دور البلازميدات في انتاج البلورات البروتينية في بكتريا *Bacillus thuringiensis* المعزولة محلياً

محمد عادل جعفر*، عبد الكريم عبد الرزاق القزاز و علي صادق محمد

قسم التقنيات الاحيائية ، كلية العلوم ، جامعة بغداد,بغداد,العراق.

الخلاصـــة

درست قابلية العزلة المحلية *Bacillus thuringiensis* على انتاج البلورات البروتينية وذلك بفحصها مجهريا وتبين قدرتها على انتاج البلورات البروتينية بعد 48 ساعة من بداية النمو. درس النمط البلازميدي بأستخدام تقنية الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز بتركيز 0.7% وتبين امتلاكها حزمة بلازميدية واحدة كبيرة ذات وزن جزيئي كبير، درس دور الحزمة البلازميدية في انتاج البلورات البروتينية من خلال تجارب الاقتران التي اجريت على العزلة *B. thuringiensis* المنتجة للبلورات البروتينية و الحساسة لمضاد الريفاميسين المستخدمة كخلايا واهبة، والعزلة *Bacillus* spp. غير المنتجة للبلورات البروتينية والمقاومة لمضاد الريفاميسين التي اعتبرت خلايا مستلمة. اظهرت نتائج الاقتران الحصول على مستعمرات مقترنة على وسط الاكار المغذي الحاوي على مضاد الريفاميسين وقادرة على انتاج البلورات البروتينية مما يشير الى دور البلازميد في انتاج هذه الصفة وهذا ما اكدته دراسة النسق البلازميدي لكل من الخلايا الواهبة والمستلمة والمقترنة.

Plasmid Role in Crystals Protein Production in Locally Isolated *Bacillus Thuringiensis*

Mohammad Adil Jaafar*, Abdul Kareem Al-Kazaz and Ali Sadiq Mohammad

Department of Biotechnology, Collage of Science, University of Baghdad, Baghdad,Iraq.

Abstract

The ability of crystals protein production was studied in local isolate *Bacillus thuringiensis* by microscope examination, and the crystals protein production were seen after 48 hour from growth starting, the study of plasmid profile of the isolate using gel electrophoresis technique in 0.7% of agaros gel, revealed that it had one Mega plasmid band, the plasmid role in production of crystals protein was studied by using conjugation

*Email:mohammad_biotechnology2@yahoo.com

experiments, that they applied on the local isolate *B. thuringiensis* which was crystals protein producer and Rifamycin sensitive as donor cells, with *Bacillus* spp. which didn't produce crystals protein and Rifamycin resistance as recipient cells. Conjugation experiments assured the transmission of crystals production trait with Plasmid to the recipient cells, this result confirmed that crystals protein trait was Plasmid bourn.

البحث مستل من رسالة الماجستير للباحث الاول.

المقدمة

لاتختلف بكتريا *B. thuringiensis* عن بقية انواع جنس الـ*Bacillus* فهي موجبة لصبغة غرام، عصوية الشكل مكونة للأبواغ ماعدا قابليتها على انتاج البلورات البروتينية او ما يعرف بالذيفان الداخلي (cry endotoxin) خلال مرحلة تكوين الابواغ [1] والتي تكون مسؤولة عن صفة السمية للحشرات، ونتيجة لأمتلاكها هذه الخاصية ركزت البحوث حول هذا النوع البكتيري لأجل استخدامها في مجال السيطرة البايلوجية بوصفها مبيدا للأفات الزراعية. اذ اصبحت تمثل 90% من المبيدات الحشرية المستخدمة في الولايات المتحدة الامريكية نظرا لعدم وجود اي تأثير سام لها على الخلايا الحيوانية [2,3] وفي السنين الاخيرة برزت بحوث حول قدرة البلورات البروتينية المنتجة من سلالات مختلفة من بكتريا *B. thuringiensis* على القتل التفضيلي للخلايا السرطانية [4,5] كما امكن نقل صفة قتل الحشرات الى النبات عن طريق اقحام الجينات المشفرة للذيفان الداخلي في المجين النباتي عن طريق بكتريا *Agarobacterium tumefaciens* [6,7] .

تمتلك غالبية الانماط المصلية العائدة لبكتريا *B. thuringiensis* عوامل خارج كروموسومية تختلف بأعدادها و اوزانها الجزيئية من نمط منصلي لأخر . ان الصفة المشتركة بين الانماط المصلية لبكتريا *B. thuringiensis* هي وجود ترتيب بلازميدي معقد اذ يكون الاختلاف في عدد و حجم تلك البلازميدات، فيكون التغاير كبير بالوزن الجزيئي (1.4- 180) MD [8] و كذلك عددها فيتراوح بين 1 – 8 ، اذ اشارت دراسة الى امتلاك تحت النوع *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* نسق بلازميدي معقد من ثمانية بلازميدات بأوزان جزيئية مختلفة هي 3.3 ، 4.2 ، 4.9 ، 10.6، 68 ، 75 ، 105 ، 135 MD [9] ويمكن ان يكون اكثر من ثمانية

بلازميدات [4] ، ان العديد من الجينات المشفرة للبلورات البروتينية تكون بلازميدية المنشأ كما ان بعضها كروموسومية المنشأ . وتكون هذه الجينات محمولة على بلازميدات كبيرة 40 – MD150 وبالتالي فأن غالبية هذه البلازميدات هي بلازميدات اقترانية (Conjugative Plasmids) [10]، تستطيع البلازميدات الحاملة للجينات المشفرة لهذه الصفة تحت الظروف المختبرية الانتقال بين و ضمن الانواع البكتيرية *Bacillus thuringiensis* ، *Bacillus anthracis*، *Bacillus cereus*، *Bacillus megaterium* [11,12,13] اذ اشار [14] الى ان تردد انتقال هذه الجينات الكروموسومية المنشأ في تجارب الاقتران يكون واطئ ، بينما يكون أعلى في الجينات البلازميدية المنشأ ، تهدف الدراسة الى اثبات دور البلازميدات في انتاج البلورات البروتينية عن طريق اجراء تجارب الاقتران.

المواد و طرائق العمل

1- العزلات البكتيرية

استخدمت العزلة المحلية *B. thuringiensis* المعزولة من دراسة سابقة [15] المنتجة للبلورات البروتينية والحساسة لمضادRifamycin، في حين استخدمت العزلة المحلية *Bacillus* spp. غير المنتجة للبلورات البروتينية والمقاومة للRifamycin .

2- فحص انتاج البلورات البروتينية

تم الفحص المجهري لقابلية انتاج البلورات البروتينية بعد اتباع طريقة التصبيغ الموصوفة من قبل [16].

3- اختبار الحساسية تجاه المضادات الحياتية

تم اجراء الفحص بطريقة الاقراص (Agar disk diffusion medium) [17] لغرض اختبار حساسية بكتريا *B.thuringiensis*تجاه عدد من مضادات الحيوية التالية Rifamycin ، Carbancillin، Streptomycin ، Tetracycllin ، Ampicillin ، Nalidixic acid ، Erythromycin .

4- عزل الدنا البلازميدي

تم استخلاص الدنا الكلي من الخلايا البكتيرية بطريقة التمليح الخارجي (Salting out) الموصوفة من قبل [18].

5- الترحيل الكهربائي

حدد المحتوى البلازميدي للعزلات البكتيرية بعد ترحيل المحتوى الوراثي المستخلص على هلام الاكاروز بتركيز 0.7% وحسب الطريقة الموصوفة من قبل [18].

6- عزل بكتريا *Bacillus* spp. المقاومة لمضاد Rifamycin

نميت الخلايا البكتيرية على وسط الاكار المغذي بتراكيز متدرجة من مضاد Rifamycin ابتدأ من 0.25 الى 50 مايكروغرام/مليليتر حسب ما ذكر في [13].

7- الاقتران البكتيري

اجريت تجربة الاقتران بين بكتريا *B. thuringiensis* المنتجة للبلورات البروتينية و الحساسة لمضاد اليفمايسين كخلايا واهبة، و البكتريا المستلمة *Bacillus* spp. غير المنتجة للبلورات البروتينية والحساسة لمضاد الريفاميسين حسب ما جاء في [19]، وبعد عملية الاقتران تم نشر عينات بمقدار 0.1 مليليتر بعد اجراء التخافيف على وسط الاكار المغذي الحاوي على مضاد الريفاميسين بتركيز نهائي 50 مايكرو غرام/مليليتر وحضنت الاطباق بدرجة 37 مئوي لمدة 48 ساعة بعدها تم فحص قدرة المستعمرات النامية على انتاج البلورات البروتينية مجهريا.

النتائج و المناقشة

فحص انتاج البلورات البروتينية

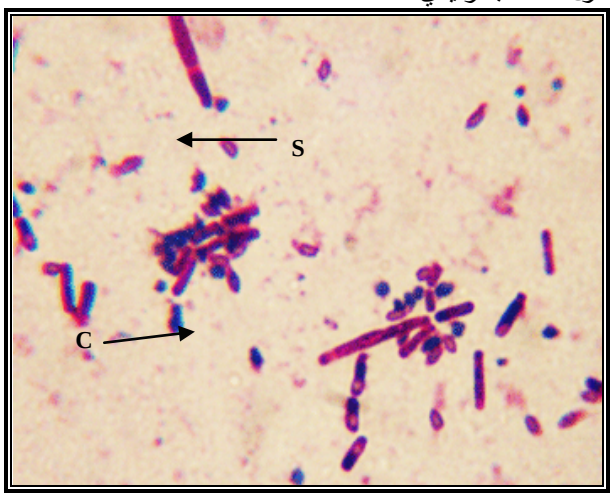
لغرض فحص انتاجية بكتريا *B. thuringiensis* للبلورات البروتينية اتبعت طريقة التصبيغ الموصوفة من قبل [16] والشكل 1 يوضح تلون الابواغ البكتيرية بصبغة Carbol fuchsin بالون الاحمر والتي تكون بيضوية الشكل في حين اصطبغت البلورات البروتينية بصبغة Naphthul blue black بالون الاسود.

الحساسية تجاه مضادات الحيوية

تم اختبار قابلية بكتريا *B. thuringiensis* على مقاومة عدد من مضادات الحيوية باستخدام طريقة الاقراص Agar disk diffusion، حيث تم اختبار سبعة انواع من مضادات الحيوية توزعت حسب اختلافها في اليات تأثيرها على الخلية البكتيرية [20]. بينت النتائج على ان بكتريا *B. thuringiensis* كانت حساسة للمضادات الحيوية Rifamycin، Streptomycin، Tetracycllin، Nalidixic acid، Erythromycin ، في حين كانت مقاومة للمضادين Ampicillin و Carbancillin واللذان يعودان الى مجموعة البنسلينات، اذ اشارت دراسات عدة الى ان صفة المقاومة للبنسلين هي احدى الصفات التشخيصية لبكتريا *B. thuringiensis* و بكتريا *B. cereus* والتي تميزها عن بكتريا *B. anthracis* وهذه الصفة ناتجة من قابلية البكتريا على انتاج انزيم β-lactamase [21,22].

عزل الدنا البلازميدي

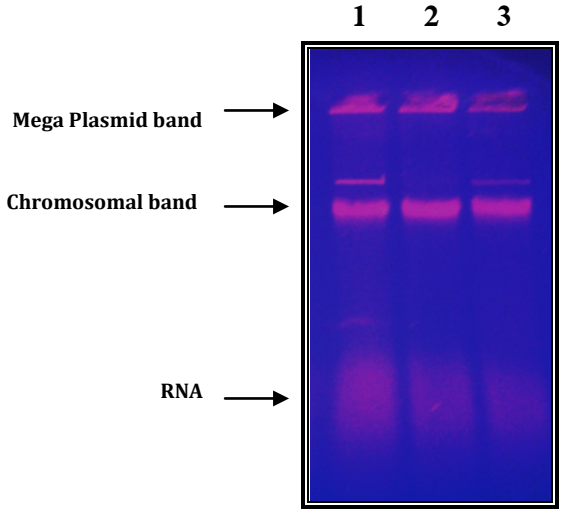
تم التحري عن المحتوى الوراثي لبكتريا *B. thuringiensis* وذلك لأجل التعرف على النسق البلازميدي اذ تم اعتماد طريقة التمليح الخارجي [18] لعزل الدنا الكلي والتي اظهرت كفاءة في عزل الدنا البلازميدي .



الشكل 1- البلورات البروتينية والابواغ العائدة لبكتريا *B thuringiensis* بعد تصبغها بصبغتي Carbol fuchsin و Naphthul blue black (S= Spore , C= Crystal)

أكدت نتائج الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز وبعد مرور ساعة ونصف من بدء الترحيل امتلاك بكتريا *B. thuringiensis* حزمة بلازميدية واحدة كبيرة ، في حين تبين عدم امتلاك بكتريا *Bacillus* spp. اي حزمة بلازميدية والشكل 2 يوضح نتائج الترحيل الكهربائي، أشارت دراسات عدة الى امتلاك سلالات بكتريا *B. thuringiensis* نسق بلازميدي معقد ، فيكون متغاير بالعدد والوزن الجزيئي، فقد اشار [23] في دراسة على سلالات عائدة الى تحت النوع *kurstaki* ، امتلاكها عدد من البلازميدات قد يصل الى 12 وبأوزان جزيئية تراوحت 1.9 – 120 MD .

وفي دراسة اخرى اجريت من قبل [9] على تحت النوع *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* ، تبين امتلاكها 8 بلازميدات و بأوزان جزيئية تراوحت 3.3 – 135 MD. وكما تشير هذه الدراسات الى وجود اختلاف في العدد و الوزن الجزيئي للبلازميدات المعزولة من سلالات عائدة لنفس تحت النوع العائد لبكتريا *B. thuringiensis* مختبريا، وهذا يعود الى استخدام طرائق مختلفة عند عزل البلازميدات الكبيرة او بسبب عدم كفاءة طرائق العزل لكبر الوزن الجزيئي لهذه البلازميدات ، وكذلك قلة عدد النسخ للبلازميدات الكبيرة [13] .

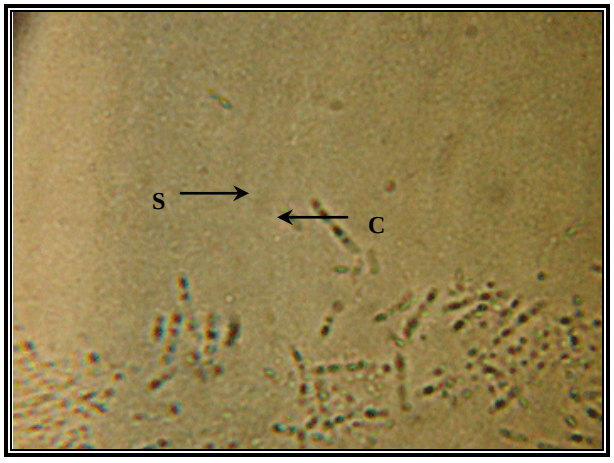


الشكل.2–الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز بتركيز 0.7% بعد 1.5 ساعة و بفرق جهد 70 فولت بعد اجراء تجربة الاقتران
المسار رقم1: النسق البلازميدي لبكتريا *B. thuringiensis* (الواهبة) قبل الاقتران
المسار رقم 2 : النسق البلازميدي لبكتريا *Bacillus* spp. (المستلمة) قبل الاقتران
المسار رقم 3 : النسق البلازميدي لبكتريا *Bacillus* spp. (المقترنة)

الاقتران البكتيري

لغرض التعرف على موقع المورثات المشفرة لصفة انتاج البلورات البروتينية اجريت تجربة الاقتران، اذ عدت بكتريا *B. thuringiensis* بكتريا واهبة لقدرتها على انتاج البلورات البروتينية وامتلاكها حزمة بلازميدية فضلاً عن حساسيتها اتجاه مضاد Rifamycin، في حين عدت بكتريا *Bacillus* spp. المقاومة لتركيز 50 مايكروغرام/مليلتر من مضاد Rifamycin بوصفها بكتريا مستلمة، لعدم قدرتها على انتاج البلورات البروتينية وعدم امتلاكها أيةَ حزمة بلازميدية كما موضح في الشكل 2 .

أظهرت النتائج الموضحة في الشكل 3 نجاح عملية الاقتران بعد محاولات عدة، وبتردد اقتران (1.2×10^{-8}) ، اذ اكتسبت البكتريا المستلمة صفة انتاج البلورات البروتينية عند فحصها مجهريا، وهذا يؤكد أن هذه الصفة بلازميدية المنشأ وذلك بعد التحري عن النسق البلازميدي للخلايا المقترنة كما موضح بالشكل 2 الذي يبين انتقال الحزمة البلازميدية الى البكتريا المستلمة المقاومة لمضاد Rifamycin، وهذا يؤدي الى الاستنتاج الى ان الجينات التنظيمية والتركيبية المسؤولة عن التشفير لصفة انتاج البلورات البروتينية جميعها بلازميدية المنشأ وهذه النتائج تتفق مع نتائج سابقة اكدت انتقال صفة انتاج البلورات البروتينية الى انواع اخرى عائدة الى جنس الـ *Bacillus* [11,12,13].



الشكل 3 – قدرة بكتريا *Bacillus* spp. المقترنة على انتاج البلورات البروتينية عند فحصها بالمجهر الضوئي بقوة تكبير 200X (S=Spore , C=Crystal)

ان نتائج تجربة الاقتران تتفق مع العديد من الدراسات التي اشارت الى ان الجينات المشفرة للبلورات البروتينية بلازميدية المنشأ، وتتصف هذه البلازميدات بكونها تمتلك اوزان جزيئية كبيرة MD150 – 33 [10,24] وكذلك كونها بلازميدات اقترانية، فقد

اشارت العديد من الادبيات العلمية الى امكانية نقل صفة انتاج البلورات البروتينية بوساطة الاقتران مختبريا من بكتريا *B thuringiensis* الى عدد من الانواع العائدة الى جنس الـ *Bacillus*، اذ تم نقل صفة انتاج البلورات البروتينية من بكتريا *B. thringiensis* الى بكتريا *B. megaterium* مختبريا من خلال عملية الاقتران [13] و الى انواع اخرى عائد ة الى جنس *Bacillus* تضمنت *B. subtilis, B. licheniformi*، *B sphaericus*، *B. cereus* [10,25].

المصادر:

1. Agaisse, H. and Lereclus, D. **1995.** How does *Bacillus thuringiensis* produce so mach insecticidal crystal protein?. *J. Bacterio*. **177**,pp:6027-6032.
2. Environmental Protection Agency (EPA). **1998.** EPA. Reregistration Eligibility Decision (RED) *Bacillus thuringiensis* US.EPA, preventation pesticides and toxic substance, EPA 738-R-98-004, 19P.
3. Roh, J.Y.; Choi, J.Y., Li,MS; Jin, B.R. Je, YH. **2007.** *Bacillus thuringiensis* as aspecific, safe, and effective toolfor insect pest control. *Journal of microbiology and biotechnology* **17**,pp**:**547-559.
4. Mizuki, E.; Ohba, M.; Akao, T.; Yamashita, S.; Saitoh, H. and Park, Y.S. **1999.** Unique activity associated with non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: in vitro cell- killing action on human cancer cells *J. Appl. Microbiolo*. **86**,pp:477-486.
5. Saitoh, H.; Shiro, O.; Tomoyuki, I.; Tetsuyuki, A.; Mizuki, E. and Ohba, M. **2006.** Investigation of a novel *Bacillus thuringiensis* gene encoding a parasporal protein , parasporin – 4, that preferential kills human leukemik T cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70** ,pp:2935-2941.
6. Barton, K.; Whiteley, H. and Yang, N. **1987.** *Bacillus thuringiensis* Delta-Endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to Lepidopteran insects. *Plant physiolo.* **85**,pp:1103-1109.
7. Gatehouse, J.A. **2008.** Biotechnological prospect for engineering insect- resistant plant. *Plant Physiolo.* **146** ,pp:881-887.
8. Stahly, D.P.,Dingman, D. w.; Bulla, L. A.; and Aronson, A. I. **1978.** Possible origin and function of the parasporal crystal in *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. and Biophysic. Research Communi*. **84** ,pp: 581-588.
9. Gonzalez, J.M. and Carlton, B.C. **1984.** A large transmissable plasmid is required for crystal toxin production *Bacillus thuringiensis* varity *israelensis*. *Plasmid* **11**,pp: 28-38.
10. Gonzalez, J.M.; Brown, J. and Carlton, B.C. **1982.** Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmid coding for δ - endotoxin among strains *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **79** ,pp: 6951-6955.
11. Battisti, L.; Green, B. D. and Thoren, C. B. **1985.** Mating system for transfer of plasmids among *Bacillus anthracis, Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* , *J. Bacteriolo*. **162** ,pp:543-550.
12. Wiwat, C.; Panbangred, W. and Bhumiratana, A. **1990.** Transfer of plasmids and chromosomal genes amongst subspecies of *Bacillus thuringiensis*. *J. Indust. Microbiolo.* **6**,pp:19-27.
13. Bora, R. S.; Murty, M. G. and Sekar, V. **1994.** Introduction of a lepidopteran –specific Insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* by conjugal transfer into a *Bacillus megaterium* strain that persists in the cotton phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiolo*. **60**,pp:214-222.
14. Aronson, A. I. and Beckman, W. **1987.** Transfer of chromosomal genes and plasmid in *Bacillus thuringiensis* . *Appl. Environ. Microbiolo.* **53**,pp: 1525-1530.
15. Al-Rubaie, A. D. J. **2006.** Biological and Biochemical Study on parasporal protein produced by *Bacillus thuringiensis* local isolates (Al-Nahrain University). Ph. D. thesis.
16. Smirnoff, W. A. **1962.** A staining method for differentiating spores , crystals and cells of *Bacillus thuringiensis*. *J. Insect. Patholo.* **4** ,pp: 384-386.

17. Baron, E. J.; Peterson, L. R. and Finegold, S. M. **1994.** Antimicrobial agent and chemotherapy. In: Baily and Scott's Diagnostic Microbiology .9th ed. Mosby Year Book Inc, USA.
18. Maniatis, T.; Fritsch, E. F. and Sambrook, J. **1982.** Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory N.Y.
19. Weiserova, M. ; HuBacek, J.; Brenner, V.; Piruzian,E.S.;Kobec,N.S.and Velikodvorskaya **1987.** Mini-Mu. Transposition bacterial gene on the transmissible plasmid. *Folia Microbiology* **32** ,pp: 268.
20. Nester, E. W.; Anderson, D. G.; Roberts, C. E.; Pearsall. N. N. and Nester, M. T. **(2001).** Antimicrobial medications In : Microbiology, A Human Perspective. 3rd ed. Pp:495-520. McGrow – Hill Higher Companies.
21. Parry, J. M.; Turnbull, P. C. and Gibson, J. R. **1983.** Method and characterization test In: A colour atlas of Bacillus sp. wolf medical Publication. Ltd.
22. Turnbull, C. B.; Sirianni, N. M.; LeBron, C. I.; Samaan, M. N.; Sutton, F. N.; Reyes, A. E. and Peruski, L. F. **2004.** MICs of selected antibiotecs for *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, and *Bacillus mycoides* from rangs clinical and environmental source as determined by the Etest. *J. Clinic. Microbio*. **42** ,pp:3626-3643.
23. Aronson, A. I.; Beckman, W. and Dunn, P. **1986.** *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiolo. Rev*. **50** ,pp:1-24.
24. Kronsted, J. W.; Shnepff, H. E. and Whiteley, H. R. **1983.** Diversity of location for *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. *J. Bacteriolo*. **154** ,pp:419-428.
25. Wilcks, A.; Jayaswal, N.; Lereclus, D. and Andrup, L. **1998.** Characterization of plasmid pAW63 , a second self-transmissible plasmid in *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD73. *Microbio*. **144** ,pp:1263-1270.