جداسازی جدایه‌های بومی باکتری
Bacillus thuringiensis Berliner از خاک‌های زراعی ایران

رسول مرزبان[1] و غلامرضا صالحی جوزدانی[2]

چکیده

اولین قدم به عنوان پایه و اساس تحقیق روی باکتری *Bacillus thuringiensis*، جداسازی جدایه‌های بومی و نگهداری آن‌ها به عنوان بانک ژن این باکتری است. برای این کار در سال‌های ۱۳۸۰-۱۳۷۸ تعداد ۲۲۳۴ نمونه خاک زراعی از کلیه استان‌های ایران جمع‌آوری شد. با استفاده از روش انور حسین و همکاران با اندکی تغییر تعداد ۲۸,۴۴۵ جدایه باکتری تشکیل‌دهنده اسپور و در نهایت ۱۲۸ جدایه باکتری *B. thuringiensis* جداسازی شد. بیشترین تعداد جدایه‌های این باکتری نسبت به تعداد نمونه جمع‌آوری شده از خاک مزارع پنبه، چغندرقند، برنج و دانه‌های روغنی (آفتابگردان و کلزا) بدست آمد و کمترین تعداد از مزارع صیفی و سبزی حاصل گردید. در بین استان‌های مختلف، به ترتیب استان‌های گیلان و اردبیل دارای بیشترین تعداد جدایه بودند. نتایج زیست‌سنجی این جدایه‌ها روی لارو کرم قوزه پنبه و سوسک کلرادوی سیب‌زمینی نشان داد که ۵۸٪ جدایه‌ها بیماریزا هستند.

واژه‌های کلیدی: جداسازی، خاک زراعی، *Bacillus thuringiensis*، ایران

---

۱ ـ عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی ramarzban@yahoo.com

۲ ـ عضو هیأت علمی مؤسسه بیوتکنولوژی

مقدمه و بررسی منابع

باکتری *Bacillus thuringiensis* Berliner، یک باکتری گرم مثبت و تشکیل دهنده اسپور است که در زمان تشکیل اسپور، تولید پروتئین‌های کریستالی سمی برای برخی از حشرات می‌کند. این باکتری از زیستگاه‌های مختلف خصوصاً خاک جداسازی شده و به عنوان باکتری عمومی خاک شناخته می‌شود (۱۱). ایشیواتا (۱۹۰۱) باکتری اسپوردار هوازی را از کرم ابریشم بیمار جدا و آن را *Bacillus sotto* یا Sudden - collapse bacillus نام نهاد (۱۵). برلینر (۱۹۱۱) در ناحیه تورنژیا[3] در کشور آلمان باکتری مشابهی را از پروانه آرد گندم (*Anagasta kuehniella* Zell.) جدا و در سال ۱۹۱۵ آن را *B. thuringiensis* نامگذاری کرد (۷). متس (۱۹۲۷) با جداسازی مجدد *B. thuringiensis* اطلاعات بیشتری را در مورد آن بیان نمود، وی برلینر متوجه شد که محیط کشت حاوی اسپور دارای اجسام نامنظم لوزی شکل است ولی متوجه سمیت اجسام فوق نشد (۱۷). هانات (۱۹۵۳) ثابت کرد که همزمان با تشکیل اسپور درون سلول باکتری، اجسام بلورین نیز بوجود می‌آیند (۱۳). هانای و جیمز (۱۹۵۵) پروتئین‌های کریستالی را که دارای حداقل ۱۷ اسیدآمینه بودند از *B. thuringiensis* به طور خالص بدست آوردند (۱۲). آنگوس (۱۹۵۶) تأثیر اندوتوکسین *B. thuringiensis* را به اثبات رسانید و کریستال را عامل اصلی از بین رفتن لارو حشرات معرفی نمود (۵). در مطالعاتی که روی خاک‌ها در برخی کشورها انجام گرفته، *B. thuringiensis* در تعداد زیادی از خاک‌ها بدست آمده و در برخی دیگر تنها در تعداد معدودی از خاک‌ها حاصل شده است. در آمریکا از ۴۶,۳۷۳ جدایه‌ای که کلنی آنها شبیه به *B. thuringiensis* بود، تنها ۲۵۰ جدایه از این باکتری بدست آمد (۱۰). از خاک‌های زراعی بنگلادش در مجموع ۶۵۰ جدایه جدا شد که همه این جدایه‌ها دارای اسپور-کریستال بودند (۶). اوهبا و همکاران (۱۹۷۹) بهترین منبع جداسازی *B. thuringiensis* در ژاپن را مکان‌های پرورش کرم ابریشم می‌دانند، چرا که ۱۴۶ جدایه از این باکتری را از ۱۸ مزرعه پرورش کرم ابریشم جدا نمودند (۱۹). برنارد و همکاران (۱۳۷۷) از ۲,۳۶۳ نمونه شامل نمونه خاک، مواد انباری، بقایای حشرات، مواد گیاهی و موادی غیر از مواد مذکور از ۸۰ کشور، در مجموع ۵,۳۰۳ جدایه باکتری *B. thuringiensis* جدا نمودند (۸).

هوسان کیم و همکاران (۱۹۹۸) در مجموع ۵۸ جدایه باکتری *B. thuringiensis* را از خاک‌های مناطق مختلف کره جدا کردند، ۳۵ درصد جدایه‌ها روی پروانه‌ها ۲۰ درصد روی دوبالان و ۳۶ درصد هم روی پروانه‌ها و هم روی دوبالان اثرات سمی از خود بروز داد و ۹٪ آنها نیز غیر سمی بودند (۱۴). المانی و مک دام (۱۹۹۷) از زیستگاه‌های مختلف اردن ۴۴ جدایه این باکتری را جدا نمودند که ۲۲٪ آنها روی مگس سرکه بیماریزا بود (۴). در مطالعه خاک‌های ۳۰ کشور به عنوان نماینده‌هایی از ۵ قاره جهان مشاهده گردید که *B. thuringiensis* در نمونه‌های قاره آسیا دارای بیشترین فراوانی بوده است (۱۶). وست و همکاران (۱۹۸۵) مهمترین عامل بقا و

1- Thuringia

دوام باکتری‌های *B. thuringiensis* و *B. cereus* در خاک را مواد غذایی قابل دسترس می‌دانند (۲۰).

در مطالعه خاک‌های ایران، ایزدیار و همکاران (۱۳۷۷) از ٦۰۰ نمونه خاک مناطق جنگلی شمال ایران ۱۲ جدایه و مرزبان و همکاران (۱۳۸۱) از ۲۵ نمونه خاک زراعی شهرستان کرمانشاه یک جدایه *B. thuringiensis* جداسازی نمودند (۱،۳). در یک زیست‌سنجی مقایسه‌ای، جدایه‌های بومی *B. thuringiensis* دارای تأثیر بیشتری از *B. thuringiensis* subsp. *Kurstaki* HD-1، ماده مؤثره فرآورده تجاری دایپل بودند (۲). در این بررسی جهت بدست آوردن جدایه‌های بومی مؤثر و مناسب در کنترل بیولوژیک آفات و جدا سازی و حفظ یکی از باکتری‌های مفید خاک قبل از تداخل با واریته‌های تجاری اقدام به جداسازی و جمع‌آوری جدایه‌های بومی خاک‌های زراعی ایران گردید.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه‌های خاک

از مزارع آبی مناطق مختلف زراعی ایران بطور تصادفی از سطح خاک تا عمق حدود ۱۵ سانتیمتری بوسیله بیلچه حدود ۲۰۰ گرم خاک نمونه‌برداری و در داخل کیسه‌های پلاستیکی با رعایت شرایط استریل و با قید مشخصات قرار داده شد. نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شدند.

جداسازی جدایه‌های *B. thuringiensis*

با استفاده از روش انور حسین و همکاران (٦) با اندکی تغییر، نمونه‌های خاک در سرم فیزیولوژیک ۱/۵ درصد وزن حجمی حل و حداقل به مدت ۳۰ دقیقه بدون حرکت قرار داده شدند، سپس ۱/۵ میلی‌لیتر از فاز بالایی[1] جدا و با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه حرارت داده شد. سپس بلافاصله در محیط نوترینت آگار[5] دارای ۷٪ کلرید سدیم در دمای ۳۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ روز با رعایت شرایط استریل بصورت خطی کشت گردید. بعد از موعد مقرر کلنی‌های شبیه باکتری *B. thuringiensis* توسط میکروسکوپ فازکنتراست بررسی و جدایه‌های واجد زوائد پروتئینی و اسپور جدا و به روش سری رقت[6] خالص سازی گردیدند.

زیست‌سنجی جدایه‌های باکتری

جدایه‌های خالص شده در محیط کشت نوترینت آگار با اسیدیته ۷/٤ و دمای ۳۱ درجه سانتیگراد به مدت هفت روز کشت داده شدند. در پایان مدت مذکور زوائد پروتئینی و اسپورهای تولید شده از محیط کشت برداشت شد و سوسپانسیون اسپور-کریستال با غلظت 3×10^{8} اسپور در میلی لیتر در آب مقطر استریل تهیه گردید. سمیت آنها روی لارو سن دوم کرم قوزه پنبه (*Helicoverpa armigera* Hubn.) و سوسک کلرادوی سیب‌زمینی (*Leptinotarsa decemlineata* Say.) آزمایش گردید. به این ترتیب که برای کرم قوزه پنبه غلظت فوق به نسبت ۳ میلی‌گرم در یک گرم به غذای مصنوعی لاروها اضافه گردید و برای لاروهای سوسک کلرادوی سیب‌زمینی از برگ‌های سیب‌زمینی

1- Supernatant phase
2- Nutriant Agar
3- Serial dilution

آغشته شده سوسپانسیون فوق استفاده گردید. پس از سه روز تغذیه، لاروهای تلف شده جمع‌آوری، ضدعفونی سطحی و براساس اصول کخ روی محیط نوترینت آگار کشت شدند. نگهداری نمونه‌ها به دو روش لیوفیلایز و گلیسرول در دمای حدود -۲۵^{o} C صورت گرفت.

نتایج و بحث

در مجموع تعداد ۲,۲۳٤ نمونه خاک از مزارع آبی مناطق مختلف ۲۸ استان کشور جمع‌آوری گردید. تعداد ۲۸,٤٤٥ جدایه باکتری تشکیل‌دهنده اسپور جداسازی و در نهایت ۱۲۸ جدایه *B. thuringiensis* جدا سازی و خالص‌سازی گردید (جدول ۱). این باکتری در بیش از ۸۰ درصد استان‌های مختلف کشور پراکنش داشته و بیشترین جدایه به ترتیب از استان‌های گیلان، اردبیل، گلستان، چهارمحال و بختیاری، کرمانشاه و آذربایجان غربی جدا شد و از استان‌های خوزستان، خراسان، سمنان، لرستان و زنجان جدایه‌ای بدست نیامد. بیشترین تعداد جدایه *B. thuringiensis* نسبت به تعداد نمونه خاک جمع‌آوری شده به ترتیب از خاک‌های مزارع پنبه، دانه‌های روغنی (آفتابگردان و کلزا)، چغندرقند و برنج حاصل شد. کمترین جدایه از خاک‌های مزارع سبزی و صیفی بدست آمد. از خاک‌های آمریکا نیز بیشترین تعداد جدایه *B .thuringiensis* از خاک‌های مزارع دانه‌های روغنی و پنبه جداسازی شده است (۱۰). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که حدود ۵٪ از نمونه‌ها دارای *B. thuringiensis* بودند که نسبت به سایر کشورها پایین اما نسبت به مطالعات قبلی خاک‌های ایران توسط ایزدیار و همکاران (۱) بیشتر است. ۵۸٪ این جدایه‌ها روی لاروهای کرم قوزه پنبه و سوسک کلرادوی سیب‌زمینی بیماریزا بودند یا به عبارت دیگر بیش از ۱۰٪ تلفات ایجاد کردند. بعضی از محققین وجود جدایه‌های *B. thuringiensis* غیربیماریزا را در خاک یک مسأله عمومی دانسته‌اند (۱٦،۱۸). مطالعاتی که در طی یکی دو دهه گذشته روی اکولوژی *B. thuringiensis* انجام گرفته نشان داده که خاک زیستگاه طبیعی این باکتری است. بیش از چند هزار جدایه *B. thuringiensis* که از خاک جدا شده‌اند، از لحاظ فنوتیپ و ژنوتیپ فوق‌العاده متغیر بوده‌اند و مهمترین فاکتور اکولوژیکی مؤثر در حفظ و بقای این باکتری در خاک مواد غذایی قابل دسترس شناخته شده است (۹،۱۰،۱۵،۱٦،۱۸). با توجه به اینکه احتمال حضور *B. thuringiensis* در خاک‌های فقیر کمتر از خاک‌های غنی می‌باشد (۲)، لذا پراکنش این باکتری با پراکنش خاک‌های حاصلخیز ایران تقریباً یکسان است (شکل ۱). انور حسین و همکاران (۱۹۹۷) نیز حضور *B. thuringiensis* را در خاک‌های سنگلاخی و سبک کمتر می‌دانند و اثبات کردند که اسیدیته خاک در فراوانی و پراکنش جدایه‌های *B. thuringiensis* بی‌تأثیر است (٦).

سپاسگزاری

بدین وسیله از زحمات و تلاش ارزنده سودابه ایزدیار، یعقوب رشیدی و مریم کلانتری بابت همکاری در انجام این تحقیق صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

جدول شماره ۱: پراکنش باکتری *B. thuringiensis* Ber. در خاک‌های زراعی مناطق مختلف ایران

محل نمونه برداری		تعداد نمونه خاک دارای B. t / تعداد نمونه خاک آزمایش شده	تعداد جدایه B. t جدا شده / تعداد جدایه باکتری اسپوردار
استان	محصول		
آذربایجان شرقی	**گندم**	۷ / ۰	۲۳۵ / ۰
	چغندرقند	۷ / ۰	۲۳۸ / ۰
	سیب‌زمینی	۵/۱	۱۵٦ / ۲
	سبزی	۱۲ / ۱	۳۹۳ / ۱
آذربایجان غربی	گندم	۸ / ۰	۲۸۲ / ۰
	چغندرقند	۲۳ / ۳	٦۰٤ / ٤
	سبزی و صیفی	۱٦ / ۱	۳۷٦ / ۱
	آفتابگردان	۱۰ / ۳	۲۹۸ / ۳
اردبیل	سیب‌زمینی	۹ / ۲	۲۵۵ / ۳
	گندم	۲۲ / ۵	۷۳۵ / ۵
	پنبه	٦ / ۳	۷٦ / ٦
اصفهان	گندم وجو	۳۳ / ۰	۳۹۱ / ۰
	سیب‌زمینی	۳۷ / ۰	۵۵۳ / ۰
	سبزی و صیفی	۲٤ / ۱	۳۰۵ / ۱
	آفتابگردان	۳٦ / ٤	۳۱۸ / ٤
ایلام	گندم	۵۰ / ۱	۲۷۲ / ۱
	برنج	۱۰ / ۰	٤۵ / ۰
	سبزی	۱۵ / ۰	۷۳ / ۰
بوشهر	سبزی	۱۷ / ۳	۲۲۷ / ۳
	کنجد	۲۱ / ۰	۲۱۷ / ۰
	کلزا	٤٤ / ٤	۵۸۳ / ٤
تهران	گندم	۳۲ / ۱	۳۲۹ / ۱
	سیب‌زمینی	۵ / ۰	۱۰۷ / ۰
	سبزی	٤ / ۰	۱۳۵ / ۰
چهار محال و بختیاری	سبزی	۲۹ / ۱	۱۷٤ / ۱
خراسان	پنبه	۲۰ / ۰	۳٤۷ / ۰
	چغندرقند	۱۲ / ۰	۱۵۱ / ۰
	گندم و جو	۲۰ / ۰	۲٦۳ / ۰
خوزستان	گندم	٤۹ / ۰	٦۲٦ / ۰
	سبزی	٤٤ / ۰	۹۷٤ / ۰
زنجان	چغندرقند	۳۰ / ۰	۱۰۰ / ۰
	گندم	۵۰ / ۰	۱۵۹ / ۰
سمنان	صیفی	۳۰ / ۰	۲۰٤ / ۰

سیستان و بلوچستان	گندم	۱ / ۳۶	۱ / ۳۸۶
	سبزی وصیفی	۰ / ۴۶	۰ / ۴۹۵
فارس	پنبه	۰ / ۲۰	۰ / ۲۹۹
	گندم	۰ / ۵۵	۰ / ۷۸۰
	ذرت	۱ / ۲۷	۱ / ۴۵۰
قزوین	گندم	۱ / ۱۲	۱ / ۱۰۳
	چغندرقند	۱ / ۱۶	۱ /۱۸۵
قم	سبزی	۲ / ۴۰	۲ / ۱۲۰
کردستان	گندم	۶ / ۵۶	۷ / ۱۴۲۱
	سبزی و صیفی	۰ / ۴۰	۰ / ۷۰
کرمان	گندم و جو	۲ / ۳۰	۲ / ۵۵۲
	صیفی	۲ / ۷۲	۲ / ۱۰۳۱
کرمانشاه	گندم	۴ / ۶۱	۴ / ۱۲۷
	سبزی و صیفی	۵ / ۶۵	۵ / ۱۳۹۸
	چغندرقند	۱ / ۵۰	۱ / ۱۶۱
کهگیلویه و بویراحمد	سبزی وصیفی	۰ / ۳۹	۰ / ۳۵۱
	چغندرقند	۵ / ۲۹	۷ / ۵۰۰
	چغندرقند	۸ / ۷۲	۱۰ / ۸۶۷
گلستان	پنبه	۳ / ۱۳	۴ / ۳۳۱
	گندم	۸ / ۳۵	۸ / ۱۰۹۴
	سبزی وصیفی	۰ / ۵۴	۰ / ۹۸۹
گیلان	برنج	۱۷ / ۲۴۳	۱۹ / ۲۴۴۲
لرستان	گندم و جو	۰ / ۳۱	۰ / ۷۱۱
	سبزی و صیفی	۰ / ۲۷	۰ / ۵۳۵
مازندران	برنج	۲ / ۶۰	۳ / ۷۴۷
مرکزی	گندم	۲ / ۳۸	۲ / ۴۴۶
هرمزگان	سبزی	۲ / ۷۲	۳ / ۹۳۲
همدان	سیب‌زمینی	۱ / ۶۰	۱ / ۲۴۰
	گندم	۰ / ۲۰	۰ / ۱۲۳
یزد	سبزی	۰ / ۱۰	۰ / ۱۳۴
	گندم وجو	۴ / ۶۸	۵ / ۳۴۹

منابع

۱. ایزدیار، س، امیرصادقی، س. و روحانی، ح. ۱۳۷۷. جداسازی استرین‌های بومی *Bacillus thuringiensis* از خاک‌های مناطق شمال ایران. خلاصه مقالات شانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، ۱ تا ۵ شهریور، آموزشکده کشاورزی کرج، صفحه ۱۹۸.

۲. مرزبان، ر. ۱۳۸۱. زیست‌سنجی مقایسه‌ای چند جدایه بومی *Bacillus thuringiensis* با زیر گونه *Bacillus thuringiensis*i subsp. *kurstaki* روی شب‌پره هندی(*Plodia interpunctella* Hb.). نشریه آفات و بیماری‌های گیاهی، جلد ۷۰، شماره ۱، صفحه ۹۰-۸۳.

۳. مرزبان، ر.، بیات اسدی، ه. و میرمؤیدی، ع. ۱۳۷۷. بررسی پراکنش باکتری *Bacillus thuringiensis* Ber. در خاک‌های استان کرمانشاه. خلاصه مقالات شانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، ۱ تا ۵ شهریور، آموزشکده کشاورزی کرج، صفحه ۲۳۹.

4. Al - Momani, F. 1997. Isolation and phenotypical identification of spore - forming *Bacillus* species from Jordanian habitats with larvicidal activity against *Drosophila melanogaster*. Letters in Applied Microbiology, 25: 359-362.

5. Angus, T. A., 1956. Association of toxicity with protein crystalline inclusion of *Bacillus sotto* Ishiwata. Can. J. Microbial. 2: 122-131.

6. Anear, H. Ahmad., S. and H. Sirajal, 1997. Abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* in the agricultural soil of Bangladesh. 70: 221-225.

7. Berliner, E. 1911. Uber die schlaffsucht der Mehlmotlenroupe Ephestia kueniella Zell. Und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis* nsp., Z. Angew Entomol, 2, 29-56 (Cited in the Safety of microbial insecticides Pp. 36-39).

8. Bernhard, K., J. Butt, D. J. Ellis, Robert, G. M., Pauli, S., Rodgers, P., and Burges, H. D. 1997. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*. Worldwide distribution, characterization and activity against insect pests. J. Invert. Pathol., 70: 59-68.

9. Chicott, C. N. and Wigley, P. J. 1993. Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from Jov and insect habitats in New Zealand. Journal of invertate pathology. 61: 244-247.

10. Delucca, A. J., J. G. Simonson, and A. D., Larson. 1981. *Bacillus thuringiensis* distribution in soils of the United States. Can. J. Microbial. 27: 865-870.

11. Dulmage, H. T., and K. Aizawa. 1982. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in nature. In Kurstak E. (Ed) Microbial and viral pesticides. Mercel Dekker. Inc. New York, pp. 209-237.

12. Hannay, C. L. and J. P. Fitz. 1955. The protein crystals of *Bacillus thuringiensis* Ber. Can. J. Microbial. 1: 694-710.

13. Hannat, C. L. 1953. Crystalline inclusions in aerobic spore-forming bacteria. Nature, 172: 1004.

14. Ho san Kim, Dae Won Lee, Soo Dong Woo, Yong Man Yu, and Scok Kwon Kang. 1998. Distribution, Serological identification and PCR analysis of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of Korea. Cur. Microbial. 37: 195-200.

15. Ishiwata, S. 1901. On a kind of severe flacherie (Sotto disease). I. Dianihen Sanshi Kaiho 114, 1 (Cited in the Safety of microbial insecticides, pp. 36-39).

16. Martin, P. A. W. and R. S. Travers. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. Appl. Environ. Microbiol., 55: 2437-2442.
17. Matts, O. 1927. Parasitore krunkheitender mehlmottenlarven unde versuche uber ihre verwendbarkeit als biologissche Bekam P fungus mittel. (Cited in the Insect Pathology. 633 pp).
18. Ohba, M. and K. Aizawa. 1985. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in soils of Japan. J. Invert. Pathol. 47: 277-282.
19. Ohba, M. K., Aizawa K., and T. Furusawa. 1979. Distribution of *Bacillus thuringiensis*. Serotypes in Ehime Prefecture. Japan APPI. Entomol. Zool., 14(3): 340-345.
20. West, A. W., Burges, H. D., Dixon, T. J., and C. H. Wyborn. 1985. Survival of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* spore inocula in soil: effects of pH, moisture, nutrient avaiability and indigenous microorganisms. Soil Biol. Biochem. 17: 657-665.