بررسی اثر کشندگی سوپرناتات کشت مایع جدایه های بومی باکتری *Bacillus thuringiensis* روی لارو مگس سرکه

روح اله عباسیان جزی[1*]، حبیب عباسی پور[1]، منصوره کشاورزی[2]
۱) دانشگاه شاهد ۲) موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر Ro.abbasiyan@gmail.com

چکیده

باکتری *Bacillus thuringiensis* یک باکتری خاکزی، گرم مثبت و اسپورزاست که به علت ایجاد اجسام کریستالی که برای راسته های مختلف حشرات اثر کشندگی دارد و از آن به عنوان آفت کش زیستی استفاده می شود. سویه های مختلف این باکتری علاوه بر توکسین های کریستالی سموم دیگری را نیز تولید می کنند که بعضاً اثر سینرژیستی با توکسین کریستالی دارد و تعدادی از آنها مانند β- اگزوتوکسین نیز هستند که علاوه بر حشرات، آثار سوء برای سایر مهره داران مانند انسان نیز دارد. لذا می بایستی از جدایه هایی از این باکتری استفاده کرد که فاقد این سموم باشد. در این مطالعه، سوپرناتانت کشت مایع سی و شش جدایه ی مختلف بومی باکتری *B. thuringiensis* که از مناطق مختلف کشور جداسازی شده بود، برای واکنش زیست سنجی بر علیه لارو مگس سرکه استفاده شد. نتایج حاکی از این بود که اکثریت جدایه ها کشندگی زیر بیست درصد داشته و تنها پنج جدایه، معادل ۱۱ درصد، کشندگی پنجاه درصدی یا بالاتر را نشان می دهند.

کلمات کلیدی: باکتری *Bacillus thuringiensis*، سوپرناتانت، بتا- اگزوتوکسین، مگس سرکه، زیست سنجی

مقدمه

باکتری *Bacillus thuringiensis* یک باکتری خاکزی گرم مثبت، هوازی اختیاری، اسپورزا می باشد (۱) و به خاطر اینکه خاصیت حشره کشی بر علیه راسته های مختلف حشرات دارد و برای سایر جانداران بی اثر است، از آن به آفت کش زیستی استفاده می شود. خاصیت حشره کشی به دلیل ایجاد اجسام کریستالی در فاز رکود می باشد که محتوی سموم Cry و Cyt می باشد (۲). علاوه بر این سموم این باکتری در مراحل مختلف رشد مانند فاز رویشی، انواع دیگر توکسین ها را نیز تولید می کند که به محیط ترشح می شود. این سموم شامل آلفا اگزوتوکسین، بتا اگزوتوکسین، همولیزین، توکسین های VIP، انتروتوکسین و غیره می شود. این توکسین ها دارای اثرات مختلفی روی حشرات هستند (۳). بعضی از آنها مانند توکسین VIP اثر سینرژیستی با توکسین های کریستالی دارد (٤). تعدادی نیز مانند همولیزین و بتااگزوتوکسین علاوه بر حشرات روی سایر مهره داران اثر سوء می گذارند. مهمترین این سموم غیرمجاز بتا-اگزوتوکسین می باشد که در مرحله رویشی باکتری به داخل محیط ترشح شده، ساختمان غیرپروتئینی دارد، دارای وزن مولکولی کم و مقاوم به حرارت (۷۰ درجه در مدت ۱۵دقیقه) می باشد (۵). حشراتی که در معرض این سم قرار گیرند و مرگ اتفاق نیافتد، وزن و قدرت زادآوری در آنها کاهش پیدا می کند (٦). بتا-اگزوتوکسین قابلیت عبور از غشاء دستگاه گوارش را نداشته و نمی تواند آنرا تخریب کند و به وسیله ی آنزیم فسفاتاز تجزیه می شود (۵). این توکسین توسط سروتایپ های ۹، ۸، ۷، ۱ و 4a4b تولید می شود. اثر فوری روی میزبان ندارد و فقط هنگام جلد اندازی و تبدیل لارو به شفیره اثر می گذارد، بر روی پرندگان و پستانداران هم اثر سوء دارد. این توکسین از لحاظ اندازه کوچکتر از آلفا- اگزوتوکسین بوده اما دامنه ی تاثیرش زیادتر می باشد، این توکسین تورینژینسین نیز نامیده می شود. قابل حل در آب و از لحاظ ساختاری شبیه و آنالوگ ATP، بوده و بازدارنده ی DNA و RNA پلی

مراز می باشد. دامنه ی تاثیر این توکسین روی لارو و شفیره ی راسته های دوبالان و بالپولکداران می باشد. این توکسین چون در روی سنتز RNA تاثیر سوء دارد. از طرف سازمان حفاظت از محیط زیست EPA مجاز به استفاده بر علیه حشرات نبوده و فرموله های تجاری حشره کش *B. thuringiensis* فاقد این اگزوتوکسین می باشد. این توکسین علاوه بر حشرات روی نماتدها، کنه ها و بعضی از مهره داران نیز موثر می باشد (۷). بتا اگزوتوکسین در برخی حشرات به عنوان یک ماده بازدارنده تغذیه ای عمل می کند. ممانعت از تغذیه در حشرات با دریافت دوزهای بالای تورینژینسین مشخص شده است و غلظتهای زیر کشنده موجب تاخیر در تغییر جلد حشره و ایجاد نقص جنینی در آن می گردد (۸).

لذا در فرمولاسیون تجاری نبایستی حاوی این توکسین های غیر مجاز باشد یا اینکه از جدایه هایی که این سموم را تولید نمی کند می بایستی استفاده گردد. در این پژوهش اثر کشندگی سوپرناتانت کشت مایع جدایه های بومی بر روی مگس سرکه بررسی گردید.

مواد و روش ها

۱) جدایه های بومی باکتری: جدایه های باکتری که از مناطق مختلف کشور (خراسان، آذربایجان، تهران و اصفهان) جداسازی شده بود، در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت. هر کدام از جدایه ها روی ارلن های ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۲ میلی لیتر محیط مایع کشت اختصاصی مایع GYS (شامل گلوکز: ۱gr، عصاره مخمر: ۲ gr، $NH_4(SO_4)$:۲gr، $MnSO_4$: ۰/۰۶ gr، $MgSo_4$: ۰/٤ gr، $CaCl_2$: ۰/۰۸ gr، K_2HPO_4: ۵ gr) تلقیح شده و به مدت ٤٨ ساعت در دور rpm ۲۵۰ انکوبه گردید تا باکتری به مرحله اسپوریلاسیون برسد (۹). سپس محتوای ارلن ها درون فالکون استریل ریخته شد و در دور g ۵۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سلسیوس، سانتریفوژ شد و مایع رویی جداسازی و از آن برای واکنش های زیست سنجی استفاده گردید. همچنین برای اطمینان از نبود کریستال پروتئینی، واکنش گرم از سوپرناتانت انجام شد که هیچ گونه اسپور یا کریستال پروتئینی مشاهده نشد.

۲) مگس سرکه: مگس سرکه، *Drosophila melanogaster* نژاد وحشی از آزمایشگاه ژنتیک دانشگاه شاهد تهیه شد و در لوله های حاوی محیط کشت آرد گندم و مخمر در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در ژرمیناتور پرورش داده شد.

۳) واکنش زیست سنجی: یک گرم از محیط کشت آرد گندم و مخمر درون پلیت، گذاشته شد. سپس سوپرناتانت کشت باکتری به آن اضافه و مخلوط گردید. ۱۰ عدد لارو سن دوم یا سوم مگس سرکه به آن اضافه شد و در دمای ۲۵ درجه درون ژرمیناتور قرار داده شد و تعداد لاروهای تبدیل شده به شفیره و همچنین مرده تا یک هفته شمارش شدند.

نتایج

نتایج به دست آمده در جدول یک آورده شده است.

ردیف	نام حشره	تعداد لارو اولیه	تعداد لارو مرده	لارو شفیره شده	درصد کشندگی
۱	۱	۱۰	۵	۵	۵۰
۲	۲	۱۰	٦	٤	٦۰
۳	۳	۱۰	۱	۹	۱۰
٤	۷	۱۰	۸	۲	۸۰

جدول	۵	۸	۱۰	۱	۹	۱۰
نتایج	٦	۱۷	۱۰	۱	۹	۱۰
سنجی	۷	۲۰	۱۰	۵	۵	۵۰
	۸	۲۵	۱۰	۲	۸	۲۰
	۹	۳۱	۱۰	۰	۱۰	۰
	۱۰	۳۷	۱۰	۰	۱۰	۰
	۱۱	٤۷	۱۰	۱	۷	۱۰
	۱۲	۵۰	۱۰	۰	۱۰	۰
	۱۳	۵۵	۱۰	۰	۱۰	۰
	۱٤	۵٦	۱۰	۰	۱۰	۰
	۱۵	۵۷	۱۰	۱	۹	۱۰
	۱٦	۵۹	۱۰	۳	۷	۳۰
	۱۷	۷۲	۱۰	۰	۱۰	۰
	۱۸	۷۸	۱۰	۱	۹	۱۰
	۱۹	۸۱	۱۰	۱	۹	۱۰
	۲۰	۸۲	۱۰	۲	۸	۲۰
	۲۱	۸۵	۱۰	۰	۱۰	۰
	۲۲	۸٦	۱۰	۳	۷	۳۰
	۲۳	۸۸	۱۰	۱۰	۰	۱۰
	۲٤	۹۲	۱۰	۰	۱۰	۰
	۲۵	۹۳	۱۰	۲	۸	۲۰
	۲٦	٤۰۱	۱۰	۲	۸	۲۰
	۲۷	٤۰۲	۱۰	۰	۱۰	۰
	۲۸	1a	۱۰	۳	۷	۳۰
	۲۹	4a	۱۰	۲	۸	۲۰
	۳۰	11a	۱۰	۳	۷	۳۰
	۳۱	17a	۱۰	۱	۹	۱۰
	۳۲	42a	۱۰	۰	۱۰	۱۰
	۳۳	54a	۱۰	۲	۸	۲۰
	۳٤	57a	۱۰	۳	۷	۳۰
	۳۵	81a	۱۰	۲	۸	۲۰
	۳٦	84a	۱۰	۲	۸	۲۰
						۱–
						زیست

سوپرناتانت کشت جدایه های بومی باکتری *B. thuringiensis* بر علیه مگس سرکه

نتایج حاصل حاکی از این بود که ۲۲/۲ درصد سوپرناتانت کشت مایع جدایه ها اثر کشندگی برای لارو حشره نداشتند، ۲۷/۸ درصد کشندگی ده درصد،ی ۲۲/۲ درصد کشندگی بیست درصدی و ۱۳/۹ درصد کشندگی سی درصدی نشان دادند و تنها ٤ جدایه یعنی حدود ۱۱ درصد کشندگی پنجاه درصد یا بیشتر را نشان دادند. لذا توصیه می شود در فرموله سازی تجاری این جدایه های بومی برای مبارزه با آفات، بحث میزان تولید بتا اگزوتوکسین و سموم غیر مجاز مورد توجه قرار گیرد و از جدایه هایی که اگزوتوکسین تولید نمی کنند استفاده شود و یا به نحوی این سموم غیر مجاز حذف گردند.

منابع

1. **Nazarian, A., Jahangiri, R., Salehi Jouzani, Gh., Seifinejad, A., Soheilivand, S., Bagheri, O., Keshavarzi, M. and Alamisaeid, K. 2009.** Coleopteran-specific and putative novel cry genes in Iranian native *Bacillus thuringiensis* collection. *Journal of Invertebrate Pathology*, 102: 101–109.
2. **Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. and Soberón, M. 2011**. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Jurnal of Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41: 423-431.
3. **Glare, T.R. and O'Callaghan, M. 2000**. *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. John Wiley, Chichester, UK, 350 pp.
4. **Espinasse, S., Gohar, M., Lereclus, D. and Sanchis, V. 2002**. An ABC transporter from *Bacillus thuringiensis* is essential for β-exotoxin I production. *Journal of Bacteriology*, 184: 5848–5854.
5. **Sebesta, K., Farkas, J. and Horska, K. 1981.** Thuringiensin, the betaexotoxin of *Bacillus thuringiensis*. In: H.D. Burges, Editor, Microbial Control of Pest ant Plant Diseases, 1970–1980, Academic Press, New York, pp. 249–281.
6. **Cooper, D.J., Zhang, Q.Y., Areliando, A. and Pinnock, D.E. 1990**. The effect of *Bacillus thuringiensis* var. *tolworthi* on *Lucilia cuprina* larval tissue-an ultrastructural study, p. 357. In D. J. Cooper, J. Drummond, and D. E. Pinnock (ed.), Vth international colloquium on invertebrate pathology and microbial control in Adelaide, Australia. Society for Invertebrate Pathology.
7. **Sela, S., Schickler, H., Chet, I. and Spiegel, Y. 1998**. Purification and Characterization of *Bacillus cereus* Collagenolytic/proteolytic Enzyme and Its Effect on *Meloidogyne javanica* Cuticular Proteins. *European Journal of Plant Pathology*, 104: 59-67.
8. **Tanada, Y. and Kaya, H.K. 1993**. Insect Pathology. Academic Press, San Diego. 666 pp.
9. **Patel, K.D., Bhanshali, F.C. and Ingle, S.S. 2011.** Diversity and Characterization of *Bacillus thuringiensis* Isolates from Alluvial Soil of Mahi River Basin, India. *Journal of Advances in Developmental Research*, 2(1): 14-20.

Abstract

Bacillus thuringiensis, a soil bacterium, gram-positive and spor forming bacterium that due to a producing crystalline body that has a lethal effect on insects of different orders, it is used as a biological pesticide. Different strains of this bacterium moreover of crystalline toxin produce others toxin that some of them have synergistic effect with crystalline toxin and some of them, such as β-exotoxin, have harmful effects for other vertebrates, including humans. Therefore must be used the isolates that lacking this harmful toxins. In this study, native culture supernatant of fluid culture of

thirty-six native isolates of *B. thuringiensis* bacteria that have been isolated from different parts of the country were bioassay against larvae of fruit fly (*Drosophila melanogaster*). The results indicate that the lethality of the majority of isolates was under twenty percent, had only five isolates, 11 percent, show fifty percent or more than fifty percent fatality.