

آفات و بیماریهای گیاهی

جلد ۷۱، شماره ۲، اسفند ۱۳۸۲

مقایسه چند روش مختلف برای ردیابی و تعیین میزان

بتاگروتوکسین در فرآورده‌های باکتری *Bacillus thuringiensis*

Comparison of several methods for detection and quantification of β -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 بتاگروتوکسین 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 ^۱HPLC و زیست‌سنجی، بتاگروتوکسین در فرآورده B.t.H ردیابی گردید. نتایج حاکی از آن است که زیست‌سنجی 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 معنی‌دار با شاهد دارند. نتایج تست HPLC نشان داد که پیک بتاگروتوکسین خالص به عنوان استاندارد و پیک نمونه B.HI از نظر زمان بازداری یکسان می‌باشند. دلایل فوق‌همگی حکایت از وجود بتاگروتوکسین به مقدار ۸۲۵ ppm 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 بتاگروتوکسین نشان داد که می‌تواند ابزار مناسبی برای ردیابی بتاگروتوکسین و کنترل کیفی فرآورده‌های باکتری *B. thuringiensis* باشد.

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

مقدمه

بر اساس قوانین و مقررات ثبت آفت‌کش‌های میکروبی سازمان حفاظت محیط زیست^۱، فرآورده‌های بیولوژیک بر اساس باکتری *B. thuringiensis* Ber بایستی فاقد بتاگروتوکسین باشند. بتاگروتوکسین 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). بتاگروتوکسین در بافت‌های کلیه و جگر برخی پستانداران صدمات زیادی وارد می‌کند 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* بتاگروتوکسین را ردیابی کردند. باند و همکاران (Bond et al., 1969) موفق شدند از زیرگونه Berliner، بتاگروتوکسین را به صورت خالص جداسازی کنند و نشان دهند که مشتق نوکلئوتیدی آدنین می‌باشد و وزن مولکولی در حدود ۸۲۵ کیلو دالتون دارد. کدوری و همکاران (Qadri et al., 1989) اگزروتوکسین حاصل از کشت *B. thuringiensis* را روی لارو *Musca domestica* تست کردند، نتایج نشان داد که LD50 آن روی لارو سن یک $0.14 \mu\text{g/g}$ است. همچنین اگزروتوکسین 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 ۴ *A. aegypti* و برای لارو سن سه *M. domestica* سمی و کشنده است. هوفر و همکاران (Hauffer et al., 1985) آگزوتوکسین حاصل از زیرگونه *morrisoni* را روی لارو *Haematobia irrita* آزمایش کردند که میزان مرگ و میر برای لارو حشره در غلظت‌های ۱، ۳ و ۵ میکروگرم در ماده غذایی به ترتیب ۱۲/۸، ۴۴/۶ 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^۱ را برای ردیابی و تعیین میزان بتاگزوتوکسین در فرآورده‌های *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 ۷۵/۸ جدایه‌ها دارای بتاگزوتوکسین هستند. اسپیناس و همکاران (Espinasse et al., 2002) با مطالعه ۶۴۰ جدایه طبیعی نشان دادند که ژنهای عامل بتاگزوتوکسین روی همان پلاسمیدهای حامل ژنهای Cry هستند.

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

روش بررسی

تهیه سوپرناتانت^۱

برای جداسازی و خالص‌سازی بتاگروتوکسین، بر اساس روش اوها و همکاران (Ohba et al., 1981) ۲/۸ گرم از پودر فرآورده BH 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 200 rpm بهم زده شده، سپس با سرعت 3000 rpm به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ گردید، فاز مایع بالایی بدست آمده را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو نموده آنگاه برای صاف شدن و خلوص بیشتر مجدداً فاز مایع بالایی مذکور سانتریفوژ شد. به کمک تبخیر کننده حجم فاز مایع به ۱۶۰ ml تغلیظ گردید.

اندازه‌گیری با HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

برای انجام این آزمایش ابتدا از نمونه استاندارد بتاگروتوکسین (انستیتو پاستور فرانسه)، محلول استاندارد مادر با غلظت 100 ppm تهیه گردید. سپس محلول‌های استاندارد رقیق‌تر (5 ppm، 10 ppm، 20 ppm و 30 ppm) از محلول فوق با استفاده از بافر 5۰ M KH₂PO₄, PH3۰ بدست آمد (Levinson et al., 1990). شرایط دستگاه HPLC بشرح زیر بوده است:

50 M KH ₂ PO ₄ PH3	Detector: UV: 260nm	HPLC: Model 4110
rate: 2ml/m		فاز متحرک
100 ml		حجم تزریق
ODSI (C18)		نوع ستون
25 cm		طول ستون
/46 cm		قطر ستون

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 20 ppm بتاگروتوکسین خالص که از هر لحاظ مناسب بود استفاده گردید.

فاز مایع بالایی BtH که به ml60 تغلیظ شده بود به تدریج با محلول بافر 50 M KH₂PO₄ تا ۲۵ بار رقیق گردید تا قابل تجزیه بوسیله دستگاه HPLC باشد. محلول رقیق شده قبل از آنالیز با استفاده از فیلتر نایلونی ۰۴۵/m صاف گردید. و سپس به ستون دستگاه HPLC تزریق و فراکشن^۱ حاصل جمع‌آوری شد.

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

آزمایش زیست‌سنجی

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

برای این کار فاز مایع عاری از کریستال و اسپور فرآورده BtH بر اساس روش اوها و همکاران (Ohba et al., 1981) تهیه شد (تغلیظ نشده)، سپس غلظت‌های مختلف فاز مایع BtH شامل 5 (x5 برابر دز مصرفی در مزرعه)، 10 (x10)، 25 (x25) و 50 (x50) تهیه و آگروتوکسین 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. زیست‌سنجی به صورت انفرادی در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تیمار در سه تکرار انجام گرفت، به این صورت که یک گرم

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

نتیجه و بحث

زمان بازداری استاندارد ppm20 بتاگروتوکسین خالص ۱۲/۸۴ دقیقه تعیین شد و بیک نمونه B.t.H 73/12 دقیقه تعیین گردید (شکل ۱). جهت اطمینان از اینکه بیک نمونه B.t.H همان بیک بتاگروتوکسین خالص است ملاحظه شد که با اضافه کردن بتاگروتوکسین خالص به نمونه B.t.H تنها بیک ۱۲/۷۴ بزرگتر شده و بقیه بیک‌های اضافی نمونه بدلیل رقیق‌تر شدن محلول کوچکتر شده‌اند (شکل ۱) و این مسئله تأیید کننده وجود بتاگروتوکسین در نمونه B.t.H بر اساس ماده موثره *B.thuringiensis* subsp. *aizawai* است. طبق کروماتوگرام‌های حاصل شده غلظت بتاگروتوکسین در نمونه B.t.H رقیق شده (به میزان ۵۵ بار) حدوداً 15 ppm بدست آمد که در حجم ml2 تغلیظ شده ppm825 می‌باشد.

تجزیه واریانس تلفات چهار غلظت فاز مایع اتوکلاو شده B.t.H و در شاهد مثبت و منفی در تست زیست‌سنجی روی لارو سن دو، سه گونه حشره نشانگر تفاوت معنی دار در سطح ۱٪ بود ($F > 202, df = 5, P < 0.01$). در مقایسه میانگین درصد تلفات فاز مایع B.t.H 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 (جدول ۱) به عبارت دیگر بایستی عامل کشته‌ای 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 زیست‌سنجی حشرات راسته Diptera بعنوان حساس‌ترین راسته حشرات به بتاگروتوکسین معرفی شده‌اند (Qadri et al., 1989). که در این آزمایش عکس العمل لاروهای کرم قوزه پنبه و بید آرد در پایین‌ترین دوز (x5) با شاهد تفاوت معنی دار نشان داده‌اند لذا می‌توانند به عنوان حشرات حساس به بتاگروتوکسین در زیست‌سنجی استفاده شوند. نتایج حاصل از تست زیست‌سنجی و HPLC تأیید کننده قطعی وجود بتاگروتوکسین

در فرآورده BtH است. برای ردیابی بتاگروتوکسین در فرآورده‌های تجاری *B.thuringiensis* توصیه می‌شود از هر دو روش زیست‌سنجی و HPLC به عنوان مکمل هم استفاده شود هر چند روش زیست‌سنجی 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 زیست‌سنجی بتاگروتوکسین بوده است مطمئن سازد و علاوه بر این می‌تواند میزان بتاگروتوکسین را در فرآورده برآورد نماید. مک کلینتوک و همکاران (McClintock et al., 1995) معتقداند که فرآورده‌های *B.thuringiensis* بایستی عاری از بتاگروتوکسین باشند و از استرین‌هایی استفاده شود که توانایی تولید بتاگروتوکسین نداشته باشند. البته بخیت و همکاران (Bekheit et al., 1993) نشان دادند که محیط غذایی هم می‌تواند در تولید بتاگروتوکسین مؤثر باشد. غیر از کشورهای بلوک شرق در سایر کشورها عاری بودن فرآورده‌های *B.thuringiensis* از بتاگروتوکسین الزام‌آور است. اضافه می‌نماید که ماده مؤثره این فرآورده به انسستینو 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 \pm میانگین درصد تلفات			
H. armigera	E. kuhniela	G. melonella	تیمار
11 \pm 1 d	10 \pm 1.15 d	10 \pm 1.15 de	15x
12 \pm 1.15 d	18 \pm 1.52 c	17 \pm 0.58 cd	10x
19 \pm 1 c	20 \pm .57 c	27 \pm 1.15 c	25x
59 \pm 1 b	55 \pm 1.53 b	50 \pm 5.13 b	50x
95 \pm 1.15 a	91 \pm 2.08 a	93 \pm 2.08 a	بتاگروتوکسین استاندارد
			¹ (کنترل مثبت)
3 \pm .58 e	0 e	1 \pm .58 e	شاهد (کنترل منفی)

¹ غلظت برابر دز مصرفی فاز مایع حرارت داده شده BtH

² انسستینو 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 ۱۶۵۴-۱۹۳۹۵ تهران، ایران.