

بهینه‌سازی محیط کشت در تولید اسپور و کریستال باکتری *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* و ارزیابی زهر آگینی آن روی سن دوم پروانه *Ephestia kuehniella*

المیرا مختارنژاد^۱، شهرام آرمیده^{۲*}، محمود رضازاد باری^۳، محمدحسن صفرعلیزاده^۴، محمدرضا رضایانه^۵، مریم فروزان^۶

۱. دانشجوی دکتری حشره‌شناسی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

۲. دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

۳. استاد گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

۴. استاد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

۵. دانشیار بخش کنترل بیولوژیک، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران

۶. استادیار بخش تحقیقات گیاهپزشکی، سازمان تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان غربی، ارومیه

(تاریخ دریافت: ۹۹/۱۲/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۱۶)

چکیده

در پژوهش حاضر بیماری‌زایی اسپور و کریستال باکتری (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (HD-1)) تولیدشده در انواع محیط کشت در شرایط تخمیری و غیرتخمیری روی سن دوم لاروی *Ephestia kuehniella* L. بررسی شد. تعداد کلنی، تعداد اسپور، ضریب شکست نوری (OD) و وزن خشک سلولی در محیط کشت غنی شده و غنی نشده در شرایط تخمیری پس از ۹۶ ساعت کشت به ترتیب (2.8×10^{14} CFU بر میلی‌لیتر، 1.18×10^{10} اسپور بر میلی‌لیتر، 2.8×10^8 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، 11.8×10^{10} spore.mL⁻¹) و (2.8×10^{14} CFU بر میلی‌لیتر، 1.18×10^{10} اسپور بر میلی‌لیتر، 2.8×10^8 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، 11.8×10^{10} spore.mL⁻¹) در شرایط تخمیر نشده (1.5×10^{14} CFU بر میلی‌لیتر، 8.1×10^{10} اسپور بر میلی‌لیتر، 1.64×10^8 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، 8.1×10^{10} spore.mL⁻¹) و در شرایط تخمیر نشده (1.5×10^{14} CFU بر میلی‌لیتر، 8.1×10^{10} اسپور بر میلی‌لیتر، 1.64×10^8 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، 8.1×10^{10} spore.mL⁻¹) در شرایط تخمیر نشده در مدت ۹۶ ساعت کشت، پس از دو روز تیمار لاروها (۰/۹ و ۳/۰) و در شرایط تخمیر نشده (۱/۵ و ۴/۲) میکروگرم بر میلی‌لیتر و شاخص LT₅₀ در شرایط تخمیر شده (۶/۲ و ۱۰/۷) و در شرایط تخمیر نشده (۷/۲ و ۱۲/۶) ساعت برآورد شد. بررسی‌های زیست‌سنجی میزان مرگ‌ومیر حاصل از سوسپانسیون رشد کرده در محیط کشت غنی شده و غنی نشده در شرایط تخمیر شده پس از ۹۶ ساعت کشت، پس از دو روز تیمار لاروها به ترتیب (۶۱/۰ و ۴۶/۶) و در شرایط تخمیر نشده (۵۳/۳ و ۳۸/۶) درصد نشان داد. نتایج نشان داد محیط کشت غنی شده در شرایط تخمیر شده سبب تولید بیشترین میزان اسپور و کریستال و در نتیجه افزایش زهر آگینی باکتری روی لارو سن دوم پروانه *E. kuehniella* شد. واژه‌های کلیدی: *Bacillus thuringiensis*، *Ephestia kuehniella*، تخمیر، محیط کشت غنی شده.

Improvement the media culture for spore/crystal production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and evaluate their virulence against second larval instar of *Ephestia kuehniella* L.

Elmira Mokhtarnejhad¹, Shahram Aramideh^{2*}, Mahmood Rezazad Bari³, Mohammad Hassan Safaralizadeh⁴, Mohammad Reza Rezapannah⁵, Maryam Forouzan⁶

1. PhD Student of Entomology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

2. Associate Professor of Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

3. Professor of Food Science Department, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

4. Professor of Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

5. Associate Professor of Department of Biological Control, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agriculture Research Education and Extension Organization, Tehran, Iran.

6. Plant Protection Research Department, West Azarbaijan, Agriculture and Natural Resources Research Center, ARFEO, Urmia, Iran.

(Received: March 7, 2021- Accepted: September 7, 2021)

Abstract

In the present study, the pathogenicity of spores/crystals produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (HD-1) in different culture media within fermented and non fermented conditions were determined against the second larval instar of *Ephestia kuehniella* L. The colony forming unit (CFU), spore count, optical density (OD) and cell mass indices in enriched and non-enriched liquid media of fermented condition after 96 h cultivation were (2.8×10^{14} CFU.mL⁻¹, 11.8×10^{10} spore.mL⁻¹, 2.8×10^8 mg.mL⁻¹ and 11.0 g.L⁻¹) and (2.6×10^{14} CFU.mL⁻¹, 10.0×10^{10} spore.mL⁻¹, 2.4×10^8 mg.mL⁻¹ and 9.9 g.L⁻¹), respectively while those were found to be (1.8×10^{14} CFU.mL⁻¹, 8.1×10^{10} spore.mL⁻¹, 1.64×10^8 mg.mL⁻¹ and 8.9 g.L⁻¹) and (1.5×10^{14} CFU.mL⁻¹, 7.4×10^{10} spore.mL⁻¹, 1.56×10^8 mg.mL⁻¹ and 7.9 g.L⁻¹) in non-fermented condition, respectively. The LC₅₀ value of *Btk* spore/crystal cultured on enriched and non-enriched liquid media for 96h cultivation in fermented condition after 2 days treatment against larval instar were obtained (0.9 and 3.0) and in non-fermented condition (1.5 and 4.2) μ g.mL⁻¹, respectively. The LT₅₀ value in fermented condition (6.2 and 10.7) and in non-fermented condition (7.2 and 12.6) h were, respectively. Bioassay studies indicated that the *Btk* spore/crystal suspension cultured on enriched and non-enriched media in fermented condition for 96h cultivation after 2 days treatment had (61.0 and 46.6%) and in non-fermented condition (53.3 and 38.6%) mortality, respectively. The results confirm that enriched culture medium in fermented conditions produced the highest amount of spores and crystals and thus increased bacterial toxicity on the second larval instar of *E. kuehniella* after treatment.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, *Ephestia kuehniella*, Fermentation, Enriched medium.

* Corresponding author E-mail: Sh.aramideh@urmia.ac.ir

مقدمه

(Joung and Horticultural, 2000). امروزه برای غلبه بر این چالش، فعالیت‌های تولید انبوه بر پایه بهبود و توسعه فرآیند تولید محصولات *Bt* و افزایش سمیت ذاتی باکتری و تولید محصولات قوی‌تر صورت گرفته است. از جمله روش‌های مختلف استفاده شده در دنیا در تولید انبوه این باکتری، ایجاد فرمولاسیون پودری جهت افزایش طول دوره ماندگاری و حمل و نقل، افزودن مواد جانبی جهت جلوگیری از رسوب باکتری، افزودن مواد نگهدارنده در جهت افزایش عمر مفید سوسپانسیون باکتری، افزودن مواد محافظت کننده در جهت جلوگیری از تجزیه سریع در برابر اشعه UV نور خورشید و بهینه‌سازی محیط کشت و شرایط رشدی باکتری با استفاده مواد اولیه مختلف و فرایند تخمیر در جهت افزایش کارایی باکتری در کنترل آفات هدف می‌باشد (Burges and Jones, Rojas et al., 2018). در بهینه‌سازی محیط کشت بر حسب نوع سوبه و مواد اولیه بکار رفته در هر محیط کشت، نتایج متفاوتی به دست می‌آید (Amin et al., 2008). از سویی در فرایند تخمیر نیز میزان تولید، شدت بیماری‌زایی و امنیت محصولات تولید شده و همچنین در دسترس بودن ترکیبات استفاده شده در محیط کشت به گونه‌ای که کمترین خلل را در فرآیند تخمیر ایجاد کنند، بسیار حائز اهمیت است. نرخ رشد سلولی، اسپورولاسیون و تولید اندوتوکسین در طول فرآیند کشت و تخمیر، نیازمند انواع مختلف ترکیبات در محیط کشت می‌باشد (Mazmira et al., 2012). به عبارتی محیط غذایی و دیگر پارامترهای رشدی از جمله دما، اسیدیته، غلظت اکسیژن، نمک‌های معدنی و نیز میزان تلقیح اولیه بسیار موثر در سینتیک رشد و تولید مقادیر مختلف توکسین و اسپوردر شرایط تخمیر صنعتی می‌باشد (Aharonowitz and Demain, 1980). همچنین در دسترس بودن منابع کربن می‌تواند در افزایش رشد سلولی، تولید اسپور و توکسین بسیار موثر باشد (Tirado-Montiel et al., 2001). علاوه بر اهمیت و کارایی بسیار زیاد باکتری *Bt* بعنوان حشره‌کش زیستی، متأسفانه در کشور ما در زمینه فرآیند اقتصادی تولید این باکتری تحقیقات بسیار

امروزه افزایش روز افزون استفاده از ترکیبات شیمیایی در کنترل حشرات آفات خطرات و اثرات جانبی بسیاری در زیست‌بوم را به دنبال داشته است که از آن جمله می‌توان به پدیده مقاومت، طغیان مجدد، خطر بقایای آفتکش‌ها، تاثیر روی موجودات غیرهدف و در نتیجه شکست چرخه کنترل بیولوژیک اشاره کرد (Ibrahim et al., 2010). از این رو استفاده از سایر روش‌های کنترلی جایگزین، سازگار با محیط زیست و موثر در کنترل آفات هدف با به حداقل رساندن مصرف مواد شیمیایی حائز اهمیت می‌باشد (Goettel et al., 1955). از جمله روش‌های جایگزین روش‌های شیمیایی، می‌توان به بیماری‌گرهای حشرات خصوصاً باکتری *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* در کنترل لارو بالپولکداران اشاره کرد (Gupta and Dikshit, 2010). باکتری *Bt* قابل کشت در محیط جامد، نیمه جامد و مایع بوده (Valicente et al., 2012; El-Kersh et al., 2010) و طی اسپورولاسیون، کریستال پروتئین دلتا اندوتوکسین با خاصیت حشره-کشی تولید می‌کند (Sanahuja et al.; Federici, 2007). کریستال پروتئین‌ها روی رسته‌های حشرات از جمله، پروانه‌ها، سخت بال‌پوشان و دوبرالان با اثرات زهرآگینی (Van Frankenhuyzen, 2009; Dominguez-Arrizabalaga et al., 2019) و در بسیاری از موجودات زنده، حیات وحش و حشرات مفید بی ضرر هستند (Sarker and Mahbub, 2012). از جمله پروتئین‌های سمی موثر روی بالپولکداران *Cry1Aa*، *Cry2Aa*، *Cry1Ab* و *Cry1Ac* هستند که با وزن مولکولی متفاوت (۳۰ تا ۱۴۲ کیلودالتون) در فازهای مختلفی از اسپورولاسیون این باکتری تولید می‌شوند (Schunemann et al., 2014). ویژگی‌های منحصر به فرد و صرفه اقتصادی *Bt* امکان استفاده از تکنولوژی روز در تولید انبوه توکسین‌های بیشتر با قیمت کمتر برای بشر را فراهم کرده است. از آن جایکه محصولات تولید شده از باکتری *Bt* علاوه بر ویژگی‌های سودمندانه بدلیل عملکرد ضعیفشان توانایی رقابت با آفتکش‌های شیمیایی را ندارند

یک لوپ پلاتینی به ارلن شیشه‌ای ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر نوترینت براس (NB, Difco) شامل (۱٪ عصاره گوشت، ۲٪ مخمر، ۵٪ سدیم کلرید و ۵٪ پپتون) از قبل استریل شده در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شده و جهت رشد به انکوباتور شیکر (New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, NJ) با دور چرخش ۵۰ دور بر دقیقه، دمای 35 ± 2 درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت منتقل شد. سپس ۴ میلی‌لیتر از باکتری رشد کرده در NB به انکوباتور تمام اتوماتیک (V ۲۳۰، A ۵، مدل FS-۰۱) یکبار حاوی ۶ لیتر محیط کشت مایع غنی نشده و بار دیگر محیط کشت غنی شده بصورت مجزا منتقل شد. مجدداً فرایند مذکور در شرایط بدون بیوراکتور و تخمیر نیز انجام شد. در مرحله بعدی هر ۱۲ ساعت یکبار سوسپانسیونی از اسپور و کریستال رشد کرده در تمام محیط‌های کشت به مدت ۹۶ ساعت استخراج و تعداد کلنی‌های تشکیل یافته (CFU)، تعداد اسپور، ضریب شکست نوری (OD) و وزن خشک توده سلولی در طی فاز رشدی جهت تخمین رشد سلولی و رسم منحنی رشد محاسبه شد. در نهایت نمونه‌های استخراج شده سوسپانسیون اسپور و کریستال باکتری جهت انجام آزمایش‌های زیست‌سنجی استفاده شد. جهت محاسبه CFU، ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون اسپور و کریستال استخراج شده از تمامی محیط‌های کشت مایع در هر ۱۲ ساعت، پس از ۱۰ برابر رقیق شدن توسط آب مقطر استریل روی NA در دمای 35 ± 2 درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت جهت رشد کلنی‌ها منتقل شد. شمارش تعداد اسپورها بر طبق روش لیو و تزنگ (Liu & Tzeng, 2000) با استفاده از لام گلبول شمار Neubauer انجام شد. در این روش جهت حذف سلول‌های رویشی، سوسپانسیون ۱۰ برابر رقیق شده اسپور و کریستال باکتری را در حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه قرار داده و ۱۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون جهت شمارش تعداد اسپور در هر میلی‌لیتر بکار برده شد. محاسبه ضریب شکست حاصل از تعداد سلول‌های باکتری (OD)

کمی صورت گرفته است (Keshavarzi et al., 2005). استفاده از مواد غذایی متفاوت و شرایط تخمیر در تولید انبوه اسپور و کریستال باکتری *Bt* و نیز افزایش میزان سمیت آن می‌تواند یک روش مفید در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات باشد، در تحقیق حاضر، شرایط بهینه و موثر در افزایش کارایی باکتری - *Bt* subsp. *kurstaki* از طریق افزایش در میزان تولید اسپور و توکسین و در نتیجه افزایش در میزان زهرآگینی ضمن بکارگیری کمترین میزان دوز مصرفی باکتری با ایجاد بیشترین میزان تلفات در کمترین مدت زمان تیمار در کنترل لارو سن دوم پروانه *E. kuehniella* مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه استرین‌های باکتری

کلیه آزمایشات در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه انجام شد. سویه مرجع باکتری *B.t. subsp. kurstaki* de Barjac (*Bti* H-1) از بخش کنترل بیولوژیک موسسه تحقیقات گیاهپزشکی سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی تهران، ایران تهیه شد.

شرایط کشت، قابلیت زنده‌مانی اسپور و نمودار رشد

طبق روش بن کدر و همکاران (Ben Khedher et al., 2011) استرین‌های باکتری در ظرف شیشه‌ای حاوی محیط کشت آگار (NA, Difco) از قبل استریل شده (در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه) در دمای 35 ± 2 درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت حاوی محیط کشت داده شد. سپس مقدار $10^7 \times 1$ برابر رقیق شده از باکتری‌های رشد یافته روی NA در آب مقطر استریل تهیه و پس از همگن‌سازی در ظرف شیشه‌ای حاوی NA پخش و در دمای 35 ± 2 درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت جهت بلوغ اسپور و تولید کریستال مجدداً کشت داده شد (El-Kersh et al., 2012; El-Kersh et al., 2014). در گام بعد، مقداری از باکتری رشد کرده روی NA توسط

ساعت) از بیوراکتور جداسازی شد. فرایند مذکور یکبار دیگر بصورت مجزا در بیوراکتور حاوی محیط کشت تریپتون سویا براس (TSB) (شامل کازئین پپتون ۵۶/۷٪، سویا پپتون ۱۰٪، سدیم کلرید ۱۶/۷٪، دی-پتاسیم فسفات ۸/۳٪ و دکستروز ۲۸/۳٪) غنی شده با سولفات آهن ۷ آبه ۰/۰۲ گرم بر لیتر، سولفات روی ۷ آبه ۰/۰۲ گرم بر لیتر، سولفات منیزیم ۷ آبه ۰/۳ گرم بر لیتر، مخمر ۵٪ و کازئین ۵٪ انجام شد.

فرآیند بدون تخمیر

در این روش ۴ میلی‌لیتر سوسپانسیون *Btk* از قبل رشد کرده در ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر NB، در فلاکس ۶ لیتری NB غنی نشده از قبل استریل شده (در اتوکلاو ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه) کشت و به انکوباتور با دور چرخش ۵۰ دور بر دقیقه، دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۹۶ ساعت جهت تولید اسپور و کریستال باکتری در شرایط فاقد تخمیر منتقل شد. سوسپانسیون اسپور و کریستال در بازه زمانی مختلف و بصورت جداگانه (هر ۱۲ ساعت یکبار به مدت ۹۶ ساعت) از فلاکس جداسازی شد. این فرایند یکبار دیگر در فلاکس ۶ لیتری محتوی محیط کشت غنی شده مذکور انجام شد.

استخراج و شناسایی اسپور و کریستال *Btk*

جهت استخراج توکسین‌های پروتئینی از روش بل و همکاران، (Bel et al., 1997) بر اساس سانتریفیوژ دور بالا استفاده شد. در این روش سوسپانسیون جدا شده در زمان‌های مختلف باکتری حاوی اسپور، کریستال و سلول‌های رویشی رشد کرده در محیط‌های مختلف کشت مایع در شرایط تخمیر شده و نشده در سانتریفیوژ با دور چرخش ۳۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت و مایع رویی بالایی حذف شد. رسوب باقی مانده با ۱۴۰ میلی‌لیتر سدیم دی-سولفات (SDS) ۱٪ - بتا مرکاپتواتانول ۰/۰۱٪ ترکیب و به مدت ۱۰ دقیقه جهت رهایی کریستال‌ها حرارت داده شد و مجدداً در سانتریفیوژ با دور چرخش-

برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با استفاده از اسپکتوفتومتر (۲۳۰۷، ۵۵۷A، مدل ۶۴-۲۰۸۸-۶۴ LKBBiochrom، انگلستان) در طول موج ۶۰۰ نانومتر (طول موجی که اسپور بیشترین جذب نوری را دارد) انجام شد (Aneja, 2007). برای محاسبه وزن خشک توده سلولی، رسوبات نمونه‌ها پس از سانتریفیوژ با دور چرخش ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه و حذف مایع رویی لیوفیلیزه و وزن خشک رسوبات برحسب گرم بر لیتر محاسبه شد. از آنجایی که وزن خشک توده سلولی متأثر از ذرات جامد معلق موجود در محیط کشت می‌باشد شمارش تعداد اسپورها دقیق‌تر از محاسبه وزن خشک سلولی در تخمین میزان رشد سلولی برآورد شده است (Devidas et al., 2014). برای کاهش خطا کلیه محاسبات مذکور در سه تکرار انجام و میانگین آنها برآورد شد (USDA, 2011). در نهایت نمونه‌ها برای انجام زیست‌سنجی استفاده شد. این آزمایشات طی دو مرحله و هر مرحله در سه تکرار انجام شد (Valicente et al., 2010).

فرآیند تخمیر

جهت انجام فرآیند تخمیر، سویه *Btk* پس از کشت در ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری محتوی ۱۰۰ میلی‌لیتر NB از قبل استریل شده (در اتوکلاو ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه) در انکوباتور با دور چرخش ۵۰ دور بر دقیقه و دمای 35 ± 2 درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت منتقل شد. پس از رشد، ۴ میلی‌لیتر سوسپانسیون اسپور و کریستال باکتری به بیوراکتور تمام اتوماتیک (۲۳۰۷، A ۵، مدل FS-۰۱) با اکسیژن محلول (DO) ۰٪، اسیدیته (pH) ۷، دور چرخش ۵۰ دور بر دقیقه، هوا دهی اولیه ۶ ساعته و دمای ۳۵ درجه سلسیوس حاوی ۶ لیتر محیط کشت NB از قبل استریل شده غنی نشده و ضد کف به مدت ۹۶ ساعت تحت شرایط ثابت مذکور برای تولید اسپور و کریستال باکتری در شرایط تخمیرمنتقل شد. سوسپانسیون اسپور و کریستال در بازه زمانی مختلف و بصورت جداگانه (هر ۱۲ ساعت یکبار به مدت ۹۶

کریستال باکتری و شدت بیماری‌زایی، زیست‌سنجی روی لارو سن دوم پروانه انجام شد. لارو پروانه‌ها در بخش حشره‌شناسی دانشگاه ارومیه در شرایط استاندارد و بر اساس روش سیدی و همکاران (Seyedi *et al.*, 2017) پرورش داده شد. مراحل مختلف لاروی بر اساس اندازه‌گیری طول و عرض کپسول سر توسط میکروسکوپ نوری (Co. LTD Olympus، ۲۲۰۷، ۱۲A/۰، مدل CHK) و بر پایه‌ی روش بریندلی (Brindley, 1930) جداسازی شد. زیست‌سنجی روی لارو سن دوم پروانه *E. kuehniella* توسط سوسپانسیون اسپور و کریستال باکتری *Btk* (10^{14} CFU/ml \times ~) بدست آمده از محیط کشت غنی شده و نشده در شرایط تخمیر شده و نشده در زمان‌های مختلف (هر ۱۲ ساعت به مدت ۹۶ ساعت) بصورت جداگانه انجام شد. پس از انجام تست‌های اولیه، غلظت‌هایی از سوسپانسیون بدست آمده در زمان‌های مختلف (۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۶۰، ۷۲، ۸۴ و ۹۶ ساعت) که کمترین و بیشترین مرگ‌ومیر (۲۰-۸۰٪) را ایجاد کرده انتخاب و سه غلظت بین آن بر اساس فرمول پورمیرزا (Pourmirza, 2005) تعیین کرده و زیست‌سنجی بر اساس غلظت‌های بدست آمده انجام شد. طرح آزمایش کاملاً تصادفی (CRD) به کمک پنج ظرف پلاستیکی با ابعاد (۷×۵×۴ cm) محتوی پنج عدد دیسک آردی آغشته شده با ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون اسپور و کریستال باکتری به همراه ۱۰ لارو پروانه در سه تکرار انجام شد (Haunget *et al.*, 1997). در ظرف پلاستیکی دیگری نیز طبق روش مذکور محتوی پنج دیسک آردی آغشته شده با آب مقطر استریل و ۱۰ میکرولیتر توئین ۸۰ (فاقد اسپور و کریستال باکتری) به عنوان شاهد تهیه شد. لاروهای تیمار شده و شاهد در شرایط مشابه (28 ± 2 درجه سلسیوس، با دوره نوری ۸ : ۱۶ روز به شب) نگهداری شد. براساس روش پرومالسامی و همکاران (Perumalsamy *et al.*, 2009) زمانی که لاروها حرکت خود را از دست می‌دادند مرده محسوب می‌شدند. شمارش مرگ‌ومیر هر ۲۴ ساعت یکبار به مدت ۹۶ ساعت انجام شد. برای تصحیح درصد مرگ-

۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد و در نهایت مایع رویی بالایی حذف شد. جهت رسوب پروتئین، ۱۴۰ میکرولیتر تری‌کلرواستیک اسید (TCA) ۲۰٪ به رسوب حاصل اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد. نمونه‌ها دوباره در سانتریفیوژ با دور چرخش ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد و مایع رویی بالایی با دقت حذف شد. در نهایت ۱۰۰ میلی‌لیتر استون خالص به نمونه‌ها اضافه شد و در سانتریفیوژ با دور چرخش ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد و پس از حذف مایع رویی بالایی، رسوبات خالص برای استفاده در کروماتوگرافی و شناسایی بر اساس الکتروفورز پروتئین با استفاده از روش SDS-PAGE با مقدار مساوی بافر نمونه (شامل ۰/۱۵ مولار Tris/Cl با اسیدیته ۸/۸، ۳/۷۵ میلی‌مولار EDTA، ۰/۷۵ مولار ساکارز، ۰/۰۷۵ بروموفنل آبی، ۲/۵٪ سدیم دی‌سولفات و ۷/۴ میلی‌مولار دی‌تیوتریتول) ترکیب شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه با غلظت یکسان روی ژل سدیم دی‌سولفات- پلی‌آکریل آمید (SDS-PAGE) با ۱۲٪ ژل متمایز کننده و ۴٪ ژل متراکم کننده با ولتاژ ۱۵۰ ولت بارگذاری شد (Laemmli, 1970 Mosafaie, 2003). رنگ‌آمیزی ژل با ۰/۱٪ کوماسی بلو R-۲۵۰، ۹۵٪ محلول حجم به حجم متانول و آب مقطر استریل به همراه ۵٪ استیک اسید گلاسیال در ظرف شیشه‌ای ۵۰۰ میلی-لیتری حاوی محلول رنگی روی اوربیتال شیکر در دمای اتاق و به مدت یک شبانه‌روز انجام شد. فرآیند رنگ‌بری توسط محلول متانول استیک‌اسید گلاسیال (۹۰٪ محلول متانول رقیق شده با آب مقطر استریل با حجم برابر به اضافه ۱۰٪ استیک اسید) روی اوربیتال شیکر تا روشن شدن زمینه‌ی ژل و وضوح باندها انجام گرفت. در نهایت جهت ثابت شدن ژل از محلول ۱۰٪ استیک‌اسید، ۲۰٪ متانول و ۷۰٪ آب مقطر استریل استفاده شد و پس از اسکن به یخچال منتقل شد.

زیست‌سنجی

جهت مقایسه تاثیر انواع محیط کشت در رشد اسپور و

ومیر در تیمارها در صورت وجود تلفات در شاهد از فرمول ابوت (Abbott, 1925) استفاده شد.

غلظت و زمان مرگ‌ومیر ۵۰٪ جمعیت (LC₅₀) و (LT₅₀)

جهت محاسبه LC₅₀ ایجاد شده توسط سوسپانسیون اسپور و کریستال به دست آمده از محیط کشت غنی شده و غنی نشده در شرایط تخمیر شده و نشده، از درصد مرگ‌ومیر ایجاد شده توسط هر غلظت در لاروها هر ۲۴ ساعت یکبار به مدت ۹۶ ساعت از روش انجید و همکاران (Enegide *et al.*, 2013) استفاده شد. محاسبه مقادیر LT₅₀ براساس درصد مرگ‌ومیر ایجاد شده توسط LC₅₀ حاصل از کلیه‌ی سوسپانسیون استخراج شده از محیط کشت غنی شده و نشده در شرایط تخمیر شده و نشده، هر ۶ ساعت یکبار و تا زمان مرگ‌ومیر آخرین لارو انجام شد.

مقایسه مرگ‌ومیر ایجاد شده توسط سوسپانسیون اسپور و کریستال تخمیر شده و نشده باکتری *Btk*

جهت مقایسه مرگ‌ومیر ایجاد شده توسط سوسپانسیون اسپور و کریستال به دست آمده از محیط کشت تخمیر شده و نشده در زمان‌های مختلف، ظرف پلاستیکی با ابعاد (۷×۵×۴ cm) محتوی پنج عدد دیسک آردی آغشته شده با ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون اسپور و کریستال استخراج شده باکتری به همراه ۱۰ لارو سن دوم پروانه در سه تکرار انجام شد. در ظرف پلاستیکی دیگری نیز طبق روش مذکور پنج دیسک آردی آغشته شده با آب مقطر استریل و- ۱۰ میکرولیتر توئین ۸۰ (فاقد هر گونه سوسپانسیون اسپور و کریستال باکتری) به عنوان شاهد تهیه شد. لاروهای تیمار شده و شاهد در شرایط مشابه (۲±۲۸) درجه سلسیوس، با دوره نوری ۸:۱۶ روز به شب) نگهداری شد. زمانی که لاروها حرکت خود را از دست می‌دادند مرده محسوب می‌شدند. شمارش مرگ‌ومیر هر ۲۴ ساعت یکبار به مدت ۹۶ ساعت انجام شد.

تجزیه آماری

کلیه تجزیه‌های آماری داده‌های به دست آمده جهت محاسبه LC₅₀، LT₅₀، Slope و خطای استاندارد هر غلظت از سوسپانسیون اسپور و کریستال به دست آمده در زمان‌های مختلف با استفاده از آنالیز پروبیت (Probit) بر اساس روش فینی (Finney, 1971) انجام شد. دو تیماری که فاصله LC₅₀ آن روی هم اورلپ باشد با اطمینان ۹۵٪ بدون اختلاف معنی‌دار در زهرآگینی در نظر گرفته شد (Gobatto *et al.*, 2010). ارزیابی و مقایسه تاثیر سوسپانسیون اسپور و کریستال باکتری روی لارو پروانه در آزمایش‌های زیست‌سنجی، توسط آنالیز یک طرفه آنووا (One Way ANOVA) و همگن‌سازی واریانس داده‌ها با استفاده از تست شاپیرو و ویلک (Shapiro and Wilk, 1965) انجام شد. برای مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون توکی (TukeyHSD) در سطح آماری ۵٪ معنی‌دار از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۲ USA, IL, Chicago) استفاده شد.

نتایج

محاسبه CFU، تعداد اسپور، OD و وزن خشک توده سلولی

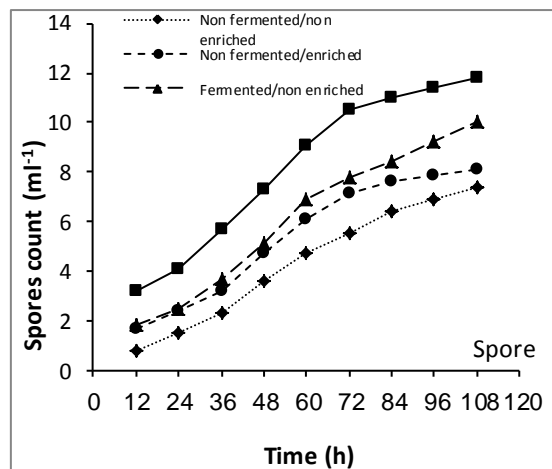
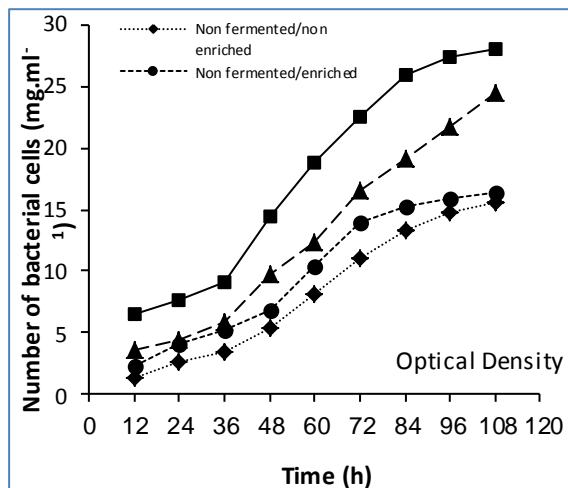
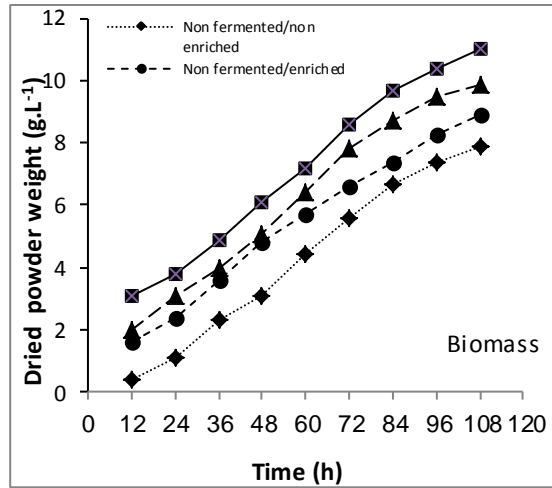
نتایج تعداد کلنی‌های تشکیل شده (CFU)، تعداد اسپور، ضریب شکست نوری (OD) و وزن خشک توده سلولی سوسپانسیون اسپور و کریستال باکتری *Btk* کشت شده روی محیط کشت غنی شده و نشده در شرایط تخمیر نشده و تخمیر شده به فاصله هر ۱۲ ساعت نشان داد که محیط کشت غنی شده تخمیر شده سبب تولید بیشترین میزان توکسین و بیومس سلولی شده است (شکل ۱).

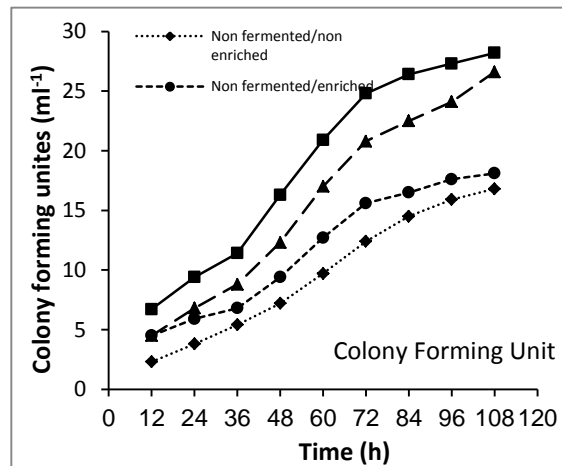
شاخص LC₅₀ و LT₅₀ محیط کشت تخمیر شده و نشده

بررسی سمیت هر یک از سوسپانسیون‌های اسپور و کریستال استخراج شده از محیط کشت غنی شده و نشده در شرایط تخمیر شده و نشده هر ۱۲ ساعت یکبار و به مدت ۹۶ ساعت جهت محاسبه غلظت موثر در مرگ‌ومیر ۵۰٪ جمعیت (LC₅₀) و زمان موثر در

نشده در شرایط تخمیر شده و نشده به مدت ۹۶ ساعت، دو روز پس از تیمار شدن لاروها به ترتیب ۳/۰ و ۴/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد (جدول ۱).

E. kuehniella انجام شد. شاخص LC_{50} سوسپانسیون اسپور و کریستال استخراج شده از محیط کشت غنی





شکل ۱. لگاریتم تعداد کلنی CFU، اسپور، OD و وزن خشک توده سلولی (بیومس) سوسپانسیون *Btk* کشت شده روی محیط کشت غنی شده و نشده در شرایط تخمیر شده و نشده در فواصل زمانی مختلف.

Figure 1. Log colony forming unites (CFU), spores count, number of bacterial cells (OD) and Freeze dried powder weight (biomass) of *Btk* suspension cultured on enriched and non-enriched media at different intervals during the fermented and non-fermented process.

جدول ۱. بررسی سمیت (LC_{50}) سوسپانسیون اسپور و کریستال *Btk* استخراج شده از محیط کشت غنی نشده تحت شرایط تخمیر شده و نشده هر ۱۲ ساعت یکبار، دو روز پس از تیمار شدن لارو سن دوم *Ephestia kuehniella*.

Table 1. Assesmen toxicity (LC_{50}) after 2 days of treatment by *Btk* spore/crystal suspension extracted from non enriched media under fermented and non-fermented condition every 12h against second instar larvea of *Ephestia kuehniella*.

Cultivation condition	Extraction S/C time (h)	Slope± SE	X ² (df)	LC ₅₀ (95% CLs*) (μg.mL ⁻¹)
Before fermentation	12	2.1± 0.92	0.59 (3)	57.6 (36.7- 1817.4)
	24	2.1 ± 0.84	0.04 (3)	54.8 (36.6 - 5409.7)
	36	2.1 ± 0.80	0.11 (3)	35.5 (22.0 - 540.7)
	48	1.3 ± 0.50	0.23 (3)	34.2 (25.1- 185.6)
	60	1.6 ± 0.62	0.24 (3)	16.3 (12.0 - 63.0)
	72	1.6 ± 0.72	0.29 (3)	9.7 (7.2 - 40.6)
	84	1.2 ± 0.62	0.14 (3)	6.3 (3.4 - 55.4)
	96	1.0 ± 0.47	0.06 (3)	4.2 (1.7 - 8.8)
	After fermentation	12	-	-
24		-	-	-
36		2.2 ± 0.77	0.14 (3)	24.5 (19.2 - 61.6)
48		1.3 ± 0.44	0.13 (3)	23.5 (15.7- 92.7)
60		1.6 ± 0.62	0.03 (3)	10.5 (7.8 - 21.7)
72		1.8 ± 0.67	0.03 (3)	7.1 (5.1 - 11.4)
84		1.3 ± 0.53	0.07 (3)	4.9 (2.9 - 8.8)
96		0.8 ± 0.34	0.14 (3)	3.0 (1.3 - 14.3)

*Confidence limits

پس از تیمار شدن لارو سن دوم به ترتیب ۱۰/۷ و ۱۲/۶ ساعت به دست آمد (جدول ۲).

شاخص LT_{50} بر پایه LC_{50} سوسپانسیون اسپور و کریستال استخراج شده از محیط کشت غنی نشده در شرایط تخمیر شده و نشده به مدت ۹۶ ساعت، دو روز

جدول ۲. شاخص LT_{50} سوسپانسیون اسپور و کریستال *Btk* استخراج شده از محیط کشت غنی نشده تحت شرایط تخمیر شده و نشده هر ۱۲ ساعت، دو روز پس از تیمار شدن لارو سن دوم *Ephestia kuehniella*.

Table 2. LT_{50} based on LC_{50} after 2 days of treatment by *Btk* spore/crystal suspension extracted from non-enriched media under fermented and non-fermented condition every 12h against second instar larva of *Ephestia kuehniella*.

Cultivation condition	Extraction S/C time (h)	LC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Slope \pm SE	X^2 (df)	LT_{50} (95% CLs) (h)
Before fermentation	12	57.6	2.9 ± 0.32	17.2 (8)	22.5 (17.0 - 28.0)
	24	54.8	2.7 ± 0.30	13.9 (8)	20.1 (15.2 - 24.9)
	36	35.5	2.4 ± 0.33	17.2 (7)	17.9 (11.7 - 23.8)
	48	34.2	2.5 ± 0.31	10.1 (6)	16.4 (11.0 - 21.4)
	60	16.3	2.5 ± 0.31	12.2 (7)	15.3 (10.4 - 19.7)
	72	9.7	2.2 ± 0.30	14.4 (7)	15.1 (9.1 - 20.3)
	84	6.3	2.1 ± 0.29	15.1 (7)	13.8 (7.3 - 19.2)
	96	4.2	1.9 ± 0.31	13.7 (6)	12.6 (5.0 - 18.7)
After fermentation	12	-	-	-	-
	24	-	-	-	-
	36	24.5	2.6 ± 0.32	12.5 (7)	15.5 (10.7 - 19.8)
	48	23.5	2.5 ± 0.31	9.5 (7)	14.4 (11.6 - 17.1)
	60	10.5	2.4 ± 0.33	10.2 (6)	14.1 (9.9 - 19.6)
	72	7.1	2.3 ± 0.33	9.6 (6)	13.8 (8.7 - 18.2)
	84	4.9	2.4 ± 0.33	9.3 (6)	12.3 (9.5 - 14.9)
	96	3.0	2.1 ± 0.32	8.1 (6)	10.7 (8.5 - 14.5)

در حالی که LC_{50} سوسپانسیون اسپور و کریستال تیمار لاروها به ترتیب ۰/۹ و ۱/۵ میکروگرم بر میلی-کشت شده در محیط کشت غنی شده به مدت ۹۶ ساعت در شرایط تخمیر شده و نشده، دو روز پس از

جدول ۳. سمیت (LC_{50}) سوسپانسیون اسپور و کریستال *Btk* استخراج شده از محیط کشت غنی شده تحت شرایط تخمیر شده و نشده هر ۱۲ ساعت یکبار، دو روز پس از تیمار شدن لارو سن دوم *Ephestia kuehniella*.

Table 3. Assesmen toxicity (LC_{50}) after 2 days of treatment by *Btk* spore/crystal suspension extracted from enriched media under fermented and non-fermented condition every 12h against second instar larva of *Ephestia kuehniella*.

Cultivation condition	Extraction S/C time (h)	Slope \pm SE	X^2 (df)	LC_{50} (95% CLs) ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$)
Before fermentation	12	2.1 ± 0.87	0.46 (3)	45.9 (33.4 - 1793.0)
	24	1.8 ± 0.72	0.25 (3)	32.6 (23.0 - 345.3)
	36	2.1 ± 0.76	0.08 (3)	23.5 (16.3 - 42.0)
	48	1.1 ± 0.47	0.23 (3)	20.5 (13.0 - 607.1)
	60	1.4 ± 0.52	0.06 (3)	8.3 (5.2 - 13.1)
	72	1.3 ± 0.48	0.00 (3)	4.7 (1.9 - 6.9)
	84	1.2 ± 0.47	0.14 (3)	2.6 (0.7 - 3.8)
	96	0.9 ± 0.38	0.18 (3)	1.5 (0.0 - 2.5)
After fermentation	12	-	-	-
	24	1.6 ± 0.69	0.00 (3)	18.8 (14.0 - 79.8)
	36	2.0 ± 0.69	0.33 (3)	12.9 (9.8 - 18.9)
	48	1.1 ± 0.38	0.04 (3)	6.3 (3.6 - 11.7)
	60	1.4 ± 0.44	0.17 (3)	3.1 (1.2 - 4.3)
	72	1.2 ± 0.44	0.20 (3)	1.9 (0.3 - 3.0)
	84	0.8 ± 0.33	0.12 (3)	1.1 (0.0 - 2.0)
	96	0.7 ± 0.26	0.05 (3)	0.9 (0.1 - 1.7)

شاخص LT_{50} بر پایه LC_{50} سوسپانسیون اسپور و کریستال استخراج شده از محیط کشت غنی شده در شرایط تخمیر شده و نشده مدت ۹۶ ساعت، دو روز پس از تیمار شدن لارو سن دوم به ترتیب ۶/۲ و ۷/۲ ساعت به دست آمد (جدول ۴).

جدول ۴. شاخص LT_{50} سوسپانسیون اسپور و کریستال *Btk* استخراج شده از محیط کشت غنی شده تحت شرایط تخمیر شده و نشده هر ۱۲ ساعت، دو روز پس از تیمار شدن لارو سن دوم *E. kuehniella*.

Table 4. LT_{50} based on LC_{50} after 2 days of treatment by *Btk* spore/crystal suspension extracted from enriched liquid media under fermented and non-fermented condition every 12h against second instar

Cultivation condition	Extraction S/C time (h)	larva of <i>Ephestia kuehniella</i> .			
		LC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Slope \pm SE	X^2 (df)	LT_{50} (95% CLs) (h)
Before fermentation	12	45.9	2.6 ± 0.30	15.7(8)	19.2 (14.0 - 24.3)
	24	32.6	2.3 ± 0.28	11.5 (8)	16.0 (12.8 - 18.9)
	36	23.5	2.5 ± 0.34	16.7 (6)	14.1 (7.6 - 19.8)
	48	20.5	2.3 ± 0.33	10.0 (6)	11.5 (6.6 - 15.6)
	60	8.3	2.1 ± 0.40	7.5 (4)	10.4 (2.2 - 14.5)
	72	4.7	1.9 ± 0.32	8.2 (6)	9.4 (6.0 - 12.3)
	84	2.6	2.1 ± 0.37	7.4 (5)	8.5 (5.6 - 11.0)
	96	1.5	1.8 ± 0.35	7.3 (5)	7.2 (4.7 - 11.1)
After fermentation	12	-	-	-	-
	24	18.8	2.6 ± 0.37	11.6 (5)	14.4 (8.0 - 20.1)
	36	12.9	2.4 ± 0.33	11.4 (6)	13.1 (8.7 - 18.9)
	48	6.3	2.4 ± 0.37	8.2 (5)	11.0 (5.8 - 15.3)
	60	3.1	2.4 ± 0.37	9.4 (5)	10.2 (4.6 - 14.5)
	72	1.9	2.0 ± 0.36	6.9 (5)	9.2 (6.0 - 11.8)
	84	1.1	1.7 ± 0.35	8.1 (5)	7.4 (1.2 - 12.5)
	96	0.9	2.1 ± 0.37	8.0 (5)	6.2 (4.9 - 10.4)

مقدار دوز مصرف و در کمترین زمان پس از تیمار، بیشترین تلفات را در لارو سن دوم پروانه *E. kuehniella* ایجاد کرده است.

مرگ‌ومیر حاصل از اسپور و کریستال استخراج شده از انواع محیط کشت

آنالیز داده‌ها نشان داد که مرگ‌ومیر لارو سن دوم پروانه *E. kuehniella* تحت تاثیر غلظت سوسپانسیون اسپور و کریستال استخراج شده از محیط کشت غنی شده و نشده در شرایط تخمیر شده و نشده در زمان-

نتایج آزمایشات زیست‌سنجی تایید کننده این موضوع است که سوسپانسیون اسپور و کریستال باکتری *Btk* رشد کرده در تمام محیط کشت‌های مذکور در تمامی تست‌ها دارای خاصیت لاروکشی موثر در لارو سن دوم پروانه *E. kuehniella* می‌باشد. با این تفاوت که سوسپانسیون اسپور و کریستال رشد کرده در محیط کشت غنی شده در شرایط تخمیر شده دارای کمترین مقدار LC_{50} و LT_{50} در لارو سن دوم پروانه می‌باشد. به عبارتی سوسپانسیون استخراج شده از محیط کشت غنی شده تخمیر شده با کمترین

آمده بیشترین مرگومیر حاصل از سوسپانسیون استخراج شده از محیط کشت غنی شده و نشده در شرایط تخمیر شده در لارو سن دوم پروانه به ترتیب پس از ۷۲ و ۸۴ ساعت کشت (۵۸/۷ و ۴۴/۵٪) مشاهده شد در حالی که بیشترین میزان مرگومیر در شرایط تخمیر نشده به ترتیب پس از ۸۴ و ۹۶ ساعت (۵۰/۰ و ۳۸/۶٪) به دست آمد. به عبارت دیگر با در نظر گرفتن نرخ مرگومیر، سوسپانسیون اسپور و کریستال استخراج شده از محیط کشت غنی شده در شرایط تخمیر شده بیشترین تاثیر در مرگومیر لارو سن دوم پروانه *E. kuehniella* در کمترین زمان را داشته است.

های مختلف می باشد (جدول ۵). مقایسه میانگین و خطای استاندارد (SE) بدست آمده از نرم افزار SPSS، با استفاده از آنالیز واریانس داده ها ANOVA، آزمون توکی با دامنه استاندارد (HSD) (درصد میانگین های با حروف الفبای مشابه واقع در هر ستون فاقد اختلاف معنی دار در سطح ۵٪ طبق آزمون توکی هستند).

نتایج نشان داد که سوسپانسیون اسپور و کریستال باکتری *Btk* استخراج شده از محیط کشت غنی شده مرگومیر بیشتری نسبت به محیط کشت غنی نشده و همچنین شرایط تخمیر شده مرگومیر بیشتری نسبت به شرایط تخمیر نشده در لارو سن دوم پروانه *E. kuehniella* ایجاد کرده است. بر اساس نتایج به دست

جدول ۵. درصد مرگومیر حاصل از سوسپانسیون اسپور و کریستال باکتری *Btk* استخراج شده از محیط کشت غنی شده و نشده در شرایط تخمیر شده و نشده هر ۱۲ ساعت یکبار و به مدت ۹۶ ساعت، دو روز پس از تیمار لارو سن دوم پروانه *Ephestia kuehniella* توسط آزمون توکی (P=۰/۰۵).

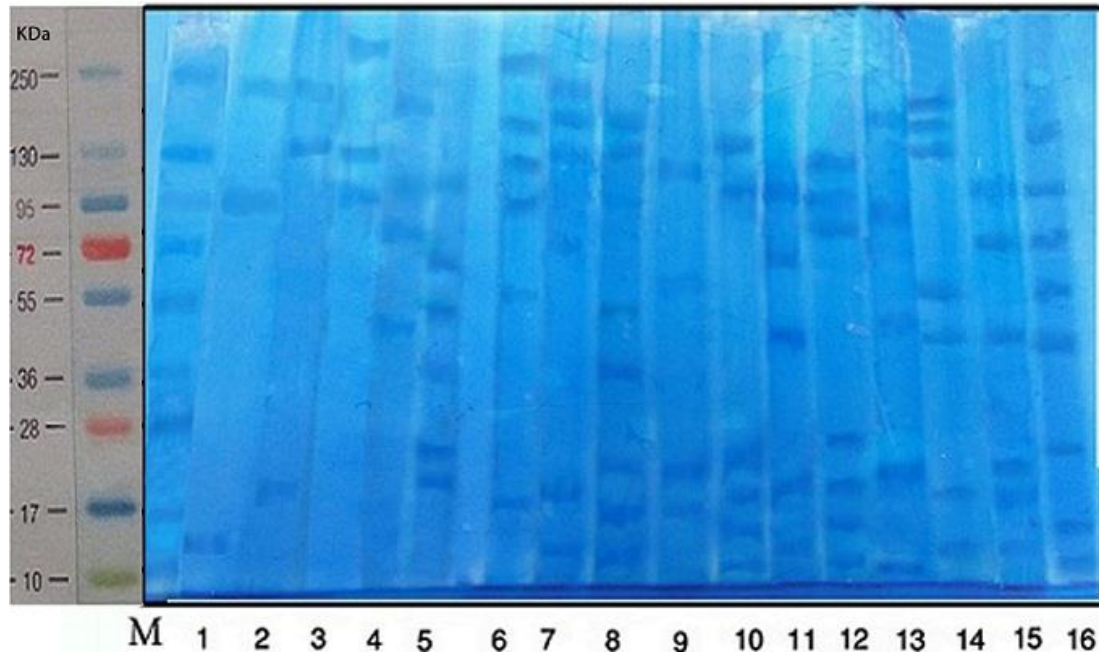
Table 5. Mean comparison percentage of *Btk* spore/crystal suspension extracted from enriched and non-enriched media in fermented and non-fermented condition effect per 12h for 96h against second instar larva of *Ephestia kuehniella* by tukey test after 2 days of treatment (P = 0.05).

Extraction time(h)	Non enriched medium		Enriched medium	
	Before fermentation	After	Before fermentation	After
		fermentation		fermentation
12	1.1 ± 1.1 ^f	5.3 ± 1.1 ^e	5.5 ± 1.1 ^{ef}	10.0 ± 0.0 ^{ef}
24	4.4 ± 1.1 ^e	8.8 ± 1.1 ^{de}	12.7 ± 1.1 ^{de}	14.4 ± 1.1 ^{de}
36	5.5 ± 1.1 ^e	12.2 ± 1.1 ^{cd}	21.1 ± 1.1 ^{cd}	18.8 ± 1.1 ^{cd}
48	7.6 ± 0.0 ^e	19.4 ± 1.1 ^c	27.4 ± 1.1 ^c	22.2 ± 1.1 ^{bc}
60	11.9 ± 1.9 ^{cd}	28.1 ± 1.1 ^b	35.5 ± 1.1 ^b	34.8 ± 1.1 ^{ab}
72	18.3 ± 1.9 ^{bc}	36.3 ± 0.0 ^{ab}	45.7 ± 1.1 ^{ab}	58.7 ± 1.1 ^a
84	24.4 ± 2.9 ^b	44.5 ± 1.1 ^a	50.0 ± 0.0 ^a	59.8 ± 1.1 ^a
96	38.6 ± 1.9 ^a	46.6 ± 0.0 ^a	53.3 ± 1.9 ^a	61.0 ± 1.1 ^a
Control	0.0 ± 0.0 ^f	0.0 ± 0.0 ^f	1.1 ± 1.1 ^f	1.1 ± 1.1 ^f
P	0.03	0.001	0.02	0.001
F(8, 18)	19.4	109.1	38.1	97.2

غنی شده و نشده در شرایط تخمیر شده نشان دهنده بیشترین تعداد باند پروتئینی با وزن مولکولی ۱۰ تا ۲۵۰ کیلودالتون در محیط کشت غنی شده در مقایسه

شناسایی پروتئین های استخراج شده با استفاده از روش SDS-PAGE از روپیل پروتئین های استخراج شده از محیط کشت

با محیط کشت غنی نشده است که این امر موید تاثیر مثبت محیط کشت و فرآیند تخمیر در افزایش میزان تولید پروتئین می‌باشد (شکل ۲) (جدول ۶).



شکل ۲. الکتروفورز Cry پروتئین‌های باکتری *Btk* استخراج شده از محیط کشت غنی شده و نشده در شرایط تخمیر شده. ستون M: نشانگر مولکول‌های پروتئینی بر حسب وزن مولکولی (۱۰ تا ۲۵۰ کیلوالتون). ستون ۱. Cry پروتئین‌های استخراج شده از محیط کشت غنی نشده بعد از ۱۲ ساعت کشت. ستون ۲. Cry پروتئین‌های استخراج شده از محیط کشت غنی شده بعد از ۱۲ ساعت کشت. ستون ۳. Cry پروتئین‌های استخراج شده از محیط کشت غنی نشده بعد از ۲۴ ساعت کشت. ستون ۴. Cry پروتئین‌های استخراج شده از محیط کشت غنی شده بعد از ۲۴ ساعت کشت. ستون ۵. Cry پروتئین‌های استخراج شده از محیط کشت غنی نشده بعد از ۳۶ ساعت کشت. ستون ۶. Cry پروتئین‌های استخراج شده از محیط کشت غنی شده بعد از ۳۶ ساعت کشت. ستون ۷. Cry پروتئین‌های استخراج شده از محیط کشت غنی نشده بعد از ۴۸ ساعت کشت. ستون ۸. Cry پروتئین‌های استخراج شده از محیط کشت غنی شده بعد از ۴۸ ساعت کشت. ستون ۹. Cry پروتئین‌های استخراج شده از محیط کشت غنی نشده بعد از ۶۰ ساعت کشت. ستون ۱۰. Cry پروتئین‌های استخراج شده از محیط کشت غنی شده بعد از ۶۰ ساعت کشت. ستون ۱۱. Cry پروتئین‌های استخراج شده از محیط کشت غنی نشده بعد از ۷۲ ساعت کشت. ستون ۱۲. Cry پروتئین‌های استخراج شده از محیط کشت غنی شده بعد از ۷۲ ساعت کشت. ستون ۱۳. Cry پروتئین‌های استخراج شده از محیط کشت غنی نشده بعد از ۸۴ ساعت کشت. ستون ۱۴. Cry پروتئین‌های استخراج شده از محیط کشت غنی شده بعد از ۸۴ ساعت کشت. ستون ۱۵. Cry پروتئین‌های استخراج شده از محیط کشت غنی نشده بعد از ۹۶ ساعت کشت. ستون ۱۶. Cry پروتئین‌های استخراج شده از محیط کشت غنی شده بعد از ۹۶ ساعت کشت.

Fig 2. SDS-PAGE profiles of *Btk* Cry proteins extracted from enriched and non-enriched medium in fermented condition. Media: lane M: protein molecular weight marker (10 to 250 kDa); lane 1: cry protein of non-enriched medium for 12h; lane 2: cry protein of enriched medium for 12h; lane 3: cry protein of non-enriched medium for 24h; lane 4: cry protein of enriched medium for 24h; lane 5: cry protein of non-enriched medium for 36h; lane 6: cry protein of enriched medium for 36h; lane 7: cry protein of non-enriched medium for 48h; lane 8: cry protein of enriched medium for 48h; lane 9: cry protein of non-enriched medium for 60h; lane 10: cry protein of enriched medium for 60h; lane 11: cry protein of non-enriched medium for 72h; lane 12: cry protein of enriched medium for 72h; lane 13: cry protein of non-enriched medium for 84h; lane 14: cry protein of enriched medium for 84h; lane 15: cry protein of non-enriched medium for 96h; lane 16: cry protein of enriched medium for 96h.

جدول ۶. وزن مولکولی Cry پروتئین‌های باکتری *Btk* استخراج شده دو نوع محیط کشت در شرایط تخمیر شده هر ۱۲ ساعت به مدت ۹۶ ساعت کشت.

Table 6. Molecular weight of *Btk* Cry proteins extracted from different media in fermented condition every 12h for 96h cultivation.

Extraction time (h)	<i>Btk</i> Cry proteins extracted from fermented condition(kD _a)	
	Non-enriched medium	Enriched medium
12	17-95-250	17-130-250
24	95-130-280	50-72-95-210
36	19-22-36-55-72-95	17-55-91-110-190-250
48	10-17-72-110-150-210	10-17-22-36-55-95-130-150
60	17-22-55-110	10-15-17-22-95-130
72	12-17-50-72-95	10-15-17-25-72-95-130
84	10-21-50-72-140	12-17-50-55-130-155-200
96	12-17-20-38-72-95	10-15-25-50-55-72-95-150

سازی تولید باکتری *Bt* دارد (Zouri *et al.*, 2002;)
 منابع ازت از دیگر عوامل موثر در بهبود عملکرد محیط کشت و افزایش میزان توکسین و اسپور هستند (Valicente and Mourao, 2008). از سوی دیگر تکنولوژی تخمیر جهت تولید آفت‌کش‌ها نیز یکی از موثرترین فاکتورها در رشد و اسپورولاسیون باکتری *Bt* به عنوان حشره‌کش بیولوژیک بوده و سبب افزایش معنی داری در میزان تولید اسپور و کریستال پروتئین ($p=0.05$) نسبت به محیط کشت تخمیر نشده می‌باشد (Abidha *et al.*, 2002). در تحقیق حاضر جهت شناخت اهمیت منابع غذایی در غنی سازی محیط کشت و توانایی آن در بهینه‌سازی رشد باکتری، در شرایط رشدی مختلف از سوسپانسیون اسپور و کریستال باکتری *Btk* رشد کرده در محیط کشت غنی شده و نشده در دو شرایط رشدی تخمیر شده و نشده در فرمانتور ۷ لیتری استفاده شد و در نهایت میزان رشد، اسپورولاسیون، تولید دلتا اندوتوکسین و نرخ مرگ‌ومیر ایجاد شده در لارو حشره هدف (لارو سن دوم *E. kuehniella*) مورد بررسی قرار گرفت (Sarrafzadeh *et al.*, 2005; Travers *et al.*, 1987).
 مطالعات حاضر نشان داد که میزان تولید اسپور و کریستال وابسته به شرایط مختلف رشدی و محیط‌های مختلف کشت می‌باشد (Devidas *et al.*, 2014) به گونه‌ای که تعداد کم اسپور تولید شده در آزمایشات مقدماتی قبل از فرآیند تخمیر و غنی‌سازی محیط

بحث

باکتری *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (سروتایپ H1) (*Btk*) با خاصیت لاروکشی عموماً در کنترل پروانه‌ها استفاده می‌شود (Gupta and Dikshit, 2010). از آنجایی که پروتئین‌های سمی باکتری *Bt* نقش مهمی در مبارزه بیولوژیک دارند، شناسایی و بهینه‌سازی شرایط تولید بیشترین مقدار از این پروتئین‌های حشره‌کش می‌تواند یک راه حل مناسب در برنامه‌های مدیریتی باشد (Yang and Wang, 1998). باکتری *Bt* برای رشد بهینه نیاز به یک سری عناصر از قبیل کربن و نیتروژن به عنوان منابع تامین کننده انرژی دارد (Sarrafzadeh *et al.*, 2005). به عبارتی منابع مورد استفاده در محیط کشت و شرایط رشد نقش مهمی در بازدهی، خاصیت حشره‌کشی اسپور و کریستال و تولید تجاری این حشره‌کش بیولوژیک دارد (Devidas *et al.*, 2014). شناسایی شرایط ایجاد کننده بیشترین مقدار تولید توکسین و اسپور در طی فاز رشدی با قدرت حشره‌کشی بالا و بازدهی بیشتر در کمترین مدت زمان تیمار با استفاده از ترکیبات مختلف در دسترس و با ماهیت کنترلی در ترکیب محیط کشت امری ضروری است (Poopathi and Abidha, 2008). نمک‌های معدنی مختلف به عنوان منابع املاح از جمله این ترکیبات در جهت غنی‌سازی محیط کشت می‌باشد که با تحریک رشد باکتری تاثیر معنی داری در افزایش میزان CFU و تولید اسپور و کریستال پروتئین و در نتیجه بهینه-

کشت ($10^8 \times 7/4$ اسپور بر میلی‌لیتر) نشان دهنده عدم تامین مواد غذایی مورد نیاز و شرایط بهینه رشد باکتری نسبت به آزمایشات نهایی در حضور فرآیند تخمیر و غنی‌سازی محیط کشت ($10^8 \times 11/8$ اسپور بر میلی‌لیتر) می‌باشد. به عبارتی در دسترس بودن منابع مورد نیاز رشد باکتری از جمله پروتئین، کربن و نمک‌های معدنی در ترکیبات محیط کشت و در نتیجه رشد بهینه سلول‌های باکتریایی در محیط کشت غنی شده در شرایط تخمیر شده، سبب افزایش قابل توجهی در میزان CFU، اسپور تولید شده، OD، وزن خشک توده سلولی و در نتیجه سموم تولیدی شده است (Poopathiand Archana, 2012). بر اساس مطالعات تیرادو-مونتیل و همکاران (Tirado-Montiel et al., 2001) طی فرآیند رشد باکتری *Bt* میزان در دسترس بودن مواد غذایی می‌تواند نقش موثری در تولید سلول‌های مقاوم، اسپور و کریستال باکتری داشته باشد. مطالعات کشاورزی و همکاران (Keshavarzi et al., 2005) نیز یک ارتباط مستقیم میان بیومس سلولی و ترکیبات محیط کشت را نشان می‌دهد. به طور کلی سمیت ایجاد شده در پایان فرآیند تخمیر وابسته به منابع غذایی محیط کشت و شرایط رشدی بوده (Ramirez-Lepe and Ramirez-Suero, 2012) و در ارتباط مستقیم با تولید بیومس سلولی می‌باشد (Soccol et al., 2009). طبق تحقیق حاضر نیز که نتایج آن مطابق با گزارش اخیر سازمان جهانی بهداشت می‌باشد (WHO, 1985)، سموم باکتریایی تولید شده در محیط کشت غنی شده در شرایط تخمیر شده، در کمترین دوز مصرفی بیشترین تاثیر معنی‌دار در مرگومیر لارو سن دوم پروانه *E. kuehniella* را در کمترین مدت زمان تیمار بر اساس شاخص‌های LC_{50} و LT_{50} ایجاد کرده است به گونه‌ای که سوسپانسیون اسپور و کریستال *Btk* کشت شده در محیط کشت غنی شده در کمترین مدت زمان تخمیر نسبت به سایر محیط‌های کشت (۷۲ ساعت تخمیر) بیشترین تاثیر معنی‌دار در مرگومیر لارو سن دوم پروانه (۵۸/۷٪)، دو روز پس از تیمار نشان داد. طبق مطالعات والیسنت و همکاران (Valicente et al.,)

کشت (2010) نیز سوسپانسیون باکتری *Btk* رشد کرده در محیط کشت پس از ۹۶ ساعت تخمیر با تولید $10^8 \times 12/9$ اسپور بر میلی‌لیتر سبب ایجاد خاصیت سمی و تلفات در سنین مختلف لارو پروانه *E. kuehniella* شده است. آنالیز SDS-PAGE با استفاده از تکنیک-های استاندارد برای مشاهده پروفیل پروتئین باکتری (Laemmli, 1970) نیز نشان دهنده این موضوع می‌باشد که محیط کشت غنی شده در شرایط تخمیر شده سبب افزایش تولید پروتئین‌های Cry و شمار باندهای پروتئینی شده است که این امر در ارتباط مستقیم با شتاب در فاز رشدی، افزایش شمار سلول-های باکتریایی با قابلیت رشد و زنده‌مانی بیشتر و در نتیجه افزایش بهره‌وری از طریق افزایش در میزان سمیت در محیط کشت غنی شده تخمیر شده می‌باشد (Dulmage, 1970).

نتیجه‌گیری کلی

سموم حاوی پروتئین‌های کریستالی *Bt*، به دلیل اختصاصی و بی‌خطر بودن روی موجودات غیر هدف و محیط زیست، عاملی موثر جهت کنترل تلفیقی آفات هدف هستند. تولید انبوه و اقتصادی سموم *Bt* از طریق بهینه‌سازی شرایط رشدی با ایجاد شرایط تخمیر و نیز تامین ترکیبات مورد نیاز برای رشد باکتری به کمک محیط کشت مناسب، می‌تواند بستر بسیار مناسبی برای افزایش تولید اسپور/کریستال باکتری *B. thuringiensis* و در نتیجه افزایش بهره‌وری باکتری از طریق افزایش در زهرآگینی و تلفات بالا در کمترین مدت زمان تیمار برای کنترل حشرات آفات باشد و راه‌حل مناسبی برای غلبه بر مقاومت حشرات به آفتکش‌های شیمیایی باشد (Roh et al., 2007). نتایج تحقیق حاضر نیز نشان داد محیط کشت غنی شده در شرایط تخمیری سبب تولید بیشترین میزان اسپور و کریستال و در نتیجه افزایش زهرآگینی در باکتری *Btk* می‌گردد، بطوریکه با بکارگیری کمترین دوز مصرفی سبب ایجاد بیشترین میزان تلفات در کمترین مدت زمان تیمار روی لارو سن دوم پروانه *E. kuehniella* شده است. لذا انتخاب و استفاده صحیح و

بیمارگر *Bt* و بکارگیری بیوتکنولوژی تخمیری و
 بهینه از منابع غذایی و محیط کشت و تکثیر باکتری
 بیوراکتورها در تولید تجاری آن می‌تواند بسیار موثر
 باشد.

REFERENCES

- Abbott, W.S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18, 265- 267.
- Aharonowitz, Y. & Demain, A. L. (1980). Thoughts on secondary metabolism. *Biotechnology and Bioengineering*, 22, 5- 9.
- Amin, G., Alotaibi, S., Youssef Narmen, A. & Saleh, W. D. (2008). Optimization of a fermentation process for bioinsecticide production by *Bacillus thuringiensis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(11), 2465- 2471.
- Aneja, K. R. (2007). *Experiments in Microbiology, Plant Pathology and Biotechnology*. 632 pages.
- Bel, Y., Granedo, F., Alberola, T. M., Martinez-Sebastian, M. J. & Ferre, J. (1997). Distribution, frequency and diversity of *Bacillus thuringiensis* in olive tree environments in Spain. *Systematic of Applied Microbiology*, 20, 652- 658.
- Ben Khedher, S., Kamoun, A., Jaoua, S. & Zouari, N. (2011). Improvement of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide production by sporeless and sporulating strains using response surface methodology. *New Biotechnology*, 28(6), 705–712.
- Brindley, T. A. (1930). The growth and development of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera) and *Tribolium confusum* Duval (Coleoptera) under controlled conditions of temperature and relative humidity. *Annals of the Entomological Society of America*, 23, 741–757.
- Burges, H. D. & Jones, K. A. (1998). Formulation of bacteria, viruses and protozoa to control insects. In: Formulation of microbial biopesticides. Vol., ed. Eds. *Springer*, 33-127.
- Devidas, P. C., Pandit, B. H. & Vitthalrao, P. S. (2014). Evaluation of different culture media for improvement in bio insecticides production by indigenous *Bacillus thuringiensis* and their application against larvae of *Aedes aegypti*. *The Scientific World Journal*. Article ID 273030, 6 pages.
- Dominguez-Arrizabalaga, M., Villanueva, M., Beatriz Fernandez, A. & Caballero, P. (2019). A strain of *Bacillus thuringiensis* containing a novel cry7Aa2 gene that is toxic to *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Insects*, 10(9), 259.
- Dulmage, H. T. (1970). Production of the spore- γ -endotoxin complex by variants of *Bacillus thuringiensis* in two fermentation media. *Invertebrate Pathology*, 16(3), 385-389.
- El-Kersh, T. A., Al-akeel, R. A., Al-sheikh, Y. A. & Alharbi, S. A. (2014). Isolation and distribution of mosquito-larvicidal Cry genes in *Bacillus thuringiensis* strains native to Saudi Arabia. *Tropical Biomedicine*, 31, 616-32.
- El-Kersh, T. A., Al-Sheikh, Y. A., Al-Akeel, R. A. & Alsayed, A. A. (2012). Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* isolates from Saudi Arabia. *African Journal of Biotechnology*, 11(8), 1924-38.
- Enevide, C., David, A. & Fidelis, S. A. (2013). A new method for determining acute toxicity in animal models. *Toxicology International*, 20(3), 224-226.
- Federici, B. (2007). Bacteria as biological control agents for insects: economics, engineering and environmental safety. In Vurro M, Gressel J (ed.), *Novel biotechnologies for biocontrol agent enhancement and management*, Springer, Dordrecht, The Netherlands, 25–51.
- Finney, D. N. (1971). *Probit Analysis*, 3rd edition, London: Cambridge University Press. *Pharmaceutical Sciences*, p. 318.
- Foda, M. S., Ismail, I. M. K., Moharam, M. E. & Sadek, Kh. H. A. (2002). A novel approach for production of *Bacillus thuringiensis* by solid state fermentation. *Egyptian Journal of Microbiology*, 37(2), 135-155.
- Ghribi, D., Zouari, N., Trigui, W. & Jaoua, S. (2007). Use of sea water as salts source in starch and soya bean-based media, for the production of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticides. *Process Biochemistry*, 42, 374-378.
- Gobatto, V., Giani, S.G., Camassola, M., Dillon, A. J. P., Specht, A. & Barros, N. M. (2010). *Bacillus thuringiensis* isolates entomopathogenic for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) and *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Brazilian Journal of Biology*, 70, 1039-1046.
- Goettel, M. S., Jahns, D. L. & Inglis G. D. (1955). The role of fungi the biological control of grasshoppers. *Canadian Journal of Botany*, 73 (1), 1-75.
- Gupta, S. & Dikshit, A. K. (2010). Biopesticides: an ecofriendly approach for pest control. *Biopesticides*, 3(1), 186-188.

22. Haung, Y., Tan, J. M. W. L., Kini, R. M. & Ho, S. H. (1997). Toxic and antifeedant action of numeg oil against *Tribolium castaneum* (Herbdt) and *Sitophilus zeamais* Motsch. *Stored Product Research*, 33, 289- 298.
23. Ibrahim, M. A., Griko, N., Junker, M. & Bulla, L. A. (2010). *Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective. *Bioengineered Bugs*, 1, 31–50.
24. Joung, K. B. . & Horticultural, R. (2000). A review of the environmental impacts of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*, Vol., *Agriculture and Agri-food Canada*, Research Branch.
25. Keshavarzi, M., Salimi, H. & Mirzanamadi, F. (2005). Biochemical and physical requirements of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* For high biomass yield production. *Agricultural Science and Technology*, 7, 41-47.
26. Laemmlli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
27. Liu, B. L. & Tzeng, Y. M. (2000). Characterization study of the sporulation kinetics of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 68 (1), 11-17.
28. Mazmira, M. M., Ramlah, S. A. A., Rosfarizan, M. , Ling, T. C. & Ariff, A. B. (2012). Effect of saccharides on growth, sporulation rate and endotoxin synthesis of *Bacillus thuringiensis*. *African Journal of Biotechnology*, 11(40), 9654-9663.
29. Mostafaie, A. (2003). *Theoretical and practical guide Protein Electrophoresis in Gel*. Press yadavaran.
30. Perumalsamy, H., Kim, N. J. & Ahn, Y. J. (2009). Larvicidal activity of compounds isolated from *Asarum heterotropoides* against *Culex pipiens pallens*, *Aedes aegypti*, and *Ochlerotatus togoi* (Diptera: Culicidae). *Medical Entomology*, 46(6), 1420- 1423.
31. Poopathi, S. & Abidha, S. (2008). Biodegradation of poultry waste for the production of mosquitocidal toxins. *International Journal of Biodeterioration and Biodegradation*, 62(4), 479-482.
32. Poopathi, S. & Archana, B. (2012). Optimization of medium composition for the production of mosquitocidal toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 50 (1), 65-71.
33. Pourmirza, A. A. (2005). Local variation in susceptibility of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) to insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 98(6), 2176-2180.
34. Ramirez-Lepe, M. & Ramirez-Suero, M. (2012). Biological control of mosquito larvae by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, *Insecticides Pest Engineering*, chapter 11, In Tech Press.
35. Roh, J. Y., Choi, J. Y., Li, M. S., Jin, B. R. . & Je, Y. H. (2007). *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and efective tool for insect pest control. *Microbiology and Biotechnology*, 17, 547.
36. Rojas, N. L., Lewkowicz, E. S. & Nobile, M. L. (2018). Alternative low-cost process for large-scale production of *Bacillus thuringiensis* in a simple and novel culture system. *Environmental Science and Health, Part B*; 53(11), 719-728.
37. Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R. M., Capell, T. & Christou, P. (2011). *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnology*, 9, 283–300.
38. Sarker, N. & Mahbub, K. R. (2012). *Bacillus thuringiensis*: An Environment Friendly Microbial Control Agent. *Microbiology*, 2, 36-51.
39. Sarrafzadeh, M. H., Guiraud, J. P., Lagneau, C., Gaven, B., Carron, A. & Navarro, J. M. (2005). Growth, sporulation, delta- endotoxins synthesis, and toxicity during culture of *B. thuringiensis* H-14. *Current Microbiology*, 51(2), 75-81.
40. Schunemann, R., Knaak, N. & Fiuza, L. M. (2014). Mode of action and specificity of *Bacillus thuringiensis* toxins in the control of caterpillars and stink bugs in soybean culture. *ISRN Microbiology*, 1-12.
41. Seyedi, H., Mehrkhou, F & Noori, F. (2017). Type of ceneralflours as factors affecting biological and physiological characteristics of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *Crop Protection*, 6(2), 273-285.
42. Shapiro, S. S. & Wilk, M. B. (1965). An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). *Biometrika*, 52(3/4), 591-611.
43. Soccol, C. R., Pollom, T. E. V., Fendrich, R. C., Prochmann, F.A., Mohan, R., Blaskowski, M. M. M., Melo, A. L., de Carvalho, C. J. B. & Thomaz-Soccol, V. (2009). Development of a low cost bioprocess for endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* intended for biological control of *Aedes aegypti*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52, 121-130.
44. Tirado-Montiel, M. L., Tyagi, R. D. & Valero, J. R. (2001).Waste water treatment sludge as a raw material for the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Water Research*, New York, 35(16), 3807-3816.

45. Travers, R. S., Martin, P. A. W. & Reichelderfer, C. F. (1987). Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(6), 1263-1266.
46. USDA. (2011). Laboratory Guide book MLG 3.01. *Quantitative Analysis of Bacteria in Foods as Sanitary Indicators*.
47. Valicente, F. H. & Moura, A. H. C. (2008). Use of by-products rich in carbon and nitrogen as a nutrient source *Bacillus thuringiensis* (Berliner)-based biopesticide. *Neotropical Entomology*, 37, 702-708.
48. Valicente, F. H., Tuelher, E., Leite, M. I. S., Freire, F. L. & Vieira, C. M. (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.
49. Van Frankenhuyzen, K. (2009). Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Invertebrate Pathology*, 101, 1-16.
50. WHO. (1985). Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide. TDR/BVC/ *Sphaericus*, 85, 3(1).
51. Yang, X. M. & Wang, S. S. (1998). Development of *Bacillus thuringiensis* fermentation and process control from a practical perspective. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 28(2), 95-98.
52. Zouari, N., Achour, O. & Jaoua, S. (2002). Production of delta-endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and over coming of catabolite repression by using highly concentrated gruel and fish meal media in 2- and 20-dm³ fermenters. *Chemical Technology and Biotechnology*, 77, 877-882.