



شناسایی و تعیین سروتیپ سویه‌های بومی باسیلوس تورنجینسیس در خاک‌های مختلف استان فارس

دکتر الهام معظمیان^۱، دکتر نیما بهادر^۲، دکتر منوچهر رسولی^{۳*}، دکتر نگار آذرپیرا^۴

^۱ دانشجوی دکتری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات فارس، گروه میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی
^۲ استادیار، بخش ایمنولوژی، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی بالینی استاد البرزی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ^۳ دانشیار، مرکز تحقیقات پیوند و ترمیم اعضا، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

چکیده

سابقه و هدف: باسیلوس تورنجینسیس، باکتری تولیدکننده یک یا چند سم پروتئینی بلوری در مرحله اسپورزایی و با قابلیت از بین بردن حشره‌ها، نماتودها و سلول‌های سرطانی می‌باشد. هدف از انجام این پژوهش، جداسازی، شناسایی و مقایسه سم پروتئینی Cry از این باکتری در سویه‌های بومی جداسازی شده از مناطق مختلف استان فارس می‌باشد. مواد و روش‌ها: در این پژوهش به صورت تصادفی ۲۵ نمونه خاک از ۶ منطقه استان فارس جمع‌آوری گردید و با استفاده از ۷ روش متفاوت جداسازی سویه‌ها انجام شد. شناسایی نمونه‌ها بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی، بررسی ساختار بلوری پروتئین Cry با استفاده از میکروسکوپ فازکنتراست و SDS-PAGE به منظور بررسی تنوع توکسین پروتئینی Cry انجام گرفت. یافته‌ها: نمونه‌های خاک شهر شیراز بیشترین سویه باکتری باسیلوس تورنجینسیس را داشتند. از طرف دیگر بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی شامل تخمیر سوکروز و سالیسین، تولید لسیتیناز و هیدرولیز اسکولین، جدایه‌ها در سه سروتیپ قرار گرفتند. نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که با وجود این که جدایه‌های مورد بررسی دارای نوارهای پروتئینی با فراوانی متفاوت هستند، اما پس از برش با پروتئیناز K، تقریباً تمامی نمونه‌ها حدود اندازه ۳۴ کیلو دالتون را داشتند. واژگان کلیدی: باسیلوس تورنجینسیس، پروتئین Cry، تعیین سروتیپ، SDS-PAGE در یافت مقاله: آذر ۸۸ پذیرش برای چاپ: اسفند ۸۸

مقدمه

جوان روی حشرات خاصیت کشندگی ندارند. اما باکتری‌های مسن‌تری که وارد مرحله اسپورزایی شده اند کاملاً سمی هستند. باسیلوس تورنجینسیس، باکتری گرم مثبت، بی‌هوازی اختیاری و تولیدکننده اسپور می‌باشد. این میکروارگانیسم پروتئین‌های سمی حشره‌کش را به صورت بلورهای چسبیده به اسپور (پاراسپورال) در مرحله اسپورزایی تولید می‌نماید. ژن‌های کدکننده پروتئین‌های Cry بیشتر بر روی پلاسمید قرار داشته و اندازه بین ۱۵ تا ۱۵۰ مگا

باکتری باسیلوس تورنجینسیس برای اولین بار توسط ایشاواتا (Ishiwata) در سال ۱۹۰۱ میلادی با مطالعه بر روی لاروهای کرم ابریشم مشاهده شد. در آن زمان وی کشف کرد که باکتری‌های

(* آدرس برای مکاتبه: شیراز، بیمارستان نمازی، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی بالینی استاد البرزی، بخش ایمنولوژی.

مواد و روش ها

الف) جداسازی و شناسایی باکتری: برای جداسازی باسیلوس تورنجینسیس از خاک، ۲۰۰ گرم خاک از عمق ۱۰ سانتی متری به صورت تصادفی از ۷ منطقه مختلف استان فارس شامل شیراز، جهرم، کازرون، مرودشت، فسا و سد درودزن، (در مجموع ۲۵ نمونه) تهیه گردید. نمونه ها در کیسه های پلاستیکی استریل و در دمای ۴°C تا زمان آزمایش نگهداری شدند. به منظور جداسازی این باکتری از خاک، ۷ روش متفاوت، مطابق جدول شماره ۱ استفاده گردید که بر اساس مطالعات آزمایشگاهی بهترین روش شکل تغییر یافته WHO (روش اول) بود (۹).

جدایه ها بر اساس ویژگی های شکلی و تولید سم، از نظر آزمون های بیوشیمیایی مانند تخمیر قندهای مالتوز، گلوکز، فروکتوز، مانیتول، سوکروز، سالیسین و تجزیه نشاسته، اسکولین و سترات و تولید آنزیم های اوره آز، همولیزین، کاتالاز و تحرک مطالعه شدند. تمامی آزمایش های انجام شده با نمونه استاندارد (باسیلوس تورنجینسیس با شماره NCIMB9134 انگلستان) مقایسه گردید (۹).

ب) مشاهده سم و جداسازی پروتئین *Cry*: به منظور مشاهده سم بلوری *Cry*، باکتری در محیط نوترینت آگار حاوی ۲۰٪ آگار و ۲٪ نمک به مدت ۷۲ ساعت گرم خانه گذاری شد تا باکتری وارد مرحله اسپورزایی گردد. سپس سم مورد نظر با استفاده از میکروسکوپ فازکنتراست مشاهده گردید (۱۰).

جداسازی و خالص سازی بلور پروتئین ها بر اساس روش لی (Lee) و همکارانش انجام گرفت. جدایه ها بر روی محیط نوترینت آگار کشت داده شد تا باکتری ها وارد مرحله اسپورزایی شوند (۱۴). سپس دو لوپ از کلنی باکتریایی به لوله های اپندروف استریل حاوی یک میلی لیتر هیدروکسید سدیم سرد اضافه گردید. سوسپانسیون باکتریایی به مدت ۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) سانتریفوژ شده و محلول رویی دور ریخته شد و ته نشست با ۱۴۰ میکرولیتر از SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) ۱٪ و ۰/۱٪ مرکاپتاتانول (ME) به حالت سوسپانسیون در آورده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای جوش قرار گرفت تا بلورها جدا شوند. پس از آن نمونه برای بار دوم به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm

دالتون را دارند. تاکنون بیش از ۱۰۰ ژن *Cry* تعیین توالی گردیده و به تازگی به ۵۳ گروه مختلف دسته بندی شده است که اساس آن شباهت نوکلئوتیدی و محدوده اختصاصیت میزبان می باشد (۱) و (۲). فعالیت حشره کشی باسیلوس تورنجینسیس به نوع پروتئین های *Cry* و نوع حشره بستگی دارد. جدایه های طبیعی باسیلوس تورنجینسیس به عنوان حشره کش زیستی در برابر بعضی از رده های حشرات مورد استفاده قرار می گیرد. از طرف دیگر برخی از سویه های باسیلوس تورنجینسیس برای نماتودها و پروتوزوئرها نیز سمی می باشند (۳ و ۴). هم چنین در مطالعات جدید سویه هایی از باسیلوس تورنجینسیس گزارش شده اند که بر علیه رده های سلول های سرطانی خاص خاصیت کشندگی دارند (۵ و ۶).

باسیلوس تورنجینسیس در بسیاری از زیستگاه ها یافت می شود و زیرگونه های معروف آن از حشره های مرده یا لاروها و در بسیاری از نمونه هایی که سم ها در آن فعالیت کرده اند، جداسازی شده است. این میزبان ها شامل سخت پوشان، دو بالان و بال پولک داران می باشند. زمانی که لارو حشرات می میرند حاوی مقدار زیادی اسپور هستند که می توانند در محیط رها شوند. این باکتری در زیستگاه های متفاوت از قبیل گرد و خاک، محصولات ذخیره شده، جسد حشرات، خاک کشاورزی و محیط های آبی یافت می شود و سویه های آن نوع ژنتیکی را همراه با توان سمیت متفاوت نشان می دهند که بیشتر به دلیل تبادل پلاسمید بین سویه ها می باشد (۷). در حقیقت هر زیستگاه می تواند سویه ای جدید از باسیلوس تورنجینسیس را داشته باشد که بر روی گروه حشرات مشخص اثر سمی دارند. بنابراین سویه های جدا شده از محیط های مختلف دارای ویژگی های متفاوتی هستند (۸). بر همین اساس بیشتر پژوهشگران دنیا بر روی جداسازی سویه های جدید باسیلوس تورنجینسیس تمرکز نموده اند تا اثرات حشره کشی و یا ضد سرطانی آن را مطالعه نمایند. هدف از این پژوهش، جداسازی سویه های باسیلوس تورنجینسیس از مناطق مختلف استان فارس و بررسی توکسین پروتئینی *Cry* آن ها می باشد تا در مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گیرند.

این باکتری از خاک روش تغییر یافته WHO بود. در روش یاد شده بیشترین تعداد باکتری ها جداسازی گردید. میانگین ایندکس [(تعداد باکتری های انتخابی/باسیلوس تورنجینسیس های جدا شده) × ۱۰۰] باسیلوس تورنجینسیس در استان فارس ۰/۳۴٪ بود. همچنین بیشترین سویه ها در شهر شیراز شناسایی شد (نمودارهای ۱ و ۲).

۵۰ جدایه حاوی سم بلورین بر اساس ۱۲ آزمون بیوشیمیایی شامل هیدرولیز نشاسته و خون، تولید آنزیم اوره آز و لسیتیناز، تخمیر قندهای گلوکز، مالتوز، فروکتوز، مانیتول، سوکروز و سالیسین، هم چنین استفاده از اسکولین و سیترات مورد بررسی قرار گرفتند. در تمام موارد سویه های جداسازی شده در تولید کاتالاز و همولیزین توانایی بارزی داشتند. سویه های جداسازی شده از نظر حرکت و تخمیر قندهای لاکتوز و سالیسین متغیر بودند، اما تمامی سویه ها از نظر تولید آنزیم لسیتیناز و هیدولیز نشاسته و اسکولین مثبت و تست اوره آز منفی را داشتند. اکثر سویه ها توانایی تخمیر گلوکز، مالتوز و فروکتوز را داشته و تولید اسید می نمودند. هیچ یک از سویه های جداسازی شده توانایی تخمیر مانیتول و استفاده از سیترات را نداشتند. همان طور که در جدول ۱ مشخص شده است نمونه های جداسازی شده بر اساس ۴ آزمون تخمیری در سه سروتیپ

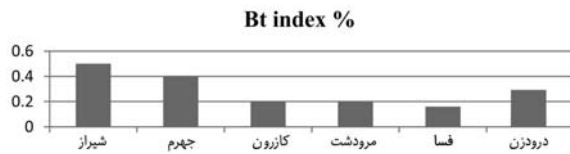
سانتریفوژ شده و ۱۴۰ میکرولیتر تری کلرو استیک اسید ۲۰٪ برای رسوب گذاری پروتئین به ته نشست اضافه گردید و ۱۰ دقیقه بر روی یخ نگه داری شد. سپس از آن سوسپانسیون تهیه شده و برای ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد در مرحله بعد محلول رویی به آرامی براشته شد و SDS-PAGE با بافر ۰/۱۵ Tris/Cl مولار با pH ۸/۸، EDTA ۳/۷۵mM، سوکروز، ۰/۷۵M، ۰/۰۷۵٪ بروموفنل بلو، SDS ۲/۵٪ و ۷/۴mM دی تیوتریتول) انجام گرفت. در نهایت نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای جوش قرار داده شد و الکتروفورز با ژل پلی آکریل آمید ۱۰٪ در ۱۵۰V انجام پذیرفت. سپس ژل با محلول های استیک اسید، متانول و آب مقطر استریل تثبیت گردید و به کمک رنگ کوماسی بریلیانت بلو رنگ آمیزی و مطالعه شد.

نتایج

الف) جداسازی و شناسایی باکتری: از ۲۵ نمونه جمع آوری شده از ۷ منطقه استان فارس، ۱۱۱۰ کلنی از باکتری های تشکیل دهنده اسپور حاصل گردید که ۶۹۶ کلنی از نظر شکل به کلنی باسیلوس تورنجینسیس شباهت داشتند. بهترین روش بازیافت

جدول ۱: روش های مورد استفاده جهت جداسازی باکتری از خاک.

روش	نکات کلیدی
۱	۵ گرم از خاک را در فویل آلومینیومی در ۸۰°C به مدت ۵ ساعت در آون خشک گرمخانه گذاری شد. سپس به ۱ گرم از نمونه خاک ۱۰ میلی لیتر سرم نمکی (۸۵ W/V) اضافه نموده و ورتکس گردید. ۱ میلی لیتر از این محلول در ۸۰°C به مدت ۱۲ دقیقه گرمخانه گذاری و سپس ۵ دقیقه بر روی یخ قرار داده و رقت های ۱۰ ^{-۱} تا ۱۰ ^{-۳} از آن تهیه گردید. ۰/۱ از هر نمونه بر روی محیط لوریا آگار کشت داده شد. بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷°C کلنی های شبیه به باسیلوس تورنجینسیس جداسازی شدند و ایزوله ها از نظر تست بیوشیمیایی و تولید پروتئین Cry مورد بررسی قرار گرفت (۹).
۲	۲۰۰ گرم نمونه در سرم فیزیولوژی حل نموده و بعد از ته نشین شدن نمونه از مایع شفاف رویی ۲ میلی لیتر برداشته و به مدت ۵ دقیقه در ۸۰°C حرارت می دهیم. ← کشت بر روی نوترینت آگار در دمای ۳۱°C به مدت ۵ روز (۱۰).
۳	۲ گرم نمونه در آب مقطر حل نموده و ۵ دقیقه حرارت در آب در حال جوشیدن ← فیلتر نمودن نمونه ← کشت در محیط نوترینت آگار (۱۱).
۴	۰/۲۵ گرم نمونه خاک در ۱۰ میلی لیتر محیط نوترینت برات ← ۱۵ دقیقه حرارت ۶۵°C ← کشت بر روی محیط اسپورزا (۱۱).
۵	۱ گرم خاک در ۱۰ میلی لیتر محیط لوریا برتانی مایع حاوی ۰/۲۵ مولار سدیم استات ← شیک دادن در دور ۳،۲۵۰ ساعت در ۳۰°C ← ۳ دقیقه در ۸۰°C ← کشت در محیط لوریا برتانی آگار ← بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری کشت در محیط T13 (۱۱).
۶	۱ گرم نمونه در ۹ میلی لیتر آب مقطر حل نموده و از آن رقت ۱۰ ^{-۳} - ۱۰ ^{-۱} تهیه می گردد ← حرارت دهی در دمای ۶۵°C به مدت ۱۵ دقیقه ← افزودن ۱۰۰ میکرولیتر رقت ۱۰ ^{-۱} ادر ۱۰۰ میلی لیتر محیط ۵۰°C نوترینت آگار ← پلیت نمودن محیط و ۷۲ ساعت گرمخانه گذاری در ۳۰°C (۱۲).
۷	۰/۲۵ گرم نمونه خاک در ۱۰ میلی لیتر محیط نوترینت برات حاوی ۰/۲۵ مولار سدیم استات ← ۲۴ ساعت در ۳۷°C ← ۵ دقیقه حرارت ۸۰°C ← کشت بر روی محیط نوترینت آگار (۱۳).

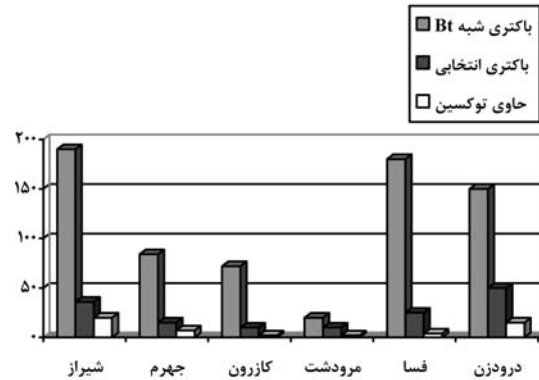


نمودار ۲: فراوانی باسیلوس تورنجینسیس در مناطق مختلف.

بحث

باسیلوس تورنجینسیس یک باکتری میله ای اسپوردار و هوازی است، که در خاک برخی از مناطق به وفور یافت می شود. در دهه ی ۱۹۷۰ این باکتری به خاطر وجود سم های ضدآفات محصولات گیاهی (لارو حشرات) از اهمیت ویژه ای برخوردار شد. این سم (بلور پروتئین) برای اولین بار توسط هانی (Hannay) در سال ۱۹۵۳ معرفی شد. وی نشان داد که این سم حاوی یک ماده آلکالینی محلول می باشد که برای لارو حشرات کشنده است. مطالعات جدید نشان داده است که این سم رشد برخی از سلول های سرطانی را کاهش می دهد. پژوهش های دیگر نشان می دهد که در خاک کشورهای مختلف، سویه های این باکتری دارای ظرفیت های متفاوت ژنتیکی در کد کردن توکسین می باشند، برای مثال هیچ کدام از ژن های سویه A1 ها کم از کشور عراق از لحاظ توالی مشابه ژن های کدکننده سم های Cry، Cyt و Vip در سوش استاندارد نبودند (۱۴).

در این پژوهش تنوع و پراکندگی سویه های بومی باکتری باسیلوس تورنجینسیس در زیستگاه های مختلف استان فارس مورد مطالعه قرار گرفت که بر اساس تولید سم، آزمون های بیوشیمیایی و بررسی الگوی پروتئینی انجام گردید. شناسایی اولیه بر اساس وجود بلورهای پروتئینی انجام گردید. در تحقیق حاضر، ایزوله ها بلورهای پروتئینی لوزی شکل را داشتند. هم چنین آرمیده (Aramideh) و همکاران در سال ۲۰۱۰ از نمونه خاک مناطق مختلف استان آذربایجان غربی باسیلوس تورنجینسیس را جداسازی نمودند که بلورهای پروتئینی مشابهی داشتند (۱۵). بیشترین فراوانی باسیلوس تورنجینسیس از نمونه های خاک باغات شهر شیراز جداسازی شد. این نتیجه نشان دهنده تمایل این باکتری به مناطق نمناک و معتدل می باشد که با نتایج صالحی



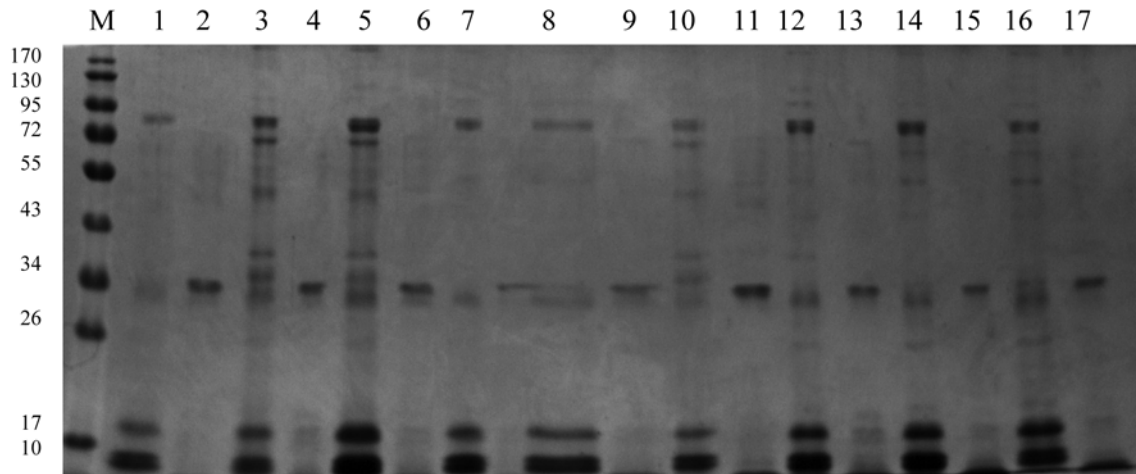
نمودار ۱: پراکندگی باسیلوس تورنجینسیس در نمونه های جداسازی شده از مناطق مختلف استان فارس.

قرار داشتند، که در این میان کمترین سروتیپ متعلق به سوتو و بیشترین متعلق به کورستاکي بود.

ب) مشاهده سم و جداسازی پروتئین *Cry*: از بین ۶۹۶ نمونه شبیه به باسیلوس تورنجینسیس، ۱۴۶ جدایه بر اساس تفاوت های ریختی اولیه و شکل ظاهری کلنی انتخاب شدند و در زیر میکروسکوپ فاز کنتراست از نظر حضور بلور پروتئین مورد مطالعه قرار گرفت. از بین کلنی های انتخابی ۵۰ نمونه دارای بلور بودند. مطالعات میکروسکوپی نشان دهنده وجود بیش از یک نوع سم در بین جدایه ها بود و اجسام پاراسپورال در دو دسته لوزی شکل (بزرگتر از اسپور) و کروی شکل (کوچک تر از اسپور) قرار گرفتند. ج) *SDS-PAGE*: به منظور بررسی اندازه سم پروتئینی، الکتروفورز بر روی ژل پلی آکریل آمید ۱۰٪ انجام گردید (تصویر ۱). باسیلوس تورنجینسیس های جداسازی شده پروتئین هایی با اندازه های متفاوت شامل ۸۸، ۷۰، ۳۵ و ۱۸ کیلودالتون داشتند، اما بیشتر نمونه ها از نظر اندازه توکسین یکسان بودند. پس از تیمار آنزیمی با استفاده از پروتئیناز K با غلظت ۶۰ $\mu\text{g}/\text{M}$ بیشترین غلظت از پروتئین قطعه ۳۴ کیلودالتونی ایجاد شد (تصویر ۱).

جدول ۲: تعیین سروتیپ باسیلوس تورنجینسیس بر اساس آزمون های بیوشیمیایی تخمیر قندها.

سروتیپ	آسکولین	سالیسین	لسیتیناز	سوکروز	تعداد سروتیپ ها
Thuringiensis	+	+	+	+	۱۴
Kurstaki	+	+	+	-	۳۴
Sotto	+	-	+	-	۲



تصویر ۱: الکتروفورز پروتئین ۹ نمونه جداسازی شده از استان فارس. M: مارکر. ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴، ۱۶، ۱۸، ۲۰، ۲۲، ۲۴، ۲۶، ۲۸، ۳۰، ۳۲، ۳۴، ۳۶، ۳۸، ۴۰، ۴۲، ۴۴، ۴۶، ۴۸، ۵۰، ۵۲، ۵۴، ۵۶، ۵۸، ۶۰، ۶۲، ۶۴، ۶۶، ۶۸، ۷۰، ۷۲، ۷۴، ۷۶، ۷۸، ۸۰، ۸۲، ۸۴، ۸۶، ۸۸، ۹۰، ۹۲، ۹۴، ۹۶، ۹۸، ۱۰۰، ۱۰۲، ۱۰۴، ۱۰۶، ۱۰۸، ۱۱۰، ۱۱۲، ۱۱۴، ۱۱۶، ۱۱۸، ۱۲۰، ۱۲۲، ۱۲۴، ۱۲۶، ۱۲۸، ۱۳۰، ۱۳۲، ۱۳۴، ۱۳۶، ۱۳۸، ۱۴۰، ۱۴۲، ۱۴۴، ۱۴۶، ۱۴۸، ۱۵۰، ۱۵۲، ۱۵۴، ۱۵۶، ۱۵۸، ۱۶۰، ۱۶۲، ۱۶۴، ۱۶۶، ۱۶۸، ۱۷۰، ۱۷۲، ۱۷۴، ۱۷۶، ۱۷۸، ۱۸۰، ۱۸۲، ۱۸۴، ۱۸۶، ۱۸۸، ۱۹۰، ۱۹۲، ۱۹۴، ۱۹۶، ۱۹۸، ۲۰۰، ۲۰۲، ۲۰۴، ۲۰۶، ۲۰۸، ۲۱۰، ۲۱۲، ۲۱۴، ۲۱۶، ۲۱۸، ۲۲۰، ۲۲۲، ۲۲۴، ۲۲۶، ۲۲۸، ۲۳۰، ۲۳۲، ۲۳۴، ۲۳۶، ۲۳۸، ۲۴۰، ۲۴۲، ۲۴۴، ۲۴۶، ۲۴۸، ۲۵۰، ۲۵۲، ۲۵۴، ۲۵۶، ۲۵۸، ۲۶۰، ۲۶۲، ۲۶۴، ۲۶۶، ۲۶۸، ۲۷۰، ۲۷۲، ۲۷۴، ۲۷۶، ۲۷۸، ۲۸۰، ۲۸۲، ۲۸۴، ۲۸۶، ۲۸۸، ۲۹۰، ۲۹۲، ۲۹۴، ۲۹۶، ۲۹۸، ۳۰۰، ۳۰۲، ۳۰۴، ۳۰۶، ۳۰۸، ۳۱۰، ۳۱۲، ۳۱۴، ۳۱۶، ۳۱۸، ۳۲۰، ۳۲۲، ۳۲۴، ۳۲۶، ۳۲۸، ۳۳۰، ۳۳۲، ۳۳۴، ۳۳۶، ۳۳۸، ۳۴۰، ۳۴۲، ۳۴۴، ۳۴۶، ۳۴۸، ۳۵۰، ۳۵۲، ۳۵۴، ۳۵۶، ۳۵۸، ۳۶۰، ۳۶۲، ۳۶۴، ۳۶۶، ۳۶۸، ۳۷۰، ۳۷۲، ۳۷۴، ۳۷۶، ۳۷۸، ۳۸۰، ۳۸۲، ۳۸۴، ۳۸۶، ۳۸۸، ۳۹۰، ۳۹۲، ۳۹۴، ۳۹۶، ۳۹۸، ۴۰۰، ۴۰۲، ۴۰۴، ۴۰۶، ۴۰۸، ۴۱۰، ۴۱۲، ۴۱۴، ۴۱۶، ۴۱۸، ۴۲۰، ۴۲۲، ۴۲۴، ۴۲۶، ۴۲۸، ۴۳۰، ۴۳۲، ۴۳۴، ۴۳۶، ۴۳۸، ۴۴۰، ۴۴۲، ۴۴۴، ۴۴۶، ۴۴۸، ۴۵۰، ۴۵۲، ۴۵۴، ۴۵۶، ۴۵۸، ۴۶۰، ۴۶۲، ۴۶۴، ۴۶۶، ۴۶۸، ۴۷۰، ۴۷۲، ۴۷۴، ۴۷۶، ۴۷۸، ۴۸۰، ۴۸۲، ۴۸۴، ۴۸۶، ۴۸۸، ۴۹۰، ۴۹۲، ۴۹۴، ۴۹۶، ۴۹۸، ۵۰۰، ۵۰۲، ۵۰۴، ۵۰۶، ۵۰۸، ۵۱۰، ۵۱۲، ۵۱۴، ۵۱۶، ۵۱۸، ۵۲۰، ۵۲۲، ۵۲۴، ۵۲۶، ۵۲۸، ۵۳۰، ۵۳۲، ۵۳۴، ۵۳۶، ۵۳۸، ۵۴۰، ۵۴۲، ۵۴۴، ۵۴۶، ۵۴۸، ۵۵۰، ۵۵۲، ۵۵۴، ۵۵۶، ۵۵۸، ۵۶۰، ۵۶۲، ۵۶۴، ۵۶۶، ۵۶۸، ۵۷۰، ۵۷۲، ۵۷۴، ۵۷۶، ۵۷۸، ۵۸۰، ۵۸۲، ۵۸۴، ۵۸۶، ۵۸۸، ۵۹۰، ۵۹۲، ۵۹۴، ۵۹۶، ۵۹۸، ۶۰۰، ۶۰۲، ۶۰۴، ۶۰۶، ۶۰۸، ۶۱۰، ۶۱۲، ۶۱۴، ۶۱۶، ۶۱۸، ۶۲۰، ۶۲۲، ۶۲۴، ۶۲۶، ۶۲۸، ۶۳۰، ۶۳۲، ۶۳۴، ۶۳۶، ۶۳۸، ۶۴۰، ۶۴۲، ۶۴۴، ۶۴۶، ۶۴۸، ۶۵۰، ۶۵۲، ۶۵۴، ۶۵۶، ۶۵۸، ۶۶۰، ۶۶۲، ۶۶۴، ۶۶۶، ۶۶۸، ۶۷۰، ۶۷۲، ۶۷۴، ۶۷۶، ۶۷۸، ۶۸۰، ۶۸۲، ۶۸۴، ۶۸۶، ۶۸۸، ۶۹۰، ۶۹۲، ۶۹۴، ۶۹۶، ۶۹۸، ۷۰۰، ۷۰۲، ۷۰۴، ۷۰۶، ۷۰۸، ۷۱۰، ۷۱۲، ۷۱۴، ۷۱۶، ۷۱۸، ۷۲۰، ۷۲۲، ۷۲۴، ۷۲۶، ۷۲۸، ۷۳۰، ۷۳۲، ۷۳۴، ۷۳۶، ۷۳۸، ۷۴۰، ۷۴۲، ۷۴۴، ۷۴۶، ۷۴۸، ۷۵۰، ۷۵۲، ۷۵۴، ۷۵۶، ۷۵۸، ۷۶۰، ۷۶۲، ۷۶۴، ۷۶۶، ۷۶۸، ۷۷۰، ۷۷۲، ۷۷۴، ۷۷۶، ۷۷۸، ۷۸۰، ۷۸۲، ۷۸۴، ۷۸۶، ۷۸۸، ۷۹۰، ۷۹۲، ۷۹۴، ۷۹۶، ۷۹۸، ۸۰۰، ۸۰۲، ۸۰۴، ۸۰۶، ۸۰۸، ۸۱۰، ۸۱۲، ۸۱۴، ۸۱۶، ۸۱۸، ۸۲۰، ۸۲۲، ۸۲۴، ۸۲۶، ۸۲۸، ۸۳۰، ۸۳۲، ۸۳۴، ۸۳۶، ۸۳۸، ۸۴۰، ۸۴۲، ۸۴۴، ۸۴۶، ۸۴۸، ۸۵۰، ۸۵۲، ۸۵۴، ۸۵۶، ۸۵۸، ۸۶۰، ۸۶۲، ۸۶۴، ۸۶۶، ۸۶۸، ۸۷۰، ۸۷۲، ۸۷۴، ۸۷۶، ۸۷۸، ۸۸۰، ۸۸۲، ۸۸۴، ۸۸۶، ۸۸۸، ۸۹۰، ۸۹۲، ۸۹۴، ۸۹۶، ۸۹۸، ۹۰۰، ۹۰۲، ۹۰۴، ۹۰۶، ۹۰۸، ۹۱۰، ۹۱۲، ۹۱۴، ۹۱۶، ۹۱۸، ۹۲۰، ۹۲۲، ۹۲۴، ۹۲۶، ۹۲۸، ۹۳۰، ۹۳۲، ۹۳۴، ۹۳۶، ۹۳۸، ۹۴۰، ۹۴۲، ۹۴۴، ۹۴۶، ۹۴۸، ۹۵۰، ۹۵۲، ۹۵۴، ۹۵۶، ۹۵۸، ۹۶۰، ۹۶۲، ۹۶۴، ۹۶۶، ۹۶۸، ۹۷۰، ۹۷۲، ۹۷۴، ۹۷۶، ۹۷۸، ۹۸۰، ۹۸۲، ۹۸۴، ۹۸۶، ۹۸۸، ۹۹۰، ۹۹۲، ۹۹۴، ۹۹۶، ۹۹۸، ۱۰۰۰. پروتئین های برش داده شده با آنزیم پروتیناز K با غلظت ۶۰ µg/M.

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که میزان پراکندگی باسیلوس تورنجینسیس در مناطق مختلف استان فارس ۰/۳۴ است و از نظر الگوی پروتئینی تنوع زیادی در بین پروفایل جدایه های مورد بررسی وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی استاد البرزی و مرکز تحقیقات پیوند و ترمیم اعضا به دلیل حمایت های مالی و اجرایی کمال امتنان را دارند.

(Salehi) و همکاران در سال ۲۰۰۸ مطابقت دارد. یکی از روش های متداول شناسایی باسیلوس تورنجینسیس، تعیین سروتیپ بر اساس آنتی ژن های تازک (flagellar) می باشد که گران قیمت است و نیاز به طراحی آنتی بادی های اختصاصی دارد. اما با استفاده از آزمون های بیوشیمیایی، شناسایی سریع تیپ های بیوشیمیایی مختلف باسیلوس تورنجینسیس قابل انجام است. بنابراین بر اساس آزمون های بیوشیمیایی، جدایه ها در سه سروتیپ، تورنجینسیس، کورستاکی و سوتو قرار گرفتند (۱۵ و ۱۰).

از طرف دیگر در این مطالعه سم بلوری جدایه های جداسازی شده بر اساس الکتروفورز بر روی ژل پلی آکریل آمید ۱۰٪ مورد مطالعه قرار گرفت. پروتئین های Cry در برابر سویه های خاص حشرات و سلول ها بسیار انتخابی عمل می کنند. جدایه های مختلف از نظر الگوی پروتئینی به یکدیگر مشابه بوده و پروتئین های مختلف در اندازه های مختلف تولید می کنند. وزن مولکولی این پروتئین ها تقریباً در اکثر نمونه ها ۸۸، ۳۴، ۱۸ و ۱۵ کیلودالتون بود که از این نظر با نتایج میزوکی و همکاران مطابقت دارد (۳). جداسازی نمونه های باسیلوس تورنجینسیس از این منطقه جغرافیایی با هدف جداسازی و شناسایی سویه ها و سم صورت گرفت که متعاقباً در تحقیقات بعدی از سم در درمان سلول های سرطانی استفاده شود تا نقش این بلور پروتئین در کلینیک مورد ارزیابی قرار گیرد.

References

1. Vidal-Quist JC, Castanera P, Gonzalez-Cabrera J. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from citrus orchards in Spain and evaluation of their insecticidal activity against *Ceratitis capitata*. *Microbiol Biotechnol*. 2009; 19(8):749-759.
2. Yu J, Tan L, Liu Y. Phylogenetic analysis of *Bacillus thuringiensis* based of PCR amplified fragment polymorphism of flagellin genes. *Curr Microbiol*. 2002; 45: 139-143.
3. Mizuki E, Park YS, Saitoh H, Yamashita S, Akaot H, Higuchi K, Ohba M. Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Clin Diag lab Imm*. 2000; 7(4): 625-634.
4. Kondo S, Mizuki E, Akao T, Ohba M. Antitrichomonal strains of *Bacillus thuringiensis*. *Parasitol Res*. 2002; 88: 1090-1092.
5. Uemori A, Maeda M, Yasutake K, Ohgushi A, Kagoshima K, Mizuki E, Ohba M. Ubiquity of parasporin-1 producers in *Bacillus thuringiensis* natural populations of Japan. *Naturwissenschaften*. 2007; 94:34-38.
6. Yamashita S, Katayama H, Saitoh H, Akao T, Park YS, Mizuki E, Ohba M, Ito A. typical three-domain Cry proteins of *Bacillus thuringiensis* strain A1462 exhibit cytotoxic activity on limited human cancer cells. *J Biochem*. 2005; 138 (6): 663-672.
7. Uemori A, Ohgush A, Yasutake K, Maeda M, Mizuki E, Ohba M. Parasporin-1Ab, a novel *Bacillus thuringiensis* cytotoxin preferentially active on human cancer cells *In Vitro*. *Anticancer Research*. 2008; 28: 91-96.
8. Apaydin O, Yenidunya AF, Harsa S, Gunes H. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from different grain habitats in Turkey. *World J Microbi Biotechnol*. 2005; 21: 285-292.
9. Santana MA, Moccia CC, Gillis AE. *Bacillus thuringiensis* improved isolation methodology from soil samples. *J Microbiol Met*. 2008; 75: 357-358.
10. Salehi Jouzani, G, Pourjan Abad A, Seifinejad A, Marzban R, Kariman K, Maleki B. Distribution and diversity of Dipteran-specific cry and cyt genes in native *Bacillus thuringiensis* strains obtained from different ecosystems of Iran. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2008; 35: 83-94.
11. Rampersad J, Ammons D. *Bacillus thuringiensis* isolation method utilizing a novel stain, low selection and high throughput produced atypical results. *BMC Microbiol*. 2005; 24:5:52.
12. Chatterjee SN, Bhattacharya T, Dangar TK, Chandra G. Ecology and diversity of *Bacillus thuringiensis* in soil environment. *Afr J Biotech*. 2007; 6 (13): pp. 1587-1591.
13. Travers RS, Martin PAW, Reichelderfer CF. Selective process for efficient isolation of *Bacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol*. 1987; 53: 1263-1266.
14. Lee DW, Akao T, Yamashita S, Katayama H, Maeda M, Saitoh H, Mizuki E, Ohba M. Non insecticidal parasporal proteins of a *Bacillus thuringiensis* isolate exhibit a preferential cytotoxicity against human leukemia T cells. *Biochem Biophys comm*. 2000; 272: 218-223.
15. Aramideh S, Saferalizadeh MH, Pourmirza AA, Rezazadeh Bari M, Keshavarzi M, Mohseniazar M. Characterization and pathogenic evaluation of *Bacillus thuringiensis* isolates from West Azerbaijan province-Iran. *AJMR*. 2010; 4 (12):1224-1229.



Isolation, characterization and serotype classification of *Bacillus thuringiensis* from different soil samples of Fars province

Elham Moazamian¹, Nima Bahador², Manochehr Rasouli³, Negar Azarpira⁴

¹Lecturer, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Fars, Iran

²Assistant Professor, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Fars, Iran

³Assistant Professor, Department of Immunology, Professor Alborzi Clinical Microbiology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

⁴Associate Professor, Organ Transplant Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Abstract

Background and Objective: *Bacillus thuringiensis* (Bt) is a bacterium best known for its production of crystal-like bodies comprised of one or more crystal proteins in sporulation phase, which can be toxic to insects, nematodes and cancer cells. The purpose of this study is isolation, characterization and comparison of Cry proteins in the isolated strains obtained in different parts of Fars province.

Material and Methods: 25 soil samples were collected from six different habitats in Fars province using seven different methods. Characterization was performed based on biochemical tests, protein crystal morphology by phase-contrast microscope and variation of cry protein toxin using SDS-PAGE.

Results: The tests showed a highest count of Bt strains in soil samples obtained from Shiraz city. The Bt colonies were classified according to biochemical tests such as: sucrose and salicin fermentation, lecithinase production and esculin hydrolyzing.

Conclusion: Results showed that although isolated strains have a variety of protein bands with different sizes, the proteins with 34KD was observed following proteinase K digestion in all the samples.

Keyword: *Bacillus thuringiensis*, Cry protein, Serotyping, SDS-PAGE