آفات و بیماریهای گیاهی
جلد ۷۱، شماره ۲، اسفند ۱۳۸۲

مقایسه چند روش مختلف برای ردیابی و تعیین میزان بتاگزوتوکسین در فرآورده‌های باکتری *Bacillus thuringiensis*

Comparison of several methods for detection and quantification of ß- exotoxin in commercial *Bacillus thuringiensis* products

رسول مرزبان و محمدرضا تاجبخش
موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی
(تاریخ دریافت : فروردین ۸۲ تاریخ پذیرش : اسفند ۸۲)

چکیده

تعدادی از استرین‌های باکتری *B. thuringiensis* در زمان رشد و تکثیر تولید بتاگزوتوکسین می‌کنند. این توکسین برای همه موجودات زنده از جمله انسان سمی و خطرناک بوده و در برخی کشورها وجود آن در فرآورده‌های تجاری ممنوع می‌باشد. به دو روش HPLC[1] و زیست سنجی، بتاگزوتوکسین در فرآورده B.t.H ردیابی گردید. نتایج حاکی از آن است که زیست سنجی غلظت‌های مختلف فاز مایع بالایی حرارت داده شده فرآورده B.t.H روی لارو سن دو *Helicoverpa armigera*، *Galleria melonella* و *Ephestia kuhniella* در سطح ۱٪ تفاوت معنی دار با شاهد دارند. نتایج تست HPLC نشان داد که پیک بتاگزوتوکسین خالص به عنوان استاندارد و پیک نمونه BtH از نظر زمان بازداری یکسان می‌باشند. دلایل فوق همگی حکایت از وجود بتاگزوتوکسین به مقدار ppm825 در فرآورده B.t.H با ماده مؤثره *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* دارد.

1. High Performance Liquid Chromatography

روش زیست سنجی در مقایسه با کروماتوگرافی HPLC دقت بیشتری در ردیابی بتاگزوتوکسین نشان داد که می‌تواند ابزار مناسبی برای ردیابی بتاگزوتوکسین و کنترل کیفی فرآورده‌های باکتری *B. thuringiensis* باشد.

واژه‌های کلیدی: فرآورده B.t.H ، بتاگزوتوکسین، ردیابی، HPLC ، زیست سنجی، *Bacillus thuringiensis* subsps. *aizawai*

مقدمه

بر اساس قوانین و مقررات ثبت آفت‌کش‌های میکروبی سازمان حفاظت محیط زیست[1]، فرآورده‌های بیولوژیک بر اساس باکتری *B. thuringiensis* Ber بایستی فاقد بتاگزوتوکسین باشند. بتاگزوتوکسین که تورینژینسین (thuringiensin) و توکسین مقاوم به حرارت نیز نامیده می‌شود یک آنالوگ نوکلئوتیدی آدنین است که به صورت ترکیبی با قندهای ریبوز و گلوکز می‌باشد. این توکسین به دلیل جلوگیری از رونویسی DNA توسط آنزیم RNA پلیمراز مانع سنتز RNA شده و در نتیجه فرآیند تولید پروتئین را در سلول مختل می‌کند (Taborsky,1992). بتاگزوتوکسین در بافت‌های کلیه و جگر برخی پستانداران صدمات زیادی وارد می کند و همچنین مشکوک به موتاسیونزایی است (Meretoja et al., 1977). مک‌کانل و ریچاردز (McConnell and Richards, 1959) برای اولین بار در محیط کشت *B. thuringiensis* بتاگزوتوکسین را ردیابی کردند. باند و همکاران (Bond et al., 1969) موفق شدند از زیرگونه Berliner، بتاگزوتوکسین را به صورت خالص جداسازی کنند و نشان دهند که مشتق نوکلئوتیدی آدنین می‌باشد و وزن مولکولی در حدود ۸۲۵ کیلو دالتون دارد. کدری و همکاران (Qadri et al., 1989) اگزوتوکسین حاصل از کشت *B.thuringiensis* را روی لارو *Musca domestica* تست کردند، نتایج نشان داد که LD50 آن روی لارو سن یک ۰/۰٤ µg/g است.

همچنین اگزوتوکسین خالص را روی *Aedes aegypti* و *M. domestica* تست کردند

1. Environmental Protection Agency (EPA)

که مشاهده شد سم مذکور برای لاروهای سن ۱ و ٤ *A. aegypti* و برای لارو سن سه *M. domestica* سمی و کشنده است. هوفر و همکاران (Haufer et al., 1985) اگزوتوکسین حاصل از زیرگونه *morrisoni* را روی لارو *Haematobia irrta* آزمایش کردند که میزان مرگ و میر برای لارو حشره در غلظت‌های ۱، ۳ و ۵ میکروگرم در ماده غذایی به ترتیب ۱۲/۸، ٤٤/٦ و ۸۱/۵ درصد بود. لوینسون و همکاران (Levinson et al., 1990) روش تغییر یافته HPLC را برای آشکارسازی و تعیین کمیت بتاگزوتوکسین، حاصل از فاز بالای بدست آمده از سانتریفوژ محیط کشت باکتری استفاده کردند و توانستند نوع جدیدی از بتاگزوتوکسین را از زیرگونه *morrisoni* جداسازی کنند، که روی سوسک کلرادو سیب زمینی خاصیت کشندگی نشان داد. گوهار و پرشات (Gohar and Perchat, 2001) و هرناندز و همکاران (Hernandez et al., 2001) نیز روش HPLC را برای ردیابی بتاگزوتوکسین پیشنهاد کرده‌اند. بخیت و همکاران (Bekheit et al., 1993) روش الیزا[1] را برای ردیابی و تعیین میزان بتاگزوتوکسین در فرآورده های *B. thuringiensis* گزارش و دریافتند که روش الیزا قادر است سطح پایین بتاگزوتوکسین حدود ۰/۱ ng/ml را ردیابی کند و حساسیت آن بیشتر از روش HPLC است. کارلو و همکاران (Carlo et al., 1987) بتاگزوتوکسین جدا شده از محیط کشت *B. thuringiensis* را روی مگس خانگی تست نمودند. نتایج نشان داد که سمیت آن برای مرحله شفیرگی (۵ روزه)، ۸۵/۵ میکروگرم بر میلی لیتر و برای بالغ ها ۰/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر محیط غذایی است. کالبرگ و همکاران (Carlberg et al., 1995) دو سروتایپ *B.thuringiensis* را که یکی از آنها بدون بتاگزوتوکسین و دیگری دارای بتاگزوتوکسین بود روی سالمونلا آزمایش کردند و نتایج نشان داد که هیچ کدام از آنها اثر موتاسیونزایی بر سالمونلا نداشت. پرانی و همکاران (Perani *et al.*, 1998) جدایه‌های جدید را از نظر وجود بتاگزوتوکسین آزمایش و مشاهده کردند که ۵۸٪ جدایه‌ها دارای بتاگزوتوکسین هستند. اسپیناس و همکاران (Espinasse *et al*, 2002) با مطالعه ٦٤۰ جدایه طبیعی نشان دادند که ژنهای عامل بتاگزوتوکسین روی همان پلاسمیدهای حامل ژنهای Cry هستند.

---

1. Elisa

هدف از این تحقیق مقایسه دو روش ردیابی بتاگزوتوکسین در فرآورده‌های *B.thuringiensis* است تا بتوان مناسب ترین روش را انتخاب و به کار گرفت.

روش بررسی

تهیه سوپرناتانت[1]

برای جداسازی و خالص‌سازی بتاگزوتوکسین، بر اساس روش اوهبا و همکاران (Ohba et al.,1981) ۲/۸ گرم از پودر فرآورده BtH با ماده مؤثره *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* شرکت تلفیق دانه را در یک لیتر آب مقطر استریل مخلوط و به مدت ۲ ساعت با شیکر دور rpm200 بهم زده شده، سپس با سرعت rpm3000 به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ گردید، فاز مایع بالایی بدست آمده را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتی گراد اتوکلاو نموده آنگاه برای صاف شدن و خلوص بیشتر مجدداً فاز مایع بالایی مذکور سانتریفوژ شد. به کمک تبخیر کننده حجم فاز مایع به ml60 تغلیظ گردید.

اندازه گیری با HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

برای انجام این آزمایش ابتدا از نمونه استاندارد بتاگزوتوکسین(انستیتو پاستور فرانسه)، محلول استاندارد مادر با غلظت 100 ppm تهیه گردید. سپس محلول‌های استاندارد رقیقتر (ppm5، ppm 10، ppm 20 و ppm 30) از محلول فوق با استفاده از بافر M KH2PO4, PH3۵۰ بدست آمد (Levinson et al., 1990). شرایط دستگاه HPLC بشرح زیر بوده است:

HPLC: Model 4110	فاز متحرک
Detector: UV: 260nm	حجم تزریق
ODSI (C18)	نوع ستون
25 cm	طول ستون
/46 cm	قطر ستون

50 M KH2PO4 PH3
rate: 2ml/m
100 ml

1. Supernatant

دستگاه HPLC با غلظت‌های استاندارد ساخته شده در چند مرحله کالیبره گردید و پس از حصول نتیجه، جهت مقایسه با پیک فاز مایع بالایی حرارت داده شده BtH، غلظت ppm20 بتااگزوتوکسین خالص که از هر لحاظ مناسب بود استفاده گردید.

فاز مایع بالایی BtH که به ml60 تغلیظ شده بود به تدریج با محلول بافر M ۵۰ KH2PO4 تا ۲۵ بار رقیق گردید تا قابل تجزیه بوسیله دستگاه HPLC باشد. محلول رقیق شده قبل از آنالیز با استفاده از فیلتر نایلونی m45/ صاف گردید. و سپس به ستون دستگاه HPLC تزریق و فراکشن[1] حاصل جمع‌آوری شد.

جهت اطمینان از اینکه پیک شناسایی شده در فاز مایع بالایی BtH همان پیک بتااگزوتوکسین می‌باشد فاز مایع BtH و بتااگزوتوکسین خالص ترکیب و محلول بدست آمده به ستون HPLC تزریق و نتایج جمع‌آوری گردید.

آزمایش زیست سنجی

زیست سنجی بر اساس روش لوینسون و همکاران (Levinson et al., 1990) با کمی‌تغییر استفاده شد. آزمایشات زیست سنجی روی لاروهای سن دو کرم قوزه پنبه (*Helicoverpa armigera*) و لاروهای بیدآرد (*Ephestia kuhniella*) و پروانه موم‌خوار (*Galleria melonella*) انجام گردید.

برای این کار فاز مایع عاری از کریستال و اسپور فرآورده BtH بر اساس روش اوهبا وهمکاران (Ohba *et al.*, 1981) تهیه شد (تغلیظ نشده)، سپس غلظت‌های مختلف فاز مایع BtH شامل 5) x5 برابر دز مصرفی در مزرعه)، x10، x25، x50 تهیه و اگزوتوکسین خالص (استاندارد) بعنوان کنترل مثبت و شاهد به عنوان کنترل منفی بکار برده شدند. که برای این کار ml3 از هر غلظت با ۱۰ گرم ماده غذایی مخلوط شد. زیست سنجی به صورت انفرادی در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تیمار در سه تکرار انجام گرفت، به این صورت که یک گرم

---

1. Fraction

ماده غذایی تیمار شده در داخل قوطی فیلم قرار داده و یک عدد لارو سن دو به قوطی اضافه گردید برای هرتیمار از ۱۰ لارو سن دو استفاده شد. بعد از یک هفته مرگ ومیر لاروها ثبت گردید.

نتیجه و بحث

زمان بازداری استاندارد ppm20 بتاگزوتوکسین خالص ۱۲/۸٤ دقیقه تعیین شد و پیک نمونه B.t.H 73/12 دقیقه تعیین گردید (شکل۱). جهت اطمینان از اینکه پیک نمونه B.t.H همان پیک بتاگزوتوکسین خالص است ملاحظه شد که با اضافه کردن بتاگزوتوکسین خالص به نمونه BtH تنها پیک ۱۲/۷٤ بزرگتر شده و بقیه پیک‌های اضافی نمونه بدلیل رقیقتر شدن محلول کوچکتر شده‌اند (شکل۱) و این مسئله تأیید کننده وجود بتا اگزوتوکسین در نمونه BtH بر اساس ماده موثره *B.thuringiensis* subsp. *aizawai* است. طبق کروماتوگرام‌های حاصل شده غلظت بتاگزوتوکسین در نمونه BtH رقیق شده (به میزان ۵۵ بار)حدوداً 15 ppm بدست آمد که در حجم 2 ml تغلیظ شده ppm825 می‌باشد.

تجزیه واریانس تلفات چهار غلظت فاز مایع اتوکلاو شده BtH و دو شاهد مثبت ومنفی در تست زیست سنجی روی لارو سن دو، سه گونه حشره نشانگر تفاوت معنی دار در سطح ۱٪ بود (P<۰/۰۱ ، F>202 ، df۵=). در مقایسه میانگین درصد تلفات فاز مایع BtH و تیمارهای شاهد با آزمون دانکن غیر از گونه *G.melonella* بین چهار غلظت فاز مایع فرآورده با شاهد (کنترل منفی) در سطح ۱٪ تفاوت معنی دار وجود داشت (جدول۱) به عبارت دیگر بایستی عامل کشنده‌ای غیر از اسپور و کریستال *B.thuringiensis* در فرآورده باشد که به حرارت نیز مقاوم است. همچنین مشاهده می‌شود که با افزایش غلظت فاز مایع بر تلفات لاروها افزوده شده است و بین افزایش غلظت فاز مایع با افزایش درصد تلفات لاروها ارتباط مستقیم وجود دارد. در روش زیست سنجی حشرات راسته Diptera بعنوان حساس‌ترین راسته حشرات به بتاگزوتوکسین معرفی شده‌اند (Qadri et al., 1989). که در این آزمایش عکس العمل لاروهای کرم قوزه پنبه و بید آرد در پایین ترین دز(x5) با شاهد تفاوت معنی دار نشان داده‌اند لذا می‌توانند به‌عنوان حشرات حساس به بتاگزوتوکسین در زیست سنجی استفاده شوند. نتایج حاصل از تست زیست سنجی و HPLC تائید کننده قطعی وجود بتاگزوتوکسین

در فرآورده BtH است. برای ردیابی بتاگزوتوکسین در فرآورده‌های تجاری *B.thuringiensis* توصیه می‌شود از هر دو روش زیست سنجی و HPLC به عنوان مکمل هم استفاده شود هر چند روش زیست سنجی روشی طولانی و ملال‌آور است اما از لحاظ دقت، کارایی بیشتری نسبت به HPLC دارد که این مسئله توسط لوینسون و همکاران (Levinson et al., 1990) نیز بیان شده است، اما HPLC می‌تواند ما را نسبت به اینکه عامل کشنده در زیست سنجی بتاگزوتوکسین بوده است مطمئن سازد و علاوه بر این می‌تواند میزان بتاگزوتوکسین را در فرآورده برآورد نماید. مک کلینتوک و همکاران (McClintock et al., 1995) معتقدند که فرآورده‌های *B.thuringiensis* بایستی عاری از بتاگزوتوکسین باشند و از استرین‌هایی استفاده شود که توانایی تولید بتاگزوتوکسین نداشته باشند. البته بخیت و همکاران (Bekheit et al., 1993) نشان دادند که محیط غذایی هم می‌تواند در تولید بتاگزوتوکسن مؤثر باشد. غیر از کشورهای بلوک شرق در سایر کشورها عاری بودن فرآوردهای *B.thuringiensis* از بتاگزوتوکسین الزام‌آور است. اضافه می‌نماید که مادهٔ مؤثره این فرآورده به انستیتو پاستور فرانسه ارسال و توسط Papierok، باکتری *B. thuringiensis subsp. aizawai* تشخیص داده شد.

جدول ۱- مقایسه میانگین درصد تلفات فاز مایع بالایی حرارت داده شده BtH و تیمارهای شاهد روی لارو سن دو، سه گونه بال پولکدار.

Table1: Comparison %mortality average autoclaved supernatant of BtH and controls on the second stage larvae of three Lepidoptera.

خطای معیار ± میانگین درصد تلفات			
H. armigera	E. kuhniela	G. melonella	تیمار
11 ± 1 d	10 ± 1.15 d	10 ± 1.15 de	[1]5x
12 ± 1.15 d	18 ± 1.52 c	17 ± 0.58 cd	10x
19 ± 1 c	20 ±. 57 c	27 ± 1.15 c	25x
59 ± 1 b	55 ± 1.53 b	50 ± 5.13 b	50x
95 ± 1.15 a	91 ± 2.08 a	93 ± 2.08 a	بتاگزوتوکسین استاندارد [2] (کنترل مثبت)
3 ±. 58 e	0 e	1 ±. 58 e	شاهد (کنترل منفی)

[1] غلظت ۵برابر دز مصرفی فاز مایع حرارت داده شده BtH

[2] انستیتو پاستور فرانسه

سپاسگزاری:

بدین وسیله از زحمات و تلاش ارزنده آقایان حسن هدی و غلامرضا صالحی در راه این تحقیق صمیمانه تشکر و قدردانی می گردد.

نشانی نگارندگان: رسول مرزبان، بخش تحقیقات مبارزه بیولوژیک و محمدرضا تاجبخش، بخش تحقیقات آفت‌کش‌ها، موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی، صندوق پستی ۱۴۵۴-۱۹۳۹۵ تهران، ایران.