 2.34 ملغ/مل وانعدام إنتاج البروتين البللوري عند 24 ساعة. قد يعزى سبب ذلك لكون البروتين البللوري من منتجات الأيض الثانوية، والتي تنتج عادة عند أطوار النمو المتأخرة مستفيداً من البروتينات الخلوية الناتجة من موت الخلايا، وهذا يتناسب مع ما أشار إليه العديد من الباحثين من إنتاج البروتين البللوري بعد 72 ساعة (Imen *et al.*, 2009) و (Cheng and Brady, 2001).



الشكل 2. تأثير درجة الحرارة في إنتاج البروتين البللوري لبكتريا *B. thuringiensis KS3*
(2% ببتون، 1.5% سكروز، 0.0025 كبريتات المنغنيز، رقم هيدروجيني 7.5، حضن المزروع البكتيري 72 ساعة بسرعة 120 دورة/دقيقة)، LSD=0.334

أظهر اختبار الفعالية البيولوجية للبروتين البللوري المنتج في مستنبت الشاهد (لوريا برتاني) قبل التعديل والبروتين البللوري المنتج في المستنبت المعدل أنّ خليط الأبواغ الداخلية/السبورات والبللورات هو ذو فعالية بيولوجية سامة ليرقات الطور الثاني لحشرة عث التين بدليل ظهور اليرقات الميتة بصورة مسودة مع ميل جسد الحشرة للتحلل، كما هو واضح في الشكل (3).

الشكل 3. الفعالية البيولوجية لخليط الأبواغ الداخلية/السبورات والبروتين البللوري ضد يرقات حشرة *Ephestia cautella*
(2% ببتون، 1.5% سكروز، 0.0025 كبريتات المنغنيز، رقم هيدروجيني 7.5، بدرجة 30 س° ولمدة 72 ساعة وبسرعة 120 دورة/دقيقة)
1- يرقات معاملة بخليط الأبواغ الداخلية/السبورات والبروتين ,2- يرقات غير معاملة

تعمل العديد من مكونات مستنبت الزرع على تنشيط أو تثبيط إنتاج السموم البكتيرية من خلال آليات التنظيم المتعلقة بالنمو والإنتاج، وهذا يتلاءم مع ما جاء به Valicente, (2010) من التأثير الإيجابي لسكر الغلوكوز وبعض الأملاح المعدنية مثل $FeSO_4$ و $ZnSO_4$ و$MnSO_4$ و$MgSO_4$ والتي تضاف إلى وسط لوريا برتاني السائل، كما اعتمد Gonzalez *et al.,* (2013) على وسط الببيتون ومستخلص الخميرة وخليط من الأملاح المعدنية لإنتاج السموم البكتيرية من Bt.

الاستنتاجات:

نستنتج من كل ما سبق أنّ للظروف التغذوية والبيئية تأثير كبير في إنتاج البروتين البللوري من العزلة المحلية *B. thuringiensis* KS3 حيث لوحظ تشابها في ظروف الإنتاج البيئية (درجة الحرارة والتهوية وفترة الحضن) بينها وبين ما هو منشور، بينما اختلفت العزلة المحلية باحتياجاتها التغذوية ببعض الاختلاف عما هو منشور في بحوث مشابهة، وهذا يؤيد الحاجة الماسة لتحديد الظروف المختبرية المثلى للإنتاج الريادي عند عزل السلالات الجديدة لاستخدامها صناعياً في إنتاج المبيد الأحيائي. وقد تمت مراعاة إضافة مصادر للطاقة والبروتين، وتم اختيار كلا من السكروز كمصدر للطاقة والببتون كمصدر للنيتروجين العضوي وإضافة ملح كبريتات المغنيسيوم وضبط الرقم الهيدروجيني ليكون 7.5 والتحضين عند 30° س لمدة 72 ساعة باستخدام الحاضنة الهزازة، وذلك لتوفير الظروف المثلى لإنتاج البروتين البللوري، الذي أثبت فعالية بيولوجية سامة ليرقات حشرة عث التين.

المراجع:

الخفاجي، خلود عبد الاله محمد وسميرة عودة خليوي وخميس حبيب مطلك وصفاء عبد الرحيم محمود وصابرين عبد الهادي صالح (2017). عزل وتشخيص بكتريا *Bacillus thuringiensis* من الترب العراقية واستخدامها ضد يرقات حشرة عث التين *Ephestia cautella* (Walker). مجلة مركز بحوث التقنيات الأحيائية. 11(2): 5-13.

Cheng, B.; and A.V. Brady (2001). Fermentation of new *Bacillus thuringiensis* strain. HELIA 24(35): 47- 54.

Feitelson, J.S. (1993). The *Bacillus thuringiensis* family tree, p 63–71. *In* Kim L(ed), Advanced engineered pesticides. Marcel Dekker, Inc., New York, NY.

Feitelson, J.S.; J. Payne; and L Kim (1992). *Bacillus thuringiensis* insects and beyond. Biotechnology. 10:271–275.

Gonzalez, A.; G. Rodrigues; R.Y. Bruzon; M.Z. Mendez; and G. Ren (2013). Isolation and characterization of entomopathogenic bacteria from soil samples from the western region of Cuba. J. Vector Ecology. 46-52.

Hassan, A.; H. Muhanad; I. Emad; M. Hayat (2011). Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* isolates from Syrian soil and testing of their insecticidal activities against some insect pests**.** Turk J. Agric., 35: 421-431.

Imen, S.; R. Souad; and J. Samir (2009). A new Tunisian strain of *Bacillus thuringiensis* Kurstaki having high insecticidal activity and delta endotoxin yield. Arch. Microbiol., 191: 341- 348.

Mendoza, G.; A. Portillo; E. Arias; R.M. Ribas; and J. Olmos (2012). New combinations of *cry* genes from *Bacillus thuringiensis* strains isolated from northwestern Mexico**.** International Microbiology. 15:209-216.

Schnepf, E. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62: 775– 806.

Sikdar, D.P.; M.K. Majumdar; and S.K. Majumdar (1993). Optimization of process for production of delta- endotoxin by *Bacillus thuringiensis* var isralesis in 5-liter fermenter. Biochemical Archives. 9: 119- 123.

Somerville, H.J.; and V.P. Hazel (1975). An insect toxin from spores of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus.* J. of General Microbiol., 87: 359- 369.

Valicente, F.H.; T. Edmar De Souza; M.I. Santos Leite; F.L. Freir; and C. Macedo (2010). Production of *Bacillus thuringiensis* Biopesticide using commercial lab medium and agricultural by-products as nutrient sources. Revista Brasileira de Milho e Sorgo. 9(1): 1-11.

Determination of the Optimum Laboratory Conditions for the Production of Crystal Protein by *Bacillus thuringiensis* KS3 Isolated from Iraqi Soils

Khlood Abid-Alelah Alkhafaji*(1) Samera Oda Khleoy(2) Safaa Abid Alrahem Mahmoud(1) Shaemaa Rajab Farhan(1) Sabreen Abid Alhadi Saleh(2) and Mohamed Abid al- Rahem Abiallah(1)

(1). Applied Microbiology Department, Center of Biotechnology, Directorate of Agricultural Research, Ministry of Science and Technology. Iraq.
(2). Biology Control Department, Pest Integrating Management Center, Directorate of Agricultural Research. Ministry of Science and Technology. Iraq.
(*Corresponding author: Khlood Abid-Alelah Alkhafaji. E-Mail: khloodalkhafaji@yahoo.com).

Received: 15/03/2018 Accepted: 25/09/2018

Abstract

This research aimed to determine the optimum conditions for the production of crystal protein produced by a local Iraqi isolate of *Bacillus thuringiensis* KS3. This research was conducted at the laboratories of Directorate of Agricultural Research during the period from 2016 to 2017. Growth factors such as sugar, nitrogen sources and minerals were evaluated, also pH was determined. Environmental factors such as temperature, aeration and time of production were studied separately; Laurea Bertani broth (LB) was modified for optimal production of crystal protein. Sucrose gave the best concentration of protein which reached up to 4.49 mg/ml, while peptone could be used as a substitute of a tryptone as best nitrogen source. No significant differences among tryptone, soytone, beef extract and casein. The best C:N ratio was that of 2% peptone and 1.5% sucrose which gave 5.252 mg/ml. Magnesium sulfate increased the crystal protein concentration which reached to 7.92. No significant difference was observed between magnesium sulfate and manganese chloride. Medium equilibrated to pH 7.5 was used for highest crystal protein production compared with pHs 6.5, 7, and 8. Culture of *Bacillus thuringiensis* KS3 incubated for 72 h at 30 ºC with 120 rpm/min in a shaker incubator gave the best protein concentration.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, delta toxin, sucrose, peptone, pH.