Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)

49(1), Spring, 2026

10.22055/ppr.2026.50800.1851

Study of the culturable bacterial community in the digestive tract of *Helicoverpa armigera* larvae and the effect of the fungus *Beauveria bassiana* on the abundance of digestive tract bacteria

M. Amiri[1], A. Khani[2 *], N. Sahebzadeh[2], M. Najimi[3]

1. Ph.D. student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran
2. ***Corresponding Author:** Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran (abbkhani@uoz.ac.ir)
3. Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran

Received: 8 October 2025 Revised: 8 January 2026 Accepted: 13 January 2026

Abstract

Background and Objectives

Bacteria are an important group of microorganisms that live within the insect guts. Bacteria inhabiting the gut of insects provide many benefits to their hosts, such as aiding in digestion, reproduction, immunity, tissue homeostasis, adaptation to environment and resistance to pathogen and pesticides. Insect microbial associates play important roles in the development of diseases caused by entomopathogens and toxicoses caused by insecticides. Different types of interactions may occur between bacterial symbionts and insect-pathogenic ascomycetes (e.g., *B. bassiana*). *Helicoverpa armigera* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae) is a polyphagous and economically important pest of the order Lepidoptera, that infests important crops worldwide, including cotton, tomatoes, sunflowers, corn, peas, vegetables and agricultural crops. However, studies on the microbiota in the insect order are scarce. This study aimed to identify the symbiotic bacteria associated with *H. armigera* guts and to survey the effect of the pathogenic fungus, *B. bassiana* (concentration of 10^6 conidia/ml) on the abundance of bacterial flora.

Materials and Methods

Eggs and larvae were collected from the corn fields of Jiroft, Kerman, and reared in laboratory conditions at 27±2°C, 65±5% relative humidity and a 16L: 8D photoperiod. The fungus *B. bassiana* Isolate (IRAN 1395C) was obtained from the Iranian Plant Protection Research Institute and grown on Potato Dextrose Agar (PDA) at 25 °C until sporulation. Bacterial identification was performed based on phenotypic characteristics using standard bacteriological methods, as well as the 16S rRNA encoding gene sequence and its comparison with the NCBI database. The contents of the digestive tube of fifth instar larvae were cultured in enriched Nutrient Agar medium using the 16 linear methods. After colony formation and purification, Gram staining was performed, and individual isolates were transferred to specific culture media (blood agar for Gram-positive bacteria and Eosin Methylene Blue agar (EMB) and MacConkey agar for Gram-negative bacteria). After purification in specific culture media, biochemical and differential tests, including oxidase, urease, catalase, Simon citrate agar, mannitol fermentation, motility, methyl red, gas production in Triple sugar iron agar (TSI) and Wegas-Persquaer tests, were used to identify bacteria. The appearance of the colonies was examined based on certain characteristics, such as size, form, color, elevation, consistency and opacity. In addition, the

study involved counting bacterial colonies in treated larvae inoculated with the fungus *B. bassiana* and in a control group, using a mixed-culture method.

Results

The results of biochemical and differential tests and phenotypic studies showed that the predominant commensal bacteria in the digestive tract of *Helicoverpa armigera* larvae were the Gram-positive bacteria genus, include *Staphylococcus* (Bacillales: Staphylococcaceae, are Gram-positive cocci 1µm in diameter that form clumps.), *Streptococcus* (Lactobacillales: Streptococcaceae, are Gram-positive, nonmotile, nonsporeforming, catalase-negative cocci that occur in pairs or chains.), *Bacillus* (Bacillales: Bacillaceae, are rod-shaped, endospore-forming, aerobic or facultative anaerobic), *Enterococcus* (Lactobacillales: Enterococcaceae, are Gram-positive cocci that often occur in pairs (diplococci) or short chains, and are difficult to distinguish from streptococci on physical characteristics alone) and Gram-negative bacteria genus contain *Enterobacter* (Enterobacterales: Enterobacteriaceae, is a genus of Gram-negative, facultatively anaerobic, rod-shaped or coliform bacilli, non-spore-forming bacteria) and *Klebsiella* (Enterobacterales: Enterobacteriaceae, is a genus of Gram-negative, oxidase-negative, rod-shaped bacteria with a prominent polysaccharide-based capsule). The accuracy of the results for biochemical and differential determination was verified by molecular analysis using DNA sequences of the 16S rRNA gene, compared with the NCBI sequences database. After identifying the culturable bacteria in biochemical media, the number of bacterial colonies in the digestive tract of larvae infected with the fungus *B. bassiana* in the bacterial culture medium was counted using a colony counter, and the numbers in the treated and control larvae were compared. The number of bacterial colonies in the growth medium decreased significantly in the digestive tracts of treated larvae infected with pathogenic fungi compared to control larvae.

Discussion

The findings deepened the understanding of the role of associated microbiota–pathogen interaction in maintaining microbiota stability. They may also contribute to the development of novel biological control agents and pest management strategies. However, this is an initial step on the study of gut microbe communities of cotton bollworm. Further functional analysis remains to be done, including isolation, identification, and metabolic analysis of gut microbial strains by culture-independent techniques, in addition to the impact of pathogens on the diversity and abundance of bacterial flora.

Keywords: Gut microbiota, Helicoverpa armigera, Pathogenic fungus, Pest management

Associate editor: R. Rezaei (Ph.D.)

Citation: Amiri, M., Khani, A., Sahebzadeh, N. & Najimi, M (2026). Study of the culturable bacterial community in the digestive tract of *Helicoverpa armigera* larvae and the effect of the fungus *Beauveria bassiana* on the abundance of digestive tract bacteria. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), 49*(1), 69-87. https://doi.org/ 10.22055/ppr.2026.50800.1851

گیاه‌پزشکی (مجله علمی کشاورزی)
جلد ۴۹، شماره ۱، بهار ۱۴۰۵

10.22055/ppr.2026.50800.1851

بررسی جامعه باکتریایی قابل کشت لوله گوارش کرم غوزه پنبه *Helicoverpa armigera* و اثر قارچ *Beauveria bassiana* بر فراوانی باکتری‌های لوله گوارش

مطهره امیری[۱]، عباس خانی[۲*]، نجمه صاحب زاده[۲]، محسن نجیمی[۳]

۱- دانشجوی دکتری، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۲- * **نویسنده مسوول**: دانشیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۳- دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۷/۱۶ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۱۰/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۰/۲۳

چکیده

باکتری‌های لوله گوارش حشرات، در بهبود عملکرد سیستم ایمنی در برابر عوامل بیماری‌زای حشرات و سم‌زدایی حشره‌کش‌ها نقش دارند. انواع مختلفی از همکنش ممکن است بین باکتری‌های همزیست و عوامل بیمارگر حشرات مشاهده شود. هدف این پژوهش شناسایی باکتری‌های قابل کشت در دستگاه گوارش کرم غوزه پنبه و تاثیر عامل بیمارگر قارچی *Beauveria bassiana* (غلظت 10^6 کنیدی در میلی‌لیتر) بر فراوانی جامعه باکتریایی لوله گوارش لارو این حشره می‌باشد. تخم و لارو این حشره از مزارع آلوده ذرت شهرستان جیرفت جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد و بطور جداگانه در قفس با دیواره توری، در دما ۲ ± ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵ ± ۶۵ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت نوری، روی بلال ذرت پرورش داده شد. جدایه قارچ بیمارگر *B. bassiana* IRAN 1395 C از کلکسیون موسسه تحقیقات گیاهپزشکی ایران تهیه گردید. برای خالص‌سازی قارچ‌ها از محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار به روش تک‌اسپور استفاده شد. باکتری‌ها از لوله گوارش لاروها جداسازی و روی محیط رشد غذایی غنی‌شده آگار، کشت شدند. شناسایی باکتری‌ها بر پایه بررسی‌های بیوشیمیایی و تعیین ویژگی‌های ریخت‌شناسی با روش‌های استاندارد باکتری‌شناسی و هم‌چنین استفاده از توالی ژن کدکننده 16 S rRNA و مقایسه آن با داده‌های پایگاه مرکز ملی اطلاعات زیست‌فناوری انجام شد. فراوانی کلنی باکتری‌ها در لاروهای آلوده شده با قارچ *B. bassiana*، به روش کشت آمیخته شمارش و با شاهد مقایسه گردید. در بررسی‌های بیوشیمیایی و ریخت‌شناسی، باکتری‌های جنس *Staphylococcus, Streptococcus, Bacillus, Enterobacter, Enterococcus* و *Klebsiella* در لوله گوارش لارو، شناسایی شد. هم‌چنین این نتایج با استفاده از بررسی‌های مولکولی و مقایسه توالی ژن کدکننده 16 S rRNA با داده‌های پایگاه مرکز ملی اطلاعات زیست‌فناوری[۱] تأیید شد. تعداد کلنی باکتری‌ها در محیط رشد در مورد لاروهای آلوده شده با قارچ بیماریزا نسبت به شاهد کاهش معنی‌دار داشت. بررسی بعدی کل جامعه باکتریایی لوله گوارش از جمله باکتری های غیر قابل کشت روی محیط رشد از اهداف بعدی این تحقیق خواهد بود. یافته‌های این تحقیق درک ما از نقش کنشی باکتری‌های همزیست و عوامل بیماری‌زا را در حفظ پایداری جامعه باکتریایی افزایش داده و می‌تواند به گسترش استفاده از عوامل مهار زیستی آفت و راهبردهای جدید مدیریت آفات کمک کند.

کلیدواژه‌ها: بیمارگر قارچی، کرم غوزه پنبه، مدیریت آفات، باکتری‌های همزیست

دبیر تخصصی: دکتر رسول رضائی

[۱] NCBI

مقدمه

کرم غوزه پنبه، *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae)، آفتی چندین‌خوار از راسته بالپولکداران است که محصولات مهمی مانند پنبه، گوجه‌فرنگی، آفتابگردان، ذرت، نخود، سبزیجات و محصولات زراعی را در سراسر جهان آلوده می‌کند (Sharma et al., 2005). این آفت شش سن لاروی دارد، با ولع تغذیه می‌کند و بنابراین می‌تواند باعث کاهش چشمگیر تولید محصولات کشاورزی شود. رهبردهای کنترلی این آفت از جمله استفاده از آفت‌کش‌ها، دشوار است زیرا لاروها در داخل گیاه میزبان تغذیه می‌کنند (Bagheri et al., 2021).

لوله گوارش حشرات زیستگاه مناسبی برای تجمع میکروبی می باشد. باکتری‌های لوله گوارش به صورت همزیست در دستگاه گوارش حشرات قرار دارند و به کسب مواد مغذی ضروری و هضم پلی ساکاریدهای گیاهی و افزایش رشد و نمو میزبان، ایمنی علیه دشمنان طبیعی، تجزیه فیتوتوکسین‌ها و سم‌زدایی آفت‌کش‌ها کمک می‌کنند. به علاوه باکتری‌های همزیست در حشرات نقش مهمی در تحمل دمای بالا و مقاومت در برابر پارازیتوئیدها دارند (van den Bosch & Welte, 2017). همزیست‌ها می‌توانند کارایی بیماری‌زایی حشرات ناقل بیماری‌های ویروسی گیاهی یا زمان رشد و نمو آن‌ها در حشرات را تحت تاثیر قرار داده و در نتیجه بیماری‌های ایجاد شده توسط این ناقلین را کنترل کنند (Boucias et al., 2018). باکتری‌های همزیست در حشرات ناقل ویروس‌های گیاهی از طریق تاثیر در دریافت، پایداری، آزادسازی ویروس در طول گردش ویروس در بدن حشرات و تاثیر در انتقال ویروس نقش محافظتی از گیاهان در برابر ویروس‌های مضر دارند (Wu et al., 2022).

طبق تحقیقات انجام شده در لوله گوارش موریانه‌ها و لارو سوسک‌های چوبخوار جامعه‌ی میکروبی[1] وجود دارد که از طریق هضم سلولز و تثبیت نیتروژن به تغذیه حشره کمک می‌کنند (Delalibera et al., 2005; Warnecke et al., 2007). همچنین همزیست‌ها می‌توانند مواد مغذی مانند اسیدهای آمینه و نیتروژن را برای حشرات فراهم کنند (Gupta et al., 2012). نتایج پژوهش‌ها بر مگس سرکه نشان داد که باکتری‌های لوله گوارش بر سرعت رشد و اندازه بدن میزبان تاثیر می‌گذارند (Shin et al., 2011). تیمار شته، *Acyrthosiphon pisum* (Harris)، با آنتی‌بیوتیک‌ها برای از بین بردن میکروب‌های همزیست، هیچ اثر مضر مستقیمی بر زیست‌شناسی شته نداشت (Wilkinson, 1998). با این حال، میکروب‌های لوله گوارش تولیدکننده کیتیناز، *Serratia marcescens* (Bizio)، رشد و نمو لارو پروانه پشت الماسی، *Plutella xylostella* (L.) را افزایش دادند (Indiragandhi et al., 2008). سن *Acrosternum hilare* (Say) برای رشد و بقا به همزیست‌ها نیاز دارد، در حالی که ممکن است برای رشد و بقای سن *Murgantia histrionica* (Hahn) به همزیست‌ها نیازی نباشد (Pardo & Almeida, 2009). در کرم ابریشم باقلا، *Anticarsia gemmatalis* (Hubner)، به نظر نمی‌رسد که حذف همزیست‌های لوله گوارش بوسیله‌ی آنتی‌بیوتیک‌ها تاثیر بسزایی در بقا و رشد داشته باشد (Visotto et al., 2009).

شکل لوله گوارش حشرات و ترکیبات شیمیایی مختلف موجود در آن، تأثیر قابل توجهی بر ساختار و ترکیب جامعه‌ی میکروبی دارد و به همین دلیل تنوع و تعدد جوامع میکروبی لوله گوارش متفاوت است. رشد و تکامل سریع، باعث شده باکتری‌های لوله گوارش بتوانند مسیرهای متابولیکی متعددی را توسعه دهند که با جایگاه‌های اکولوژیک متنوع سازگار شوند (Mondal et al., 2023). تغییر در جامعه‌ی میکروبی لوله گوارش می‌تواند به میزان قابل توجهی محتویات غذایی همولنف را تغییر دهد و عواملی مانند شرایط محیطی، مراحل زندگی و رژیم غذایی می‌تواند اثرات شدید بر شکل‌دهی ساختار و عملکرد میکروبی لوله گوارش ایجاد کند (Sudakaran et al., 2012).

[1] Microbiota

نتایج نشان می‌دهد که جامعه‌ی میکروبی لوله گوارش با تنظیم متابولیسم تغذیه‌ای حشره تاثیر بارزی بر فیزیولوژی میزبان دارد. مطالعات اخیر نشان داده که جامعه‌ی میکروبی لوله گوارش زنبور عسل در متابولیسم، عملکرد سیستم ایمنی، رشد و نمو و محافظت در برابر بیمارگر نقش دارد. همچنین مشخص شده است که اختلال در جامعه‌ی میکروبی لوله گوارش اثر مضر برای سلامتی زنبور عسل دارد و باعث اختلال در متابولیسم کربوهیدرات‌ها می‌شود (Zheng et al., 2017).

اگرچه تنوع بالایی از میکروارگانیسم‌ها از تعداد زیادی از گونه‌های حشرات گزارش شده است، اما مطالعات کمی به بررسی کل جوامع میکروبی و پیامدهای عملکردی و اکولوژیک مرتبط با آن پرداخته‌اند (Reeson et al., 2003). روابط همزیستی بین حشرات و باکتری‌های لوله گوارش آنها در بسیاری از حشرات از جمله موریانه‌ها و شته‌ها، مطالعه شده است (Breznak & Switzer, 1986; Chen & Purcell, 1997). با این حال، مطالعه این روابط در راسته بالپولکداران، که از نظر آفات اقتصادی اهمیت ویژه دارند، محدود است و اطلاعات کمی در مورد باکتری‌های مرتبط با لارو پروانه‌ها وجود دارد. مطالعات انجام شده روی جامعه‌ی میکروبی لوله گوارش پروانه‌ها این احتمال را مطرح کرد که میکروارگانیسم‌ها مواد مغذی ضروری را فراهم می‌کنند یا در عملکردهای بیوشیمیایی مهم مربوط به هضم غذای میزبان کمک می‌کنند (Broderick et al., 2004).

قارچ‌های بیماری‌زای حشرات از طریق کوتیکول خارجی به حفره عمومی بدن حشرات دسترسی پیدا می‌کنند، جایی که مواد مغذی را جذب می‌کنند، سموم تولید می‌کنند، سلول‌های میزبان را از بین می‌برند و در نهایت میزبان خود را می‌کشند (Ebrahimifar et al., 2017; Moghassem et al., 2023). عفونت‌های قارچی و مسمومیت‌های ناشی از حشره‌کش‌ها ممکن است جوامع میکروبی و پاسخ‌های ایمنی را در لوله گوارش حشرات تغییر دهند. همزیست‌های میکروبی حشرات می‌توانند در جلوگیری از توسعه بیماری‌های ناشی از حشرات بیماری‌زا از طریق سم‌زدایی مایکوتوکسین‌ها (Boucias et al., 2018) و رفع مسمومیت‌های ناشی از حشره‌کش‌ها (Gomes et al., 2020) نقش مهمی ایفا کنند. از طرف دیگر سموم قارچی یا مایکوتوکسین‌ها می‌توانند از طریق مکانیسم‌های مختلف، چه مستقیم و چه غیرمستقیم، به طور قابل توجهی بر جوامع میکروبی تأثیر بگذارند. این سموم می‌توانند فعالیت ضدمیکروبی از خود نشان دهند، پاسخ‌های سلول میزبان را تغییر دهند و بر فراهمی زیستی سایر ترکیبات تأثیر بگذارند (Wei et al., 2017; Guerre, 2020; Kryukov et al., 2021).

در این تحقیق جامعه‌ی باکتریایی لوله گوارش کرم غوزه پنبه قابل کشت روی محیط رشد باکتریایی، بررسی شده و تاثیر عامل بیمارگر قارچی *B. bassiana* بر فراوانی کلنی جامعه‌ی باکتریایی مطالعه شد تا از این اطلاعات در بررسی‌های بعدی بیوتکنولوژی استفاده شود. با توجه به اهمیت جامعه‌ی میکروبی حشرات، با شناخت باکتری‌های همزیست کارآمد که باعث سازگاری حشرات در برابر عوامل مضر می‌شوند و مطالعه اساسی ساز و کارهای این تقابل می‌توان رویکردهای کنترل آفات مبتنی بر منابع میکروبی یا روش‌های حفاظتی برای حشرات مفید را تسهیل و توسعه داد. آگاهی از جامعه‌ی میکروبی لوله گوارش کرم غوزه پنبه و نقش‌هایی که در بوم‌شناسی و زیست‌شناسی لارو ایفا می‌کند، می‌تواند به اهداف جدیدی برای مدیریت این آفت منجر شود.

مواد و روش‌ها

پرورش کرم غوزه پنبه

در این مطالعه نمونه‌های تخم و لارو این حشره از مزارع آلوده ذرت شهرستان جیرفت استان کرمان جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. در مرحله بعد، لاروها و تخم‌های حشره جداسازی و بطور جداگانه در قفس چوبی به ابعاد ۱۰۰×۱۰۰ سانتی‌متر دیواره توری با مش ریز، در شرایط دمای بهینه برای رشد ۲ ± ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵ ±۶۵ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت نوری، روی بلال ذرت پرورش داده شدند و پس از ظهور حشرات کامل جهت جفت‌گیری و تخم‌ریزی در قفس مخصوص نگهداری شدند

و سپس لاروهای خارج شده از تخم روی گیاه میزبان پرورش داده شدند.

آلودگی لارو حشره با قارچ *B. bassiana*

قارچ بیمارگر *B. bassiana* IRAN 1395 C از کلکسیون موسسه تحقیقات گیاهپزشکی ایران تهیه گردید. برای خالص‌سازی قارچ‌ها از محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار[۱] (محیط کشت ساخت شرکت مرک از تأمین‌کننده داخلی شرکت زند بیوتک تهیه و مطابق دستورالعمل سازنده استفاده شد.) به روش تک‌اسپور استفاده شد. برای این منظور یک بلوک میسلیومی از محیط کشت برداشته و به لوله آزمایش حاوی ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه و همگن گردید و سپس با لوپ از سوسپانسیون روی لام قرار داده شد و زیر میکوسکوپ نوری بررسی و تعداد اسپور شمارش شد. مشاهده تعداد کمتر از ۱۰ اسپور در زیر میکروسکوپ جهت خالص‌سازی مناسب بود. یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون روی محیط کشت پخش شد تا تراکم‌های یکسانی بدست آید و سپس ظروف پتری به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس جهت جوانه‌زنی نگهداری شد. پتری‌ها زیر میکروسکوپ بررسی و اسپورهای جوانه‌زده به محیط کشت جدید منتقل شدند. برای تهیه سوسپانسیون اسپور سطح کلنی قارچ به وسیله یک اسکالپل سترون تراشیده شد و به داخل آب مقطر سترون حاوی دو قطره توین ۸۰ (۰/۵ درصد) داخل لوله‌های فالکون افزوده شد. برای جدا شدن اسپورها از هم و عدم تشکیل زنجیره اسپور سوسپانسیون مربوطه به مدت یک دقیقه به وسیله شیکر هم زده شد و به این صورت سوسپانسیون یکنواختی از قارچ تهیه گردید. جهت شمارش اسپورها و تهیه تراکم اسپور در واحد حجم از لام هموستومتر و میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی (۴۰) استفاده شد و برای انجام آزمایش‌ها از غلظت‌های 10^6 اسپور در میلی‌لیتر استفاده گردید (Butt & Goettel, 2000).

به منظور تیمار لارو، کنیدی‌های استخراج شده از محیط کشت را در محلول آب توئین ۲۰ درصد تا غلظت نهایی 10^6 کنیدی در میلی‌لیتر معلق و غلظت با استفاده از هموسیتومتر تعیین شد. ابتدا به منظور ضدعفونی سطحی و حذف ساپروفیت‌ها سطحی، لاروها به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۵ درصد غوطه‌ور و ۳۰ ثانیه در آب مقطر سترون شستشو داده شدند. سپس حشرات مذکور جهت حذف آب اضافی به مدت یک دقیقه روی کاغذ صافی قرار داه شدند. سپس لاروهای سن پنجم به مدت ۹۵ ثانیه در یک سوسپانسیون آب توئین از کنیدی قارچ غوطه‌ور و لاروهای کنترل نیز با محلول آب توئین عاری از کنیدی قارچ تیمار گردیدند. پس از تلقیح، لاروها با قلم مو روی میزبان منتقل و روزانه بررسی شدند و ۷۲ ساعت بعد از تیمار از لاروهای دارای علایم بیماری (تغییر رنگ، توقف تغذیه و علایم پیش شفیرگی زودتر از موعد) جهت بررسی فراوانی کلنی باکتریایی استفاده شد (Kryukov et al., 2021). حداقل ۳۰ لارو در این آزمایش (۱۵ لارو برای شاهد و ۱۵ لارو برای تیمار) استفاده شد.

بررسی فلور باکتریایی لوله گوارش کرم غوزه پنبه

لاروهای سن پنجم کرم غوزه پنبه مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد سترون قرار داده و سپس با آب مقطر سترون شستشو شد و بعد به مدت ده دقیقه به منظور بی حرکت شدن داخل فریزر قرار داده و سپس سر هر نمونه از بدن جدا و با پنس سترون دستگاه گوارش خارج و در لوله ۱/۵ میلی‌لیتری قرار گرفت و در نهایت در فسفات بافر سالین هموژنیزه گردید.

بافت همگن شده در ۱۰۰ میکرولیتر محلول فسفات بافر سالین قرار داده شد و نمونه‌ها به صورت سریالی تا رقت پی پی ام رقیق شده و محتویات لوله گوارش لارو حشره در محیط کشت آگار مغذی[۲] به روش۱۶ تایی خطی برای وجود و عدم وجود باکتری‌ها کشت داده شدند. پلیت‌ها جهت رشد به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند (Gupta et al., 2012). پس از خالص‌سازی تک‌کلنی‌ها با کشت متوالی، رنگ‌آمیزی گِرَم انجام شد و

[۱] PDA

[۲] Nutrient Agar

جدایه‌های منفرد به محیط کشت‌های اختصاصی بلاد آگار[۱] برای باکتری‌های گِرَم مثبت و مَک‌کانکی[۲] آگار و ائوزین متیلن بلو آگار[۳] برای باکتری‌های گِرَم منفی منتقل شدند و پس از خالص‌سازی در محیط کشت‌های اختصاصی، از آزمون‌های بیوشیمیایی و افتراقی اکسیداز، اوره آز و کاتالاز (Holding & Collee, 1971)، آزمون‌های سیمون سیترات آگار، آزمون متیل-رد، آزمون وگس-پرسکوئر (دوره نهفتگی به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ تا ۳۷ درجه سلسیوس) (Powers & Latt, 1977) ، آزمون تخمیر مانیتول (Shields & Tsang, 2006)، آزمون حرکت[۴] (SIM) (دوره نهفتگی به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس) (Tittsler & Sandholzer, 1936) و تولید گاز در آزمون TSI[۵] (Kohlerschmidt et al., 2021) برای شناسایی باکتری‌ها (جدول ۱) استفاده شد (Quinn et al., 1994; Kuhnigk & König, 1997). پرگنه‌ها براساس خصوصیات از قبیل شکل، اندازه، رنگ، حاشیه، ارتفاع و قوام انتخاب شد و تعداد پرگنه‌ها در پلیت‌های حاصل از کشت لاروهای تیمار شده با قارچ عامل بیماریزا و شاهد با استفاده از کلنی شمار[۶] شمارش شدند.

شناسایی مولکولی باکتری‌ها

جدایه‌های خالص‌شده از نظر ویژگی‌های میکروسکوپی، ماکروسکوپی و آزمون‌های مختلف بیوشیمیایی دسته‌بندی شدند. پس از حذف جدایه‌های تکراری، تعداد ده جدایه از نظر مولکولی بررسی شد. برای استخراج DNA جدایه‌های منتخب، از کیت متعلق به شرکت آزما اکسیر مخصوص باکتری‌های گِرَم منفی و گِرَم مثبت استفاده شد. ابتدا هریک از باکتری‌های جداشده به لوله‌های اپندورف دو میلی‌لیتری حاوی محیط کشت مایع[۷] انتقال داده شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، به‌مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در انکوباتور شیکردار نگهداری شد. سپس نمونهٔ موردِنظر برای دو دقیقه سانتریفیوژ (۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای۳۷ درجه سلسیوس) شد. سپس مایع رویی دور ریخته شد و این کار تا زمان به‌دست‌آوردن مقدار مناسب از رسوب باکتری ادامه یافت. کیفیت DNA با استفاده از روش الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد و DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه Nanodropتعیین غلظت شد. غلظت DNA الگو ۸۰-۵۵ نانوگرم بود. مراحل بعدی طبق پروتکل کیت استخراج ژنوم انجام گرفت.

به‌منظور تکثیر ژن 16 SrRNA از پرایمر عمومی باکتری‌ها، برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد.

پرایمر رفت Fwd: 27F (5′- AGAGTTTGATCATGGCTCAG -3′)

پرایمر برگشت Rev: 1492R (5′- TACGGYTACCTTGTTACGACTT -3′)

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد که شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس آمپلیکون، ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر و یک میکرولیتر از DNA هر جدایه بود. طبق دستورالعمل، مراحل اجرایی چرخه شامل واسرشت سازی اولیه به‌مدت پنج دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس و پس از آن و ۳۵ چرخهٔ تکرارشونده شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۷ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و پس از پایان ۳۵ چرخه برای سنتز نهایی، گسترش نهایی به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد. محصول PCR در ژل آگارز ۲٪ در بافر تریس‌بوریک‌اسید در ۸۵ ولت الکتروفورز شد (Edgar, 2013).

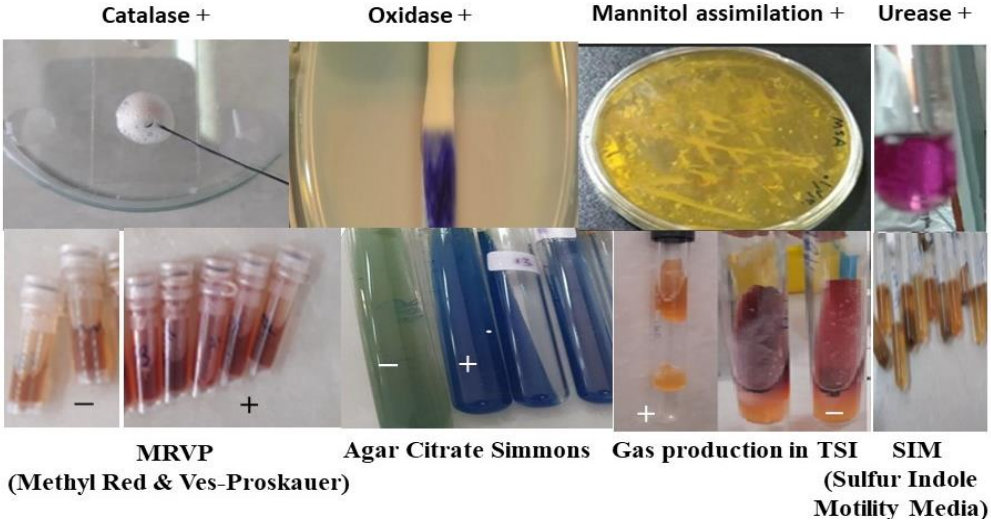
پس از خالص‌سازی محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، محصول نهایی توسط شرکت توپاز ژن کاوش توالی‌یابی شد. نتایج توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزارChromas Pro ویرایش و در فرمت FASTA ذخیره شد و به‌کمک نرم‌افزارBLAST در پایگاه دادهٔ NCBI، با سایر داده‌های

[۱] Blood agar
[۲] MacConkey agar
[۳] Eosin methylene blue agar
[۴] Sulphide Indole Motility
[۵] Triple sugar iron agar
[۶] Colony counter
[۷] Nutrient Broth

مندرج در GenBank مقایسه و درصد تشابه جدایه‌های به‌دست‌آمده با انواع شناخته‌شدهٔ آن‌ها تعیین شد (جدول ۲).

تجزیه آماری داده‌ها

نرمال بودن داده‌های مربوط به تعداد کلنی باکتریایی به وسیله‌ی آزمون Kolmogorov-Smirnov مورد سنجش قرار گرفت و برابری واریانس[۱] داده‌های هر تیمار توسط آزمون لون[۲] بررسی شد. داده‌ها با حذف حدود پنج درصد داده‌های پرت خیلی کمتر از میانگین (حدود یک چهارم میانگین) در تیمار بیمارگر و با تبدیل داده‌ها به روش Johnson transformation در نرم‌افزار Minitab، نرمال گردید. تجزیه آماری با استفاده از آزمون Independent samples t-test با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۷ انجام شد.



شکل ۱- آزمایش‌های بیوشیمیایی و افتراقی انجام شده برای شناسایی جامعه باکتریایی لوله گوارش

Figure 1. Biochemical and differential tests performed to identify the gut microbiome

نتایج

در نتیجه‌ی بررسی‌های بیوشیمیایی و افتراقی اکسیداز، اوره آز، کاتالاز، سیمون سیترات آگار، آزمون تخمیر مانیتول، آزمون حرکت، آزمون متیل-رد، آزمون وگس-پرسکوئر و تولید گاز در آزمون Triple sugar iron agar (TSI) و اندازه‌گیری تراکم باکتری‌ها، رنگ آمیزی گِرَم و بررسی ظاهر کلنی‌ها با توجه به ویژگی‌های خاص از قبیل اندازه، شکل، رنگ، برآمدگی، قوام و شفافیت و با استفاده از چارت شناسایی جنس‌های *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* *Enterococcus* *Enterobacter* و *Klebsiella* در محیط رشد باکتری‌ها شناسایی شدند (جدول ۱). هم‌چنین این نتایج با انجام بررسی‌های مولکولی و مقایسه توالی ژن کدکننده 16 S rRNA با داده‌های بانک اطلاعات ژنوم نوکلوتیدی در NCBI، تأیید شد (جدول ۲).

جنس باکتری‌های گِرَم مثبت شناسایی شده در لوله گوارش کرم غوزه پنبه

Staphylococcus -1

باکتری‌های گِرَم مثبت با کوکسی‌های کروی شکل به رنگ بنفش با آرایش‌های تک، دوتایی، چهارتایی و یا چند تایی نامنظم (شبیه خوشه انگور) مشاهده شدند (شکل ۲a). بهترین محیط برای رشد آنها کشت بلاد آگار بود و پس از ۲۴-۱۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵-۳۷ درجه سلسیوس کلنی‌های ۴-۸ میلی‌متری کرم تا زرد و پرتقالی رنگ روغنی رشد کردند. برای این جنس باکتری تست حرکت، اکسیداز و Ves-Proskauer منفی و تست مانیتول سالت آگار و کاتالاز مثبت و عامل افتراق این جنس شدند (جدول ۱).

Bacillus -2

باکتری‌های گِرَم مثبت، به شکل باسیل‌های میله‌ای که پس از رنگ‌آمیزی گِرَم به رنگ آبی تا بنفش رنگ مشاهده شد (شکل ۲b). بهترین محیط کشت اختصاصی آنها بلاد

[۱] Homogeneity of variance

[۲] Levene's Test

آگار می‌باشد و روی این محیط ایجاد همولیز می‌کند و پس از ۲۴–۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس کلنی‌های خاکستری پهن با کناره‌های نامنظم رشد یافتند. البته بهترین رشد خود را در دمای ۵۵ درجه سلسیوس انجام می‌دهند. تست حرکت، کاتالاز و تخمیر مثبت و تست اکسیداز و مانیتول سالت آگار منفی می‌باشد (جدول ۱).

3- *Enterococcus*

کوکسی‌های گِرَم مثبت هستند که به صورت جفت یا زنجیره‌های کوتاه مشاهده شدند (شکل ۲c). در تشخیص ماکروسکوپی شباهت زیادی با استرپتوکوک‌ها داشتند که تفکیک ظاهری آنها دشوار بود، حباب‌های ناشی از تست کاتالاز آن‌ها ضعیف بود و بنابراین منفی تلقی شد. برخلاف استرپتوکوک‌ها تا دمای ۴۵ درجه سلسیوس و در حضور NaCl %6/5 و pH قلیایی، رشد داشتند. تست مانیتول مثبت و تست حرکت در برخی جدایه‌ها مثبت (جدایه شماره یک، جدول ۲) و در برخی جدایه‌های دیگر منفی (جدایه شماره سه، جدول ۲) ثبت شدکه در افتراق گونه‌های این جنس حایز اهمیت است. روی محیط بلاد آگار رشد خوبی مشاهده شد و کلنی آنها خاکستری رنگ بود اما روی محیط مک‌کانکی آگار رشدی نداشت.

4- *Streptococcus*

باکتری‌های کروی، گِرَم مثبت و کاتالاز منفی که عامل تمایز آنها از استافیلوکوکوس می‌باشد که به شکل کوکسی‌های دوتایی و یا زنجیره مشاهده شدند (شکل ۲d). در محیط کشت اختصاصی بلاد آگار گوسفندی رشد خوبی داشتند (عدم رشد روی مک‌کانکی آگار) در تشخیص اولیه این جنس بررسی همولیز روی محیط بلاد آگار بود که کلنی را با لوپ برداشته و نور از آن عبور داده شد و محیط زیر و اطراف کلنی، مورد بررسی قرار گرفت. در نتیجه بررسی همولیز عبور نور از کف پلیت یا Transillumination مشاهده شد که همولیز فرایند پاره شدن گلبول‌های قرمز خون در اثر فعالیت آنزیمی یا سموم باکتریایی است. تخمیر گلوکز مثبت و تولید گاز و اکسیداز منفی بوده ودر دمای انکوباسیون ۲۴ تا ۳۵ درجه سلسیوس رشد داشت (Ryan & Ray, 2004).

جنس باکتری‌های گِرَم منفی شناسایی شده در لوله گوارش کرم غوزه پنبه

1- *Klebsiella*

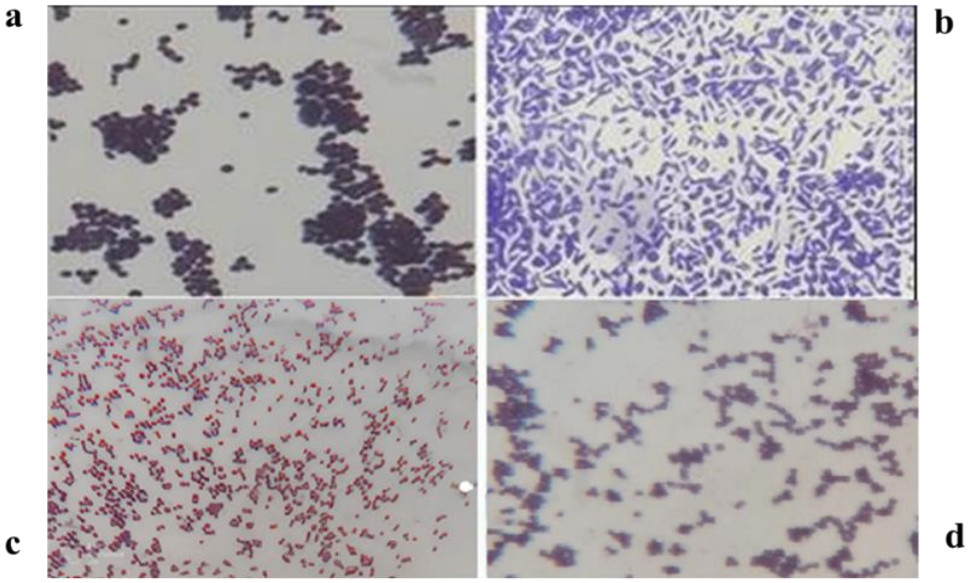
این جنس از خانواده انتروباکتریاسه است که در این خانواده تست اکسیداز منفی و کاتالاز مثبت می‌باشد. این جنس روی محیط کشت EMB به صورت کلنی صورتی رنگ (شکل ۳a، بالا) و در محیط MacConkey Agar کلنی‌های موکوییدی صورتی رنگ با مرکز کرم رنگ رشد کردند و در تشخیص میکروسکوپی به شکل کوکوباسیل‌های گِرَم منفی مشاهده شدند (شکل ۳a، پایین) و آزمون تخمیر لاکتوز، سیترات، کاتالاز و MR مثبت و تست اوره آز، VP TSI, و تست حرکت منفی بودند که وجه تمایز و افتراق این جنس از سایر جنس‌های انتروباکتریاسه بود.

2- *Enterobacter*

این جنس باکتری جز خانواده انتروباکتریاسه می‌باشد که روی همه محیط‌های استفاده شده رشد کرده و در محیط کشت مک‌کانیکی کلنی‌های شفاف و بی‌رنگ ایجاد می‌کند(شکل ۳b، بالا). یک باکتری گِرَم منفی میله‌ای شکل می‌باشد (شکل ۳b، پایین). آزمون اوره آز و MR و اکسیداز منفی داشت و آزمون لاکتوز و سیترات و کاتالاز و VP مثبت مشاهده شد. این باکتری دارای تولید گاز فراوان می‌باشد که از تخمیر گلوکز ایجاد می‌شود.

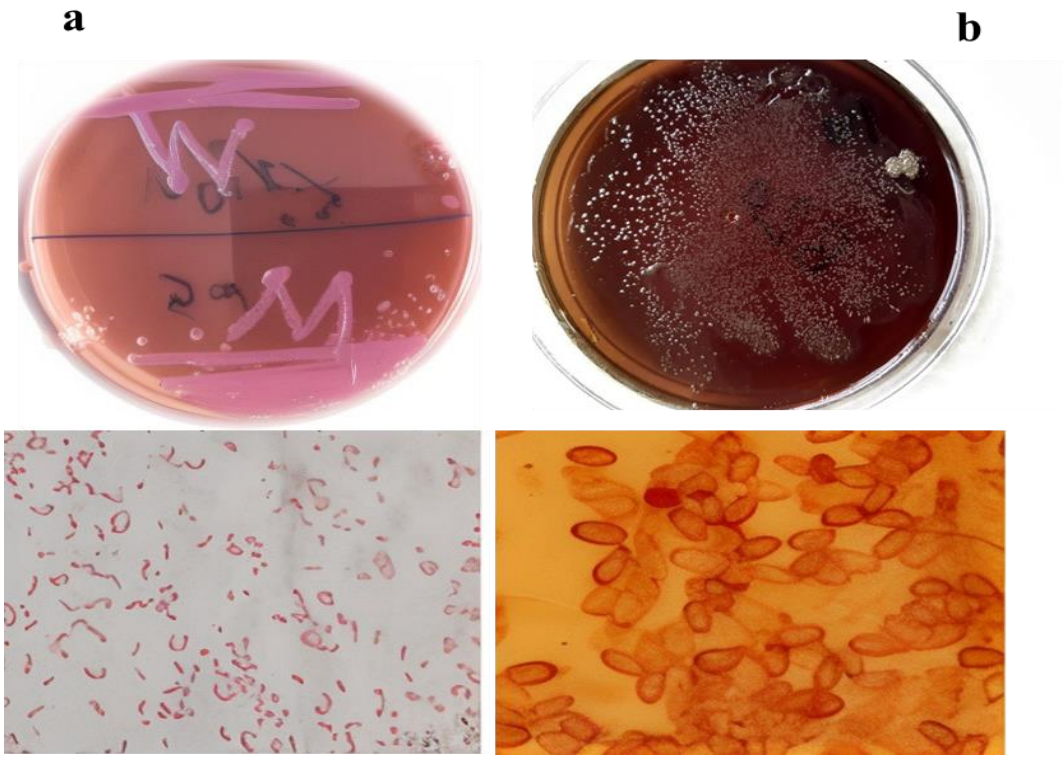
اثر قارچ *B. bassiana* بر تعداد کلنی باکتریایی در لاروهای تیمار شده

پس از شناسایی باکتری‌هایی که قابلیت کشت در محیط‌های رشد باکتری را داشتند، تعدادکلنی باکتریایی لوله گوارش لاروهای آلوده با قارچ *B. bassiana* به روش کشت آمیخته در محیط رشد، با استفاده از کلنی شمار شمارش شد و تعدادکلنی باکتریایی تیمار و شاهد با هم مقایسه گردید (شکل ۴). تعداد کلنی باکتری‌های لوله گوارش در لاروهای تیمار شده کاهش معنی‌داری نسبت به لاروهای شاهد نشان داد ($t_{29} = 8.76, P< 0.001$). همچنین انتقال فضولات دفعی لاروهای تیمار شده به محیط رشد باکتری، نشان دهنده رشد قابل ملاحظه کلنی‌های باکتریایی نسبت به فضولات لاروهای شاهد بود.



شکل ۲- تصویر میکروسکوپی باکتری‌های گِرَم مثبت جنس *Staphylococcus* (a) ، *Bacillus* (b)، *Enterococcus* (c) و *Streptococcus* (d) در لوله گوارش کرم غوزه پنبه.

Figure 2. Microscopical figures of Gram positive bacterial genus, *Staphylococcus* (a), *Bacillus* (b), *Enterococcus* (c) and *Streptococcus* (d) in *Helicoverpa armigera* gut



شکل ۳- تصویر ماکروسکوپی (بالا) و میکروسکوپی (پایین) باکتری‌های گِرَم منفی جنس *Klebsiella* (a) و *Enterobacter* (b) در لوله گوارش کرم غوزه پنبه

Figure 3. Macroscopical (above) and microscopical (below) figures of Gram negative bacterial genus *Klebsiella* (a) and *Enterobacter* (b) in *Helicoverpa armigera* gut.

جدول ۱- توصیف جنس باکتری‌های لوله گوارش کرم غوزه پنبه با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی

Table 1. Characterization of the bacterial genus in *H. armigera* larvae gut using biochemical tests

Test	*Staphylococcus*	*Bacillus*	*Enterococcus*	*Streptococcus*	*Klebsiella*	*Enterobacter*
Gram reaction	+	+	+	+	−	−
Shape	Cocci	Bacilli Rods	Cocci	Cocci	coccobacilli	Rods
Catalase	+	+	−	−	+	+
Oxidase	−	−	−	−	−	−
Simmon Citrate	0	0	0	0	+	+
Urease	±	−	+	−	±	−
Gas production in TSI	−	−	−	−	+	+
Mannitol assimilation	+	−	+	+	+	−
lactose	0	0	0	0	+	+
SIM	−	+	±	−	−	−
Glucose	−	−	−	+	0	0
Ves-Proskauer	−	+	−	+	−	+
NACL %6.5	−	−	+	−	0	0
Methyl Red	+	−	+	−	+	−
Grows on MacConkey Agar	−	−	−	−	+	+
Grows on EMB Agar	−	−	−	−	+	+
Grows on Blood Agar	+	+	+	+	+	+

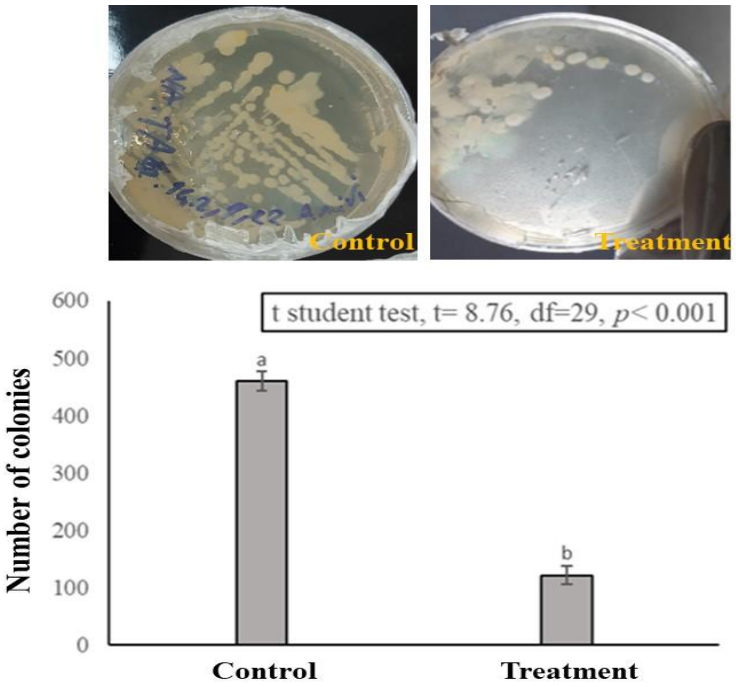
+: Test result is positive.; −: Test result is Negative.; ±: Test result is variable.; 0: Biochemical test was not required in these cases and was not performed.

+: نتیجه آزمون بیوشیمیایی مثبت، −: نتیجه آزمون بیوشیمیایی منفی، ± : نتیجه آزمون بیوشیمیایی بسته به جدایه متفاوت، 0 : آزمون بیوشیمیایی در این موارد لازم نبوده و انجام نشده است.

جدول۲- میزان شباهت جدایه‌های باکتریایی لوله گوارش کرم غوزه پنبه با نزدیک‌ترین گونهٔ (شماره دستیابی نزدیک‌ترین سویه) ثبت‌شده در پایگاه NCBI

Table 2. Similarity of bacterial isolates from the digestive tract of *H. armigera* with the closest species (accession number of the closest strain) registered in the NCBI database

Isolate row number	Genus of isolate	Closest bacterial strain	Similarity%	Access number of the nearest strain
1	*Enterococcus*	*Enterococcus casseliflavus T329*	100%	PX096437.1
2	*Enterococcus*	*Enterococcus sp.* HBUAS67745	100%	PV992053.1
3	*Enterococcus*	*Enterococcus faecium* YL462	99.3%	KY003112.1
4	*Staphylococcus*	*Staphylococcus aureus* S383	100%	PX287132.1
5	*Staphylococcus*	*Staphylococcus sp.* DST20	100%	KM405305.1
6	*Bacillus*	*Bacillus sp.* T33-2	100%	MH718307.1
7	*Bacillus*	*Bacillus sp.* OM4	100%	KJ528247.1
8	*Streptococcus*	*Streptococcus sanguinis* CEMTC_1382	100%	PV856539.1
9	*Enterobacter*	*Enterobacter sp.* Y16	100%	PX287136.1
10	*Klebsiella*	*Klebsiella sp.* Z3	100%	PX056940.1



شکل ٤- اثر قارچ *B. bassiana* (غلظت 10^6 کنیدی در میلی‌لیتر) بر تعداد کلنی باکتریایی در لوله گوارش لاروهای تیمار شده *Helicoverpa armigera*

Figure 4. Effect of *B. bassiana* fungus on bacterial colony count in treated *Helicoverpa armigera* larvae

بحث

حشرات تنوع و سازگاری بالایی با میکروب‌های همزیست دارند. میکروب‌ها نقش‌های مهمی در بسیاری از جنبه‌های زیست‌شناسی و فیزیولوژی حشرات، از قبیل هضم و جذب مواد مغذی، تقویت ایمنی و مقابله با دفاع گیاهان ایفا می‌کنند و می‌توانند مواد شیمیایی گیاهی و اگروکمیکال‌ها (حشره‌کش‌ها و علف‌کش‌ها) را متابولیزه کنند. (Zhao et al., 2022) باکتری‌ها همزیست فراوان‌ترین گونه‌های میکروارگانیسم در حشرات را تشکیل می‌دهند و عمدتا در لوله گوارش توزیع می‌شوند و در رشد، رفتار، ارتباط و سازگاری حشرات میزبان نقش دارند (Shao et al., 2017; Zheng et al., 2017).

تجزیه و تحلیل اکوسیستم‌های میکروبی لوله گوارش به دلیل ماهیت پیچیده جوامع باکتریایی پیچیده است. مطالعات اولیه عمدتا به تکنیک‌هایی متکی بودند که نیاز به کشت ارگانیسم‌ها در محیط‌های انتخابی داشتند. اگر چه مطالعاتی که از تکنیک‌های مبتنی بر کشت استفاده می‌کنند برای تجزیه و تحلیل گروه‌های خاصی از باکتری‌ها مفید بوده‌اند، اما برای بررسی اکوسیستم‌های باکتریایی لوله گوارش، محدودیت‌هایی دارند (Vaughan et al., 2000). در این مطالعه جامعه باکتریایی لوله گوارش لارو *H. armigera* با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و افتراقی شناسایی و اثر قارچ *B. bassiana* بر فراوانی باکتریایی لوله گوارش لارو بررسی شد. باکتری‌های قابل کشت از جمله جنس‌های *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus Enterococcus*, و *Klebsiella* در محیط رشد باکتری‌ها شناسایی شدند.

جامعه باکتریایی موجود در بخش میانی لوله گوارش لارو جمعیت مزرعه‌ای و آزمایشگاهی، کرم غوزه پنبه (*H. armigera*) بررسی شد، در این تحقیق لوله گوارش جمعیت آزمایشگاهی دارای یک میکروفلور نسبتاً ساده بود که عمدتاً از فیلوتیپ‌های متعلق به جنس *Enterococcus* (۸۴ درصد) تشکیل شده بود. برای جمعیت مزرعه‌ای، فیلوتیپ‌های متعلق به جنس‌های *Enterococcus* (۲۸ درصد) و *Lactococcus* (۱۱ درصد) و همچنین *Flavobacterium* (۱۰ درصد)، *Acinetobacter* (۱۹ درصد) و *Stenotrophomonas* (۱۰ درصد) اعضای غالب بودند. این نتایج اولین توصیف جامع از تنوع میکروبی بخش میانی لوله

گوارش کرم غوزه پنبه، آفت مهم، را ارائه داد و نشان داد که محیط و تأمین غذا ممکن است بر تنوع جامعه باکتریایی لوله گوارش تأثیر بگذارد (Xiang et al., 2006). باکتری‌های جنس *Enterobacter* و *Enterococcus* در این حشره عمومیت دارد و از کرم غوزه پنبه از محصولات مختلف، در سایر مناطق جهان گزارش شده است (Xiang et al., 2006; Gayatri Priya et al., 2012). با استفاده از تکنیک‌های کشت باکتری روی محیط رشد، گونه‌های *Bacillus firmus, Bacillus niabense, Paenibacillus jamilae, Cellulomonas variformis, Acinetobacter schindleri, Micrococcus yunnanesis, Enterobacter sp.,* و *Enterococcus cassiliflavus* در لاروهای سن پنجم *H. armigera* در نقاط مختلف هند از گیاهان میزبان گوناگون، جداسازی و شناسایی شد (Gayatri Priya et al., 2012). در بررسی باکتری‌های تجزیه‌کننده سلولز در لوله گوارش کرم غوزه پنبه، جنس *Klebsiella* به عنوان غالب‌ترین جنس شناخته شد. پس از *Klebsiella* ، بسیاری از گونه‌های *Enterobacter* و *Bacillus* به ترتیب به عنوان گروه‌های غالب در بخش جلویی و عقبی لوله گوارش مشاهده شدند. اما در این بررسی برخلاف مطالعات قبلی و از جمله بررسی انجام شده، لوله گوارش کرم غوزه پنبه فاقد باکتری‌های جنس *Enterococcus* بود (Dar et al., 2021). در بررسی دیگر جامعه باکتریایی لاروهای کرم غوزه پنبه مقاوم به سموم فسفره و پایروتروییید شامل *Bacillus pumulis, B. subtilis, Enterococcus casseliflavus, Rhodococcus sp., Pseudomonas sp., Staphylococcus sp* و *Pseudomonas aeruginosa* و در لاروهای جمعیت حساس شامل *Proteus vulgaris, Cellulosimicrobium cellulans, Klebsiella oxytoca, Bacillus subtilis, Stenotrophomonas maltophilia* و *Pseudomonas sp.* بوده است (Madhusudan et al., 2021).

گونه‌های *Enterococcus* اعضای رایج جوامع میکروبی لوله گوارش در حشرات و سایر حیوانات هستند (Reeson et al., 2003; Broderick et al., 2004). به نظر می‌رسد که جدایه‌های جنس *Enterococcus*، از جمله *Enterococcus avium*، ممکن است استات تولید کنند تا pH لوله گوارش میزبان را کاهش دهند. pH لوله گوارش هم برای حشرات و هم برای میکروب‌های لوله گوارش مهم است. کاهش pH لوله گوارش میزبان می‌تواند مزایایی را برای میزبان حشره ایجاد کند، زیرا برخی از سموم میکروبی در راسته بالپولکداران، مانند سم تولید شده بوسیله باکتری *B. thuringiensis*، در شرایط قلیایی فعال می‌شوند (Wilson & Benoit, 1993).

در مطالعه مشابه باکتری‌های *Klebsiella oxytoca* و *Bacillus spp* در دستگاه گوارش پروانه *Acrolepipsis assectella* شناسایی شدند. این باکتری‌ها در اثر عمل روی مولکول‌هایی که توسط حشرات از گیاهان دریافت می‌شوند، ترکیبات دی سولفید الکیلی فرار تولید می‌کنند که در ترکیبات دفعی پروانه دیده شده و به عنوان کایرمون در جلب پارازیتوید *Diadromus pulchellus* به طرف پروانه عمل می‌کنند (Thibout et al., 1995). باکتری‌های *Klebsiella pneumonia* و *Enterobacter cloacae* در لوله گوارش ملخ صحرایی می‌توانند از اسید وانیلیک مشتق شده از گیاه برای تولید guaiacol و فنول استفاده کنند که دو ترکیب اصلی برای ساخت فرومون تجمعی هستند (Dillon & Charnley, 2002). باکتری باسیلوس *Bacillus* جدا شده از لوله گوارش جنس نر *Bactrocera dorsalis* می‌تواند با استفاده از گلوکز و ترئونین به عنوان سوبسترا فرمون جنسی تولید کند (Ren et al., 2021). بررسی سوسک حنایی خرما نشان داد لوله گوارش لارو این حشره، شامل باکتری‌های متنوعی از جنس‌های *Kocuria*، *Serratia*، *Bacillus*، *Enterobacter* و *Shigella* بوده که قادر به تجزیه سلولز هستند (Basavand et al., 2024).

در بررسی حاضر اثر قارچ *B. bassiana* بر جامعه باکتریایی لوله گوارش لارو *H. armigera* بررسی شد و مشخص شد تعداد کلنی باکتری‌ها در لوله گوارش لاروهای تیمار شده کاهش معنی‌داری نسبت به لاروهای شاهد داشته و در عوض انتقال فضولات دفعی لاروهای تیمار شده به محیط رشد باکتری، نشان دهنده رشد قابل ملاحظه کلنی‌های باکتریایی بود که نشان می‌دهد حشره احتمالا به دلیل سموم

بیولوژیک مترشحه از قارچ و تخریب سلول‌های اپیتلیال بخش میانی لوله گوارش مقدار زیادی از این جامعه باکتریایی را طی اختلالات فیزیولوژیک ایجاد شده، دفع کرده است.

در بررسی جامعه باکتریایی لوله گوارش لاروهای *Spodoptera littoralis* حساس و مقاوم به سم *Bt Cry1c*، جنس‌های باکتریایی *Pantoea*، *Enterobacter*، *Bacillus*، *Staphylococcus*، *Citrobacter* و *Acinetobacter* بیشتر با جمعیت حساس همبستگی داشتند و جنس‌های *Enterococcus*، *Micrococcus* و *Clostridium* بیشتر با جمعیت مقاوم مرتبط بودند. افزایش باکتری‌های خانواده Enterococcaceae در جمعیت‌های مقاوم و حذف جنس‌های *Klebsiella* و *Serratia* از لوله گوارش این لاروها به نظر می‌رسد یک مکانیسم تطبیقی در جهت کاهش اثر سمیت سم *Bt* باشد. این نتایج به‌وضوح نشان می‌دهد میکروبیوتای لوله گوارش می‌تواند از طریق تغییرات کمی و کیفی، در شکل‌گیری یا تشدید مقاومت به حشره‌کش‌های میکروبی نقش داشته باشد و باعث تغییرات قابل‌توجه در پاسخ فیزیولوژیک میزبان شود (Abd El Aziz et al., 2024).

به دلیل منشأ قارچی، خواص ضد میکروبی مایکوتوکسین‌ها به محض خالص‌سازی این ترکیبات فرضیه‌سازی شد و اولین مطالعات آزمایشگاهی با آفلاتوکسین تأیید کرد که این سم می‌تواند رشد باکتری‌ها را مهار کند (Arai et al., 1967; Guerre, 2020). پاتولین، سیترینین، آلکالوئیدهای ارگوت و سایر مایکوتوکسین‌ها از نظر فعالیتشان علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی غربالگری شدند، اما استفاده از آنها به عنوان آنتی‌بیوتیک به دلیل سمیتشان توصیه نشده است (Bennett & Klich, 2003).

به علاوه، میکروبیوم لوله گوارش می‌تواند بر پاسخ ایمنی حشره میزبان تأثیر بگذارد، به‌طوری که در برخی موارد، حضور آن می‌تواند پاسخ ایمنی را تعدیل کرده و حشره را نسبت به عفونت ناشی از *B. bassiana* مقاوم‌تر یا حساس‌تر کند. بررسی لارو *Delia antiqua* نشان داده که جامعه باکتریایی مانع از عمل کنیدی‌های *B. bassiana* شده و پایداری میکروبیوم را در طول تهاجم این قارچ حفظ می‌کند (Zhou et al., 2021). از سوی دیگر، میکروبیوم لوله گوارش می‌تواند در افزایش بیماری‌زایی *B. bassiana* نیز نقش داشته باشد. آلودگی با این بیمارگر می‌تواند منجر به تغییراتی در ترکیب میکروبیوم لوله گوارش حشره شود که به دیسبیوزیس[۱] (عدم تعادل میکروبی) معروف است. این تغییرات اغلب شامل افزایش بار باکتریایی و کاهش تنوع میکروبی هستند. به علاوه، این قارچ ممکن است با تولید سمومی مانند اووسپورین[۲]، پاسخ‌های ایمنی لوله گوارش حشره (مانند تولید پپتیدهای ضد میکروبی و آنزیم‌های اکسیداز) را سرکوب کند. این سرکوب می‌تواند زمینه را برای انتقال باکتری‌های فرصت‌طلب از لوله گوارش به همولنف فراهم آورد و بیماری زایی قارچ را تقویت کنند. به طور خاص، عفونت قارچی باعث رشد بیش از حد و انتقال پاتوژن فرصت‌طلب *Serratia marcescens* از لوله گوارش به حفره عمومی بدن در پشه *Anopheles stephensi* شده و در نتیجه مرگ را افزایش می‌دهد (Wei et al., 2017). وضعیت مشابهی در *Lymantria dispar asiatica* مشاهده شده است و انتقال میکروبیوم لوله گوارش شامل *Enterococcus*، *Pseudomonas*، *Enterobacter* و *Microbacterium* به حفره عمومی بدن، نقش بسزایی در افزایش حساسیت لارو این حشره به قارچ بیماری‌زای *B. bassiana* داشته است. این تعامل هم‌افزا میان میکروبیوتای لوله گوارش و قارچ پاتوژن می‌تواند به‌عنوان هدفی بالقوه در توسعه استراتژی‌های نوین برای کنترل زیستی آفات مدنظر قرار گیرد (Bai et al., 2023).

نتیجه‌گیری

میکرو ارگانیسم‌های همزیست لوله گوارش حشرات نقش مهمی در رشد، توسعه و سازگاری محیطی میزبان ایفا می‌کنند. مطالعه و شناسایی میکروارگانیسم‌های همزیست حشرات و اختلال در این رابطه، در بررسی فیزیولوژی و

[۱] dysbiosis

[۲] oosporein

مدیریت آفت دارای اهمیت بسزایی می‌باشد. نتایج این تحقیق درک ما را از نقش تعاملی جامعه باکتریایی و عوامل بیماری‌زا در حفظ و پایداری جامعه باکتریایی عمیق‌تر خواهد کرد. این یافته‌ها همچنین ممکن است به توسعه عوامل کنترل بیولوژیک جدید و استراتژی‌های مدیریت آفات کمک کنند. تجزیه و تحلیل عملکردی بیشتر، از جمله جداسازی، شناسایی و تجزیه و تحلیل متابولیک و ژنتیکی جامعه میکروبی لوله گوارش از جمله باکتری‌های غیرقابل کشت روی محیط رشد و تاثیر عوامل بیمارگر بر تنوع و فراوانی جامعه باکتریایی لارو این حشره از اهداف بعدی بررسی است.

سپاس‌گزاری

این پژوهش به‌وسیله دانشگاه زابل حمایت مالی (Grant No 0084) و معنوی شده است که تقدیر و تشکر می‌شود.

REFERENCES

Abd El Aziz, A., Moussa, S., Yassin, M. T., El Husseiny, I., & El Kholy, S. (2024). Biochemical and molecular analysis of gut microbial changes in *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) to counteract Cry1c toxicity. *Microbiology Research*, *15*(2), 943-961. https://doi.org/10.3390/microbiolres15020062

Arai, T., Ito, T. & Koyama, Y. (1967). Antimicrobial activity of aflatoxins. *Journal of Bacteriology*, *93*(1), 59–64. https://doi.org/10.1128/jb.93.1.59-64.1967

Bagheri, N., Mohammadi Sharif, M. & Golmohammadi, G. (2021). Comparing the efficacy of some chemical and non-chemical insecticides for control of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) under cotton field conditions. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, *44*(3), 135-141. https://doi.org/10.22055/ppr.2021.17132

Bai, J., Xu, Z., Li, L., Zhang, Y., Diao, J., Cao, J., Xu, L. & Ma, L. (2023). Gut bacterial microbiota of *Lymantria dispar asiatica* and its involvement in *Beauveria bassiana* infection. *Journal of Invertebrate Pathology 197*, 107897. https://doi.org/10.1016/j.jip.2023.107897

Basavand, F., Khani, A., Yaghubi, S., Najimi, M. & Sahebzadeh, N. (2024) Investigation on Gut Microbiota Diversity of *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera: Curculionidae) Larvae. *Biology bulletin of the Russian Academy of Sciences 51*(2), 294–301. https://doi.org/10.1134/S106235902360352X

Bennett, J. W. & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, *16*(3), 497–516. https://doi.org/10.1128/cmr.16.3.497-516.2003

Boucias, D. G., Zhou, Y. H., Huang, S. S. & Keyhani, N. O. (2018). Microbiota in insect fungal pathology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*, 5873–5888. https://doi.org/10.1007/s00253-018-9089-z

Breznak, J. A. & Switzer, J. M. (1986). Acetate synthesis from H_2 plus CO_2 by termite gut microbes. *Applied and Environmental Microbiology*, *52*, 623–630. https://doi.org/10.1128/aem.52.4.623-630.1986

Broderick, N. A., Raffa, K. F., Goodman, R. M. & Handelsman, J. (2004). Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*, 293–300. https://doi.org/10.1128/AEM.70.1.293-300.2004

Butt, T. M. & Goettel, M. S. (2000). Bioassays of entomogenous fungi. In: Navon, A. & Ascher, K. R. S., Eds., Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes, CAB International, Wallingford, UK, 141-195. http://doi.org/10.1079/9780851994222.0141

Chen, D. Q. & Purcell, A. H. (1997). Occurrence and transmission of facultative endosymbionts in aphids. *Current Microbiology*, *34*, 220–225. http://doi.org/10.1007/s002849900172

Dar, M. A., Shaikh, A. F., Pawar, K. D., Xie, R., Sun, J., Kandasamy, S. & Pandit, R. S. (2021). Evaluation of cellulose degrading bacteria isolated from the gut-system of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* and their potential values in biomass conversion. *PeerJ*, 9: e11254. http://doi.org/10.7717/peerj.11254

Delalibera, I., Handelsman, J. & Raffa, K. F. (2005). Contrastsin cellulolytic activities of gut microorganisms between the wood borer, *Saperda vestita* (Coleoptera: Cerambycidae), and the bark beetles, *Ips pini* and *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Curculionidae). *Environmental Entomology*, *34*(3), 541-547. https://doi.org/10.1603/0046-225X-34.3.541

Dillon, R. & Charnley, K. (2002). Mutualism between the desert locust *Schistocerca gregaria* and its gut microbiota. *Research in Microbiology*, *153*(8), 503-509. https://doi.org/10.1016/s0923-2508(02)01361-x

Ebrahimifar, J., Jamshidnia, A. & Sadeghi, R. (2017). Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on elm leaf beetle, *Xanthogaleruca luteola* Muller (Col., Chrysomelidae). *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, *40*(2), 23-32. https://doi.org/10.22055/ppr.2017.12833

Edgar, R. (2013). UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods*, 10, 996–998. https://doi.org/10.1038/nmeth.2604

Holding, A. J. & Collee, J. G. (1971). Routine biochemical tests. In: Norris, J. R. & Ribbons, D. W., Eds., Methods in microbiology, Vol. 6, Cambridge, Massachusetts, Academic Press, p. 1–32. https://doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70573

Gayatri Priya, N., Ojha, A., Kajla, M. K., Raj, A. & Rajagopal, R (2012). Host plant induced variation in gut bacteria of *Helicoverpa armigera*. *PLoS ONE*, *7*(1): e30768 https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030768

Gomes, A. F. F., Omoto, C. & Cônsoli, F. L. (2020). Gut bacteria of field-collected larvae of *Spodoptera frugiperda* undergo selection and are more diverse and active in metabolizing multiple insecticides than laboratory-selected resistant strains. *Journal of Pest Science*, *93*, 833–851. https://doi.org/10.1007/s10340-020-01202-0

Guerre, P. (2020). Mycotoxin and gut microbiota interactions. *Toxins*, *12*(12), 769. https://doi.org/10.3390/toxins12120769

Gupta, P., Samant, K. & Sahu, A. (2012). Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential. *International Journal of Microbiology*, *2012*, Article ID 578925, 5 pages. https://doi.org/10.1155/2012/578925

Indiragandhi, P., Anandha, R., Madhaiyan, M. & Sa, T. M. (2008). Characterization of plant growth-promoting traits of bacteria isolated from larval guts of diamondback moth *Plutella*

xylostella (Lepidoptera: Plutellidae). *Current Microbiology*, *56*(4), 327–333. https://doi.org/10.1007/s00284-007-9086-4

Kohlerschmidt, D. J., Mingle, L. A., Dumas, N. B. & Nattanmai, G. (2021). Identification of aerobic gram-negative bacteria. In: Green, L. H & Goldman, E., Eds., Practical handbook of microbiology, 4th Edition, Boca Raton, CRC Press, p. 59–70. https://doi.org/10.1201/9781003099277

Kryukov, V. Y., Rotskaya, U, Yaroslavtseva, O., Polenogova, O., Kryukova, N., Akhanaev, Y., Krivopalov, A., Alikina, T., Vorontsova, Y. L., Slepneva, I., Kabilov, M. & Glupov, V. V. (2021). Fungus *Metarhizium robertsii* and neurotoxic insecticide affect gut immunity and microbiota in Colorado potato beetles. *Scientific Reports*, *11*(1), Article number 1299. https://doi.org/10.1038/s41598-020-80565-x

Kuhnigk, T. & König, H. (1997). Degradation of dimeric lignin model compounds by aerobic bacteria isolated from the hindgut of xylophagous termites. *Journal of Basic Microbiology*, *37*(3), 205-211. https://doi.org/10.1002/jobm.3620370309

Madhusudan, S., Jalali, S. K. & Sibi, G. (2021). Molecular identification of insecticide degradation by gut bacteria isolated from *Helicoverpa armigera* of Cotton plants. *Journal of Applied and Natural Science*, *13*(2), 641-653. https://doi.org/10.31018/jans.v13i2.2678

Moghassem, M., Jamshidi, M., Khakvar, R. & Nematollahi, S. (2023). Assessing the Virulence of Iranian entomopathogenic fungi isolates in control of *Ephestia kuehniella* (Lep: Pyralidae) (Zeller). *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, *46*(2), 73-86. https://doi.org/10.22055/ppr.2023.42895.1676

Mondal, S., Somani, J., Roy, S., Babu, A. & Pandey, A. K. (2023). Insect microbial symbionts: Ecology, interactions, and biological significance. *Microorganisms*, *11*(11), 2665. https://doi.org/10.3390/microorganisms11112665

Pardo, S. S. & Almeida, R. P. P. (2009). Role of symbiotic gut bacteria in the development of *Acrosternum hilare* and *Murgantia histrionica* (Hemiptera: Pentatomidae). *Entomological Experimental et Applica*, *132*(1), 21–29. https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2009.00863.x

Powers, E. M. & Latt, T. G. (1977). Simplified 48-hour IMVic test: an agar plate method. *Applied and environmental microbiology*, *34*(3), 274–279. https://doi.org/10.1128/aem.34.3.274-279.1977

Quinn, P. J., Carter, M. E., Markey, B. & Carter, G. R. (1994). Clinical, Veterinary, Microbiology. Wolf Press, Spain. 648pp.

Reeson, A. F., Jankovic, T., Kasper, M. L., Rogers, S. & Austin, A. D. (2003). Application of 16S rDNA-DGGE to examine the microbial ecology associated with a social wasp *Vespula germanica*. Insect. *Molecular Biology*, *12*(1), 85–91. https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.2003.00390.x

Ren, L., Ma, Y., Xie, M., Lu, Y. & Cheng, D. (2021). Rectal bacteria produce sex pheromones in the male oriental fruit fly. *Current Biology*, *31*(10), 2220-2226. https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.02.046

Ryan, K. J. & Ray, C. G. (2004). Sherris Medical Microbiology. 4th Edition, McGraw-Hill, New York.

Shao, Y., Chen, B., Sun, C., Ishida, K., Hertweck, C. & Boland, W. (2017). Symbiont-derived antimicrobials contribute to the control of the lepidopteran gut microbiota. *Cell Chemical Biology*, *24*(1), 66-75. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.11.015

Sharma, H. C., Pampapathy, G., Dhillon, M. K. & Ridsdill-Smith, J. T. (2005). Detached leaf assay to screen for host plant resistance to *Helicoverpa armigera*. *Journal of Economic Entomology*, *98*(2), 568-576. https://doi.org/ 10.1093/jee/98.2.568

Shields, P. & Tsang, A. Y. (2006). Mannitol salt agar plates protocols. Available from MicrobeLibrary website http//www.microbelibrary.org/library/laboratory-test/3034-mannitol-salt-agar-plates-protocols.

Shin, S. C., Kim, S. H., You, H., Kim, B., Kim, A. C., Lee, K. A., Yoon, J. H., Ryu, J. H. & Lee, W. J. (2011). *Drosophila* microbiome modulates host developmental and metabolic homeostasis via insulin signaling. *Science*, *334*(6065), 670–674. https://doi.org/10.1126/science.1212782

Sudakaran, S., Salem, H., Kost, C. & Kaltenpoth, M. (2012). Geographical and ecological stability of the symbiotic mid-gut microbiota in European firebugs, *Pyrrhocoris apterus* (Hemiptera, Pyrrhocoridae). *Molecular Ecology*, *21*(24), 6134–6151. https://doi.org/10.1111/mec.12027

Thibout, E., Guillot, J. F., Ferary, S., Limouzin, P. & Auger, J. (1995). Origin and identification of bacteria which produce kairomones in the frass of *Acrolepiopsis assectella* (Lep., Hyponomeutoidea). *Experientia*, *51*(11), 1073–1075. https://doi.org/10.1007/BF01946919

Tittsler, R. P. & Sandholzer, L. A. (1936). The use of semi-solid agar for the detection of bacterial motility. *Journal of Bacteriology*, *31*(6), 575-580. https://doi.org/10.1128/jb.31.6.575-580.1936

van den Bosch, T. J. M. & Welte, C. U. (2017). Detoxifying symbionts in agriculturally important pest insects. *Microbial Biotechnology*, *10*(3), 531–540. https://doi.org/10.1111/1751-7915.12483

Vaughan, E. E., Schut, F., Heilig, H. G., Zoetendal, E. G., de Vos, W. M. & Akkermans, A. D. (2000). A molecular view of the intestinal ecosystem. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, *1*(1), 1–12. PMID: 11709849

Visotto, L. E., Oliveira, M. G. A., Guedes, R. N. C., Ribon, A. O. B. & Good-God, P. I. V. (2009). Contribution of gut bacteria to digestion and development of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. *Journal of Insect Physiology*, *55*(3), 185–191. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.10.017

Warnecke, F., Luginbu, P., Ivanova, N., Ghassemian, M., Richardson, T. H., Stege, J. T. & et al. (2007). Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of awood-feeding higher termite. *Nature*, *450*, 560–565. https://doi.org/10.1038/nature06269

Wei, G., Lai, Y., Wang, G., Chen, H., Li, F. & Wang, S. (2017). Insect pathogenic fungus interacts with the gut microbiota to accelerate mosquito mortality. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America, *114*(23), 5994-5999. https://doi.org/10.1073/pnas.1703546114

Wilkinson, T. L. (1998). The elimination of intracellular microorganisms from insects: an analysis of antibiotic-treatment in the pea aphid (*Acyrthosiphon pisum*). *Comparative Biochemistry and Physiology* Part A, *119*, 871–881. https://doi.org/10.1016/S1095-6433(98)00013-0

Wilson, G. R. & Benoit, T. G. (1993). Alkaline pH activated *Bacillus thuringiensis* spores. *Journal of Invertebrate Pathology*, *62*, 87–89. https://doi.org/10.1006/jipa.1993.1079

Xiang, H., Wei, G. F., Jia, S., Huang, J., Miao, X. X., Zhou, Z., Zhao, L. P., Huang, Y. P. (2006). Microbial communities in the larval midgut of laboratory and field populations of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*). *Canadian Journal of Microbiology*, *52*(11), 1085-1092. https://doi.org/10.1139/w06-064

Wu, W., Shan, H. W., Li, J. M., Zhang, C. X., Chen, J. P. & Mao, Q. (2022). Roles of bacterial symbionts in transmission of plant virus by Hemipteran vectors. *Frontiers in Microbiology*, *13*: 805352. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.805352

Zhao, M., Lin, X. & Guo, X. (2022). The role of insect symbiotic bacteria in metabolizing phytochemicals and agrochemicals. *Insects*, *13*(7), 583. https://doi.org/10.3390/insects13070583

Zheng, H., Powell, J. E., Steele, M. I., Dietrich, C. & Moran, N. A. (2017). Honeybee gut microbiota promotes host weight gain via bacterial metabolism and hormonal signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(18), 4775-4780. https://doi.org/10.1073/pnas.1701819114

Zhou, F., Gao, Y., Liu, M., Xu, L., Wu, X., Zhao, X., & Zhang, X. (2021). Bacterial inhibition on *Beauveria bassiana* contributes to microbiota stability in *Delia antiqua*. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 710800. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.710800

© 2026 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/.