فصلنامه علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان
شماره پیاپی۶، جلد۲، شماره ۳، تابستان ۱۳۸۸، صفحه ۵۳ تا صفحه ۶۱

روش انتخابی برای جدا نمودن *Bacillus thuringiensis* از خاک و اثر توکسین تولیدی آن بر روی *Musca Domestica*

سیامک نایبی
استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال nayebis@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۲/۲۸ تاریخ پذیرش: ۸۸/۲/۲۶

چکیده
تاکنون *Bacillus thuringiensis* با داشتن پتانسیل بالای مبارزه با آفات و حشرات مورد بررسی‌های زیادی قرار گرفته است. هدف از این تحقیق بررسی میزان کارآمد بودن روش دفع بیولوژیکی مگس با استفاده از سم ترشحی باسیلوس تورنجینستیس می‌باشد. در این آزمایش ابتدا میزان حساسیت آنتی بیوتیکی و اندازه‌گیری وزن پلاسمیدهای باسیل‌های جدا شده از نمونه‌های محیطی به کمک تست‌های شناسایی مثل متابولیسم کربوهیدرات، احیاء نیترات و رنگ آمیزی کریستال پروتئین آن‌ها انجام وسپس ۲۰ ایزولات از این باسیل شناسایی شد. بر خلاف روش‌های قدیمی که فقط رشد ارگانیسم دلخواه مدنظر قرار می‌گرفت در این روش ابتدا از رشد اسپورهای *Bacillus thuringiensis* توسط استات سدیم جلوگیری گردید وسپس در محیط کشت آگار غنی شده رشد داده شدند، در مرحله نهایی اندوتوکسین‌ها از *Bacillus thuringiensis* جدا و اثرکشندگی آن‌ها بر *Musca domestica* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده، استفاده از *Bacillus thuringiensis* و توکسین تولیدی آنرا به عنوان یک حشره کش موثر نشان داد.

کلید واژه: باسیلوس تورینجینسیس، پلاسمید، اندوتوکسین، ایزولاسیون.

مقدمه
قدمت مبارزه با آفات به اندازه تاریخ بشریت عمر دارد. با وجود این که تلاش‌های بسیاری در این راه صورت گرفته، این مشکل هنوز حل نشده و اهمیت خود را از دست نداده است. در طی ۴۰ سال گذشته سموم مبارزه با آفات و حشرات با تنوع فراوان تولید شده ولی از آن جائی که جمعیت آفات و حشرات از نظر مقاومت یا حساسیت به این سموم یکسان نمی‌باشند، اثرات مختلفی از این سموم در میان حشرات گوناگون دیده شده است که از آن جمله می‌توان به وجود آمدن گونه‌های مقاوم در اثراستفاده مکرر از این سموم نام برد. جهت مقابله با مقاوم شدن گونه‌های آفات در برابر سموم، مقدار و دفعات استفاده از سموم آن قدر زیاد شده که در بعضی موارد تا ۳۰٪ محصول به علت مسمومیت گیاهان با این سموم هدر رفته است. از طرفی آلودگی محیطی نیز به علت استفاده از سموم شیمیایی طیف وسیعی داشته و نه تنها حشرات، بلکه جانوران و انسان‌ها نیزهدف این سموم قرارگرفته‌اند (۲). با توجه به مشکلات فوق، دانشمندان راه‌های جدیدی برای مقابله با آفات و حشرات را مورد بررسی قرار داده‌اند. امروزه صنعت تولید سموم، با روش‌های بیولوژیک همگرا شده است. با استفاده از

www.SID.ir

این روش‌ها (مقرون به صرفه و اقتصادی) می‌توان از هدر رفتن محصول جلوگیری نمود(۶). با در نظر گرفتن موارد فوق، برای پی بردن به پتانسیل حشرات در زمینه ایجاد حالت پاتولوژیکی تعدادی از باکتری‌ها، قارچ‌ها، پروتوزوئرها و ویروس‌ها مورد مطالعه قرار گرفتند. یکی از بزرگ‌ترین موفقیت‌ها در این زمینه استفاده از *Bacillus thuringiensis* بود(۱۲)، گرچه کشف *Bacillus thuringiensis* در اوایل قرن بیستم صورت گرفته است، ولی استفاده از آن به عنوان حشره کش به کندی پیشرفت نمود. *Bacillus thuringiensis* باکتری میله‌ای شکل، هوازی و تشکیل دهنده اسپور که اولین بار توسط ایشیواتا در سال ۱۹۰۲ از لارو کرم ابریشم جدا گردید. خاصیت وجه تمایز این باسیل با باسیل *Bacillus cereus* در پاتوژن بودن آن برای لارو لپیدوپترا (*Lepidoptera*) بوده که از وجود پروتئین‌های کریستالی شکل ناشی در موقع لیز شدن باکتری، کریستال و اسپور آن در محیط آزاد می‌شوند(۱۴). بررسی‌های میکروسکوپ الکترونی و اشعه ایکس شبه کریستال پروتئینی به شکل الماس با ابعاد ۵/۸×۵ تا ۱۵/۵×۹ نانومتر را نشان داده است.کریستال‌های پروتئینی که به عنوان دلتا اندوتوکسین شناخته می شوند، بر روی لاروهای گونه‌های لپیدوپترا *(Lepidoptera)*، کلئوپترا *(Coleoptera)* و دیپترا *(Diptera)*تولید مسمومیت می‌کنند(۸). آنزیم‌های روده ی این لاروها، اندوتوکسین را فعال نموده و جزو آفات مهم به شمار می‌روند (۱). در تحقیق حاضر *Bacillus thuringiensis* با روش انتخابی از خاک جدا و اثر توکسین آن روی لارو حشرات خانگی مورد بررسی قرار گرفته شده است. این بررسی با هدف مطالعه روشی جدید برای مبارزه با آفاتی که جوامع انسانی را به طور مستقیم و غیر مستقیم تحت تاثیر قرار می‌دهند، انجام شده است.

مواد و روش‌ها

جدا سازی *Bacillus thuringiensis* براساس روش تراورز و همکاران انجام گرفت (۴) نمونه‌های آب و خاک از مناطق باتلاقی درلوله‌های شیشه ای جمع آوری و ۰/۵ گرم نمونه به ۱۰ میلی لیتر آبگوشت و برای جلوگیری از رشد اسپورهای *Bacillus thuringiensis* استات سدیم با غلظت ۰/۲۵ مولار اضافه گردید وبه مدت ۴ ساعت در ۱۸۰ *rpm* رشد و سپس از هر لوله ۵ میلی لیتر نمونه به مدت ۳ دقیقه در معرض حرارت ۸۰ درجه سانتی گراد قرارداده شدند. ۰/۱ میلی لیتر از نمونه‌های حرارت دیده به محیط‌های کشت Luria Agar انتقال و برای یک شب در دمای۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شدند. کلونی‌ها به صورت تصادفی از محیط‌های کشت انتخاب و در معرض تست‌های شناسایی از جمله رنگ آمیزی گرم، متابولیسم کربوهیدرات مانند گلوکز، گزیلوز، لاکتوز، گالاکتوز و مالتوز، احیاء نیترات و در نهایت رنگ آمیزی کریستال پروتئین قرار گرفتند. داخل هر لوله، یک لوله کوچک به طور برعکس قرار داده شد که در صورت تولید گاز توسط میکروارگانیسم، این گازها داخل لوله جمع شده و قابل مشاهده باشند. در تست احیاء نیترات، کلونی‌ها در آبگوشت حاوی نیترات کشت داده شدند. در این تست نیز از لوله‌های دورهام استفاده و نتایج بعد از ۲۴ ساعت به دست آمد.رنگ آمیزی کریستال پروتئین توسط رنگ آبی کوماسی (Commasie brilliant blue) انجام شد (۵).

برای تست‌های حساسیت آنتی بیوتیکی از دیسک‌های آنتی بیوگرام استفاده گردید. محیط‌های حاوی کشت باکتری‌ها، قبل از کشت با یک استاندارد از محلول سولفات باریم ($۹۹/۵mlH_2So_4W/V+۰/۵mlBaCl_{2,2}$ H_2O٪۱/۱۷۵W/V) از نظر کدورت مقایسه شدند تا همگی پلیت‌های آنتی بیوگرام با غلظت یکسان از میکروارگانیسم‌ها کشت داده شوند و نتایج از دقت بیشتری برخوردار شود. آزمایش‌های جداسازی پلاسمید از *Bacillus thuringiensis* با رشد باکتری درrpm ۱۵۰ به مدت ۶ ساعت دردمای ۳۷ درجه سانتی گراد آغاز و جدا سازی پلاسمیدها بر اساس لیز نمودن سلول‌ها توسط لیزوزیم و سدیم دو دسیل سولفات(SDS) و حذف DNA کروموزومی با قلیا و سپس رسوب دادن و خالص

Archive of SID

www.SID.ir

سازی پلاسمیدها با روش فنل کلروفرم و در نهایت ته نشین کردن با ایزوپروپانول صورت گرفت (به عنوان نشان‌گر (کنترل) از پلاسمیدهای ۵۱۷ v *E.coli* استفاده شد) (۱۳). پلاسمیدهای *Bacillus thuringiensis* به همراه پلاسمیدهای ۵۱۷ v *E.coli* روی ژل آگارز قرار داده والکتروفورز درولتاژ۶۰ ولت و جریان ۴۸-۲۴ میلی آمپر برای ۷۵ دقیقه انجام شد. رنگ‌آمیزی ژل نیز با اتیدیوم بروماید انجام گردید. در مرحله نهایی با روش رسم منحنی استاندارد، وزن مولکولی پلاسمیدها برای هرنمونه مشخص شد. برای استخراج آندوتوکسین، ایزولات‌های *Bacillus thuringiensis* را در محیط آگار در دمای ۳۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت رشد و از هر ایزولات به اندازه یک لوپ باکتری به ارلن ۵۰۰ سی سی که حاوی ۱۰۰ میلی لیترآبگوشت تریپتون فسفات بود انتقال گردید. ارلن‌های حاوی باکتری در بن ماری ۳۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند (محیط کشت اول). ۲ میلی لیتر از محیط کشت اول به ارلن‌های دیگر که حاوی ۱۰۰ میلی لیتر آبگوشت تریپتوز فسفات بودند منتقل شده و ۱۸ تا ۲۰ ساعت رشد کردند (محیط کشت دوم) (۱۵). به منظور تخمیر از یک محیط کشت ویژه که در هر لیتر شامل ۱۰ گرم تریپتون، ۵ گرم دکستروز، ۲ گرم خمیرمایه، ۱گرم k_3PO_4 و ۱ گرم k_2HPO_4 بود، استفاده شد. ۱۲۵میلی لیتر از محیط کشت ویژه به ارلن‌های با حجم ۵۰۰میلی لیتر منتقل شد و از محیط کشت دوم تا رسیدن به غلظت کل ۲٪ به این ارلن‌ها اضافه گردید. pH محیط کشت را به کمک HCl ۱ نرمال به ۷ رسانده و با استفاده از سانتریفوژ، باکتری‌های موجود در محیط‌های کشت تخمیر، رسوب داده شدند. رسوب حاصله با یک محلول ۴٪ لاکتوز (به حجم ۱/۱۰ مقدار محیط کشت سانتریفوژ شده) به حالت سوسپانسیون در آمد و با استون (به اندازه ۴ برابر حجم سوسپانسیون) ۳ مرتبه استخراج شد(به کمک ارلن خلاء). رسوب ته نشین شده روی کاغذ صافی ۲۴ ساعت در دمای اتاق باقی ماند و طی این مدت استون استفاده شده کاملاً تبخیر گردید. رسوب حاصل به صورت پودر حاوی اسپور و کریستال می‌باشد (اندوتوکسین شامل کل کریستال و قسمتی از ساختمان اسپور است). توکسین بدست آمده با رقت‌های مختلف در محیط تغذیه‌ای لاروها قرار گرفت و ۲۵ روز بعد شمارش شفیره‌ها و حشرات انجام شد(۳).

نتایج

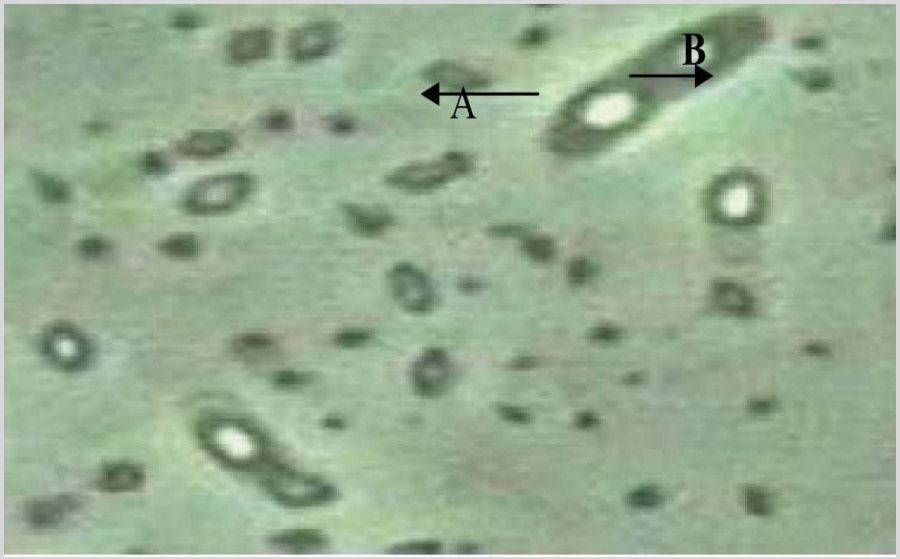
بر اساس نتایج تست‌های انجام شده ۲۰ ایزولات از کلونی‌های *Bacillus thuringiensis* در نمونه‌های خاک شناسایی شدند(شکل ۱). این باکتری در نمونه‌های جمع آوری شده آب، یافت نشد.

نمونه جدا شده از۲۰ نمونه جدا شده خصوصیات متفاوتی در این تست‌ها از خود نشان دادند. جدول ۱ نتایج تست‌های شناسایی را نشان می دهد. جدا سازی پلاسمیدها، یکی دیگر از روش‌هایی بود که به کمک آن وجود ایزولات‌های مختلف مورد تایید قرار گرفته و تعداد ۶ پلاسمید پیدا شد (شکل۲). در ضمن رابطه‌ای بین الگوی پلاسمیدها در هر ایزولات با اندوتوکسین تولیدی، یافت نشد.

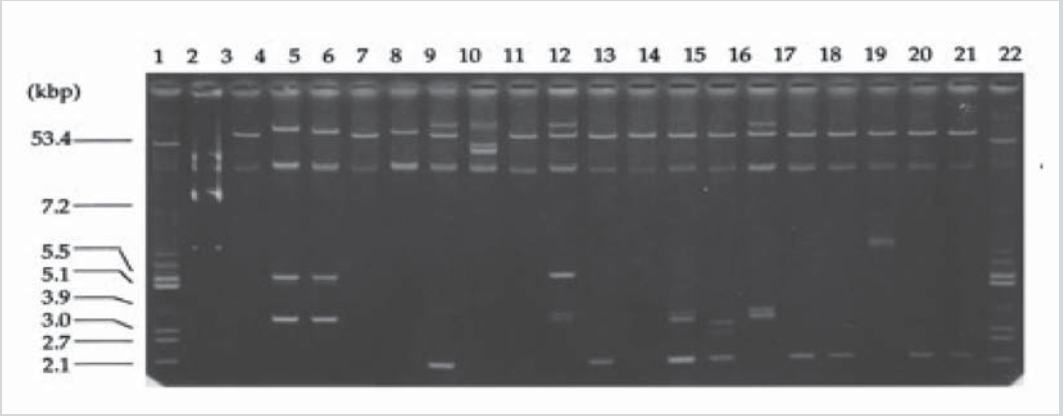
براساس نتایج تست‌های آنتی بیوگرام مشاهده شد که تقریبا تمام ایزولات‌ها به Lincomycin مقاوم هستند(جدول۳).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱ -ساختار میکروسکوپی *Bacillus thuringiensis*
A : اسپور B : کریستال پروتئین۱۶



شکل ۲- ژل الکتروفورز پلاسمیدهادر ردیف‌های ۱ و ۲۲ پلاسمیدهای E.Coli v۵۱۷ به عنوان نشانگر استفاده شده است

www.SID.ir

جدول ۱- نتایج تست‌های شناسایی برای ایزولات‌های *Bacillus thuringiensis*

تست نمونه	G Rxn	Crys Sta.	Acid Glu.	Gas Glu.	No۳ Red.	Xyl. Uti.	Lac. Uti.	Gas Lac.	Gal. Uti.	Suc. Uti.	Mal Uti.	Dex uti.
D۱٤	++	+	–	–	+	–	+	–	+	–	+	+
D۱٦	+	+	+	–	+	–	+	–	+	+	+	+
D۲٤	+	+	–	–	+	–	+	–	+	+	+	+
D۲۸	+ +	+ +	+	+	+	–	–	–	+	+	–	+
D۳٤	+	+	+	–	+	–	+	–	+	–	–	+
D۳٥	+	+	+	–	+	–	–	–	+	+	+	+
D٤٤	+	+	+	–	+	–	+	–	+	+	–	+
D٤٥	+	+	+	–	+	–	+	–	+	–	–	+
D۷٤	+	+	+	–	+	–	+	–	+	+	–	+
D۸۱	+	+	+	–	+	–	–	–	+	–	–	–
D۹٤	+	+	–	+	–	+	–	+	+	–	–	+
D۱۰۱	+	+	–	+	–	–	–	+	–	–	–	–
D۱۱۱	+	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–
D٤۱۲	+	+	–	+	–	+	–	+	–	–	+	+
D٤۲٤	+	+	+	–	+	–	–	–	+	+	+	+
D٤۳۲	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	+	+
D٥۱۹	+	+	–	–	+	–	–	–	–	+	+	+
k۱۳۱	+	+	+	+	+	–	+	–	+	+	+	+
k۱۳٤	+	+	+	+	+	–	–	–	+	+	+	+
k۲۲٦	+	+	+	–	+	–	–	–	+	+	+	+

ساکارز = Suc، گالاکتوز = Gal، مالتوز = Mal، لاکتوز = Lac، دکسترز = Dex، استفاده از گزیلوز = Xyl Uti، احیاء نیترات = No۳ Red. تولید گاز از گلوکز = Gas Glu، تولید اسید از گلوکز = Acid Glu. رنگ آمیزی کریستال = Crys Sta. رنگ آمیزی گرم = G Rxn

www.SID.ir

جدول ۲ - تعداد و وزن مولکولی پلاسمیدها در نمونه‌های جدا شده *Bacillus thuringiensis*

نمونه‌های جدا شده	پلاسمیدها	وزن مولکولی پلاسمیدها
D۱۴	۴	۶,۰ , ۹,۸ , ۳۲,۲ , ۳۵,۸
D۱۶	۲	۳۲,۲ , ۶۱,۱
D۲۴	۴	۳,۲ , ۵,۳ , ۳۶,۲ , ۶۶,۱
D۲۸	۴	۳,۲ , ۵,۳ , ۳۴,۲ , ۶۴,۵
D۳۴	۲	۳۴,۲ , ۶۱,۲
D۳۵	۲	۳۴,۲ , ۶۶,۳
D۴۴	۴	۱,۸ , ۳۴,۲ , ۶۱,۱ , ۷۴,۶
D۴۵	۴	۳۴,۲ , ۴۳,۶ , ۴۵,۹ , ۷۴,۶
D۷۴	۲	۳۴,۲ , ۶۱,۱
D۸۱	۶	۳,۱ , ۳,۶ , ۵,۳ , ۳۵,۸ , ۶۱,۱ , ۷۴,۶
D۹۴	۳	۲,۳ , ۳۴,۲ , ۶۱,۱
D۱۰۱	۲	۳۴,۲ , ۶۱,۱
D۱۱۱	۵	۲,۳ , ۳,۲ , ۳,۴ , ۳۴,۲ , ۶۱,۱
D۴۱۲	۵	۲,۳ , ۲,۹ , ۳,۳ , ۳۴,۲ , ۶۱,۱
D۴۲۴	۵	۳,۵ , ۳,۸ , ۳۴,۲ , ۶۱,۱ , ۷۴,۶
D۴۳۲	۳	۲,۳ , ۳۴,۲ , ۶۱,۱
D۵۱۹	۳	۲,۳ , ۳۴,۲ , ۶۱,۱
k۱۳۱	۳	۶,۱ , ۳۴,۲ , ۶۱,۱
k۱۳۴	۲	۲,۳ , ۳۴,۲
k۲۲۶	۳	۲,۳ ,۳۴ ,۲ , ۶۱, ۱

www.SID.ir

جدول ۳- نتایج تست‌های آنتی بیوگرام در ۲۰ ایزولات Bacillus thuringiensis
قطر حلقه‌ها بر حسب میلی متر می‌باشد

AB Iso.	MY	S	P	NA	AMP	S۳	TE	C	MET	NV	CN
D۱٤	R	۲۱	۲۴	۱۸	۲۴	۳۵	۲۹	۱۹	۱۷	۲۳	۲۴
D۱٦	R	۱۹	۲۲	۱۶	۱۸	۲۳	۲۲	۱۵	۲۰	۲۰	۲۳
D۲٤	R	۲۱	۲۸	۱۹	۲۲	۳۳	۲۸	۱۸	۲۳	۲۹	۲۶
D۲۸	R	۱۸	۲۴	۱۸	۲۱	۳۴	۲۸	۱۹	۲۴	۲۴	۲۴
D۳٤	۱۲	۲۰	۲۹	۱۶	۲۵	۳۱	۲۰	۱۹	۲۸	۲۱	۲۲
D۳۵	R	۲۰	۲۳	۱۷	۲۰	۱۸	۱۸	۱۷	۲۳	۲۴	۲۲
D٤٤	R	۲۰	۲۵	۱۹	۲۴	۳۴	۲۹	۱۹	۲۳	۲۳	۲۵
D٤۵	۱۲	۲۰	۲۹	۱۶	۲۵	۳۱	۲۰	۱۹	۲۸	۲۱	۲۲
D۷٤	R	۲۰	۲۵	۱۹	۲۴	۳۴	۲۹	۱۹	۲۳	۲۳	۲۵
D۸۱	۱۱	۲۰	۲۰	۱۴	۲۵	R	۲۲	۱۶	۹	۲۵	۲۱
D۹٤	R	۲۰	۲۵	۱۴	۲۱	۲۸	۲۰	۱۵	۲۳	۲۱	۲۵
D۱۰۱	R	۲۹	۲۰	۲۱	۲۱	۳۵	R	۲۷	۴۷	۲۲	۲۱
D۱۱۱	R	۲۵	۶۰	۲۶	۴۶	R	۲۵	۲۶	۴۳	۲۴	۲۸
D٤۱۲	R	۱۵	۲۶	۱۵	۲۴	۲۷	۲۲	۱۵	۲۳	۲۰	۲۳
D٤۲٤	R	۲۰	۲۳	۱۷	۲۰	۱۸	۱۸	۱۷	۲۳	۲۴	۲۲
D٤۳۲	R	۲۰	۲۱	۱۸	۲۰	۲۰	۱۹	۱۸	۱۹	۱۸	۲۰
D۵۱۹	R	۱۷	۲۵	۱۷	۲۸	۳۰	۲۴	۱۸	۲۲	۲۲	۲۲۱
k۱۳۱	R	۱۶	۱۸	۱۷	۲۰	۳۱	۲۲	۱۲	۲۲	۲۱	۲۱
k۱۳٤	R	۲۳	۲۵	۲۱	۲۶	۳۲	۲۱	۲۰	۳۳	۱۹	۲۱
k۲۲٦	R	۲۱	۲۴	۲۱	۳۲	۱۹	۲۰	۱۸	۳۵	۱۹	۲۰

www.SID.ir

بحث

Bacillus thuringiensis فقط در خاک یافت می‌شود و با استفاده از روش ویژه برای جدا سازی، کلونی‌های *Bacillus thuringiensis* با تراکم حتی کمتر از ۱۰۰ اسپور در یک گرم از خاک جدا می‌شوند. در این روش میکروارگانیزم‌های ناخواسته که وارد فاز رویشی شدند، توسط حرارت حذف گردیدند. این روش متمایز از روش‌های عادی است که در آن‌ها ازآنتی بیوتیک به عنوان عامل انتخاب کننده استفاده می شود. چون درصورت استفاده ازآنتی بیوتیک، باکتری‌های مورد نظرنیز ممکن است از بین بروند. در واقع ناتوانی گونه‌های *Bacillus thuringiensis* برای رشد در محیط حاوی استات سدیم، جداسازی این باکتری را توسط روش فوق ممکن می سازد.تست‌های شناسایی براساس فعالیت‌های آنزیماتیکی *Bacillus thuringiensis* صورت گرفت. یکی از اشکالات چنین روش‌هایی این است که اگر کریستال‌های موجود دراین باکتری در نظر گرفته نشود، یک گونه نزدیک، یعنی *Bacillus Cereus* ممکن است با *Bacillus thuringiensis* اشتباه گرفته شود. Lincomycin یک آنتی بیوتیک دارای حلقه β.-lactam است. *Bacillus thuringiensis* که یک باکتری گرم مثبت است احتمالاً مقدار زیادی آنزیم β-lactamase تولید می‌کند که حلقه β-lactam را تجزیه می‌کند. وجود PBP's۱ در *Bacillus thuringiensis* حساس بودن تمامی گونه‌ها را به پنی سیلین توجیه می کند (۷).

تحقیقات آینده

از آنجایی که نقش باسیل‌های تشکیل دهنده کریستال در مبارزه با آفات، با نقش پنی سیلین در درمان بیماری‌ها مقایسه می‌شود، می‌توان امیدوار بود که در آینده تحقیقات بیشتری روی این باکتری‌ها انجام شود به عنوان مثال ثابت شده که وجود پروتئینی خاص به نام Cold shock protein D- CSPD در *Bacillus thuringiensis* باعث مقاومت گیاه تنباکو به پاتوژن‌های ویروسی و قارچی می‌شود(۱۱). هم چنین اندوتوکسین جدیدی به نام (Cry۴۷Aa) از *Bacillus thuringiensis* جدا شده که روی لارو *Lucilia caprina* که انگل گوسفند استرالیایی است مؤثر بوده است (۱۰). از طرفی در بعضی از گونه‌های انگلی که برای مقابله با آن‌ها از سموم میکروبی استفاده شده، مقاومت دیده شده است. مثلاً (Trichoplasia-ni) آفتی که مربوط به کلم می باشد و یک لارو لپیدوپترای گیاهی است در برابر *Bacillus thuringiensis var. Kurstaki* کاملاً مقاوم شده است. اما همین نمونه‌های مقاوم در گیاهان دیگری مثل خیار، گوجه فرنگی و فلفل هنوز نمی‌توانند ازخود مقاومت نشان دهند (۹). بنابراین می توان امید داشت با کشف گونه‌های جدید از *Bacillus thuringiensis* و شناسایی دقیق سموم آن‌ها، طیف وسیعی از سموم میکروبی، با تمام خصوصیات دلخواه کشف شود.

منابع

1. Alejandra, B., Sarjeets, G., Soberon, M. (2007). Mode of action of B.T cry and cyt toxins and their potential for insect control.Toxican, 49(4), 423-435.

2. Alisa,W. (2005). Coffin. Journal of Transport Geography, 15, 396-406.

3. Avisar, D., Segal, M., Sneh, B., Zilberstein A. (2005). Journal of Cell Science, 118,3163-3171.

4. Broderick, N.A., Raffa, K.F., Handelsman, J., (2006). Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 103,15196-199.

5.Capello, M., Bungire, R. D., Harrison, L. (2006). A purified B.T. crystal protein with therapeutic activity against the hook worm parasite *Ancylostoma ceylanicump*.Proceeding of the National Academy of sciences. 103 (41):15154-

Archive of SID

www.SID.ir

15159.

6. Darriet, F., Duchon, S., Hougard, J. M. (2005). Journal of the American Mosquito Control Association, 21 (4), 495-496.

7. Fenselau, C., Havey, C., Teerakulkittipong, N., Swatkoski, S., Laine, O., Edwards, N. (2008). Identification of B-lactamase in antibiotic-resistant *Bacillus thuringiensis* spores. Applied and Environmental Microbiology, 74(3), 904-906.

8. Gore, J.J., Adamczy, K.J.r., Blanco, C.A. (2005). Selective feeding of *Tobacco budworm* and *bollworm*" (Lepidoptera: Noctuidae) on meridic diet with different concentration of *Bacillusthuringiensis*proteins".JourofEconomic Entomology, 98(1), 88-94.

9. Janmaat, A. F., Myers, J.H. (2005). The cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* varries with the host plant. Nat. Biotechnol, 23, 791.

10. Kongsuwan, K., Cough, J., Kemp, D., Devitt, A., Akhurst, R. (2005). Characterization of a new *Bacillus thuringiensis* endotoxin , Cry47Aa ,for the Australian sheep blowfly, Lucilia Curprina. Microbiol, 41, 361-366.

11. Kromina, K.A., Dzhavakhiia, V.G. (2006). Experssion of bacterial gene CspD in *Tobacco* plants increases the viral pathogens Mol. Gen. Microbiol.Virus, l ,31-34.

12. Magda, A., Bendary, E.L. (2006). *Bacillus thuringiensis* and *B.Sphaericus* biopesticides production. Journal of Basic Microbiology, 46,158-170.

13. Ramirez, A.R., Ibarra, J.E. (2008). Applied and Environmental Microiology, 74(1), 125-129.

14. Romeis, J., Meissle, M., Bigler, F. (2006). Journal of Nature Biotechnology, 24,63-71.

15. Yerva, K. R., Kuen-juh, T.,Wen shi, W.,Yew M.T. (2007). Journal of Process Biochem 535-

Archive of SID

www.SID.ir