بررسی آزمایشگاهی حشره کش میکروبی تولید شده توسط باکتری باسیلوس تورینژینسیس از پساب کارخانه نشاسته به منظور کنترل بیولوژیک لارو کرم بـزرگ مـوم خـوار (*Galleria melonella*)

علی اصغر قالچی ها *[۱] ، عبدالحسین دلیمی اصل[۲] و حسن عسکری[۳]

*۱- ۲. گروه حشره شناسی و انگل شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، ۳- موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور

نویسنده مسئول: علی اصغر قالچی ها، تهران-خیابان خوش، بین کمیل و مرتضوی، کوچه برزگرپور، پلاک ۲۴، طبقه۳

A.Ghalchiha@gmail.com

چکیده

مقدمه: برای پساب های خاص به ویژه آنهایی که از کارخانجات مواد غذایی حاصل می شوند به فرآوری هایی جهت تولید محصولات با ارزش افزوده مانند حشره کش های زیستی نیاز می باشد. امروزه موفق ترین حشره کش های زیستی، توسط باکتریهای میله ای شکل گرم مثبت از جنس باسیلوس تولید می شوند که در مرحله ی تشکیل اسپور، اندوتوکسین های پروتئینی کریستاله تولید کرده و هنگام ورود به روده حشرات تحت شرایط قلیایی فعال شده و باعث صدمه به غشای سلول های روده حشرات و تشکیل سوراخ در غشا می شوند و عمل تجزیه کردن سلول های اپیتلیال را انجام می دهند. مواد و روش ها: در این تحقیق، باکتری*Bacillus thuringiensis* بر روی پساب کارخانه تولید نشاسته رشد داده شد و طی عمل تخمیر پروتئین کریستاله با وزن مولکولی ۶۵ کیلو دالتون تولید گردید. سپس پروتئین حاصل را بر روی لارو حشره ی *Galleria melonella* اثر داده و میزان مرگ و میر بعد از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت ارزیابی و با نمونه کنترل مقایسه گردید. نتایج: براین اساس تعداد کل باکتری ها و اسپور های تولید شده در مرحله تخمیر شمارش شد که در محیط پلیت کانت آگار به ترتیب $۱۲/۵\times۱۰^{۸}$ و ۴۸×۱۰^{۷} کولنی در هر میلی لیتر بود. بحث و نتیجه گیری کلی: تحقیقات نشان داده تولید دلتا اندوتوکسین با اسپورزایی رابطه دارد و بیشترین میزان اثر سمیت پروتئین های کریستالی در بالاترین غلظت اسپورها می باشد.

کلمات کلیدی: حشره کش های میکروبی، پساب، *Bacillus thuringiensis Var. kurstaki*، *Galleria melonella*

مقدمه:

استفاده از تکنولوژی های نوین جهت تولید حشره کش های زیستی باعث می شود که نیاز به حشره کش های مصنوعی و شیمیایی کاهش یابد. هزینه ی سالانه کنترل شیمیایی آفات کشاورزی و حشرات که عامل بیماری ها را به انسان و دام منتقل می کنند سالانه بیش از ۳۵۰ میلیون دلار برآورد شده است. علاوه بر هزینه ی زیاد، مصرف حشره کش های رایج به علت عدم اختصاصی عمل کردن این ترکیبات، بقاء در محیط زیست و تجمع آنها که باعث بیماریهای حیوانات و به ویژه پرندگان می شود مشکل آفرین است. کنترل حشرات با استفاده از عوامل بیماریزای میکروبی (باکتری ها، قارچ ها، پروتوزواها و ویروس ها) محاسن متعددی در مقایسه با سموم شیمیایی دارد. این عوامل اختصاصی عمل کرده و به دلیل استفاده از سوبسترای ارزان قیمت هزینه تولید آنها نسبتا کم است. والرو و همکاران بیان کردند حشره کش های زیستی که توسط باکتری *B. thuringiensis* تولید

می شوند، ترکیبات بیولوژیکی خیلی اختصاصی برای کنترل حشرات می باشند که باعث ایجاد محیط سالم تر، بهبود سلامت انسان ها و تولید غذای ایمن می شود(Valero, 1999).

پساب کارخانه تولید نشاسته، محیط کشت تخمیر مناسبی برای تولید پروتئین کریستاله توسط باکتری *B. thuringiensis* است ولی فعالیت حشره کشی پروتئین های سمی فقط وابسته به نوع محیط کشت تخمیر نیست، بلکه میزان فعالیت حشره کشی آن ها به عواملی همچون فعالیت کالچر باکتریایی، نوع ترکیبات محیط، منابع کربن ونیتروژن ونسبت آنها (C/N) ومیزان دلتا اندو توکسین تولید شده، بستگی دارد. نتایج مشابه توسط کانگ و همکاران در سال ۱۹۹۲ بیان شد(Kang, 1992).

در این تحقیق، هدف استفاده از پساب کارخانه تولید نشاسته برای تولید حشره کش زیستی توسط *B. thuringiensis* به منظور کنترل بیولوژیک لارو ***Galleria melonella*** در سطح آزمایشگاهی می باشد که علاوه بر کاهش آلودگی محیط زیست،سبب تولید محصولاتی با ارزش افزوده می شود.

مواد وروش ها

محیط کشت تخمیر

میزان عناصر موجود در پساب کارخانه تولید نشاسته در جدول ۱ نشان داده شده است. بر این اساس پساب کارخانه تولید نشاسته تهیه و به عنوان ماده اولیه استفاده شد.

جدول ۱. میزان عناصر موجود در پساب کارخانه تولید نشاسته

مواد جامد کل (گرم بر لیتر)	۱۷
مواد جامد سوپانسیون (گرم بر لیتر)	۱۱
مواد جامد سوپانسیون فرار (گرم بر لیتر)	۸
pH	۳/۸۱
کربن کل (٪ماده جامد خشک)	۵۱/۸۳
نیتروژن کل (٪ماده جامد خشک)	۸/۸۹
فسفر کل (میلی گرم بر کیلوگرم)	۱۴/۳۳

سویه باسیلوس تورینژینسیس

در این تحقیق از باکتری *B. thuringiensis Var. kurstaki* استفاده شد.این باکتری از بخش تحقیقات بیولوژیک آفات موسسه گیاه پزشکی کشور تهیه گردید. برای تهیه کالچر فعال ابتدا باکتری در محیط محلول آبگوشت مغذی کشت داده شد و در ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری وسپس در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری گردید .

آماده سازی ماده تلقیح شده

این عمل در دو مرحله صورت گرفت ابتدا باکتری مورد نظر با ۱۰۰ میلی لیتر آبگوشت تریپتیکاز سوی که در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه سترون شده بود، مخلوط گشته و ۲۴ ساعت در ۳۰ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. سپس ۲٪

حجمی از محیط کشت تلقیح شده برداشته شده و با ۳۰۰ میلی لیتر دیگر از محیط کشت آبگوشت تریپتیکاز سوی سترون شده مخلوط گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای۳۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد و در نهایت ۲٪ حجمی از محیط کشت تلقیح شده که حاوی سلولهای رشد کرده بود برداشته شده و به محیط کشت تخمیر منتقل گردید. در تمام مراحل pH محیط کشت برای تلقیح، ۷ تنظیم گردید.

تخمیر

در ابتدا با افزون سود، pH محیط کشت (پساب کارخانه) بر روی ۷ تنظیم شد و محیط در ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه سترون گردید.سپس محیط کشت تلقیح شده به میزان ۲٪حجمی به محیط کشت تخمیر اضافه شده و عمل تخمیر به مدت ۳۵-۳۰ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد در شرایط هوازی صورت پذیرفت. در این مرحله پروتئین های کریستاله توسط باکتری تولید گردید.

شمارش تعداد باکتری و اسپورها

ابتدا نمونه ها با روش رقیق سازی سریالی توسط کلرید سدیم ۰/۹ درصد رقیق شده و این عمل تا رقت 10^{-7} ادامه داده شد. ۰/۱ میلی لیتر از نمونه های رقیق شده به محیط پلیت کانت آگار منتقل شده و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری گردید. برای شمارش اسپورها، ابتدا نمونه ها در حمام آب ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه حرارت داده شدند و سپس سرد شده تا سلولهای رویشی از بین رفته و فقط اسپورها باقی بمانند سپس مشابه مراحل بالا کشت داده و در نهایت کولنی های حاصل شمارش شده و تعداد آنها در هر میلی لیتر گزارش گردید.

الکتروفورز SDS-PAGE بر روی نمونه حاوی پروتئین های کریستاله

برای بررسی پروتئین های کریستاله، الکتروفورز SDS-PAGE انجام شد. برای ژل جدا کننده، گرادیان غلظت ۵٪ تهیه گردید. نشانگر فرمنتاز به عنوان استاندارد استفاده شد و وزن مولکولی پروتئین حاصل با استفاده از پروتئین های استاندارد تعیین گردید.

ارزیابی زیستی

برای تعیین قدرت حشره کشی نمونه ها، مخلوطی از اسپور و کریستالهای *B. thuringiensis* بر لارو*Galleria melonella* تاثیر داده شد و میزان مرگ و میر ارزیابی گردید. برای این منظور غذای آنها (موم عسل) به حشره کش زیستی آلوده شد و در ۵ ظرف جداگانه قرار داده شدند سپس ظرف های کوچکی از آب در محیط کشت آنها قرار داده شد و در هر ظرف ۱۰ لارو اضافه گردید سپس در دمای معمولی تحت شرایط هوازی نگهداری شدند و میزان مرگ و میر آنها بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت محاسبه گردید.

آنالیز آماری

به منظور تجزیه وتحلیل نتایج، برنامه کامپیوتری SPSS و اطلاعات بدست آمده از آزمون ارزیابی زیستی با استفاده از T test تحلیل و برای تعیین اختلاف بین میانگین نمونه ها آزمون دانکن بکار برده شد و مقایسه در سطح ۵ درصد صورت پذیرفت.

نتایج و بحث

رابطه شمارش اسپور و میزان پروتئین کریستالی

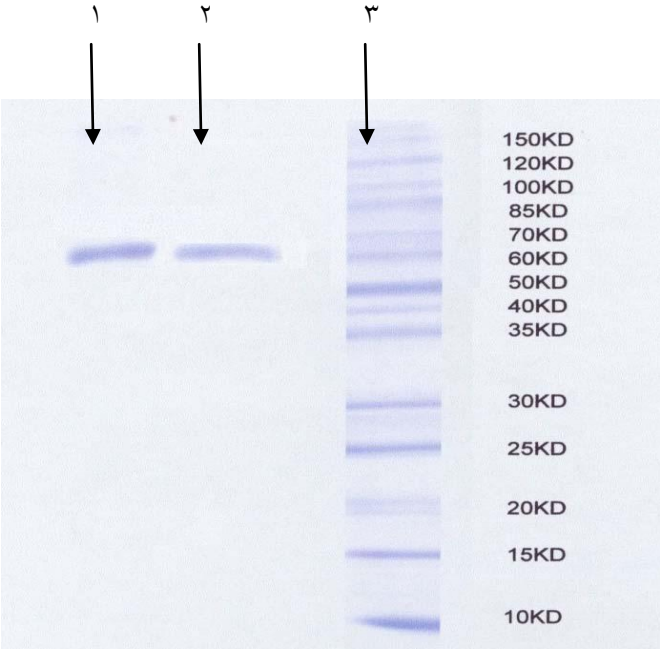
طبق نتایج بدست آمده در این تحقیق، تعداد کل باکتری ها و اسپور های شمارش شده با استفاده از محیط کشت پلیت آگار به ترتیب $۱۲/۵\times۱۰^{۸}$ و ۴۸×۱۰^{۷} کولنی در هر میلی لیتر بود (جدول۲).

جدول ۲. تعداد کل باکتری و اسپورهای حاصل از باسیلوس تورینژینسیس در محیط کشت تخمیر بعد از ۲۴ ساعت

شمارش کل باکتری (cfu/ml)	$۱۲/۵\times۱۰^{۸}$
شمارش اسپور (cfu/ml)	۴۸×۱۰^{۷}
اسپورزایی (٪)	۳۸/۴

الکتروفورز

وزن مولکولی پروتئین کریستاله با روش SDS-PAGE و با استفاده از پروتئین نشانگر اندازه گیری شد و حدود ۶۵ کیلو دالتون تعیین گردید (شکل ۱).



شکل۱. الگوی SDS-PAGE مربوط به پروتئین کریستاله تولید شده توسط باکتری *B. thuringiensis* (H14) ۱. پروتئین کریستاله ۲. پروتئین کریستاله (تکرار) ۳. نشانگر فرمنتاز

ارزیابی زیستی

نتایج بدست آمده حاکی از آن است که میزان مرگ و میر لارو های *Galleria melonella* نسبت به نمونه های کنترل (فاقد سم پروتئینی حاصل از باکتری) در سطح ۵ درصد به صورت معنی دار افزایش داشته است. البته میزان مرگ و میر لاروها در مدت

زمان ۴۸ ساعت نگهداری در محیط حاوی غذای مصنوعی آغشته به سم پروتئینی نسبت به ۲۴ ساعت افزایش بیشتری داشته است (جدول ۳).

جدول ۳. مقایسه مرگ و میر لارو های *C. pipiens* در اثر سم حاصل از باکتری باسیلوس تورینژینسیس

نمونه / زمان	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت
کنترل(بدون سم)	۰/۰۰ a *	۰/۵۰ a
پلیت های حاوی سم	۹/۰۰ b	۹/۶۰ b

*- حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی داری می باشد ($p<0/05$).

لاچهب و همکاران بیان کردند در محیط پساب نشاسته، باکتری *B. thuringiensis* فاز تاخیر کوتاهی دارد و سریعا می توانند خود را با شرایط محیطی وفق داده و آنزیم های ویژه برای کاهش مواد آلی موجود در پساب تولید کند و انرژی مورد نیاز خود را برای انجام اعمال سلولی تامین نماید، اما این باکتری در محیط حاوی نشاسته بدلیل دارا بودن میزان زیاد کربوهیدرات قابل دسترس و نیتروژن (جدول ۱)، مرحله رشد طولانی داشته و مرحله اسپورزایی آن اندکی به تاخیر می افتد *B. thuringiensis* در شروع مرحله اسپورزایی برای هیدرولیز مواد آلی مورد نیاز خود چندین نوع پروتئاز تولید می کند که میزان تولید آنزیم پروتئاز بستگی به غلظت کربن و نیتروژن قابل دسترس در محیط دارد. هر چه میزان این ترکیبات آلی بیشتر باشد تولید پروتئاز کاهش می یابد. بنابراین، پساب کارخانه تولید نشاسته بدلیل دارا بودن ترکیبات آلی محیط مناسبی برای تولید سم میکروبی حاصل از *B. thuringiensis* می باشد. چنانچه زمان تخمیر بیشتر شود میزان فعالیت آنزیم پروتئاز بیشتر گردیده و باعث هیدرولیز پروتئین کریستاله تولیدی شده و فعالیت سم حاصل کاهش می یابد. پس، مدت زمان مرحله تخمیر باید معین و حدود ۳۵-۳۰ ساعت در نظر گرفته شود(Lachhab, 2001) . نتایج به دست آمده در این تحقیق با نتیجه تانسی و همکاران که بر روی محیط کریستاله، SDS-PAGE انجام دادند مطابقت دارد. آنها مشاهده کردند که پروتئین کریستاله دلتا اندوتوکسین حاصل از *B. thuringiensis* که در مرحله اسپورزایی باکتری تولید می شود، حدود ۱۳۰ کیلو دالتون می باشد که به دلیل فعالیت بالای آنزیم پروتئاز این باکتری در محیط کشت شکسته شده و تولید دلتا اندوتوکسین با وزن مولکولی ۶۵ کیلو دالتون می کند (Curtis, 1984).

نتیجه گیری کلی:

با استفاده از پساب کارخانه تولید نشاسته به عنوان محیط کشت تخمیر و تلقیح آن با باکتری *B. thuringiensis* سم پروتئینی به صورت کریستاله با وزن مولکولی ۶۵ کیلو دالتون تولید شد که باعث از بین بردن لارو *Galleria melonella* گردید. این نوع حشره کش زیستی در مقایسه با سموم شیمیایی علاوه بر این که مزایایی همچون هزینه تولید کم در نتیجه استفاده از سوبسترای ارزان قیمت و عملکرد اختصاصی دارد، باعث کاهش آلودگی محیط زیست و تولید غذای ایمن و سالم خواهد شد و می تواند با تحقیقات گسترده تر کاربرد وسیعی در صنعت کشاورزی و بهداشت به ویژه در ایران داشته باشد.

منابع

1) Valero, J. R., S. Mohammedi, N. J. Payne and R. D. Tyagi. Microbial control of defoliating forest insects. Recent Research Developments in Microbiology.1999, 3: 455–464.
2) Kang, B.C., S. Y. Lee and H.N. Chang. Enhanced spore production of *Bacillus thuringiensis* by fed batch culture. Biotechnology Letters. 1992, 14 (8): 721–726.
3) Lachhab, K., R. D. Tyagi and J. R. Valero. Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides using wastewater sludge as a raw material: effect of inoculum and sludge solids concentration. Process Biochemistry. 2001, 37 (2): 197–208.

Experimental study of microbial insecticide produced by the bacterium *Bacillus Thuringiensis* starch factory effluent from the biological control of larvae *Galleria melonella*

Aliasghar Ghalchiha*[1], Abdolhosein Dalimi Asl[2], Hasan Askari[3]

1-2. Department of Medical Entomology & vectors of College of Medicine, University of Tarbiat Modares

3. Iranian Research Institute of Plant Protection

Corresponding Emeil: A.Ghalchiha@Gmail.com

Abstract

For certain wastes, particularly those that are derived from plant of foods to processed for produce value-added products as biological pesticides is needed. The most successful biological insecticide, by Gram-positive rod-shaped bacteria of the genus *Bacillus* spores are produced in the process, crystalline endotoxin protein produced under alkaline condition and when the insect is the intestines and cause damage to the membrane bugs and holes in the membrane of intestinal cells into the epithelial cells do your analysis. In this study, bacteria *Bacillus thuringiensis* (H14) on the wastewater plant was grown in starch and fermentation of crystalline protein with a molecular weight of 65 kDa was produced. Then the proteins on the insect larvae of *Galleria melonella* and mortality after 24h and 48h were evaluated and compared with control samples. Research has shown that the production of delta endotoxin and highest correlation with sporulation toxicity of crystal proteins in spore concentration is highest. On this basis, the total number of bacteria spores produced during fermentation was counted that in the agar plates, respectively, $12/5\times10^{8}$ and 48×10^{7} colonies per ml.

Keywords: Microbial insecticides, *Bacillus thuringiensis* , *Galleria melonella*, Effluent