Faculty of Science
Microbiology Dep.

Studies on Biopesticides Production from *Bacilli* using Different Fermentation Approaches

Submitted in Partial Fulfillment of the Requirments for the Degree of Master of Science in Microbiology

By
Nora Nabil Abdel aleem El-Gaml
B.Sc., in microbiology
(2003)

Supervised By

Prof. Dr. Fawkia M. El-Beih
Prof. of Microbiology
Microbiology Department
Faculty of Science
Ain Shams University

Prof. Dr. Mohamed S. Foda
Prof. of Microbial Chemistry
Microbial Chemistry
Department
National Research Centre

Microbiology Department
Faculty of Science
Ain Shams University
2010

كلية العلوم
قسم الميكروبيولوجي

دراسات علي إنتاج المبيدات الحيوية للحشرات من البكتيريا التابعة لجنس *الباسيلس* باستخدام الطرق التخميرية المختلفة.

رسالة مقدمة من

نورا نبيل عبد العليم الجمل
الحاصلة علي بكالوريوس العلوم (٢٠٠٣)
(ميكروبيولوجي-كيمياء)
جامعة عين شمس

كجزء للحصول علي درجة الماجستير في علوم الميكروبيولوجي

تحت إشراف

أ.د فوقية محمد البية
أستاذ بقسم الميكروبيولوجي
كلية العلوم-جامعة عين شمس

أ.د محمد صلاح فودة
أستاذ بقسم كيمياء الكائنات الدقيقة
المركز القومي للبحوث

قسم الميكروبيولوجي
كلية العلوم
جامعة عين شمس
٢٠١٠

دراسات علي إنتاج المبيدات الحيوية للحشرات من البكتيريا التابعة لجنس *الباسيلس* باستخدام الطرق التخميرية المختلفة.

رسالة مقدمة من
نورا نبيل عبد العليم الجمل
الحاصلة علي بكالوريوس العلوم(٢٠٠٣)

كجزء للحصول علي درجة الماجستير في علوم الميكروبيولوجي

قسم الميكروبيولوجي
كلية العلوم
جامعة عين شمس
٢٠١٠

كلية العلوم
قسم الميكروبيولوجي

عنوان الرسالة: دراسات علي إنتاج المبيدات الحيوية للحشرات من البكتيريا التابعة لجنس *الباسيلس* باستخدام الطرق التخميرية المختلفة.

اسم الطالبة : نورا نبيل عبد العليم الجمل

الدرجة العلمية: الماجستير فى العلوم(الميكروبيولوجي)

القسم التابع لها: الميكروبيولوجي

اسم الكية: العلوم

الجامعة: عين شمس

سنة التخرج: ٢٠٠٣

سنة المنح: ٢٠١٠

شكر

أشكر الله على مساعدتى فى انجاز هذة الرسالة

كما أشكر السادةالاساتذة الذين قاموا بالاشراف

وهم:
أ.د فوقية محمد البية
أستاذ بقسم الميكروبيولوجي
كلية العلوم-جامعة عين شمس

أ.د محمد صلاح فودة
أستاذ بقسم كيمياء الكائنات الدقيقة
المركز القومي للبحوث

و كذلك الهيئات التالية:

١-قسم كيمياء الكائنات الدقيقة- شعبة الهندسة الوراثية واليوتكنولوجى
- المركز القومي للبحوث
٢- قسم الميكروبيولوجي- كلية العلوم- جامعة عين شمس

دراسات علي إنتاج المبيدات الحيوية للحشرات من البكتيريا التابعة لجنس *الباسيلس* باستخدام الطرق التخميرية المختلفة.

نورا نبيل عبد العليم الجمل

المستخلص

تستخدم كلا من البكتيريا *باسيلس سفيركس* و*باسيلس ثورينجينسيس* لابادة يرقات البعوض وتعتبر المود الناتجة عن تلك البكتيريا صديقة للبيئة . و تستهدف الدراسة الحالية دراسة طريقة التخمير المغمورة وطريقة التخمير بالمنابت الصلبة . و بدراسة انتاجية السموم المبيدة للعوض وجد أن العزلة المصرية *باسيلس سفيركس* رقم ١ المعزولة من محافظة قنا قد تفوقت على السلاسة العالمية رقم ٢٣٦٢ تحت ظروف التخمير المغمورة

ومن ناحية أخرى قد تفوقت العزلة المصرية *باسيلس ثورينجينسيس*رقم ٤ المعزولة من محافظة الشرقية على السلاسة العالمية *باسيلس ثورينجينسيس*اسرائيلينسس تحت ظروف التخمير بالمنابت الصلبة

Faculty of Science
Microbiology Dept.

Approval Sheet

Name of the student : Nora Nabil Abdel aleem El-Gaml

Title of Thesis : Studies on Biopesticides Production from *Bacilli* using Different Fermentation Approaches

Degree : M. Sc. (Microbiology) has been approved by

Supervisors

1) Prof. Dr. Fawkia M. El-Beih
Prof of Microbiology
Faculty of Science
Ain Shams University

2) Prof. Dr. Mohamed S. Foda
Prof. of Microbial Chemistry
Microbial Chemistry Dept.
National Research Centre

Advisory committee

1) Prof. Dr. Fawkia M. El-Beih
Prof of Microbiology
Faculty of Science
Ain Shams University

2) Prof. Dr. Mohamed S. Foda
Prof. of Microbial Chemistry
Microbial Chemistry Dept.
National Research Centre

3) Prof. Dr.Bakry Mohammed Haroun
Prof. of Microbiology
Faculty of Science
Al- Azhar University, Cairo.

4) Prof. Dr. Yehia Ahmed El-Zawahry
Prof. of Microbiology
Faculty of Science
El- Zagazig University

Date of examine: / / 2010

بسم الله الرحمن الرحيم

قَالُوا سُبْحَانَكَ لاَ
عِلْمَ لَنَا إِلاَّ مَا
عَلَّمْتَنَا إِنَّكَ أَنْتَ
العَلِيمُ الحَكِيمُ

سورة البقرة اية (٣٢)

كلية العلوم
قسم الميكروبيولوجي

رســالـــة : ماجستير
اسم الطــالبة : نورا نبيل عبد العليم الجمل
عنوان الرسالة : دراسات علي إنتاج المبيدات الحيوية للحشرات من البكتيريا التابعة لجنس الباسيلس باستخدام الطرق التخميرية المختلفة.
الدرجة العلمية : الماجيستير فى العلوم (الميكروبيولوجى)

لجنة الإشراف:

ا.د/ فوقيه محمد البيه	أستاذ الميكروبيولوجي - كلية العلوم - جامعة عين شمس
ا.د/ محمد صلاح فوده	أستاذ بقسم كيمياء الكائنات الدقيقه - المركز القومي للبحوث

لجنة الممتحنين:

ا.د/ فوقيه محمد البيه	أستاذ الميكروبيولوجي - كلية العلوم - جامعة عين شمس
ا.د/ محمد صلاح فوده	أستاذ بقسم كيمياء الكائنات الدقيقه - المركز القومي للبحوث
ا.د/ بكري محمد هارون	أستاذ الميكروبيولوجي - كلية العلوم – جامعه الازهر- القاهره
ا.د/ يحيي أحمد الظواهري	أستاذ بقسم الميكروبيولوجي - كلية العلوم - جامعة الزقازيق

الدراسات العليا: **تاريخ البحث: / /٢٠١٠**

ختم الإجازة: / /٢٠١٠

أجيزت الرسالة بتاريخ: / /٢٠١٠

موافقة مجلس الكلية: / /٢٠١٠

موافقة مجلس الجامعة: / /٢٠١٠

ACKNOWLEDGEMENT

First of all, I thank ALLAH for what he gave me and what I become today.

The author would like to express her thanks and gratitude to **Dr. Fawkia Mohamed El-Beih**, professor of microbiology, Faculty of science, Ain-Shams University, for her kind supervision, encouragement, continous support and valuable advice.

The author sincerely presents her gratefulness and deepest thanks to **Dr. Mohamed Salah Foda**, professor of microbiology, Department of Microbial Chemistry, National Research Centre, Cairo, Egypt, for suggesting the point and for his instructive discussion, supervision, continous encouragement, valuable advice and guidance throughout the present study.

It is difficult to overstate my gratitude to my supervisor, **Dr. Maysa El-Sayed Moharam,** Ass. Professor of Microbiology, National research centre, Dokki, Giza. With her enthusiasm, her inspiration, and her great efforts, her help throughout my thesis-writing period; her provided encouragement, sound advice and good teaching.

I am deeply indebted to my supervisor **Dr. Hassan Mahmoud Gebreel,** Ass. Professor of Microbiology, Faculty of Science. Ain Shams University. Whose help and encouragement helped me in all of the researches.

A special thanks to the head of Microbiology department Ain-shams university.

Deep thanks are also expressed to the National Research Centre (NRC) for all facilities provided that enabled the author to accomplish this work and to the Microbiology department, faculty of science. Ain-shams university.

LIST OF ABBREVIATIONS

Btx	binary toxin
CFU	colony forming unit
EM	Electron Micrograph
FWC	final whole culture
Kda	kilo dalton
LB	Luria-Bertani medium
Mtx	Mosquitocidal toxin
OD	Optical density
pH	hydrogen-ion exponent
S.D	Standard Deviation

Studies on Biopesticides Production From *Bacilli* using Different Fermentation Approaches

By

Nora Nabil Abdel aleem El-Gaml

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis and *Bacillus sphaericus* are being used widely as larvicidal bacteria for mosquito control; these microbial pesticides are eco-friendly and specific to the target organisms. The present work is devoted to evaluate some fermentation approaches including both submerged and solid state fermentation. The study on mosquitocidal toxin production of the Egyptian isolates have revealed that isolate No.1 isolated from Quina Governorate has more toxic activity than the reference strain *Bacillus sphaericus* 2362 under submerged fermentation against the second instar larvae of *Culex pipiens*. On the other hand, the Egyptian isolate *Bacillus thuringiensis* No.4 which isolated from El-Sharkia Governorate exhibited highest larvicidal toxicity than *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* under solid state fermentation conditions.

Key words

Bacillus thuringiensis, *Bacillus sphaericus***,** *Culex pipiens***,** submerged fermentation, solid state fermentation

CONTENTS

	Page
INTRODUCTION.....	1
AIM OF THE STUDY.....	2
1.REVIEW OF LITERATURE.....	3
1.1. Mosquitoes as a vector of tropical diseases.....	3
1.2. Development of biological control means for mosquitoes vectors	5
1.2.1. Hazards associated with chemical insecticides	5
1.2.2. Definition and historical background of biological control	6
1.2.3. The use of bacteria as biological control means of mosquitoes vectors	7
1.2.4. Persistence and recycling of *B. sphaericus* in nature.	8
1.2.5. Mode of action of *B. thuringiensis* and *B. sphaericus* against their target insects larvae.....	10
1.2.6. Safety of *B. sphaericus*	11
1.3. *B. sphaericus* as a pathogen of mosquitoes vector	12
1.3.1. History of *B. sphaericus* as a pathogen for mosquito larvae	12
1.4. Compiled data on *Bacilli* pathogenic of mosquitoes and black flies (Diptera) larvae.....	13

1.5. *Bacillus thuringiensis* as a pathogen of mosquitoes and black flies larvae. 15

1.5.1. Historical background of *Bacillus thuringiensis* 15

1.5.2. Safety of *Bacillus thuringiensis* as biological control agent. 17

1.5.3. The Proteinaceous parasporal crystalline δ – endotoxin of *B. thuringiensis* 18

1.6. Production of *B. thuringiensis* and *B. sphaericus* by submerged fermentation 19

1.6.1. Fermentation media for *B.t.* production 19

1.6.2. Production of *B.t.* by solid state fermentation. …….. 21

1.7. Potentials for improvement production of *B.t.* and *B. sphaericus* toxin 26

1.8. Mass production of *B. sphaericus* by submerged fermentation: 30

1.9. Formulation of *B. sphaericus* and *B. thuringiensis* for application purposes..... 33

1.10. Some physiological factors affecting growth and toxin formation in *B. sphaericus* 36

1.10.1. Effect of carbon sources..... 36

1.10.2. Effect of aeration level..... 36

1.10.3. Effect of inoculum size 37

1.10.4. Effect of incubation period. 37

1.11 Growth of *B. sphaericus* on various amino acids as carbon and/or nitrogen sources. 38

2. MATERIALS AND METHODS 40

2.1. MATERIALS. 40

2.1.1. Organisms used in this study 40

2.1.2. Media 40

2.1.2.1. Synthetic media used for pure cultures and activation of cultures prior to physiological studies. . 40

2.1.2.2. Media used for identification of Egyptian isolates No.1 and No.4 isolated from Quina and El-Sharkia governorates, respectively. 45

2.1.2.3. Medium for antibiotic sensitivity test. 48

2.1.2.4. Media used for growth, sporulation and δ-endotoxin production in shake cultures. 50

2.1.2.5. Media used in solid state fermentation (SSF). 50

2.2. METHODS 52

2.2.1. Isolation of *Bacilli* active against Mosquitoes larvae from Egyptian Environments 52

2.2.1.1. Preparation of soil samples for isolation of *Bacillus sphaericus* 52

2.2.1.2. Bioassay of bacterial toxins against mosquitoes larvae. 52