نشریه پژوهشهای صنایع غذایی ایران، سال ۱۳۸۸، جلد ۵، شماره ۱، ص ۲۸-۳۶

# تولید حشره کش زیستی توسط *Bacillus thuringiensis* از پساب کارخانه تولید نشاسته

مرضیه موسوی نسب* و افسانه دهقان[1]

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۲/۱۷ تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۲/۱۹


## چکیده

برای پسابهای خاص به ویژه آنهایی که از کارخانجات مواد غذایی حاصل می‌شوند به فرآوری‌هایی جهت تولید محصولات با ارزش افزوده مانند حشره کش‌های زیستی نیاز می‌باشد. امروزه موفق ترین حشره کشهای زیستی، توسط باکتریهای میله ای شکل گرم مثبت از جنس باسیلوس تولید می‌شود که در مرحلهٔ تشکیل اسپور، اندوتوکسین‌های پروتئینی کریستاله تولید کرده و هنگام ورود به روده تحت شرایط قلیایی فعال شده و باعث صدمه به غشای سلول‌های روده حشرات و تشکیل سوراخ در غشا می‌شوند و عمل تجزیه کردن سلولهای اپیتلیال را انجام میدهند. در این تحقیق، باکتری *Bacillus thuringiensis* بر روی پساب کارخانه تولید نشاسته رشد داده شد و طی عمل تخمیر پروتئین کریستاله با وزن مولکولی ۶۵ کیلو دالتون تولید گردید. سپس پروتئین حاصل را بر روی لارو *Galleria melonella* اثر داده و میزان مرگ و میر بعد از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت ارزیابی و با نمونه کنترل مقایسه گردید. تحقیقات نشان داده تولید دلتا اندوتوکسین با اسپورزایی رابطه دارد و بیشترین میزان اثر سمیت پروتئین‌های کریستالی در بالاترین غلظت اسپور ها می‌باشد. بر این اساس، تعداد کل باکتری ها و اسپورهای تولید شده در مرحله تخمیر شمارش شد که در محیط پلیت کانت آگار به ترتیب $۱۲/۵\times۱۰^{۸}$ و $۴۸\times۱۰^{۷}$ کولنی در هر میلی لیتر بود.


**واژه‌های کلیدی**: حشره کش میکروبی، پساب کارخانه تولید نشاسته، اندوتوکسین، *Bacillus thuringiensi var. kurstaki*

## مقدمه

از نظر تاریخی بخش عمده ی ضایعاتی که توسط انسان تولید می‌شود، مستقیما وارد محیط زیست می‌گردد. به دلیل افزایش روز افزون جمعیت این مساله باعث آلودگی شدید منابع آب و خاک شده و سلامت انسان را تهدید می‌کند. در قرن نوزدهم، مشکل به حدی جدی شد که روشهایی برای تصفیه این ضایعات ارائه گردید و کمک کرد تا آب از نظر شیمیایی و بیولوژیکی بی خطر شود (۹). در کشورهای پیشرفته، مقدار زیادی از فاضلاب‌های صنعتی و خانگی به روش بیولوژیکی تصفیه می‌شود اما از پسابهای خاص بخصوص آنهایی که از کارخانجات مواد غذایی حاصل می‌شوند می‌توان با فرآوری هایی برای تولید محصولات با ارزش افزوده استفاده کرده و از آنها مواد قابل ارائه به بازار مانند پروتئین ها، چربیها و یا حشره کش‌های زیستی را بازیافت نمود (۷ و ۱۶). استفاده از تکنولوژی‌های نوین جهت تولید حشره کشهای زیستی باعث می‌شود که نیاز به حشره کشهای مصنوعی کاهش یابد.

هزینهٔ سالانه کنترل شیمیایی آفات کشاورزی و حشرات که عامل بیماریها را به انسان و دام منتقل می‌کنند سالانه بیش

۱و۲- به ترتیب استادیار و دانشجوی سابق کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

(* - نویسنده مسئول: Email: marzieh.moosavi-nasab@mail.mcgill.ca)

از ۳۵۰ میلیون دلار برآورد شده است. علاوه بر هزینهٔ زیاد، مصرف حشره کش‌های رایج به علت عدم اختصاصی عمل کردن این ترکیبات، بقاء در محیط زیست و تجمع آنها که باعث بیماریهای حیوانات و بویژه پرندگان می‌شود مشکل آفرین است (۸). کنترل حشرات با استفاده از عوامل بیماریزای میکروبی (باکتریها، قارچها، پروتوزواها و ویروسها) محاسن متعددی در مقایسه با سموم شیمیایی دارد. این عوامل اختصاصی عمل کرده و به دلیل استفاده از سوبسترای ارزان قیمت هزینه تولید آنها نسبتاً کم است. بسیاری از آنها دامنه فعالیت کمی دارند و بقایایی از خود در محیط باقی نمی گذارند. ایجاد مقاومت نیز در آنها بسیار غیر محتمل است البته بسیاری از این ارگانیسم‌ها به سادگی در مقیاس وسیع قابل کشت نیستند (۲۲).

والرو و همکاران بیان کردند حشره کش‌های زیستی که توسط باکتری *Bacillus thuringiensis* تولید می‌شوند، ترکیبات بیولوژیکی خیلی اختصاصی برای کنترل حشرات می‌باشند که باعث ایجاد محیط سالم تر، بهبود سلامت انسان‌ها و تولید غذاهای ایمن می‌شود (۲۱).

امروزه موفق ترین حشره کشهای زیستی، سموم حاصل از باکتریهای میله ای شکل گرم مثبت از جنس باسیلوس می‌باشند. باکتری *Bacillus thuringiensis Var. kurstaki* که برای حشرات اثر تخریبی دارد جزئ پروکاریوت ها[1] است و برای رشد به نور نیاز ندارد. این باکتری در بسیاری از محیط‌های کشت ساده ی آزمایشگاهی مانند محلول آبگوشت مغذی[2] در شرایط هوازی و در دمای بین ۴۰-۱۵ درجه سانتی گراد (دمای بهینه ۳۰ درجه سانتی گراد) به راحتی رشد می کند.

این باکتری چندین توکسین تولید می‌کند که شامل موارد زیر است: ۱- آلفا اگزوتوکسین[3]: این سم علاوه بر حشرات برای موش و دیگر مهره داران سمی می‌باشد.۲- بتا اگزوتوکسین: در برخی سویه‌های این باکتری تولید شده و بر روی پستانداران عوارض عمده ای دارد.۳- گاما اگزوتوکسین: این توکسین برای حشرات سمی نمی باشد.۴- دلتا اندوتوکسین: در مرحله مرگ باکتری و تشکیل اسپور تشکیل می‌شود (۲۵). امروزه در فراورده‌های تجاری سویه‌هایی از باکتری *B. thuringiensis* که دلتا اندوتوکسین[4] تولید می‌نمایند، استفاده می‌شود (۶).

این باکتریها در مرحلهٔ تشکیل اسپور[5]، اندو توکسین‌های پروتئینی کریستاله[6] تولید می کنند که این ترکیبات پروتئینی کریستاله باعث صدمه به غشای سلول‌های روده حشرات و تشکیل سوراخ در غشا می‌شوند و عمل تجزیه کردن سلولهای اپیتلیال[7] را انجام میدهند (۲۰). این حشره کشها، از نوع تماسی نیستند و باید توسط حشرهٔ مورد نظر مصرف شوند. پروتئین‌های کریستالهٔ حشره کش باید بصورت قابل حل درآیند تا بتوانند از نظر بیولوژیکی به شکل سم فعال عمل کنند. عمل حل شدن سم کریستاله در قسمت میانی رودهٔ حشره که محیطی قلیایی است، صورت می‌گیرد و آنزیم‌های روده از طریق عمل پروتئولیز باعث فعال شدن آنها می‌شوند (۱۱). ایمنی انسان و دام بجز حشرات از این فراورده ها به این علت است که شرایط رودهٔ انسان و دام بسیار اسیدی می‌باشد که برای این سموم نامساعد است چرا که pH پایین باعث دناتوره شدن[8] محلول پروتئین‌های کریستالهٔ حشره کش[9] شده و آنها را برای هیدرولیز بوسیله پروتئاز روده آماده می‌سازد. حشرات مسموم شده ممکن

1- Prokaryots
2- Nutrient broth

3- Exotoxin
4- Endotoxin
5- Sporulation
6- Crystal protein endotoxin
7- Epithelial cells
8- Denaturation
9- Insecticidal crystal proteins

است به سرعت تلف شوند. یا به علت اثرات ناشی از مسمومیت خون، عمل تغذیهٔ آنها متوقف شده و در طی۲ تا ۳ روز از بین بروند (۲۳).

برخی از این فرآورده‌های حشره کش که شامل سم حاصل از یک گونه خاص از باسیلوس یا زیر گونه ای از آن هستند می‌توانند برای راستهٔ کامل حشرات سمی باشند، در حالی که برخی دیگر ممکن است تنها علیه چند گونه یا حتی فقط یک گونه مؤثر واقع شوند. از دههٔ ۱۹۶۰، باکتری *B. thuringiensis* از گسترده ترین حشره کشهای میکروبی مورد استفاده می‌باشد (۲۲).

اغلب فرآورده‌های تجاری حاصل از *B. thuringiensis* هم حاوی سم پروتئینی و هم اسپور می‌باشند، در حالی که برخی دیگر فقط حاوی ترکیب سمی هستند. مقدار مصرف این سموم ۴ تا ۶ گرم در هر هکتار است که برای کنترل بیش از ۴۰ حشرهٔ مختلف که باعث خسارت به کشاورزی و جنگلها شده و برخی عامل بیماریهای انسان هستند به کار می‌روند. اندوتوکسین‌های تولید شده توسط *B. thuringiensis* برای تعدادی از حشرات به طور اختصاصی عمل کرده و هنگامی که در معرض نور ماوراء بنفش یا سایر عوامل محیطی قرار می‌گیرند به سرعت به ترکیبات غیر سمی تبدیل می‌شوند این ویژگیها باعث شده است که فرآورده‌های موجود به عنوان فرآورده‌های مناسب برای محیط زیست شناخته شوند. البته کاربرد آن بدلیل قیمت بالای تولید در مرحله تخمیر محدود شده است (۲۲). استندباری و همکاران بیان کردند ۵۹-۳۵ درصد هزینه تولید مربوط به محیط‌های تخمیر است بنابر این برای تولید تجاری سم پروتئینی حاصل از *B. thuringiensis* با هدف بازده بالا و کمترین هزینه باید از مواد خام قابل دسترس و ارزان قیمت استفاده کرد (۱۸).

عبدالحمید گزارشاتی مبنی بر کاهش هزینه تولید سم میکروبی در اثر جایگزینی ترکیبات محیطی گران قیمت مانند آرد سویا و یا پودر ماهی با ضایعات و پساب‌های صنعتی (نشاسته کاساوا، نشاسته ذرت، سبوس گندم، خیساب ذرت، ملاس و آب پنیر) ارائه داد (۱). این ترکیبات حاوی عناصر مغذی ضروری برای رشد، تولید اسپور و تشکیل کریستالهای پروتئینی توسط *B. thuringiensis* است (۱۳). پساب کارخانه تولید نشاسته، محیط کشت تخمیر مناسبی برای تولید پروتئین کریستاله توسط باکتری *B. thuringiensis Var. kurstaki* است ولی فعالیت حشره کشی پروتئین‌های سمی فقط وابسته به نوع محیط کشت تخمیر نیست، بلکه میزان فعالیت حشره کشی آن ها به عواملی همچون فعالیت کالچر باکتریایی، نوع ترکیبات محیط، منابع کربن و نیتروژن و نسبت آنها (C/N) و میزان دلتا اندوتوکسین تولید شده، بستگی دارد. نتایج مشابه توسط کانگ و همکاران در سال ۱۹۹۲ بیان شد (۱۰).

در این تحقیق، هدف استفاده از پساب کارخانه تولید نشاسته[1] برای تولید حشره کش زیستی توسط *B. thuringiensis* در سطح آزمایشگاهی می‌باشد که علاوه بر کاهش آلودگی محیط زیست، سبب تولید محصولاتی با ارزش افزوده می‌شود.

## مواد و روش ها

### محیط کشت تخمیر

میزان عناصر موجود در پساب کارخانه تولید نشاسته در جدول ۱ نشان داده شده است (۲۴).

بر این اساس پساب کارخانه تولید نشاسته از کارخانه فارس گلوکوزین شیراز تهیه و به عنوان ماده اولیه استفاده شد.

1- Starch industry wastewater

جدول ۱. میزان عناصر موجود در پساب کارخانه تولید نشاسته

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

**سویه *B. thuringiensis***

در این تحقیق از باکتری *Bacillus thuringiensis Var. kurstaki* (PTCC 1531) استفاده شد. این باکتری از مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتری‌های صنعتی ایران تهیه گردید. برای تهیه کالچر فعال ابتدا باکتری در محیط محلول آبگوشت مغذی کشت داده شد و در ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری و سپس در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری گردید (۴ و ۵).

**آماده سازی ماده تلقیح شده**

این عمل در دو مرحله صورت گرفت ابتدا باکتری مورد نظر با ۱۰۰ میلی لیتر آبگوشت تریپتیکاز سوی[1] که در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه سترون شده بود، مخلوط گشته و ۲۴ ساعت در ۳۰ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. سپس ۲٪ حجمی از محیط کشت تلقیح شده برداشته شده و با ۳۰۰ میلی لیتر دیگر از محیط کشت آبگوشت تریپتیکاز سوی سترون شده مخلوط گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد و در نهایت ۲٪ حجمی از محیط کشت تلقیح شده که حاوی سلولهای رشد کرده بود برداشته شده و به محیط کشت تخمیر منتقل گردید. در تمام مراحل pH محیط کشت برای تلقیح، ۷ تنظیم گردید (۲۴).

**تخمیر**

در ابتدا با افزودن سود، pH محیط کشت (پساب کارخانه) بر روی ۷ تنظیم شد و محیط در ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه سترون گردید. سپس محیط کشت تلقیح شده به میزان ۲٪ حجمی به محیط کشت تخمیر اضافه شده و عمل تخمیر به مدت ۳۵-۳۰ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد در شرایط هوازی صورت پذیرفت. در این مرحله پروتئین‌های کریستاله توسط باکتری تولید گردید (۲ و ۲۴).

**شمارش تعداد باکتری ها و اسپور**

ابتدا نمونه ها با روش رقیق سازی سریالی توسط کلرید سدیم ۰/۹ درصد رقیق شده و این عمل تا رقت $10^{-7}$ ادامه داده شد. ۰/۱ میلی لیتر از نمونه‌های رقیق شده به محیط پلیت کانت آگار منتقل شده و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری گردید. برای شمارش اسپورها، ابتدا نمونه ها در حمام آب ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه حرارت داده شدند و سپس سرد شده تا سلولهای رویشی از بین رفته و فقط اسپور ها باقی بمانند سپس مشابه مراحل بالا کشت داده و در نهایت کولنی‌های حاصل

1- Trypticase Soy Broth (TSB)

شمارش شده و تعداد آنها در هر میلی لیتر گزارش گردید (۲۴).

### الکتروفورز SDS-PAGE بر روی نمونه حاوی پروتئین‌های کریستاله

برای بررسی پروتئین‌های کریستاله، الکتروفورز-SDS PAGE انجام شد (۱۵). برای ژل جداکننده، گرادیان غلظت ۲۰-۵٪ و برای ژل متراکم کننده غلظت ۵٪ تهیه گردید. نشانگر فرمنتاز[1] به عنوان استاندارد استفاده شد و وزن مولکولی پروتئین حاصل با استفاده از پروتئین‌های استاندارد تعیین گردید.

### ارزیابی زیستی[2]

برای تعیین قدرت حشره کشی نمونه ها، مخلوطی از اسپور و کریستالهای *B. thuringiensis Var. kurstaki* بر لارو *Galleria melonella* که از بخش گیاه پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز تهیه گردید، تأثیر داده شد و میزان مرگ و میر ارزیابی گردید. برای این منظور غذای آنها (موم عسل) به حشره کش آلوده شده و در ۵ ظرف جداگانه قرار داده شدند سپس ظرف‌های کوچکی از آب در محیط کشت آنها قرار داده شد و در هر ظرف ۱۰ لارو اضافه گردید سپس در دمای معمولی تحت شرایط هوازی نگهداری شدند و میزان مرگ و میر آنها بعد از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت محاسبه گردید (۱۷).

### آنالیز آماری

به منظور تجزیه و تحلیل نتایج، برنامه کامپیوتری SPSS مورد استفاده قرار گرفت و اطلاعات بدست آمده از آزمون ارزیابی زیستی با استفاده از T test تحلیل و برای تعیین اختلاف بین میانگین نمونه ها آزمون دانکن به کار برده شد و مقایسه در سطح ۵ درصد صورت پذیرفت.

## نتایج و بحث

### رابطه شمارش اسپور و میزان پروتئین کریستالی

طبق نتایج بدست آمده در این تحقیق، تعداد کل باکتری‌ها و اسپورهای شمارش شده با استفاده از محیط کشت پلیت کانت آگار به ترتیب، $۱۲/۵\times۱۰^{۸}$ و $۴۸\times۱۰^{۷}$ کولنی در هر میلی لیتر بود (جدول۲).

بام و همکارش نشان دادند تولید دلتا- اندوتوکسین با اسپورزایی *B. thuringiensis* رابطه دارد و بیشترین میزان اثر سمیت پروتئین‌های کریستالی در غلظت بالای اسپورها رخ میدهد (۳). تیرادو- مونیتل و همکاران (۱۹) بیان کردند حضور اسپورها در محیط کشت اثر تقویت کنندگی بر فعالیت کریستالهای سم و اثر آنها دارد. البته تحقیقات یزا و همکارش (۲۳) نشان داد که دانسیته بالای اسپور نیز می‌تواند یک عامل ممانعت کننده برای تشکیل اندوتوکسین باشد.

**جدول ۲. تعداد کل باکتریها و اسپورهای حاصل از *B. thuringiensis* در محیط کشت تخمیر بعد از ۲۴ ساعت**

| | |
|---|---|
| شمارش کلی باکتری (cfu/ml) | $۱۲/۵\times۱۰^{۸}$ |
| شمارش اسپور (cfu/ml) | $۴۸\times۱۰^{۷}$ |
| اسپورزایی (٪) | ۳۸/۴ |

لاچهب و همکاران (۱۴) اعلام کردند در محیط پساب نشاسته، باکتری *B. thuringiensis* فاز تأخیر[3] کوتاهی دارد و سریعاً می‌تواند خود را با شرایط محیطی وفق داده و

1- Fermentase
2- Bioassay
3- Lag phase

آنزیم‌های ویژه برای کاهش مواد آلی موجود در پساب تولید کند و انرژی مورد نیاز خود را برای انجام اعمال سلولی تامین نماید، اما این باکتری در محیط حاوی نشاسته بدلیل دارا بودن میزان زیاد کربوهیدرات قابل دسترس و نیتروژن (جدول ۱)، مرحله رشد[1] طولانی داشته و مرحله اسپورزایی آن اندکی به تأخیر می‌افتد.

**الکتروفورز**

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

*B. thuringiensis* در شروع مرحله اسپورزایی برای هیدرولیز مواد آلی مورد نیاز خود چندین نوع پروتئاز تولید می‌کند که میزان تولید آنزیم پروتئاز بستگی به غلظت کربن و نیتروژن قابل دسترس در محیط دارد. هر چه میزان این ترکیبات آلی بیشتر باشد تولید پروتئاز کاهش می‌یابد. بنابراین، پساب کارخانه تولید نشاسته بدلیل دارا بودن ترکیبات آلی محیط مناسبی برای تولید سم میکروبی حاصل از *B. thuringiensis* می‌باشد. چنانچه زمان تخمیر بیشتر شود میزان فعالیت آنزیم پروتئاز بیشتر گردیده و باعث هیدرولیز پروتئین کریستاله تولیدی شده و فعالیت سم حاصل کاهش می‌یابد. پس، مدت زمان مرحله تخمیر باید معین و حدود ۳۵-۳۰ ساعت در نظر گرفته شود (۲۴).

نتایج به دست آمده در این تحقیق با نتیجه تانسی و همکاران (۲۰) که بر روی محیط حاوی پروتئین کریستاله، SDS-PAGE انجام دادند مطابقت دارد. آنها مشاهده کردند که پروتئین کریستاله دلتا اندوتوکسین حاصل از *B. thuringiensis* که در مرحله اسپورزایی باکتری تولید می‌شود، حدود ۱۳۰ کیلو دالتون می‌باشد که به دلیل فعالیت بالای آنزیم پروتئاز این باکتری در محیط کشت شکسته شده و تولید دلتا اندوتوکسین با وزن مولکولی ۶۵ کیلو دالتون می‌کند.

**ارزیابی زیستی**

نتایج بدست آمده حاکی از آن است که میزان مرگ و میر لاروهای *Galleria melonella* نسبت به نمونه‌های کنترل (فاقد سم پروتئینی حاصل از باکتری *B. thuringiensis*) در سطح ۵ درصد به صورت معنی دار افزایش داشته است. البته میزان مرگ و میر لاروها در مدت زمان ۴۸ ساعت نگهداری در محیط حاوی موم عسل آغشته به سم پروتئینی نسبت به ۲۴ ساعت افزایش بیشتری داشته است.

ناولس و همکاران (۱۲) گزارش دادند سم حاصل از *B. thuringiensis Var. kurstaki* با فسفولیپیدهای موجود در غشائ پلاسما واکنش داده و سبب پارگی سلول[2] می‌شوند. آنها این سم را بر روی موش مورد مطالعه قرار دادند و مشاهده کردند هیچ کدام از موش ها از بین نرفتند. بنابر این دریافتند که واکنش این سم پروتئینی با فسفولیپید غشائ پلاسما بسیار اختصاصی می‌باشد و در سلول تمام جانداران رخ نمی دهد.

**نتیجه گیری نهایی**

با استفاده از پساب کارخانه تولید نشاسته به عنوان محیط کشت تخمیر و تلقیح آن با باکتری *B. thuringiensis Var. kurstaki* سم پروتئینی به صورت کریستاله با وزن مولکولی ۶۵ کیلو دالتون تولید شد که باعث از بین بردن لارو *Galleria melonella* گردید. این نوع حشره کش زیستی در مقایسه با سموم شیمیایی علاوه بر اینکه مزایایی همچون هزینه تولید کم در نتیجه استفاده از سوبسترای ارزان قیمت و

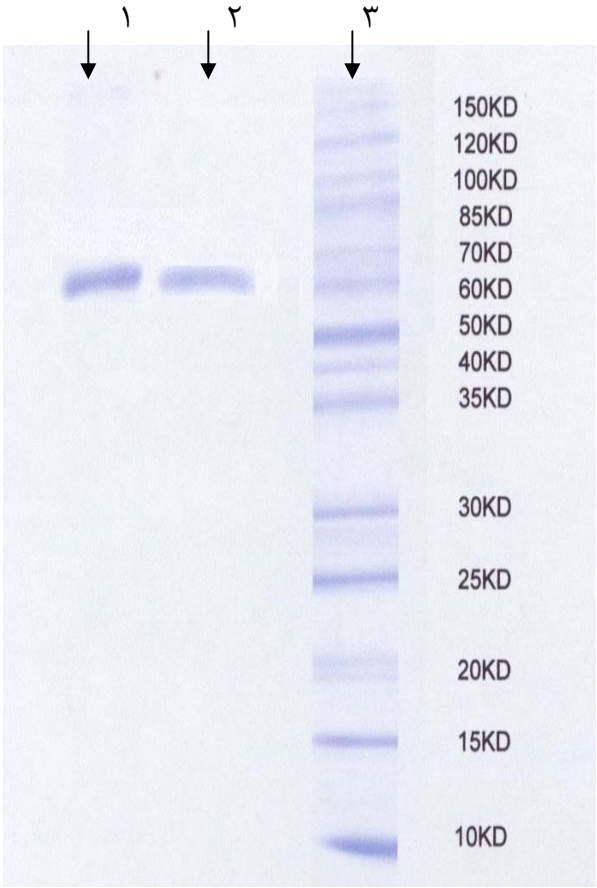
1- Log phase

2- Cytolysis

عملکـرد اختـصاصی دارد، باعـث کـاهش آلـودگی محـیط زیست و تولید غذای ایمن و سالم خواهد شد و مـی‌توانـد بـا تحقیقات گسترده تر کاربرد وسیعی در صنعت کشاورزی بـه ویژه در ایران داشته باشد.

## سپاسگزاری

بدینوسـیله از هـسته کـارآفرینی دانـشکده کـشاورزی دانشگاه شیراز که ایـن پـروژه را حمایـت مـالی نمودنـد و از کارشناسان محترم بخش علوم و صنایع غذایی خانم ها پروانه محسنی و اعظم کشتکاران و همچنین از بخـش گیاهپزشـکی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز که در اجرای این تحقیـق همکاری صمیمانه داشته اند، کمال تشکر و قدردانی را دارد.




**شکل۱. الگوی SDS-PAGE مربوط به پروتئین کریستاله تولید شده توسط باکتری *B. thuringiensis Var. kurstaki* ۱. پروتئین کریستاله ۲. پروتئین کریستاله (تکرار) ۳. نشانگر فرمنتاز**

**جدول۳. مقایسه مرگ و میر لاروهای *Galleria melonella* در اثر سم حاصل از *B. thuringiensis***

| زمان / نمونه | ۲۴ ساعت | ۴۸ ساعت |
|---|---|---|
| کنترل(بدون سم) | ۰/۰۰ $^{a*}$ | ۰/۵۰ $^{a}$ |
| پلیت‌های حاوی سم | ۹/۰۰ $^{b}$ | ۹/۶۰ $^{b}$ |

*- حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار می‌باشد ($p<۰,۰۵$).

## منابع


1) Abdel-Hameed, A. 2001. Stirred tank culture of *Bacillus thuringiensis* H-14 for production of the mosquitocidal δ-endotoxin: mathematical modelling and scaling-up studies. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 17:857–861.
2) Adjalle, K. D., S. K. Brar, M. Verma, R. D. Tyagi, J. R. Valero and R.Y. Surampalli. 2007. Ultrafiltration recovery of entomotoxicity from supernatant of Bacillus thuringiensis fermented wastewater and wastewater sludge. Process Biochemistry. Kansas city, USA. 1-39.
3) Baum, J. and T. Malvar. 1995. Regulation of insecticidal crystal protein production in *Bacillus thuringiensis*. Molecular Microbiology. 18: 1–12.
4) Brar, S. K., M. Verma and R. D. Tyagi. 2007. Bacillus thuringiensis fermentation of hydrolyzed sludge – Rheology and formulation studies. Chemosphere. 67(4):674-683.
5) Brar, S. K. and K. R. Stauffer**.** 2005. Sludge based Bacillus thuringiensis biopesticides: Viscosity impacts. Water Research. 39(13): 3001-3011.
6) Bravo, A., S. S. Gill and M. Soberón. 2007. Mode of action of Bacillus thuringiensis Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. Toxicon . 49(4): 423-435.
7) Crueger, w. and A. Crueger. 2000. Biotechnology Industrial Microbiology. Kluwer Academic, Boston. 571-584.
8) Fong, K. and H. M. Tan. 2000. Isolation of a microbial consortium from active sludge for the biological treatment of food waste. World journal of Microbiology and Biotechnology. 16:441-443.
9) Herzka, A. and R. G. Booth. 1981. Food industry wastes: disposal and recovery. Applied Science Publishers, London. 210-214.
10) Kang, B.C., S. Y. Lee and H.N. Chang. 1992. Enhanced spore production of *Bacillus thuringiensis* by fed batch culture. Biotechnology Letters. 14 (8): 721–726.
11) Knowles, B.H. 1994. Mechanisms of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal delta- toxins. In Advances in Insect Physiology, 24:245-308. Academic press, London.
12) Knowles, B.H., W.E. Thomas and D. J. Ellar. 1984. Lectin-like binding of Bacillus thuringiensis var. kurstaki lepidopteran-specific toxin is an initial step in insecticidal action. Federation of European Biochemical Societies. 168 (2): 197- 202.
13) Kroyer, G.T. 1993. Bioconversion of food processing wastes: recent research and new development. An overview . Micribiology Europe sept/oct, 30-34.
14) Lachhab, K., R. D. Tyagi and J. R. Valero. 2001. Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides using wastewater sludge as a raw material: effect of inoculum and sludge solids concentration. Process Biochemistry. 37 (2): 197–208.
15) Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. Nature (London)**.** 227: 680–685.
16) Lau, D.C.W. 1981. Utilization of sewage sludge as a resource for protein extraction and recovery. Conservation & Recycling. 4(3): 193-200.
17) Mohammedi, S., S. Subramanian, S. Yan, R. D. Tyagi and J. R. Valéro. 2006. Molecular screening of *Bacillus thuringiensis* strains from wastewater sludge for biopesticide production. Process Biochemistry. 41(4):829-835.
18) Stanbury, P. F., A. Whitaker and S. J. Hall. 1995. Principles of Fermentation Technology (Second ed.), Elsevier Science Ltd., New York.
19) Tirado-Montiel, M. L., R. D. Tyagi, J. R. Valero and R.Y. Surampalli. 2003. Production biopesticides using wastewater sludge as a raw material- effect of process parameters. Water Science and Technology**.** 48 (8): 239-246.
20) Tounsi, S., M. Dammak, A. Rebaî and S. Jaoua. 2005**.** Response of larval *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) to individual *Bacillus thuringiensis kurstaki* toxins and toxin mixtures. Biological Control. 35(1): 27-31.
21) Valero, J. R., S. Mohammedi, N. J. Payne and R. D. Tyagi. 1999. Microbial control of defoliating forest insects. Recent Research Developments in Microbiology**.** 3: 455–464.

22) Waites, M. J., N. L. Morgan and J. S. Rockey. 2001. Industrial Microbiology: An Introduction. Academic press, New York. 425-430.
23) Yezza, A. and R. D. Tyagi. 2006. Correlation between entomotoxicity potency and protease activity produced by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* grown in wastewater sludge. Process Biochemistry. 41(4): 794-800.
24) Yezza, A., and R. D. Tyagi. 2005. Bioconversion of industrial wastewater and wastewater sludge into *Bacillus thuringiensis* based biopesticides in pilot fermentor .Bioresource Technology.97(15): 1850-1857.
25) Zhong, Ch. and S. G. Edelson. 2000. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* δ-Endotoxin Which Is Toxic to Insects in Three Orders. J. of Invertebrate Pathology.76(2): 131-139.