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

مقایسه چند روش مختلف برای ردیابی و تعیین میزان بتااگزوتوکسین 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 بتااگزوتوکسین 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، بتااگزوتوکسین 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 بتااگزوتوکسین خالص به عنوان استاندارد و پیک نمونه BtH از نظر زمان بازداری یکسان می‌باشند. دلایل فوق همگی حکایت از وجود بتااگزوتوکسین 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 بتااگزوتوکسین نشان داد که می‌تواند ابزار مناسبی برای ردیابی بتااگزوتوکسین و کنترل کیفی فرآورده‌های باکتری *B. thuringiensis* باشد.

واژه‌های کلیدی: فرآورده B.t.H ، بتااگزوتوکسین، 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 بتااگزوتوکسین باشند. بتااگزوتوکسین 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). بتااگزوتوکسین 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* بتااگزوتوکسین را ردیابی کردند. باند و همکاران (Bond et al., 1969) موفق شدند از زیرگونه Berliner، بتااگزوتوکسین 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 لاروهـای سـن ۱ و ٤ *A. aegypti* و بـرای لارو سـن سـه *M. domestica* سمی و کشنده است. هوفر و همکاران (Haufer et al., 1985) اگزوتوکسین حاصـل 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 ترتیـب ۱۲/۸، ٤٤/٦ و ۸۱/۵ درصد بود. لوینسون و همکـاران (Levinson et al., 1990) روش تغییـر یافتـه HPLC را بـرای آشکارسازی و تعیین کمیت بتااگزوتوکسین، حاصل از فاز بـالای بدسـت آمـده از سـانتریفوژ محیط کشت باکتری استفاده کردند و توانستند نوع جدیـدی از بتااگزوتوکسـین را از زیرگونـه *morrisoni* جداسازی کنند، که روی سوسک کلرادو سیب زمینی خاصیت کشندگی نشـان داد. گوهار و پرشات (Gohar and Perchat, 2001) و هرناندز و همکـاران (Hernandez et al., 2001) نیز روش HPLC را برای ردیابی بتااگزوتوکسین پیشنهاد کرده‌اند. بخیت و همکاران (Bekheit et al., 1993) روش الیـزا[1] را بـرای ردیـابی و تعیـین میـزان بتااگزوتوکسـین در فـرآورده هـای *B. thuringiensis* گزارش و دریافتند که روش الیزا قادر است سطح پایین بتااگزوتوکسین حدود ۰/۱ ng/ml را ردیابی کند و حساسیت آن بیشتر از روش HPLC اسـت. کـارلو و همکـاران (Carlo et al., 1987) بتااگزوتوکسین جدا شده از محیط کشت *B. thuringiensis* را روی مگس خانگی تست نمودند. نتایج نشان داد کـه سـمیت آن بـرای مرحلـه شـفیرگی (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 کـه یکـی از آنهـا بـدون بتااگزوتوکسین و دیگری دارای بتااگزوتوکسین 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 بتااگزوتوکسین آزمـایش و مشـاهده کردنـد کـه ۵۸٪ جدایه‌ها دارای بتااگزوتوکسین هستند. اسپیناس و همکاران (Espinasse *et al*, 2002) با مطالعـه ٦٤۰ جدایه طبیعی نشان دادند که ژنهای عامل بتااگزوتوکسین روی همان پلاسمیدهای حامـل ژنهای Cry هستند.

1. Elisa

هدف از این تحقیق مقایسه دو روش ردیابی بتااگزوتوکسین 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 بتااگزوتوکسین، 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 بتااگزوتوکسین(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	Detector: UV: 260nm	50 M KH2PO4 PH3
فاز متحرک		rate: 2ml/m
حجم تزریق		100 ml
نوع ستون		ODSI (C18)
طول ستون		25 cm
قطر ستون		/46 cm

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 بالاییBtH 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 فرآوردهBtH 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