محیط زیست طبیعی، منابع طبیعی ایران، دورهٔ ۶۷، شمارهٔ ۳، پاییز ۱۳۹۳
صفحات ۳۲۱-۳۱۳

تنوع باکتری *Bacillus thuringiensis* در اکوسیستم‌های مختلف استان مازندران

فاطمه گرایلی مرادی[۱]، محمود محمدی شریف[۲*]، علیرضا هادی‌زاده[۳] و ولی‌الله بابایی‌زاد[۴]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد رشتهٔ حشره‌شناسی کشاورزی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری و ۲،۳،۴. استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۲/۲۱- تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۲/۱۶)

چکیده

باکتری *Bacillus thuringiensis* مهم‌ترین عامل کنترل میکروبی حشرات آفت محصولات کشاورزی و درختان جنگلی است. کنترل مؤثر بسیاری از این آفات مبتنی بر یافتن و کاربردی کردن سویه‌های بومی هر کشور یا منطقه است. در این پژوهش ۱۶۰ نمونه از خاک‌های جمع‌آوری‌شده از مناطق مختلف اکولوژیکی استان مازندران شامل خاک‌های مناطق جنگلی، باغی، شهری، زراعی و بدون پوشش با استفاده از شیوهٔ انتخابی استات سدیم غربال شد و ۶۳۵ جدایه به دست آمد. کشت نمونه‌های خاک بر روی محیط‌های LBA، T_3 و CCY انجام شد و گزینش اولیهٔ کلنی‌ها براساس شکل ظاهری کلنی Bt روی محیط کشت و گزینش نهایی براساس شناسایی میکروسکوپی صورت گرفت. در بررسی میکروسکوپی از ۶۳۵ سویهٔ جداسازی شده، ۳۷۵ باکتری، تولیدکنندهٔ اسپور (۵۹/۰۵درصد)، ۱۰۰ باکتری، دارای کلاهک و تولیدکنندهٔ اسپور (۱۵/۷۴درصد) و ۱۶۰ باکتری، دارای کلاهک و تولیدکنندهٔ اسپور و کریستال (۲۵/۱۹درصد) بودند. بیشترین درصد سویه‌های تولیدکنندهٔ کریستال در شهرستان‌های ساری و جویبار به‌ترتیب با ۴۰/۹درصد و ۴۰/۵۴درصد و در اکوسیستم جنگل با ۳۲/۶۳درصد مشاهده شد. نتایج نشان داد که خاک‌های نواحی جنگلی منبعی مناسب برای یافتن سویه‌های مؤثر باکتری Bt است.

کلیدواژگان: باکتری *Bacillus thuringiensis*، پروتئین کریستالی، جداسازی اختصاصی Bt، کنترل میکروبی.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۱۹۵۸۴۶۱۱- نمابر: ۰۱۵۱۳۸۲۲۵۶۷
Email: msharif1353@yahoo.com

۱. مقدمه

نیاز حیاتی برای ترکیبات امن و مؤثر که جایگزین حشره‌کش‌های شیمیایی شوند، علاقه به کاربرد عوامل کنترل زیستی را افزایش داده است. امروزه هم حشره‌کش‌های شیمیایی و هم حشره‌کش‌های زیستی استفاده می‌شوند، اما کاربرد حشره‌کش‌های زیستی مطلوب است، چراکه این ترکیبات قادرند آفات مهم کشاورزی و خانگی و همچنین ناقلان بیماری‌های انسان و حیوانات را بدون اینکه موادی سمّی یا غیرقابل تجزیه وارد اکوسیستم شود از بین ببرند (Khetan, 2001). عوامل میکروبی عموماً علیه آفات هدف بسیار اختصاصی عمل می‌کنند، بنابراین اثرات زیست‌محیطی کمتری دارند و موجب زنده‌ماندن حشرات مفید در اکوسیستم‌های مختلف می‌شوند (Tamez-Guerra *et al*., 2004).

در مورد کاربرد آفت‌کش‌های میکروبی بیشترین موفقیت در استفاده از باکتری *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1915 (Bt) به دست آمده است (Obeidat *et al*., 2004). باکتری *B. thuringiensis* نوعی باکتری گرم مثبت و اسپورشکل است که در سطح وسیع به‌منزلهٔ یک حشره‌کش زیستی‌ـ میکروبی استفاده می‌شود (Apaydin *et al*., 2008). این باکتری از خاک، حشرات، زیستگاه‌های حشرات، محصولات ذخیره‌شده و برگ برخی از گیاهان جداسازی شده است (Young *et al*., 1998). امروزه در سراسر جهان، سویه‌های بومی Bt از زیستگاه‌های مختلف جداسازی و جمع‌آوری می‌شوند (Tamez-Guerra *et al*., 2004; Apaydin *et al*., 2008).

شناسایی سویه‌های دارای پتانسیل کاربردی در کنترل بیولوژیک، نتیجهٔ برنامه‌های غربالگری بی‌شماری در سراسر دنیاست. بیشتر این برنامه‌ها دو موضوع اصلی دارند: ۱. انتخاب سویه‌های Bt جدید کاراتر از سویه‌های قبلی و ۲. جداسازی سویه‌های Bt جدید که میزبان‌های جدید و بیشتری داشته باشند (Martinez *et al*., 2004).

شیوه‌های سنتی بررسی کارایی سویه‌های مختلف این باکتری مبتنی بر انجام آزمایش‌های زیست‌سنجی است. انجام این آزمایش‌ها مستلزم پرورش حشرات و اجرای زیست‌سنجی‌های وقت‌گیر است. به‌دلیل سروکار داشتن با عوامل کنترل‌کنندهٔ زیستی گاهی این آزمایش‌ها از دقت کافی برخوردار نیست و نتایج قابل استنادی در اختیار نمی‌گذارد. در شیوه‌های جدید مولکولی برای ردیابی سویه‌های مؤثر، دقت کار افزایش و زمان انجام آزمایش‌ها نیز کاهش یافته است (Juarez-Perez, 2003 و Porcar). این شیوه‌ها نیازمند جداسازی و بررسی تنوع آن در اکوسیستم‌های مختلف است. از این‌رو آگاهی از پراکنش و تنوع زیستی آن‌ها در مکان‌های مختلف نمونه‌برداری در اکوسیستم‌های مختلف و یافتن سویه‌های جدید با سمّیت بالا روی گونه‌های مختلف حشرات آفت هدف اهمیت زیادی دارد.

هدف از این پژوهش بررسی تنوع باکتری Bt و همچنین جداسازی و غربالگری سویه‌های بومی این باکتری از خاک‌های اکوسیستم‌های مختلف شهرستان‌های استان مازندران است. ردیابی این باکتری در منابع خاکی مختلف، آگاهی از فراوانی آن در خاک‌های متعلق به اکوسیستم‌های مختلف و شناسایی خصوصیات مرتبط با کاربرد عملی آن همچون تولید کریستال حشره‌کش، اطلاعات مفیدی در اختیار متخصصان کنترل بیولوژیک حشرات قرار می‌دهد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. نمونه‌برداری

برای نمونه‌برداری خاک‌هایی از عمق ۲ـ ۵ سانتی‌متری جمع‌آوری شد. این نمونه‌ها داخل کیسه‌های پلاستیکی نگهداری و به آزمایشگاه منتقل شدند. در این پژوهش ۱۶۰ نمونهٔ خاکی از اکوسیستم‌های مختلف شامل خاک جنگل، باغ، شهری، زراعی و بدون پوشش (دو نمونه از هر نوع پوشش گیاهی) از ۱۶ شهرستان استان مازندران جمع‌آوری شد.

۲.۲. جداسازی اختصاصی باکتری

برای جداسازی باکتری Bt از روش انتخابی سدیم استات استفاده شد. بدین طریق که یک گرم از نمونه

به‌مدت ۳ ساعت در ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد در ۲۰ ml محیط کشت مایع LB (تریپتون (۱۰ گرم)، عصارهٔ مخمر (۵ گرم)، NaCl (۵ گرم)، استات سدیم (۳۴ گرم) (pH: ۶/۸) / لیتر) محتوی استات سدیم ۰/۲۵M کشت داده شد. استات سدیم به‌طور اختصاصی مانع جوانه‌زنی اسپورهای Bt می‌شود. سپس ۱ ml از هر نمونهٔ کشت داده‌شده تحت شوک حرارتی ۶۰ تا ۷۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفت. بدین ترتیب اسپورهای جوانه‌زدهٔ سایر باکتری‌ها از بین می‌رود و تنها اسپورهای مقاوم و جوانه‌نزدهٔ Bt باقی می‌ماند. سپس نمونه‌ها روی محیط‌های کشت معمول یا اختصاصی Bt (LBA, T_3 وCCY) کشت داده شدند. پس از گذشت ۳ـ ۵ روز از کشت، کلنی‌های باکتری براساس شکل ظاهری کلنی (سفید مات) گزینش اولیه شده و داخل آب نمک ۰/۹درصد در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند (Travers *et al*., 1987).

۳.۲. کشت باکتری و شناسایی میکروسکوپی

نمونه‌های نگهداری‌شده در آب نمک با استفاده از یک لوپ برداشته و روی محیط کشت جامد LBA کشت شدند. پس از گذشت ۳ـ ۵ روز از کشت، نمونه‌ها با استفاده از شیوهٔ رنگ‌آمیزی کوماسی بلو (کوماسی بلو ۱۵ میلی‌گرم، اسید استیک ۵ میلی‌لیتر و آب مقطر استریل ۵ میلی‌لیتر) براساس شاخص‌های میکروسکوپی باکتری Bt (اسپور، کلاهک و کریستال) تأیید نهایی شدند. شناسایی میکروسکوپی سویه‌های Bt عموماً از طریق فاز کنتراست (Contrast phase) میکروسکوپ برای وجود کریستال‌ها (در فاز تیره) و اسپورها (در فاز روشن) انجام می‌شود (Kaur, 2006).

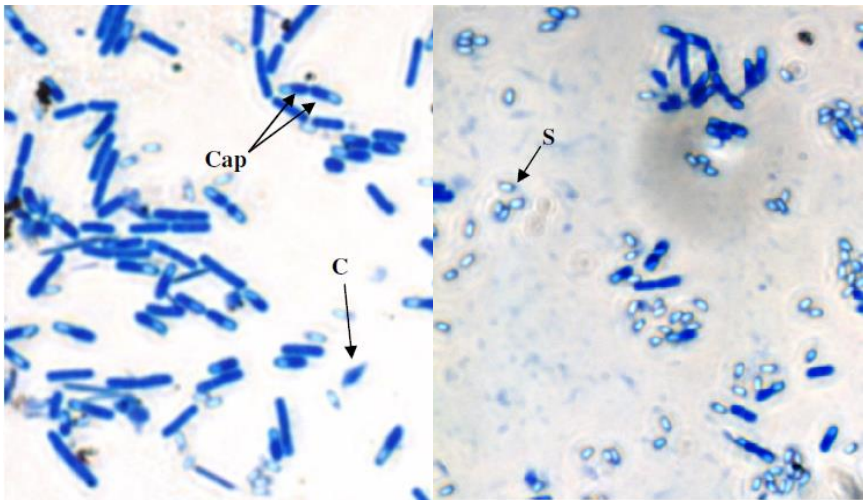
۳. نتایج

۱.۳. جداسازی سویه‌های بومی باکتری *B. thuringiensis*

در این پژوهش از ۱۶۰ نمونهٔ خاکی متعلق به ۱۶ شهرستان استان مازندران، با استفاده از شیوهٔ گزینش توسط استات سدیم، ۶۳۵ سویه باکتری براساس شکل ظاهری کلنی Bt (سفید مات) گزینش اولیه و در آب نمک ۰/۹درصد نگهداری شدند.

۲.۳. شناسایی سویه‌ها براساس شاخص‌های مورفولوژیک

گزینش نهایی سویه‌های جداسازی شده براساس شاخص‌های نمونه‌های میکروسکوپی انجام شد. یکی از مشخصات بارز این باکتری تولید اسپور داخلی و همچنین تولید کریستال طی فاز اسپورزایی است. طی فرایند اسپورزایی به‌تدریج محتویات سلول اصلی تحلیل می‌رود و به دو انتهای سلول منتقل می‌شود. هنگام رنگ‌آمیزی این قسمت به‌صورت کلاهک (Cap) دیده می‌شود. در اسلاید تهیه‌شده از جدایه‌های باکتری مربوط به خاک‌های نواحی مختلف این اشکال به‌خوبی قابل مشاهده است (شکل ۱).



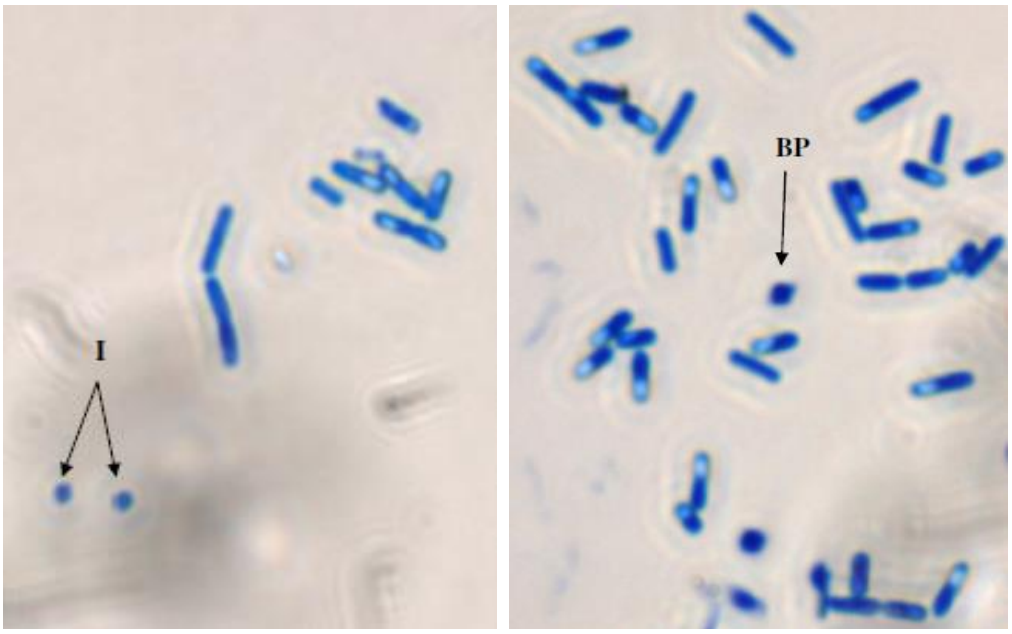
شکل۱. کریستال (C)، اسپور (S) و کلاهک (Cap) باکتری *Bacillus thuringiensis* (بزرگنمایی ×۱۰۰)

بر این اساس، در این مرحله ۳۷۵ باکتری تولیدکنندهٔ اسپور، ۱۰۰ باکتری تولیدکنندهٔ اسپور و کلاهک و ۱۶۰ باکتری تولیدکنندهٔ اسپور، کلاهک و کریستال (اصطلاحاً باکتری‌های تولیدکنندهٔ کریستال) شناسایی میکروسکوپی شدند که به‌ترتیب ۵۹/۰۵، ۱۵/۷۴ و ۲۵/۱۹ درصد از کل سویه‌های جداسازی‌شده را تشکیل می‌دهند (جدول۱).

جدول۱. تفکیک و شناسایی سویه‌های جداسازی شده با کمک میکروسکوپ نوری

تعداد نمونه‌های خاکی	۱۶۰
تعداد کل سویه‌های جداسازی شده	۶۳۵
تعداد سویه‌های تولیدکنندهٔ اسپور	۳۷۵
درصد سویه‌های تولیدکنندهٔ اسپور	٪۵۹/۰۵
تعداد سویه‌های تولیدکنندهٔ اسپور و کلاهک	۱۰۰
درصد سویه‌های تولیدکنندهٔ اسپور و کلاهک	٪۱۵/۷۴
تعداد سویه‌های تولیدکنندهٔ اسپور، کلاهک و کریستال	۱۶۰
درصد سویه‌های تولیدکنندهٔ اسپور، کلاهک و کریستال	٪۲۵/۱۹

باکتری Bt محتوی یک یا تعداد بیشتری پروتئین‌های کریستالی است که در اشکال مختلف دیده می‌شوند. با بررسی میکروسکوپی سویه‌های تولیدکنندهٔ کریستال، انواع مختلفی از پروتئین‌های کریستالی در اشکال دو هرمی، مستطیلی و بی‌شکل مشاهده شد (شکل۲).



شکل۲. کریستال دو هرمی (BP) و کریستال بی‌شکل (I) در باکتری Bt (بزرگنمایی × ۱۰۰)

۳.۳. توزیع و تنوع Bt در شهرستان‌های مختلف استان مازندران

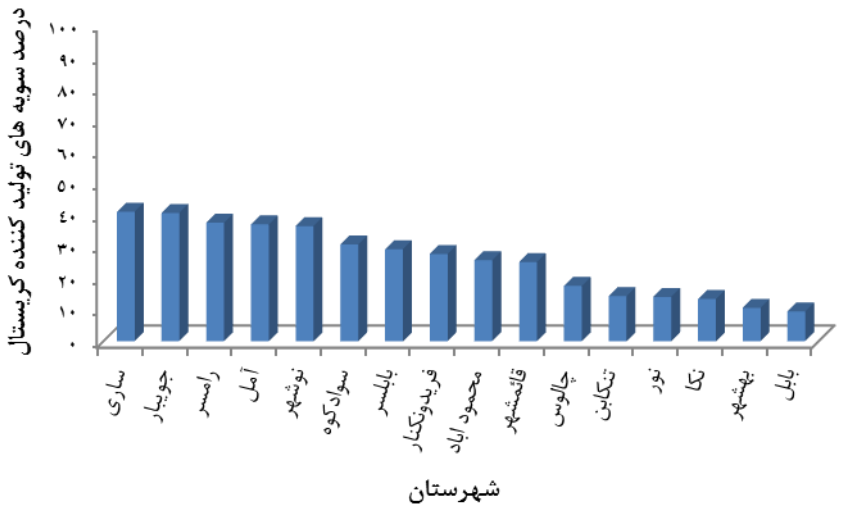
پس از شناسایی میکروسکوپی ۶۳۵ سویهٔ جداسازی شده، تعداد سویه‌های متعلق به هر شهرستان همراه با تفکیک سویه‌های تولیدکنندهٔ اسپور، کلاهک و کریستال مربوط به هر یک از آن‌ها تعیین شد (جدول۲).

بیشترین تعداد سویهٔ جداسازی شده در خاک‌های شهرستان بابلسر (۵۵ سویه)، بیشترین تعداد سویهٔ تولیدکنندهٔ اسپور در شهرستان نکا (۳۳ سویه)، بیشترین سویهٔ تولیدکنندهٔ اسپور و کلاهک در

شهرستان نور (۱۸ سویه) و بیشترین تعداد سویهٔ تولیدکنندهٔ اسپور، کلاهک و کریستال در خاک‌های شهرستان آمل (۱۷ سویه) مشاهده شد. سویه‌های Bt حاوی کریستال، شاخص اصلی برای آگاهی از توزیع و تنوع Bt در خاک‌های مناطق مختلف هستند. مبنا قراردادن تعداد سویهٔ حاوی کریستال بدون لحاظ تعداد کل سویه‌ها نمی‌تواند مبنای مناسبی برای مقایسه باشد. از این‌رو درصد سویه‌های تولیدکنندهٔ کریستال نسبت به کل سویه‌ها به‌منزلهٔ شاخص تنوع Bt استفاده شد (شکل۳).

جدول۲. توزیع سویه‌های تولیدکنندهٔ اسپور، کلاهک و کریستال در شهرستان‌های مختلف استان مازندران

ردیف	شهرستان	تعداد خاک	تعداد کل سویه	تعداد سویه‌های تولیدکنندهٔ اسپور	تعداد سویه‌های تولیدکنندهٔ اسپور و کلاهک	تعداد سویه‌های تولیدکنندهٔ کریستال	درصد سویه‌های تولیدکنندهٔ کریستال
۱	ساری	۱۰	۲۲	۱۳	–	۹	۴۰/۹
۲	جویبار	۱۰	۳۷	۲۰	۲	۱۵	۴۰/۵۴
۳	رامسر	۱۰	۴۰	۱۹	۶	۱۵	۳۷/۵
۴	آمل	۱۰	۴۶	۲۴	۵	۱۷	۳۶/۹۵
۵	نوشهر	۱۰	۴۴	۲۲	۶	۱۶	۳۶/۳۶
۶	سوادکوه	۱۰	۳۶	۲۴	۱	۱۱	۳۰/۵۵
۷	بابلسر	۱۰	۵۵	۲۹	۱۰	۱۶	۲۹/۰۹
۸	فریدونکنار	۱۰	۲۹	۱۵	۶	۸	۲۷/۵۸
۹	محمودآباد	۱۰	۴۳	۱۹	۱۳	۱۱	۲۵/۵۸
۱۰	قائم‌شهر	۱۰	۳۶	۲۶	۱	۹	۲۵
۱۱	چالوس	۱۰	۴۰	۲۳	۱۰	۷	۱۷/۵
۱۲	تنکابن	۱۰	۴۲	۲۷	۹	۶	۱۴/۲۸
۱۳	نور	۱۰	۵۰	۲۵	۱۸	۷	۱۴
۱۴	نکا	۱۰	۴۵	۳۳	۶	۶	۱۳/۳۳
۱۵	بهشهر	۱۰	۳۸	۲۹	۵	۴	۱۰/۵۲
۱۶	بابل	۱۰	۳۲	۲۷	۲	۳	۹/۳۷



شکل۳. تنوع Bt براساس درصد سویه‌های تولیدکنندهٔ کریستال در شهرستان‌های مختلف استان مازندران

براساس این نتایج، در خاک‌های جمع‌آوری شده از شهرستان‌های مختلف، شهرستان‌های ساری و جویبار به‌ترتیب با ۴۰/۹درصد و ۴۰/۵۴ درصد بیشترین میزان سویه‌های تولیدکنندهٔ کریستال و شهرستان بابل با ۹/۳۷درصد کمترین میزان سویه‌های تولیدکنندهٔ کریستال مشاهده شد.

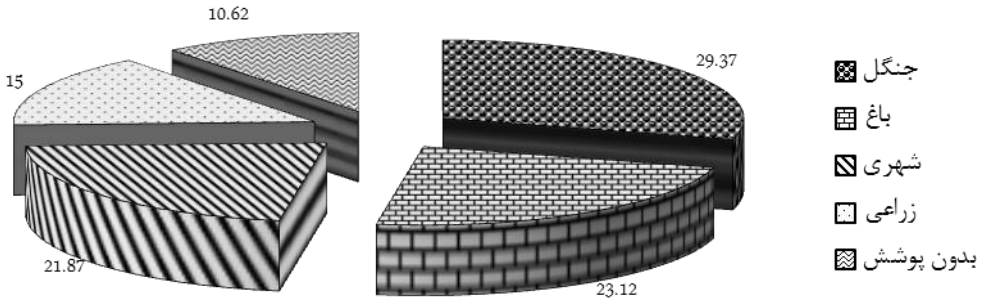
۴.۳. توزیع و تنوع Bt در اکوسیستم‌های مختلف استان مازندران

دسته‌بندی نتایج حاصل از بررسی‌های میکروسکوپی براساس خاک‌های متعلق به هر اکوسیستم در جدول۳ ارائه شده است. بر این اساس خاک‌های جنگلی با ۳۲/۶۳ درصد (۴۷ سویهٔ تولیدکنندهٔ کریستال) بیشترین و خاک‌های مناطق بدون پوشش با ۱۷/۷درصد (۱۷ سویهٔ تولیدکنندهٔ کریستال) کمترین میزان سویه‌های تولیدکنندهٔ کریستال را به خود اختصاص دادند.

در ادامه تعداد سویه‌های تولیدکنندهٔ کریستال هر یک از اکوسیستم‌ها نسبت به تعداد کل سویه‌های تولیدکنندهٔ کریستال (۱۶۰ سویه) محاسبه شد که به‌صورت نمودار دایره‌ای نشان داده شده است (شکل۴). بر این اساس خاک‌های مناطق جنگلی، باغی، شهری، زراعی و بدون‌پوشش به‌ترتیب ۲۹/۳۷، ۲۳/۱۲، ۲۱/۸۷، ۱۵ و ۱۰/۶۲ درصد از کل سویه‌های تولیدکنندهٔ کریستال را به خود اختصاص دادند.

جدول۳. توزیع سویه‌های تولیدکنندهٔ اسپور، کلاهک و کریستال در اکوسیستم‌های مختلف استان مازندران

اکوسیستم	تعداد کل سویه‌ها	تعداد سویه‌های تولیدکنندهٔ اسپور	تعداد سویه‌های تولیدکنندهٔ اسپور و کلاهک	تعداد سویه‌های تولیدکنندهٔ کریستال	درصد سویه‌های تولیدکنندهٔ کریستال
جنگل	۱۴۴	۸۲	۱۵	۴۷	۳۲/۶۳
باغ	۱۲۷	۷۰	۲۰	۳۷	۲۹/۱۳
شهری	۱۴۶	۸۳	۲۸	۳۵	۲۳/۹۷
زراعی	۱۲۲	۷۸	۲۰	۲۴	۱۹/۶۷
بدون‌پوشش	۹۶	۶۲	۱۷	۱۷	۱۷/۷



شکل۴. سهم هر یک از اکوسیستم‌ها از سویه‌های Bt تولیدکنندهٔ کریستال

۴. بحث و نتیجه‌گیری

یافتن سویه‌هایی با پتانسیل حشره‌کشی بالا برمبنای شیوه‌های مولکولی در درجهٔ اول نیازمند نمونه‌برداری، غربالگری و جداسازی از مکان‌های مختلف نمونه‌برداری است. Martin و Travers (1989) نمونه‌های خاکی قارهٔ آسیا را غنی از باکتری Bt گزارش کردند. امروزه این باکتری از نمونه‌ها و منابع مختلف از سراسر جهان یافت و گزارش شده است. این باکتری از سوسک‌های مرده توتون و بقایای توتون در کشورهای مختلف (Kaelin *et al*., 1994)، نمونه‌های خاکی در کره (Kim *et al*., 1998b)، محصولات انبارشده در کره (Kim *et al*., 1998a) و چین (Hongyu *et al*., 2000)، زیستگاه‌های آبی و خاکی در اسپانیا (Caballero, 2002 &

Martinez)، زیستگاه‌های حبوبات در ترکیه (Apaydin *et al*., 2005)، لجن فاضلاب در کانادا (Mohammedi *et al*., 2006) و باغ‌های زیتون در ترکیه (Cinar *et al*., 2008) جداسازی شده است.

براساس بیشتر پژوهش‌های انجام‌شده، یکی از مکان‌های مهم جداسازی این باکتری نمونه‌های خاکی است (Khetan, 2001). از این‌رو در این پژوهش نیز خاک‌های اکوسیستم‌های مختلف در هر شهرستان استان مازندران برای جداسازی باکتری Bt بررسی شد. در پژوهش حاضر نیز، تعداد قابل توجهی سویه از خاک‌های مختلف جداسازی شد که نشان‌دهندهٔ فراوانی قابل توجه آن در نمونه‌های خاکی است.

شرکت‌های تجاری بسیاری با هدف یافتن سویه‌هایی با دامنهٔ میزبانی متفاوت و یا سویه‌های دارای سمّیت بیشتر روی یک یا چند آفت در جداسازی سویه‌های جدید Bt سرمایه‌گذاری می‌کنند. این پژوهش‌ها، تمایل به Bt را هم به‌منزلهٔ یک راهکار ایمن محیطی در مقایسه با بسیاری از حشره‌کش‌های شیمیایی و هم به‌منزلهٔ راهکاری برای مدیریت مقاومت حشرات به حشره‌کش‌های شیمیایی افزایش داده است. به عنوان مثال هم‌اکنون بیش از ۵۰۰ گونه حشره وجود دارند که به حشره‌کش‌های شیمیایی مقاوم شده‌اند و کاربرد این عامل طبیعی می‌تواند در مدیریت کنترل آن‌ها مؤثر باشد (Makhdoom, 1998). حدود ۲۵درصد از سویه‌های جداشده در این پژوهش کریستال تولید کردند.

امروزه در سراسر جهان مجموعه‌های بزرگی از سویه‌های Bt نگهداری می‌شود. یکی از اولین پژوهش‌های انجام‌شده در زمینهٔ جداسازی باکتری Bt توسط Travers و همکاران (1987) انجام شد. نتایج نشان داد که ۲۰ تا ۹۶ درصد از گونه‌های *Bacillus* که به‌صورت تصادفی از روی محیط کشت جداسازی شدند، باکتری‌های تولیدکنندهٔ کریستال بودند. همچنین در یکی از پژوهش‌های ابتدایی و گسترده که توسط Martin و Travers (1989) در ایالت متحده و ۲۹ کشور دیگر انجام شد، ۱۱۱۵ نمونهٔ خاکی آزمایش شد که حدود ۲۷ هزارسویه جداسازی شد.

در پژوهش Forsyth و Logan (2000) از ۶۲ نمونه (خاک، خزه، گلسنگ و سایر مواد) تنها ۳ سویه Bt یافت شد. Cherif و همکاران (2001) در میان ۷۴ سویه باسیلوس جداشده از خاک‌های مختلف در تونس، ۲۰ سویه و Ejiofor و Johnson (2002) از ۴۱۳ نمونه خاک و گردوخاک انبار حبوبات، ۲۵ سویه Bt به دست آوردند که ۲۱ سویه از خاک جداسازی شده بود. در ترکیه نیز ۹۶ نمونه از زیستگاه‌های حبوبات برای جداسازی باکتری Bt بررسی شل که ۱۶۳ سویه (۳۲/۶درصد) در میان آن‌ها کریستال تولید کردند (Apaydin *et al*., 2005).

بنابراین، نتایج این پژوهش و سایر پژوهش‌هایی که برای جداسازی باکتری Bt از خاک و سایر منابع محیطی در مناطق مختلف انجام شده است، نشان می‌دهد که جست‌وجو برای یافتن این باکتری با دستاوردهای متغیری همراه بوده است. اما نتیجهٔ مشترک به‌دست‌آمده در بیشتر پژوهش‌ها، بیانگر فراوانی بالای این باکتری در نمونه‌های خاکی مناطق مختلف است و این مطلب در پژوهش حاضر نیز تأیید شد.

در شناسایی میکروسکوپی سویه‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری، بیشترین و کمترین تعداد سویه‌های تولیدکنندهٔ کریستال به‌ترتیب با فراوانی ۲۹/۳۷ و ۱۰/۶۲ درصد در اکوسیستم‌های جنگلی و نواحی بدون‌پوشش مشاهده شد. اکوسیستم‌های جنگل از پوشش‌های گیاهی متنوع و پایداری برخوردار هستند، درنتیجه تنوع زیستی بالایی نیز دارند، به‌خصوص زیستگاه مناسبی برای انواع حشرات و میکروارگانیسم‌های موجود در خاک در اختیار می‌گذارند. در کنار آن عامل مهم دیگری که می‌تواند نقش بسزایی در این زمینه داشته باشد و این ویژگی را تداوم بخشد، استفاده‌نکردن و یا استفادهٔ کمتر از آفت‌کش‌های شیمیایی در این اکوسیستم است که می‌تواند به حفظ تنوع زیستی کمک شایانی کند. تمامی این عوامل در کنار هم شرایط مناسبی را به‌منزلهٔ یک منبع و یا یک زیستگاه مناسب برای باکتری Bt فراهم می‌کند. از طرف دیگر خاک‌های بدون پوشش گیاهی هیچ‌یک از شرایط قیدشده را نداشته و در مقایسه با چهار اکوسیستم دیگر به‌منزلهٔ

منبعی برای باکتری Bt در پایین‌ترین سطح قرار گرفت.

نتایج این بررسی نشان داد که گرچه باکتری تنها در صورت واردشدن به چرخهٔ زیستی حشرات مؤثر است، اما به‌خوبی در خاک‌های مناطق مختلف پراکنده می‌شود و قابل ردیابی است. برای یافتن عوامل میکروبی غالباً جمعیت‌های طبیعی حشرات آفت از نظر وجود این عوامل بررسی می‌شوند، اما یافته‌شدن Bt در خاک‌های نواحی مختلف و پراکنش زیاد آن در خاک‌های جمع‌آوری شده از نواحی مختلف استان مازندران و به‌خصوص خاک‌های جنگلی، امکان جست‌وجو برای یافتن جدایه‌های مؤثر را آسان‌تر می‌کند. بنابراین، خاک‌های نواحی جنگلی منبعی مناسب برای یافتن سویه‌های مؤثر باکتری Bt و کنترل بیولوژیک آفات است. در پایان این پژوهش پیشنهاد می‌شود که خاک‌های نواحی جنگلی بیشتری از مناطق مختلف اکولوژیک کشور برای غربالگری و جداسازی این باکتری بررسی شود.

REFERENCES

1. Apaydin, O., Cinar, C., Turanli, F., Harsa, S., Gunes, H., 2008. Identification and bioactivity of native strains of *Bacillus thuringiensis* from grain-related habitats in Turkey. Biological Control 45, 21-28.
2. Apaydin, O., Yenidunya, A. F., Harsa, S., Gunes, H., 2005. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from different grain habitats in Turkey. World Journal of Microbiology and Biotechnology 21, 285-292.
3. Cherif, A., Ouzari, H., Daffonchio, D., Cherif, H., Ben Slama, K., Hassen, A., Jaoua, S., Boudabous, A., 2001. Thuricin 7: A novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1.7, a new strain isolated from soil. Letters in Applied Microbiology 32, 243-247.
4. Cinar, C., Apaydin, O., Yenidunya, A. F., Harsa, S., Gunes, H., 2008. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from olive-related habitats in Turkey. Journal of Applied Microbiology 104, 515-525.
5. Ejiofor, A. O., Johnson, T., 2002. Physiological and molecular detection of crystalliferous *Bacillus thuringiensis* strains from habitats in the South Central United States. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 28, 284-290.
6. Forsyth, G., Logan, N. A., 2000. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from Northern Victoria Land, Antarctica. Letters in Applied Microbiology 30, 263-266.
7. Hongyu, Z., Ziniu, Y., Wangxi, D., 2000. Isolation, distribution and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from warehouses in China. Crop Protection 19, 449-454.
8. Kaelin, P., Morel, P., Gadani, F., 1994. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from stored tobacco and *Lasioderma sericome* (F.). Applied and Environmental Microbiology 60, 19-25.
9. Kaur, S., 2006. Molecular approaches for identification and construction of novel insecticidal genes for crop protection. World Journal of Microbiology and Biotechnology 22, 233-253.
10. Khetan, S. K., 2001. Microbial Pest Control. Marcel Dekker, Inc. 300 p.
11. Kim, H. S., Lee, D. W., Woo, S. D., Yu, Y. M., Kang, S. K., 1998a. Biological, immunological, and genetic analysis of *Bacillus thuringiensis* isolated from granary in Korea. Current Microbiology 37, 52-57.
12. Kim, H. S., Lee, D. W., Woo, S. D., Yu, Y. M., Kang, S. K. 1998b. Distribution, serological identification, and PCR analysis of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of Korea. Current Microbiology 37, 195-200.
13. Makhdoom, R., 1998. Cloning and sequencing of the delta endotoxin gene from locally isolated *Bacillus thuringiensis* toxic against spotted bollworm. Ph. D. Thesis, University of the Punjab, 160 p.
14. Martin, P. A. W., Travers, R. S., 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. Applied and Environmental Microbiology 55, 2437-2442.
15. Martínez, C., Caballero, P., 2002. Contents of *cry* genes and insecticidal toxicity of *Bacillus thuringiensis* strains from terrestrial and aquatic habitats. Journal of Applied Microbiology 92, 745-752.
16. Martínez, C., Porcar, M., López, A., Escudero, I. R., Pérez-Llarena, F. J., Caballero, P., 2004. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain with a broad spectrum of activity against

Lepidopteran insects. Entomologia Experimentalis et Applicata 111, 71-77.

17. Mohammedi, S., Bala Subramanian, S. B., Yan, S., Tyagi, R. D., Valero, J. R., 2006. Molecular screening of *Bacillus thuringiensis* strains from wastewater sludge for biopesticide production. Process Biochemistry 41, 829-835.

18. Obeidat, M., Hassawi, D., Ghabeish, I., 2004. Characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from Jordan and their toxicity to the Lepidoptera, *Ephestia kuehniella* Zeller. African Journal of Biotechnology 3, 622-626.

19. Porcar, M., Juárez-Pérez, V., 2003. PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. FEMS Microbiology Reviews 26, 419-432.

20. Tamez-Guerra, P., Iracheta, M. M., Pereyra-Alférez, B., Galán-Wong, L. J., Gomez-Flores, R., Tamez-Guerra, R. S., Rodríguez-Padilla, C., 2004. Characterization of Mexican *Bacillus thuringiensis* strains toxic for Lepidopteran and Coleopteran larvae. Journal of Invertebrate Pathology 86, 7-18.

21. 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, 1263-1266.

22. Young, J. M., Chilcott, C. N., Broadwell, A., Wigley, P. J., Lecadet, M. M., 1998. Identification of serovars of *Bacillus thuringiensis* Berliner 1915 in New Zealand. Journal of Crop and Horticultural Science 26, 63-68.