The University of Tehran Press

Iranian Journal of Plant Protection Science

Online ISNN: 2008-4781

Homepage: http://ijpps.ut.ac.ir/

Investigating the non-lethal effects of the bacterium *Bacillus thuringiensis* on the snail *Achatina fulica*

Nagham Shiekh Suliman[1], Reza Talaei-Hassanloui [2]✉, E. Osdaghi[3]

1. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: nanoooalshiekh@gmail.com
2. Corresponding Author, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: rtalaei@ut.ac.ir
3. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: eosdaghi@ut.ac.ir

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received: 11 December 2025

Revised: 24 December 2025

Accepted: 28 December 2025

Published online: Spring and Summer 2025

Keywords:

Achatina fulica,

insect-pathogenic bacteria,

microbial control,

agricultural pest,

endophyte.

ABSTRACT

The snail *Achatina fulica* (Gastropoda, Achatinidae) is one of the most significant agricultural pests, characterized by its extensive distribution and broad host range among various plant species. The most common method for controlling this pest is the application of the chemical molluscicide metaldehyde. However, this approach has proven to be inefficient and environmentally harmful. Consequently, there is an urgent need to explore alternative methods, such as applying biological control agents. *Bacillus thuringiensis* (Bt) is a key microbial agent widely used for the control of insect pests, yet its potential for managing agricultural pest molluscs has not been extensively studied. In the present study, the effects of Bt prepared as a locally available commercial product, were evaluated against *A. fulica* using both direct and indirect (endophytic) approaches. Lettuce, as a preferred host plant for the snail, was cultivated in a greenhouse and used for snail feeding. For the preparation of Bt in its vegetative phase, nutrient agar (NA) was used. The endophytic potential of Bt was investigated using two methods: leaf spraying and root drenching of six-week-old lettuce plants with bacterial suspension at a concentration of 8.7×10^8 CFU/mL. Data collected 10 days after inoculation indicated successful endophytic colonization exclusively through the leaf spray method, while leaves from plants treated via root irrigation did not harbor endophytic bacteria. The efficacy of Bt was assessed under some treatments, including immersion of lettuce leaves in bacterial spore-crystal suspension (5×10^8 and 10^9 CFU/mL), vegetative-phase bacterial suspension without crystals (5×10^8 cells/mL), suspension of *Xanthomonas translucens* (control 1), and sterile distilled water (control 2). These treatments were applied to adult and non-adult snails of *A. fulica*. The results revealed no visible effects on adult snails under any treatment. However, non-adult snails treated with a concentration of 10^9 CFU/mL exhibited a complete inhibition of lettuce feeding from the second day of treatment, persisting for 21 days. To confirm the presence of the bacterium in the gastrointestinal tract of non-adults that ceased feeding, the gut was aseptically dissected 14 and 22 days post-treatment. Suspensions obtained by homogenizing the gut in sterile distilled water were cultured on nutrient agar plates. After five days of incubation, the presence of Bt spores and crystals was confirmed. Molecular analysis using PCR and sequencing of the 16S rRNA gene further validated the bacterial identity through comparison with genetic databases. Although no direct mortality of *A. fulica* was observed, the cessation of feeding in immature stages for three weeks significantly reduced the damage caused by the snail.

Cite this article: Shiekh Suliman, N., Talaei-Hassanloui, R. & Osdaghi, E. (2025). Antibacterial potential of *Lucilia sericata larval secretions* and *extracts against Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 56 (1), 267-281. DOI: https://doi.org/10.22059/ijpps.2026.410597.1007114

© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.

DOI: https://doi.org/10.22059/ijpps.2026.410597.1007114

Extended Abstract

Introduction

The African snail *Achatina fulica* is a widespread and voracious agricultural pest. It has many host plants. The most common way to control this pest is using chemical pesticides, mainly metaldehyde. However, it is ineffective against the African snail. It also has harmful effects on the environment. Thus, it is very urgent to search for another way of control, for example applying biological agents. *Bacillus thuringiensis* bacterium is one of the most important component of microbial control that has been well studied as a biocontrol agent against many insect pests. On the other side, this bacterium has not yet been studied in detail as a control agent for agricultural mollusks. In this research, the effect of BT is studied directly and indirectly on the snail *A. fullica*.

Materials and Methods

Lettuce (*Lactuca sativa*) was cultivated in a greenhouse and used as snail feed. Various treatments were tested, including: dipping lettuce leaves in Bt suspensions in two different concentrations and phases, *Xanthomonas translucens suspension* as control 1, and sterile distilled water as Control 2. Eggs, non-adult, and adult snails were assessed. To confirm the presence of the bacterium in the digestive tract of immature individuals that had ceased feeding, the digestive tract was aseptically removed at intervals of 14 and 22 days post-treatment. The suspension obtained from homogenization in a sterile mortar containing sterile distilled water was cultured on nutrient agar plates. Five days after incubation, the presence of Bt spores and crystals was examined. To confirm that the bacteria isolated from the gastrointestinal tract were indeed *B. thuringiensis*, bacterial DNA was extracted and subjected to PCR amplification. The resulting PCR product was sequenced for analysis. The obtained sequence was then analyzed and compared with existing sequences in NCBI database to ensure accurate identification. Additionally, in a separate experiment, the bacterium was introduced into lettuce plants through irrigation and foliar spray to test the capabilities of internal colonization. For this, 10 days post-inoculation, leaf samples were collected, surface-sterilized, and homogenized, the homogenate was plated and incubated for five days to confirm *B. thuringiensis* endophytic colonization. After incubation, the presence of Bt-specific spores and crystal proteins was assessed to verify successful colonization.

Results

No visible effects were observed on eggs and adult snails across all treatments. However, non-adult snails treated with the *Bt* suspension at a concentration of 10^9 CFU/ml ceased feeding from the second day of treatment onwards and continued for 21 days. Bt presence in the homogenized suspension from the gastrointestinal tracts of non-adult, starved snails was confirmed by the observation of Bt-specific spores and crystal. The bacterial identity was confirmed through sequence analysis of the 16S rRNA gene and comparison with the NCBI-BLAST database. Additionally, the study demonstrated that *B. thuringiensis* successfully colonized lettuce leaves endophytically when applied through foliar spraying. Ten days post-inoculation, Bt-specific spores and crystals were detected in lettuce leaves treated with a Bt suspension via spraying. In contrast, no evidence of endophytic colonization was observed in plants treated through root drenching, indicating that the method of application significantly influences Bt's ability to colonize lettuce endophytically. The effect of the bacterium in its endophytic state on both adult and non-adult snails is under investigation to study the effect caused by endophytic bacteria through a host plant on the snails.

Conclusion

The findings of the present study illustrate that, though B. thuringiensis does not have a direct effect on the adult *A. fulica*, its effect is remarkable at high concentrations on the feeding of non-adult snails. This effect on feeding behavior of snail can result in reduced and delayed development, which can have cascading effects on the overall population dynamics of A. fulica. On the other hand, the capability of Bt to establish an endophytic relationship with lettuce through foliar application enhances new possibilities for its application in integrated pest management systems. This may, therefore, provide a long-term, systemic resistance against pests and hence reduce reliance on periodic chemical applications. The potential of Bt as a biocontrol agent has great implications for sustainable agriculture and should be further studied for its long-term efficacy and various impacts on the different crops and snail species.

Author contribution

All authors contributed equally to the conceptualization of the article and writing of the original and subsequent drafts.

Data availability

The data will be made available on request.

Acknowledgement

This research was financially supported by the UniversityCollege of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran. We thank University of Theran for providing research facility and support.

Conflict of interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

انتشارات دانشگاه تهران

نشریه دانش گیاهپزشکی ایران، دوره ۵۶، شماره ۱

شاپا الکترونیکی: ۷۸۶۸-۲۴۲۳

Homepage: http://ijpps.ut.ac.ir/

بررسی اثرات غیرکشندگی باکتری *Bacillus thuringiensis* روی حلزون *Achatina fulica*

نغم شیخ سلیمان[۱] | رضا طلایی حسنلویی[۲] ✉ | ابراهیم اسداغی[۳]

۱. گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: nanoooalshiekh@gmail.com

۲. نویسنده مسئول، گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: rtalaei@ut.ac.ir

۳. گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: eosdaghi@ut.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۹/۲۰
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۱۰/۰۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۰/۰۷
تاریخ انتشار: بهار و تابستان ۱۴۰۴

کلیدواژه‌ها:
Achatina fulica، *باکتری بیمارگر حشرات*، *کنترل میکروبی*، *آفت کشاورزی*، *اندوفیت*.

چکیده

حلزون Achatina fulica (Gastropoda, Achatinidae) حلزون *Achatina fulica* (Gastropoda, Achatinidae)یکی از مهم‌ترین آفات کشاورزی با انتشار گسترده و دامنه میزبانی وسیع در گیاهان مختلف است. متداول‌ترین روش کنترل این‌گونه، استفاده از حلزون‌کش شیمیایی متالدئید است که اگرچه در کنترل جمعیت کارایی دارد اما اثرات منفی آن برای محیط زیست قطعی است. بنابراین، جستجو برای شیوه‌های جایگزین مانند استفاده از عوامل کنترل بیولوژیک ضروری شده است. باکتری *Bacillus thuringiensis* (Bt) مهم‌ترین عامل میکروبی برای کنترل حشرات آفت است و برای استفاده از آن در کنترل نرم‌تنان زیان‌آور کشاورزی، به بررسی بیشتری نیاز هست. در پژوهش حاضر، اثر باکتری Bt تهیه شده به صورت فرآورده تجاری در داخل کشور، به دو صورت مستقیم و غیرمستقیم (در حالت اندوفیت) روی حلزون *A. fulica* بررسی شد. کاهو به عنوان یک میزبان ترجیحی حلزون، در گلخانه کشت و برای تغذیه حلزون مورد استفاده قرار گرفت. برای دستیابی به باکتری در فاز رویشی، از کشت آن روی Nutrient Agar (NA) استفاده شد. پتانسیل اندوفیت شدن Bt با استفاده از روش پاشش روی برگ‌ها و روش آبیاری گیاهان ۶ هفته‌ای کاهو از سوسپانسیون باکتری با غلظت معادل $۸/۷\times۱۰^{۸}$ CFU/ml مورد مطالعه قرار گرفت. داده‌های حاصل از ۱۰ روز بعد از تلقیح در خصوص اندوفیت شدن باکتری در برگ‌ها نشان داد که این فرایند فقط با روش پاشش موفق بوده و برگ‌های گیاهانی که با سوسپانسیون باکتریایی از طریق ریشه تیمار شده‌اند، فاقد باکتری اندوفیت است. تأثیر Bt در چند تیمار مختلف با غوطه‌وری برگ‌های کاهو درون سوسپانسیون اسپور–کریستال باکتری (در مقادیر ۵×۱۰^{۸} و ۵×۱۰^{۹} CFU/ml)، درون سوسپانسیون باکتری در فاز رویشی و بدون کریستال (۵×۱۰^{۸} cell/ml)، سوسپانسیون باکتری *Xanthomonas translucens* (شاهد ۱) و آب مقطر استریل (شاهد ۲) روی افراد بالغ و نابالغ حلزون *A. fulica* مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که هیچ کدام از تیمارها روی افراد بالغ حلزون اثر قابل مشاهده ندارد اما افراد نابالغ حلزون تیمار شده با غلظت $۱۰^{۹}$ CFU/ml از روز دوم تیمار به بعد و به مدت ۲۱ روز هیچ تغذیه‌ای از برگ‌های کاهو نداشتند. برای تأیید وجود باکتری در دستگاه گوارشی افراد نابالغ که تغذیه را متوقف کرده بودند، در فواصل زمانی ۱۴ و ۲۲ روز پس از تیمار، لوله گوارشی از بدن آنها در شرایط استریل جدا شد. سوسپانسیون حاصل از همگن‌سازی در هاون چینی حاوی آب مقطر استریل، در ظروف پتری حاوی آگار غذایی کشت داده شد. پنج روز بعد از انکوباسیون، وجود اسپور و کریستال Bt تأیید شد. همچنین، بررسی مولکولی وجود باکتری در دستگاه گوارشی با استفاده از PCR و توالی‌یابی ژن 16S rRNA انجام گرفت و هویت باکتری با مقایسه توالی در بانک‌های اطلاعاتی تأیید گردید. با این که مرگ این گونه حلزون با باکتری مورد استفاده، ثبت نشد اما توقف تغذیه مراحل نابالغ به مدت سه هفته، می‌تواند تاثیر بسزایی در کاهش خسارت حلزون داشته باشد.

استناد: شیخ سلمان، نغم؛ طلایی حسنلویی، رضا و اسداغی، ابراهیم (۱۴۰۴). بررسی اثرات غیرکشندگی باکتری *Bacillus thuringiensis* روی حلزون *Achatina fulica*. *نشریه دانش گیاهپزشکی ایران*، ۵۶ (۱)، ۲۸۱-۲۶۷. DOI: https://doi.org/10.22059/ijpps.2026.410597.1007114

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: https://doi.org/10.22059/ijpps.2026.410597.1007114

مقدمه

حلزون‌های خانواده Achatinidae با حدود ۲۰۰ گونه در ۱۳ جنس، از نظر ایجاد خسارت در محصولات کشاورزی اهمیت زیادی دارند (Raut and Barker, 2002). حلزون غول‌پیکر آفریقایی *Achatina fulica* مهاجم‌ترین گونه حلزون آفت در جهان معرفی شده است. این گونه می‌تواند روی تعداد زیادی از گیاهان از جمله بیشتر گیاهان زینتی، سبزی‌ها و حبوبات به‌شدت آسیب بزند. پوست درختان نسبتاً بزرگ مانند مرکبات، پاپایا، لاستیک و کاکائو در معرض حمله قرار می‌گیرد. گزارش‌هایی از تغذیه *A. fulica* از صدها گونه گیاهی وجود دارد. ترجیح گیاهان خاص در یک محل خاص در درجه اول به ترکیب جوامع گیاهی، باتوجه به گونه‌های موجود و مرحله رشد گیاهان گونه‌های مختلف بستگی دارد (Raut and Ghose, 1984; Raut and Barker, 2002). گونه *A. fulica* به‌خاطر انتقال نماتد *Angiostrongylus cantonensis* عامل نگرانی برای سلامت عمومی هم است که باعث بیماری التهاب پرده مغز در انسان می‌شود، و موارد قابل‌توجهی از این مشکل در برخی از کشورهای آسیایی و جزایر اقیانوس آرام گزارش شده است (Alicata 1991; Prociv *et al*. 2000). اگر چه *A. fulica* یک حلزون گرمسیری است، اما می‌تواند در شرایط سرد، حتی برف، با خواب زمستانی زنده بماند. تولیدمثل با روش هرمافرودیت اجباری است. حلزون‌ها از شش‌ماهگی شروع به تخم‌گذاری می‌کنند. در سال اول تا ۱۰۰ عدد و در سال دوم تا ۵۰۰ عدد تخم می‌گذارند. باروری پس از سال دوم کاهش می‌یابد، اما ممکن است در پنج سال تا ۱۰۰۰ عدد تخم بگذارند. طول عمر *A. fulica* به طور معمول۶-۵ سال است، اما می‌تواند تا ۹ سال زنده بماند. متداول‌ترین روش کنترل *A. fulica* کنترل شیمیایی با استفاده از متالدئید بوده است، که علاوه بر عدم کارایی کامل، اثرات منفی آن برای محیط زیست قطعی است (Raut and Barker, 2002; Smith and Fowler, 2003).

تلاش پژوهشگران برای یافتن عوامل کنترل بیولوژیک حلزون به‌منظور کاهش مصرف یا جایگزین عوامل شیمیایی تاکنون نتایج روشن و مشخصی نداشته است. چالش‌های موجود در استفاده از روش‌های بیولوژیک، از جمله عدم سازگاری عوامل معرفی‌شده با زیستگاه‌های بومی و تأثیرات جانبی بر گونه‌های غیرهدف، نیازمند تحقیقات جامع‌تر و برنامه‌ریزی‌های بلندمدت است (Muru, 2021). به عنوان مثال، حلزون شکارگر *Euglandina rosea* در بسیاری از مناطق به‌منظور کنترل جمعیت *A. fulica* معرفی شده است. این گونه از حلزون‌ها با رژیم غذایی شکارگری خود می‌توانند به کاهش جمعیت حلزون‌های مهاجم کمک کنند. بااین‌حال، مطالعات نشان داده‌اند که این روش در برخی موارد منجر به آسیب به گونه‌های بومی حلزون‌ها شده و تأثیرات زیست‌محیطی ناخواسته ایجاد کرده است (Gerlach *et al*., 2021).

پس از شناسایی زیرگونه‌ها و سروتیپ‌های مختلف از باکتری (Bt) *B. thuringiensis* که روی موجودات متنوعی تاثیرگذار بودند، اثر آن روی کنترل حلزون نیز معطوف گردید. این باکتری هم‌اکنون به عنوان یک جایگزین یا مکمل مفید برای کاربرد آفت‌کش‌های شیمیایی مصنوعی در کشاورزی، مدیریت جنگل‌ها و کنترل ناقلین مهم بیماری‌های انسانی و دامی به کار می‌رود. پروتئین‌های Cry تولیدی این باکتری، طیف گسترده‌ای از گونه‌های حشرات به‌ویژه از راسته‌های بال‌پولک‌داران، سخت‌بال‌پوشان و دوبالان را هدف قرار می‌دهند، اما گزارش‌هایی نیز در مورد سمیت آن‌ها نسبت به بال‌غشائیان و نماتدها وجود دارد (Domínguez-Arrizabalaga *et al*. 2020). توکسین‌های Cry و Cyt به دسته توکسین‌های منفذساز (Pore Forming Toxin) تعلق دارند که به عنوان پروتئین‌های محلول در آب ترشح شده و تحت تغییرات ساختاری قرار می‌گیرند تا وارد یا از غشای سلولی میزبان عبور کنند(Vachon *et al*. 2012; Jurat-Fuentes and Crickmore, 2017) .

در این تحقیق، اثرات غیرکشندگی باکتری *B. thuringiensis* روی مراحل مختلف زندگی حلزون مهاجم و زیان‌آور کشاورزی *A. fulica* بررسی شد. هدف از این پژوهش، ارزیابی توانایی Bt در کاهش رفتار تغذیه‌ای حلزون و بررسی امکان استفاده از باکتری Bt به عنوان یک عامل زیستی در مدیریت این آفت کشاورزی بود. همچنین، سنجش توانایی اندوفیت شدن Btدر گیاه کاهو از طریق روش‌های مختلف تلقیح مورد مطالعه قرار گرفت.

پیشینهٔ پژوهش

گزارش Ester و Nijenstein در سال ۱۹۹۵ بیان می‌دارد که باکتری Bt دو روز بعد از تیمار باعث کاهش حمله نرم‌تنان به گیاهان گندم شده است (Ester and Nijenstein, 1995). در یک بررسی دیگر، Laznik و همکاران در سال ۲۰۱۰ حجم ۰/۲۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری Bt از محصول تجاری Delfin (*B. thuringiensis* var. *kurstaki*) را به لیسک *Arion* spp. تزریق کردند و یک روز بعد از تزریق این باکتری باعث مرگ ۱۰۰ درصد آنها شد (Laznik *et al*. 2010). در مطالعه Abd El Ghany و همکاران در سال ۲۰۱۷، اثر یازده جدایه *B. thuringiensis* به‌عنوان عامل کنترل بیولوژیک حلزون *Biomphalaria alexandrina* (میزبان واسط شیستوزومازیس انسان و حیوانات مختلف) بررسی گردید که نتایج نشان داد جدایه‌های مختلف باکتری با ایجاد مرگ بین ۲۰ تا ۱۰۰ درصد با ، یک عامل مناسب و موفق برای کنترل این حلزون است (Abd El Ghany *et al*., 2017).

Schneider و همکاران در سال ۲۰۲۱ گزارش کردند که توکسین Cry1Ab35 از باکتری Bt روی شکم‌پایان اثر سمی دارد (Schneider *et al*., 2021). Gaber و همکاران در سال ۲۰۲۲، فعالیت فراورده Protecto (*Bt*) بر تغییرات بیوشیمیایی و ساختار بافت‌ها در حلزون *Monacha cartusiana* را مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که شاخص‌های آنزیمی Alp، Alt و Ast افزایش پیدا می‌کند و در مقابل سطح TP در حلزون‌های تیمار شده، کاهش می‌یابد. ساختار بافت‌ها نیز تحت تاثیر قرار گرفته و غدد گوارشی در غلظت‌های LC_{20} و LC_{40}، با پاره شدن سلول‌های گوارشی و نفوذ مونوسیت‌ها، دچار نکروز و تجزیه شد (Gaber *et al*., 2022).

روش‌شناسی پژوهش

پرورش حلزون و کشت باکتری

حلزون *A. fulica* در مراحل مختلف زیستی شامل تخم، افراد نابالغ و افراد بالغ (شکل ۱) از مرکز فادر فارم حلزون، پرورش به منظور کاربردهای بهبود پوست و فیزیوتراپی صورت، تهیه شد. پس از خرید، نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل شدند و در ظروف پلاستیکی سوراخ‌دار با ابعاد مناسب قرار گرفتند و به مدت دو هفته در بستر خاک سالم با کاهوی سالم تغذیه شدند. برای تهیه باکتری از فرم تجاری سوسپانسیون غلیظ *B. thuringiensis* با نام تجاری بایولپ® تولید شرکت بایوران استفاده شد.

شکل ۱. نگهداری مراحل مختلف زیستی حلزون *Achatina fulica* شامل تخم و ظروف نگهداری آن (الف)، افراد نابالغ و ظروف نگهداری آن‌ها (ب) و افراد بالغ و ظروف نگهداری (ج).

آزمون اندوفیت باکتری در گیاهان کاهو

بذر کاهو رقم رومی (*Lactuca sativa* var. *longifolia*) تهیه و درون گلدان‌های پلاستیکی کشت شد. داخل گلخانه با شرایط دمایی ۲۵ سلسیوس، رطوبت نسبی ۶۰ ٪ و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. زمانی که گیاهان کاهو ۶ هفته‌ای شدند، سوسپانسیون باکتری به میزان ۱۰ میلی‌لیتر از غلظت معادل $8/7\times10^8$ CFU/ml مبتنی بر توصیه شرکت عرضه کننده، با استفاده از روش پاشش برگ‌ها و روش آبیاری گیاهان تلقیح شدند. ده روز بعد از تلقیح برای بررسی اندوفیت شدن باکتری، برگ‌ها از گیاهان تیماری جدا شد و با الکل ۷۰ درجه، استریل سطحی صورت گرفت. سپس در

هاون چینی حاوی اب مقطر استریل له شده و عصاره به دست آمده روی محیط کشت Nutrient Agar کشت داده شد. پنج روز بعد از کشت، وجود اسپور و کریستال متعلق به باکتری Bt مورد بررسی قرار گرفت.

زیست‌سنجی

بعد از آماده‌سازی حلزون‌ها، تاثیر سوسپانسیون باکتری با چند تیمار علیه آنها مورد بررسی قرار گرفت: غوطه‌وری برگ‌های کاهو درون سوسپانسیون اسپور–کریستال باکتری در مقادیر CFU/ml $۱۰^{۸}\times$ ۵ و $۱۰^{۹}$ و غوطه‌وری برگ‌های کاهو درون سوسپانسیون باکتری در فاز رویشی و بدون کریستال با مقدار cell/ml $۱۰^{۸}\times$ ۵، غوطه‌وری برگ‌های کاهو درون سوسپانسیون باکتری *Xanthomonas translucens* (شاهد ۱) و آب مقطر استریل (شاهد ۲)، که برای تغذیه به صورت تیمارهای جداگانه در اختیار افراد بالغ و نابالغ حلزون قرار گرفت. برای به دست اوردن فاز رویشی از باکتری *B. thuringiensis* و *X. translucens*، باکتری Bt از فرمولاسیون تجاری و *X. translucens* از ویال حاوی باکتری که قبلا توالی یابی و تعیین هویت شده و در آب گلیسرول نگهداری شده، در ظروف پتری حاوی محیط کشت Nutrient Agar (NA) کشت داده شد و ۲۴ ساعت بعد از کشت، سوسپانسیون باکتری حاوی فاز رویشی تهیه گردید.

جداسازی باکتری Bt از داخل بدن حلزون

برای تأیید وجود باکتری در دستگاه گوارشی افرادی که تغذیه را متوقف کرده بودند، در فواصل زمانی ۱۴ و ۲۲ روز پس از تیمار، لوله گوارشی از بدن آنها در شرایط استریل جدا شد. سوسپانسیون حاصل از همگن‌سازی در هاون چینی حاوی آب مقطر استریل، در ظروف پتری حاوی آگار غذایی کشت داده شد که برای جداسازی باکتری Bt از این سوسپانسیون، از روش انتخابی استات سدیم استفاده شد (Travers *et al*. 1987). برای انجام این فرآیند، یک میلی‌لیتر از نمونه به مدت سه ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس در ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع حاوی ۰/۲۵ مولار استات سدیم (با pH 6.8) کشت داده شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه تحت شوک حرارتی در دمای ۶۰ تا ۷۰ درجه سلسیوس قرار گرفت تا اسپورهای جوانه‌زده سایر باکتری‌ها از بین بروند و اسپورهای مقاوم Bt باقی بمانند. در نهایت، نمونه‌ها روی محیط‌های کشت NA کشت داده شدند. پنج روز بعد از انکوباسیون، کلنی‌های باکتری با توجه به ویژگی‌های ظاهری (رنگ سفید مات) انتخاب شده، وجود اسپور و کریستال Bt مورد بررسی قرار گرفت و در آب گلیسرول در دمای ۲۳– درجه سلسیوس نگهداری شدند.

بررسی مولکولی وجود باکتری در دستگاه گوارشی حلزون

جداسازی DNA باکتری

باکتری‌های جدا شده با روش فوق روی محیط کشت NA کشت شدند. مقدار معینی از نمونه کشت‌شده در یک میلی‌لیتر محلول حاوی Tris (۰/۰۱ مولار با pH: 8)، EDTA (۰/۰۰۱ مولار) و NaCl (۱ مولار) قرار داده و سانتریفیوژ شد. سپس مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج Tris (۰/۰۲۵مولار با pH: 8)، EDTA (۰/۰۱ مولار)، ساکارز (۲۵ درصد) و لایزوزایم (۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به بخش ته‌نشین اضافه شد و به مدت یک ساعت و نیم در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شد. پس از آن، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول دوم شامل NaOH (۱۰ مولار)، SDS (۱۰ درصد) و آب مقطر استریل به آن افزوده و نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۰– درجه سلسیوس قرار گرفتند. سپس، ۲۰۰ میکرولیتر از NaCl (۵ مولار) به مخلوط اضافه و به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۲۰– درجه سلسیوس باقی ماندند. نمونه‌ها با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت پنج دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند. محلول رویی به میکروتیوب جدید منتقل شد و به نسبت ۱/۵ تا ۲/۵ برابر حجم آن، اتانول سرد (۲۰– درجه سلسیوس) اضافه و دوباره سانتریفیوژ شد. ته‌نشین با اتانول ۷۰ درجه دو بار شست‌وشو داده شد و پس از خشک شدن، در محلول TE حاوی Tris (۱۰ میلی‌مولار) و EDTA (یک میلی‌مولار) حل شد (Rolle *et al.*, 2005).

انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز:

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با جفت آغازگر الیگونوکلیوتیدی مناسب ناحیه 16s rRNA باکتری انجام شد و محصول واکنش با استفاده از ژل آگاروز دو در صد الکتروفورز شد و الگوهای باندی به‌دست آمده مشاهده و ثبت شد. محصول PCR مربوط به ژن 16S rRNA برای تعیین توالی به یک شرکت معتبر ارسال شد.

F(fD1): AGAGTTTGATCCTGGCTCAG و R(rP2): ACGGCTACCTTGTTACGACTT (Weisburg *et al*., 1991)

همچنین، برای ارزیابی کیفیت ژل الکتروفورز و کنترل مقایسه‌ای، سه نمونه ویروسی که با پرایمرهای اختصاصی ویروسی تکثیر شده بودند، به‌عنوان نمونه‌های جانبی در کنار نمونه باکتریایی بارگذاری شدند. محصول PCR مربوط به ژن 16S rRNA برای تعیین توالی به شرکت پیشگام (Pishgam) ارسال گردید.

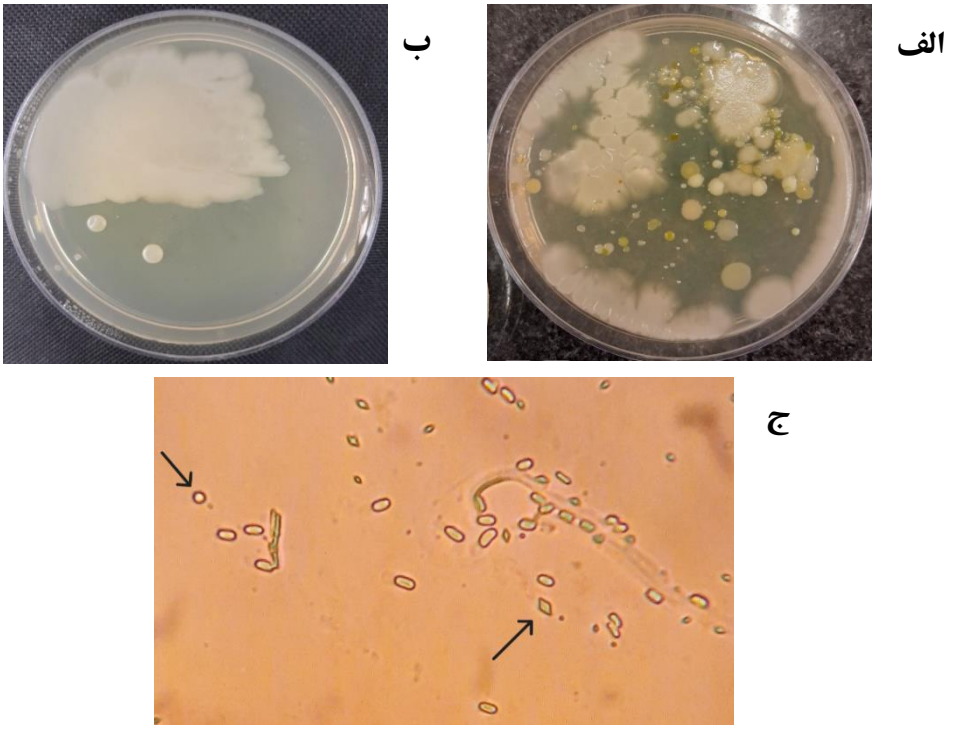
یافته های پژوهشی

بررسی اثر تیمارها رو مراحل مختلف حلزون *A. fulica*

هیچ کدام از تیمارهای آزمایشی بر افراد بالغ و تخم حلزون اثر قابل مشاهده نداشتند و هیچ گونه مرگ و میری ثبت نشد. اما افراد نابالغ حلزون تیمار شده با غلظت 10^9 CFU/ml از روز دوم تیمار به بعد و به مدت ۲۱ روز هیچ تغذیه‌ای از برگ‌های کاهو نداشتند.

بررسی ماندگاری Bt در دستگاه گوارشی حلزون

نتایج به‌دست‌آمده پنج روز پس از انکوباسیون سوسپانسیون باکتریایی حاصل از همگن‌سازی لوله گوارشی حلزون‌های کم‌فعال، وجود اسپور و کریستال‌های مرتبط با باکتری (Bt) *B. thuringiensis* را تأیید کرد. همچنین، مشاهده شد زمانی که سوسپانسیون به‌دست‌آمده از دستگاه گوارشی این حلزون‌ها، بدون استفاده از روش استات سدیم به‌طور مستقیم کشت داده شد، علاوه بر Bt، سایر باکتری‌ها نیز رشد داشتند (شکل۲–الف). در حالی که با استفاده از روش استات سدیم، تنها رشد Bt مشاهده شد (شکل ۲–ب).

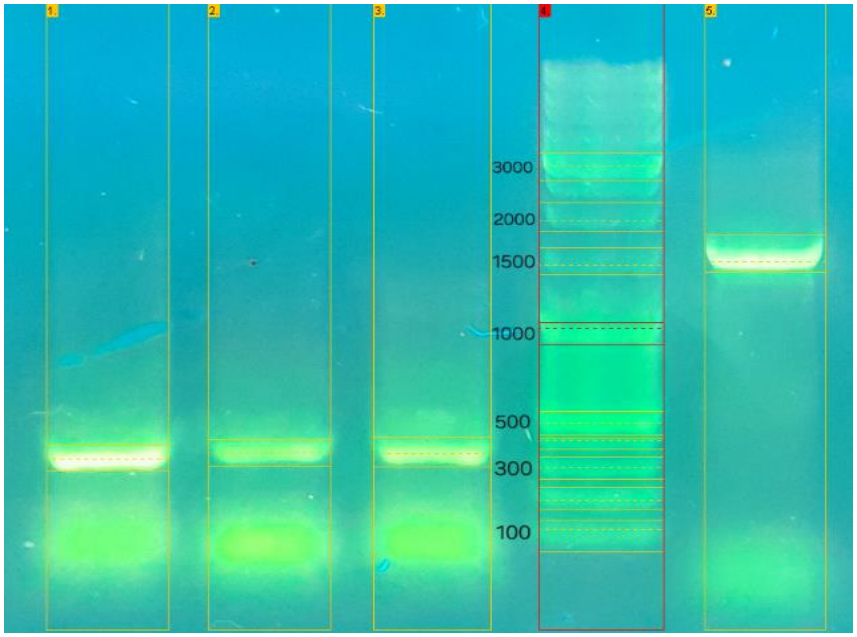


شکل ۲. کشت از سوسپانسیون دستگاه گوارشی حلزون ۱۴ روز بعد از تیمار بدون استفاده (الف) و با استفاده از روش استات سدیم (ب) و وجود اسپور و کریستال باکتری Bt از کشت سوسپانسیون جدا شده از لوله گوارشی ۱۴ روز بعد از تیمار (ج).

برای شناسایی میکروسکوپی باکتری، پنج روز پس از کشت سوسپانسیون‌های باکتریایی به‌دست آمده از دستگاه گوارش حلزون‌های کم‌فعال، که به ترتیب ۱۴ و ۲۲ روز پس از تیمار با غلظت 10^9 CFU/mL باکتری *B. thuringiensis* تهیه‌شدند، از تک‌کلون‌های رشد یافته روی محیط کشت NA اسلاید تهیه شد. این اسلایدها با استفاده از میکروسکوپ نوری در فاز کنتراست بررسی شدند و ساختارهای ویژه باکتری *B. thuringiensis* مانند اسپورها و کریستال‌های پروتئینی، شناسایی شدند. این ویژگی‌های میکروسکوپی، که در شکل ۲–ج نشان داده شده‌اند، به شناسایی مقدماتی باکتری کمک کرد. باکتری‌های جدا شده در محلول گلیسرول در دمای منفی ۲۳ درجه سلسیوس نگهداری شدند. این شرایط برای حفظ نمونه‌ها به منظور انجام مراحل بعدی آزمایش، شامل استخراج DNA و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج DNA و PCR ژن 16S rRNA

در این مطالعه، پس از استخراج DNA باکتریایی و انجام PCR با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی ناحیه 16S rRNA، محصولات واکنش بر روی ژل آگاروز ۱ درصد بارگذاری و الکتروفورز شدند. نتایج حاصل در شکل ۳ نمایش داده شده است.



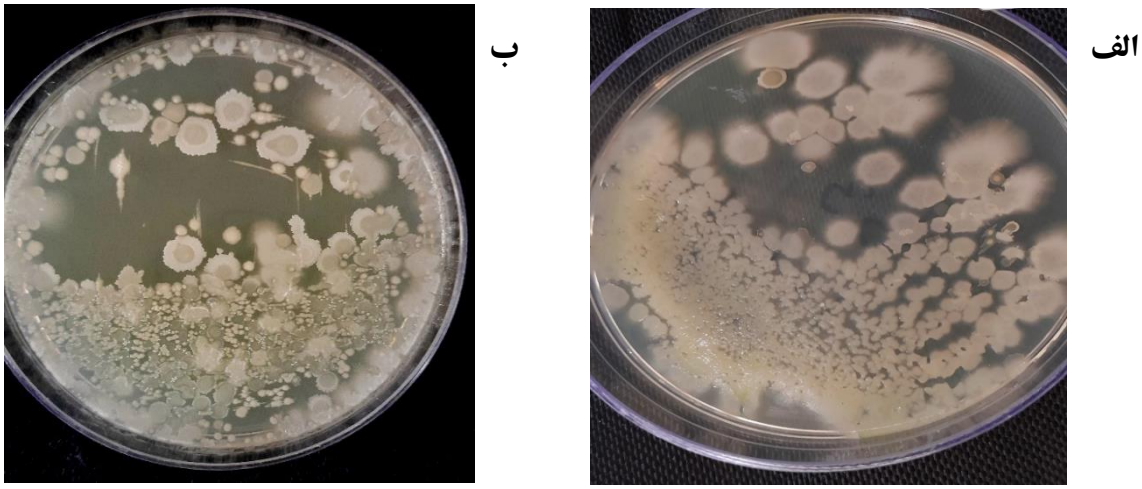
شکل ۳: تصویر ژل الکتروفورز، تحلیل‌شده با نرم‌افزار GelAnalyzer نسخه ۲۳،۱،۱، شامل :(الف) مسیرهای نمونه، شامل سه نمونه ویروسی با باندهای ۳۰۰ جفت‌باز در مسیرهای سمت چپ تصویر (Lanes 1, 2, 3) ، مسیر نردبان مولکولی در مرکز تصویر (Lane 4) ، و نمونه باکتریایی در مسیر سمت راست تصویر (Lane 5).
(www.gelanalyzer.com by Istvan Lazar Jr., PhD and Istvan Lazar Sr., PhD, CSc)

در چاهک‌های ژل، نمونه موردنظر مربوط به ناحیه 16S rRNA باکتریایی، در باندی با اندازه ۱۵۰۰ جفت‌باز مشاهده شد (شکل ۳). این باند مطابق با اندازه پیش‌بینی‌شده برای ناحیه 16S rRNA بوده و نشان‌دهنده تکثیر موفق و اختصاصی ژن هدف است. این موضوع کیفیت مطلوب استخراج DNA و صحت عملکرد PCR را تأیید می‌کند. نمونه‌های ویروسی در باندی با اندازه ۳۰۰ جفت‌باز در تصویر قابل مشاهده هستند. حضور این باندها در نقاط پیش‌بینی‌شده، علاوه بر صحت فرآیند بارگذاری و مهاجرتDNA ، نشان‌دهنده کیفیت مناسب ژل و صحت رنگ‌آمیزی است.

اطمینان حاصل شد که باکتری جدا شده از دستگاه گوارش حلزون، پس از ۲۲ روز از تیمار با سوسپانسیون باکتری که هیچ‌گونه تغذیه‌ای از برگ‌های کاهو نداشت، به گونه مورد نظر (*B. thuringiensis*) تعلق دارد. این تأیید از طریق مقایسه توالی به‌دست‌آمده با پایگاه‌های داده ژنومی NCBI (Zhang *et al.* 2000) انجام شد. تحلیل BLAST نشان داد که توالی ژن 16S rRNA مربوط به باکتری جداشده، دارای شباهتی بیش از ۹۹٪ با توالی‌های ثبت‌شده از گونه *B. thuringiensis* است. این نتایج به وضوح تأیید می‌کند که باکتری جداشده به این گونه تعلق دارد و اثرات مشاهده‌شده در رفتار تغذیه‌ای حلزون‌های نابالغ تیمارشده، مرتبط با این باکتری است.

اندوفیت کردن Bt به گیاه کاهو

نتایج بررسی اندوفیت کردن Bt در گیاه کاهو با دو روش پاشش برگ‌ها و آبیاری نشان داد که اندوفیت شدن فقط با روش پاشش سوسپانسیون موفق بوده است (شکل ۴–الف). برگ‌های گیاهانی که با سوسپانسیون باکتریایی از طریق ریشه تیمار شده‌اند، فاقد باکتری اندوفیت است (شکل ۴–ب). اثر گیاه دارای اندوفیت Bt روی مراحل بالغ و نابالغ حلزون تحت بررسی است.



شکل ٤. کشت عصاره گیاهان تیمار شده برای بررسی آندوفیت شدن، ۱۰ روز بعد از تلقیح با سوسپانسیون باکتری *Bacillus thuringiensis*. کلنی‌های Bt در روش استفاده از پاشش برگ‌ها (الف) و فاقد کلنی‌های Bt در استفاده از روش آبیاری (ب).

بحث و نتیجه گیری

مطالعه حاضر نشان داد که باکتری *B. thuringiensis* می‌تواند به عنوان یک عامل بیولوژیک بر رفتار تغذیه‌ای حلزون‌های نابالغ *A. fulica* اثرات کاملاً مشهود و بادوام داشته باشد. به طوری که حلزون‌های نابالغ تیمار شده با غلظت 10^9 CFU/ml، از روز دوم به بعد هیچ تغذیه‌ای از برگ‌های کاهو نداشتند و این قطع تغذیه به مدت ۲۱ روز ادامه داشت. مکانیسم این تاثیرگذاری هنوز به طور روشن مشخص نیست اما به احتمال زیاد با حضور کریستال پروتئین‌های Cry و Cyt ارتباط دارد. این اثرات در موارد پیشین نیز در مورد حشرات و برخی نرم‌تنان گزارش شده است. به عنوان مثال، مطالعات نشان داده که باکتری Bt زمانی که روی گیاهان گندم استفاده شده، توانسته میزان تغذیه برخی نرم‌تنان را کاهش دهد (Ester and Nigenstein, 1995).

نکته قابل‌توجه دیگر در این پژوهش، تفاوت میان حلزون‌های نابالغ و بالغ در واکنش به تیمار Bt است. در حالی که حلزون‌های نابالغ تحت تاثیر قرار گرفتند، هیچ تغییری در رفتار تغذیه حلزون‌های بالغ مشاهده نشد. این تفاوت می‌تواند به عوامل متعددی از جمله تفاوت‌های فیزیولوژیکی، سیستم ایمنی و جرم بدن مرتبط باشد. دستگاه گوارش بالغ‌ها ممکن است به دلیل وجود لایه‌های محافظتی مانند موکوس ضخیم‌تر، حائل موثرتری در برابر دسترسی توکسین‌های باکتری به دیواره لوله گوارشی باشد. لایه‌های موکوسی به محافظت از دیواره‌های دستگاه گوارش افراد بالغ در برابر عوامل و آسیب‌های مکانیکی کمک می‌کند (Radwan et al., 2020)، احتمالاً افراد نابالغ حلزون‌ها دارای لایه‌های محافظتی مشابه بالغ‌ها نباشند همان طور که در تحقیق Dikkeboom و همکاران، مشخص گردید افراد نابالغ حلزون‌ها نسبت به افراد بالغ از سیستم ایمنی ضعیف‌تری برخوردارند و سیستم‌های دفاعی و محافظتی با بلوغ و رشد تکامل می‌یابند (Dikkeboom et al. 1985). از طرف دیگر، در حلزون‌های بالغ به دلیل توده بدنی بیشتر، ممکن است برای ظهور اثرات مشابه به غلظت‌های بسیار بالاتری از باکتری نیاز باشد. این اختلاف در مقاومت به دلیل تفاوت‌های فیزیولوژیکی و سطح توسعه‌یافتگی بین نابالغ‌ها و بالغ‌ها طبیعی است. یافته تحقیق حاضر در خصوص اثر غلظت با نتایج مطالعه تغییرات هیستوپاتولوژیک روی حلزون‌های *Eobania vermiculata* قابل مقایسه است، که فقط غلظت 3×10^8 (CFU/ml) سلول‌های پوششی مری را تخریب کرده و غلظت پایین‌تر (CFU/ml 1×10^8) تأثیری نداشته است (Said and Ali, 2018). اگرچه در تحقیق حاضر تغییرات در بافت‌های گوارشی حلزون‌ها مورد

بررسی قرار نگرفت اما ممکن است تغییرات مشابهی در ساختار بافتی، مانند تخریب سلول‌های پوششی مری یا معده، رخ داده باشد که به صورت اثرات بازدارندگی تغذیه‌ای نمایان گشته است.

در تحقیق El-Sabbagh و همکاران، مشخص شد که قارچ *Aspergillus flavus* و باکتری *B. thuringiensis* به ترتیب ۳۰ و ۱۰۰ درصد مرگ در حلزون خاکزی *Monacha cartusiana* ایجاد می‌کند. این اثر کشنده به اجسام پاراسپورال تولیدشده توسط Bt نسبت داده شده است (El-Sabbagh *et al*., 2013). در مطالعه حاضر، اگرچه هیچ مرگ‌ومیری در حلزون‌های *A. fulica* مشاهده نشد، بازدارندگی تغذیه تنها در تیمار حاوی غلظت بالای اسپور–کریستال *B. thuringiensis* ثبت شد. این شباهت نشان می‌دهد که اسپور و کریستال‌های پروتئینی تولیدشده توسط Bt، مشابه با آنچه در مطالعه El-Sabbagh و همکاران گزارش شده، احتمالاً عامل اصلی این بازدارندگی تغذیه هستند. این یافته‌ها بر اهمیت نقش اجسام پاراسپورال و کریستال‌های پروتئینی در فعالیت زیستی Bt علیه حلزون‌ها تأکید دارد. با این حال، تفاوت در واکنش گونه‌های مختلف حلزون ممکن است به ویژگی‌های زیستی یا فیزیولوژیکی آن‌ها مرتبط باشد و نیازمند بررسی‌های بیشتر برای درک مکانیزم‌های دقیق اثرگذاری Bt است.

در مورد قابلیت Bt برای اندوفیت شدن در گیاه کاهو، نتایج این مطالعه نشان داد که این باکتری تنها از طریق روش پاشش بر روی برگ‌ها می‌تواند به صورت اندوفیت وارد گیاه شود، در حالی که روش آبیاری باکتری را به داخل بافت‌های گیاهی منتقل نکرد. احتمال دارد این تفاوت نشان‌دهنده اهمیت جابجایی این باکتری با روش سیمپلاستی در این گونه گیاهی (کاهو) است و انتقال باکتری با مسیر آپوپلاستی در کاهو صورت نمی‌گیرد. این یافته با نتایج کلی قبلی در مورد اندوفیت‌ها مطابقت دارد، که نشان می‌دهند روش‌های مختلف تلقیح به نحو قابل توجهی بر موفقیت یا عدم موفقیت اندوفیت شدن تأثیر می‌گذارد (Chai *et al*., 2022; Sultana *et al*., 2024). این قابلیت Bt برای استقرار اندوفیتی در گیاهان با اهمیت کشاورزی می‌تواند فرصت‌های جدیدی برای توسعه روش‌های کنترل زیستی با کاربرد سیستمیک و بلندمدت در مدیریت آفات ایجاد کند. این روش ممکن است علاوه بر کاهش وابستگی به آفت‌کش‌های شیمیایی، از طریق حفاظت سیستمیک گیاهان، در کاهش خسارات ناشی از آفات و بیماری نیز موثر باشد. به علاوه، پژوهش‌های بیشتری برای بهینه‌سازی روش‌های اندوفیت کردن Bt و نیز بررسی اثرات آن بر سایر مراحل رشد حلزون‌ها و گونه‌های دیگر آفات ضروری است تا بتوان از این باکتری به نحو موثرتری در برنامه‌های مدیریت یکپارچه آفات بهره‌برداری کرد.

سخن آخر این که بررسی حاضر به وضوح نشان می‌دهد که *B. thuringiensis* یک روش مؤثر برای کاهش چشمگیر خسارت ناشی از حلزون‌های نابالغ *A. fulica* است، علیرغم این که بر حلزون‌های بالغ اثر قابل ثبتی نداشت. لذا این امر مستلزم تحقیقات بیشتر برای بررسی دلایل این تفاوت‌ها است. علاوه بر این، نتایج ما در مورد استقرار Bt در گیاه، اگرچه محدود به روش پاشش است، اما چشم اندازهای جدیدی را برای استفاده از این باکتری در حفاظت از محصول کاهو در برابر حلزون مزبور باز می‌کند. این نکات ممکن است به عنوان پایه‌ای برای استفاده بهتر و موثرتر از Bt در مدیریت آفات و همچنین برای افزایش مقاومت گیاه در نظر گرفته شوند. تحقیقات بیشتر برای تعیین دقیق مکانیسم عمل *B. thuringiensis* در دستگاه گوارش حلزون‌های نابالغ و بررسی اثرات Bt بر سایر گونه‌های نرم‌تنان و شناسایی مناسب‌ترین روش‌های کاربرد آن، می‌تواند به گسترش کاربردهای این باکتری در کنترل آفات مختلف کمک نماید.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر به عنوان بخشی از پایان‌نامه نویسنده اول و با حمایت مالی دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران به انجام رسیده است. بدین‌وسیله از این حمایت، تشکر و قدردانی می‌شود.

REFERENCES

Abd El-Ghany, A. M., & Abd El-Ghany, N. M. (2017). Molluscicidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains against *Biomphalaria alexandrina* snails. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, *6*(4), 391-393. https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2017.05.003

Alicata, J. E. (1991). The discovery of *Angiostrongylus cantonensis* as a cause of human eosinophilic meningitis. *Parasitology Today*, *7*(6), 151-153. https://doi.org/10.1016/0169-4758(91)90285-V

Chai, Y. N., Futrell, S., & Schachtman, D. P. (2022). *Assessment of bacterial inoculant delivery methods for cereal crops. Front Microbiol 13: 791110*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.791110

Dikkeboom, R., Van der Knaap, W. P., Meuleman, E. A., & Sminia, T. (1985). A comparative study on the internal defence system of juvenile and adult Lymnaea stagnalis. *Immunology*, *55*(3), 547.

Domínguez-Arrizabalaga, M., Villanueva, M., Escriche, B., Ancín-Azpilicueta, C., & Caballero, P. (2020). Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* proteins against coleopteran pests. *Toxins*, *12*(7), 430. https://doi.org/10.3390/toxins12070430

El-Sabbagh, S. M., Adayel, S. A., Elmasry, S. A., & Alazazy, H. M. (2013). Biological control of some species of land snails infesting citrus trees. *New York Science Journal*, *6*(7), 5-12.

Ester, A., & Nijënstein, J. H. (1995). Control of the field slug *Deroceras reticulatum* (Müller)(Pulmonata: Limacidae) by pesticides applied to winter wheat seed. *Crop Protection*, *14*(5), 409-413. https://doi.org/10.1016/0261-2194(94)00024-3

Gaber, O. A., Asran, A. E. A., Khider, F. K., El-Shahawy, G., Abdel-Tawab, H., & Elfayoumi, H. M. (2022). Efficacy of biopesticide Protecto (*Bacillus thuringiensis*)(BT) on certain biochemical activities and histological structures of land snail Monacha cartusiana (Muller, 1774). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, *32*(1), 1-8. https://doi.org/10.1186/s41938-022-00534-6

Gerlach, J., Barker, G. M., Bick, C. S., Bouchet, P., Brodie, G., Christensen, C. C., ... & Yeung, N. W. (2021). Negative impacts of invasive predators used as biological control agents against the pest snail *Lissachatina fulica*: the snail Euglandina 'rosea'and the flatworm *Platydemus manokwari*. *Biological Invasions*, *23*, 997-1031. 10.1007/s10530-020-02436-w

Jurat-Fuentes, J. L., & Crickmore, N. (2017). Specificity determinants for Cry insecticidal proteins: Insights from their mode of action. *Journal of invertebrate pathology*, *142*, 5-10. 10.1016/j.jip.2016.07.018

Laznik, Ž., Mihičinac, M., Rupnik, J., Vidrih, M., Igor, P. R. Š. A., & Trdan, S. (2010). Testing the efficacy of different substances against *Arion* slugs (Arionidae) under laboratory conditions. *Acta agriculturae Slovenica*, *95*(2), 129-140. 10.2478/v10014-010-0009-x

Muru, D. (2021). *Magic bullet or shot in the dark? Potential and limits of biological control for experimental ecology* (Doctoral dissertation, Université Côte d'Azur). available on: https://theses.hal.science/tel-03272503v1

Prociv, P., Spratt, D. M., & Carlisle, M. S. (2000). Neuro-*angiostrongyliasis*: unresolved issues. *International Journal for Parasitology*, *30*(12-13), 1295-1303. https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00133-8

Radwan, M. A., El-Gendy, K. S., & Gad, A. F. (2020). Biomarker responses in terrestrial gastropods exposed to pollutants: A comprehensive review. *Chemosphere*, *257*, 127218. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127218

Raut, S. K., & Barker, G. M. (2002). *Achatina fulica* Bondich and other Achatinidae as Pests in Tropical Agriculture. In *Molluscs as crop pests* (pp. 55-114). CABI Publishing, CAB International. http://dx.doi.org/10.1079/9780851993201.0055

Raut, S. K., & Ghose, K. C. (1984). Pestiferous land snails of India. *Pestiferous land snails of India.*

Rolle, R. L., Ejiofor, A. O., & Johnson, T. L. (2005). Determination of the plasmid size and location of d-endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* by pulse field gel electrophoresis. *African Journal of Biotechnology*, *4*(7), 580-585.

Said, S. M., & Ali, S. M. (2018). Effects of bacteria Bacillus thuringiensis (Bt) on the diges-tive system of the land snail *Eobania vermiculata*. *Int J Ecotoxiol Ecobiol*, *3*(1), 17-21.

Schneider, K., Breck Davis, B., Tourtois, J., & Hulbert, D. (2021). Insecticidal combinations (WO2021222814A1). WIPO Patent. Retrieved from https://patents.google.com/patent/WO2021222814A1/en

Smith, J. W., & Fowler, G. (2003). Pathway risk assessment for achatinidae with emphasis on the giant african land snail *Achatina fulica* (Bowdich) and *Limicolaria aurora* (Jay) from the Caribbean and Brazil, with comments on related taxa *Achatina achatina* (Linne), and *Archachatina marginata* (Swainson) intercepted by PPQ. USDA-APHIS. *Center for Plant Health Science and Technology (Internal Report)*.

Sultana, R., Jashim, A. I. I., Islam, S. M. N., Rahman, M. H., & Haque, M. M. (2024). Bacterial endophyte *Pseudomonas mosselii* PR5 improves growth, nutrient accumulation, and yield of rice (*Oryza sativa* L.) through various application methods. *BMC Plant Biology*, *24*(1), 1030. https://doi.org/10.1186/s12870-024-05649-6

Travers, R. S., Martin, P. A., & Reichelderfer, C. F. (1987). Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, *53*(6), 1263-1266. 10.1128/aem.53.6.1263-1266.1987

Vachon, V., Laprade, R., & Schwartz, J. L. (2012). Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. *Journal of Invertebrate Pathology*, *111*(1), 1-12. doi: 10.1016/j.jip.2012.05.001

Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, *173*(2), 697-703. https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991

Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., & Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*, *7*(1-2), 203-214. 10.1089/10665270050081478