مجله دنیای میکروب ها
سال سوم، شماره اول (پیاپی ۶)، بهار ۱۳۸۹
صفحات ۳۰-۲۴

Original Article

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، [۲]استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات فارس، گروه میکروبیولوژی
[۳]استادیار، بخش ایمونولوژی، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی بالینی استاد البرزی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، [۴] دانشیار، مرکز تحقیقات پیوند و ترمیم اعضاء، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

چکیده

سابقه و هدف: باسیلوس تورنجینسیس، باکتری تولید کننده 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 جمع آوری 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، تقریبا تمامی نمونه‌ها حدود اندازه ۳۴ کیلو دالتون را داشتند.

واژگان کلیدی: باسیلوس تورنجینسیس، پروتئین Cry، تعیین سروتیپ، SDS-PAGE

دریافت مقاله: آذر ۸۸ پذیرش برای چاپ: اسفند ۸۸

مقدمه

باکتری باسیلوس تورینجینسیس 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 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 تولید کننده اسپور می‌باشد. این میکروارگانیسم پروتئین‌های سمی حشره کش 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

*) آدرس برای مکاتبه: شیراز، بیمارستان نمازی، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی بالینی استاد البرزی، بخش ایمونولوژی.
پست الکترونیک: Rasouliman@yahoo.com

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 می‌باشد (۱ و ۲). فعالیت حشره کشی باسیلوس تورنجینسیس به نوع پروتئین‌های Cry و نوع حشره بستگی دارد. جدایه‌های طبیعی باسیلوس تورنجینسیس به عنوان حشره‌کش زیستی در برابر بعضی از رده‌های حشرات مورد استفاده قرار می‌گیرد. از طرف دیگر برخی از سویه‌های باسیلوس تورنجینسیس برای نماتودها و پروتوزوئرها نیز سمی می‌باشند (۳ و ۴). هم چنین در مطالعات جدید سویه‌هایی از باسیلوس تورنجینسیس گزارش شده‌اند که بر علیه رده‌های سلول‌های سرطانی خاص خاصیت کشندگی دارند (۵ و ۶).

باسیلوس تورینجینسیس در بسیاری از زیستگاه‌ها یافت می‌شود و زیرگونه‌های معروف آن از حشره‌های مرده یا لاروها و در بسیاری از نمونه‌هایی که سم‌ها در آن فعالیت کرده‌اند، جداسازی شده است. این میزبان‌ها شامل سخت‌پوشان، دوبالان و بال پولک داران می‌باشند. زمانی که لارو حشرات می‌میرند حاوی مقدار زیادی اسپور هستند که می‌توانند در محیط رها شوند. این باکتری در زیستگاه‌های متفاوت از قبیل گرد و خاک، محصولات ذخیره شده، جسد حشرات، خاک کشاورزی و محیط‌های آبی یافت می‌شود و سویه‌های آن تنوع ژنتیکی را همراه با توان سمیت متفاوت نشان می‌دهند که بیشتر به دلیل تبادل پلاسمید بین سویه‌ها می‌باشد (۷). در حقیقت هر زیستگاه می‌تواند سویه‌ای جدید از باسیلوس تورنجینسیس را داشته باشد که بر روی گروه حشرات مشخص اثر سمی دارند. بنابراین سویه‌های جدا شده از محیط‌های مختلف دارای ویژگی‌های متفاوتی هستند (۸). بر همین اساس بیشتر پژوهشگران دنیا بر روی جداسازی سویه‌های جدید باسیلوس تورنجینسیس تمرکز نموده‌اند تا اثرات حشره کشی و یا ضد سرطانی آن را مطالعه نمایند. هدف از این پژوهش، جداسازی سویه‌های باسیلوس تورنجینسیس از مناطق مختلف استان فارس و بررسی توکسین پروتئینی Cry آن‌ها می‌باشد تا در مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گیرند.

مواد و روش‌ها

الف) جداسازی و شناسایی باکتری: برای جداسازی باسیلوس تورنجینسیس از خاک، ۲۰۰ گرم خاک از عمق ۱۰ سانتی‌متری به صورت تصادفی از ۷ منطقه مختلف استان فارس شامل شیراز، جهرم، کازرون، مرودشت، فسا و سد درودزن، (در مجموع ۲۵ نمونه) تهیه گردید. نمونه‌ها در کیسه‌های 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).

جدایه‌ها بر اساس ویژگی‌های شکلی و تولید سم، از نظر آزمون‌های بیوشیمیایی مانند تخمیر قندهای مالتوز، گلوکز، فروکتوز، مانیتول، سوکروز، سالیسین و تجزیه نشاسته، اسکولین و سیترات و تولید آنزیم‌های اوره آز، همولیزین، کاتالاز و تحرک مطالعه شدند. تمامی آزمایش‌های انجام شده با نمونه استاندار (باسیلوس تورنجینسیس با شماره NCIMB9134 انگلستان) مقایسه گردید (۹).

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

جداسازی و خالص‌سازی بلور پروتئین‌ها بر اساس روش لی (Lee) و همکارانش انجام گرفت. جدایه‌ها بر روی محیط نوترینت آگار کشت داده شد تا باکتری‌ها وارد مرحله اسپورزایی شوند (۱۴). سپس دو لوپ از کلنی باکتریایی به لوله‌های اپندروف استریل حاوی یک میلی‌لیتر 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 ۰/۰۱٪ مرکاپتواتانول (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 ۱۳۰۰۰rpm

سانتریفوژ شده و ۱۴۰ میکرولیتر تری کلرو استیک اسید ۲۰٪ برای رسوب‌گذاری 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 ۱۰۰۰۰rpm سانتریفوژشد در مرحله بعد محلول رویی به آرامی براشته شد و SDS-PAGE با بافر (۰/۱۵Tris/Cl مولار با pH ۸/۸، EDTA ۳/۷۵mM، ۰/۷۵M سوکروز، ۰/۰۷۵٪ برومونفل بلو، ۲/۵٪ SDS و ۷/۴mM دی تیوتریتول) انجام گرفت. در نهایت نمونه‌ها 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 محلول‌های استیک اسید، متانول و آب مقطر استریل تثبیت گردید و به کمک رنگ کوماسی بریلیانت بلو رنگ‌آمیزی و مطالعه شد.

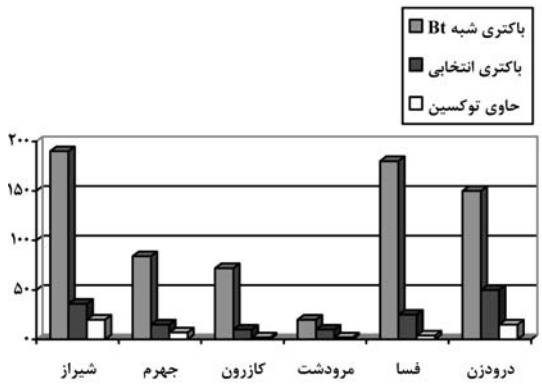
نتایج

الف) جداسازی و شناسایی باکتری: از ۲۵ نمونه جمع آوری شده از ۷ منطقه استان فارس، ۱۱۱۰ کلنی از باکتری‌های تشکیل دهنده اسپور حاصل گردید که ۶۹۶ کلنی از نظر شکل به کلنی باسیلوس تورینجنسیس شباهت داشتند. بهترین روش بازیافت این باکتری از خاک روش تغییر یافته WHO بود. در روش یاد شده بیشترین تعداد باکتری‌ها جداسازی گردید. میانگین ایندکس [(تعداد باکتری‌های انتخابی/باسیلوس تورنجینسیس‌های جداشده)×۱۰۰] باسیلوس تورنجینسیس در استان فارس ۰/۳۴٪ بود. همچنین بیشترین سویه‌ها 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، هم‌چنین استفاده از اسکولین و سیترات مورد بررسی قرار گرفتند. در تمام موارد سویه‌های جداسازی شده در تولید کاتالاز و همولیزین توانایی بارزی داشتند. سویه‌های جداسازی شده از نظر حرکت و تخمیر قندهای لاکتوز و سالیسین متغیر بودند، اما تمامی سویه‌ها از نظر تولید آنزیم لستیناز و هیدولیز نشاسته و اسکولین مثبت و تست اوره آز منفی را داشتند. اکثر سویه‌ها توانایی تخمیر گلوکز، مالتوز و فروکتوز را داشته و تولید اسید می‌نمودند. هیچ یک از سویه‌های جداسازی شده توانایی تخمیر مانیتول و استفاده از سیترات را نداشتند. همان‌طور که در جدول ۱ مشخص شده است نمونه‌های جداسازی شده براساس ۴ آزمون تخمیری در سه سروتیپ

جدول۱: 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 میلی‌لیتر سرم نمکی (W/V ۸۵٪) اضافه نموده و ورتکس گردید. ۱ میلی‌لیتر از این محلول در ۸۰°C به مدت ۱۲ دقیقه گرم‌خانه گذاری و سپس ۵ دقیقه بر روی یخ قرار داده و رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-3} از آن تهیه گردید. ۰/۱ از هر نمونه بر روی محیط لوریا آگار کشت داده شد. بعد از ۲٤ ساعت گرم‌خانه گذاری در دمای ۳۷°C، کلنی‌های شبیه به *باسیلوس تورنجینسیس* جداسازی شدند وایزوله‌ها از نظر تست بیوسیمیایی 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 میلی‌لیتر برداشته و به مدت ۵ دقیقه در ۸۰°C حرارت می‌دهیم.← 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).
٤	۰/۲۵ گرم نمونه خاک در ۱۰ میلی‌لیتر محیط نوترینت براث ← ۱۵ دقیقه حرارت ٦٥°C ← کشت بر روی محیط اسپورزا (۱۱).
٥	۱ گرم خاک در ۱۰ میلی‌لیتر محیط لوریا برتانی مایع حاوی ۰/۲۵ مولار سدیم استات← شیک دادن در دور ۲۵۰، ۳ ساعت در۳۰°C ← ۳ دقیقه در ۸۰°C ← کشت در محیط لوریا برتانی آگار← بعد از ۲٤ ساعت گرم‌خانه گذاری کشت در محیط T13 (۱۱).
٦	۱گرم نمونه در ۹ میلی‌لیتر آب مقطر حل نموده و از آن رقت 10^{-3}- 10^{-1} تهیه می‌گردد← حرارت دهی در دمای٦٥°C به مدت ۱۵ دقیقه ← افزودن ۱۰۰ میکرولیتر رقت 10^{-1}در ۱۰۰ میلی‌لیتر 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 میلی‌لیتر محیط نوترینت براث حاوی ۰/۲۵ مولار سدیم استات ← ۲٤ ساعت در ۳۷°C ← ۵ دقیقه حرارت ۸۰°C ← کشت بر روی محیط نوترینت آگار (۱۳).



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

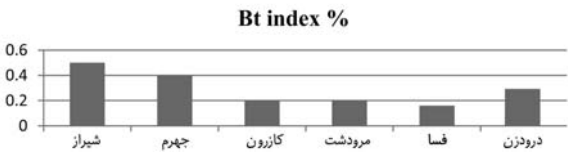
قرار داشتند، که در این میان کم‌ترین سروتیپ متعلق به سوتو و بیشترین متعلق به کورستاکی بود.

ب) مشاهده سم و جداسازی پروتئین *Cry*: از بین ۶۹۶ نمونه شبیه به باسیلوس تورنجینسیس، ۱۴۶ جدایه بر اساس تفاوت‌های ریختی اولیه و شکل ظاهری کلنی انتخاب شدند و در زیر میکروسکوپ فازکنتراست از نظر حضور بلور پروتئین مورد مطالعه قرار گرفت. از بین کلنی‌های انتخابی ۵۰ نمونه دارای بلور بودند. مطالعات میکروسکوپی نشان دهنده وجود بیش از یک نوع سم در بین جدایه‌ها 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 تورنجینسیس‌های جداسازی شده پروتئین‌هایی با اندازه‌های متفاوت شامل ۸۸، ۷۰، ۳۵ و ۱۸ کیلودالتون داشتند، اما بیشتر نمونه‌ها از نظر اندازه توکسین یکسان بودند. پس از تیمار آنزیمی با استفاده از پروتئیناز K با غلظت ۶۰ μg/M بیشترین غلظت از پروتئین قطعه ۳۴ کیلودالتونی ایجاد شد (تصویر ۱).

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

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

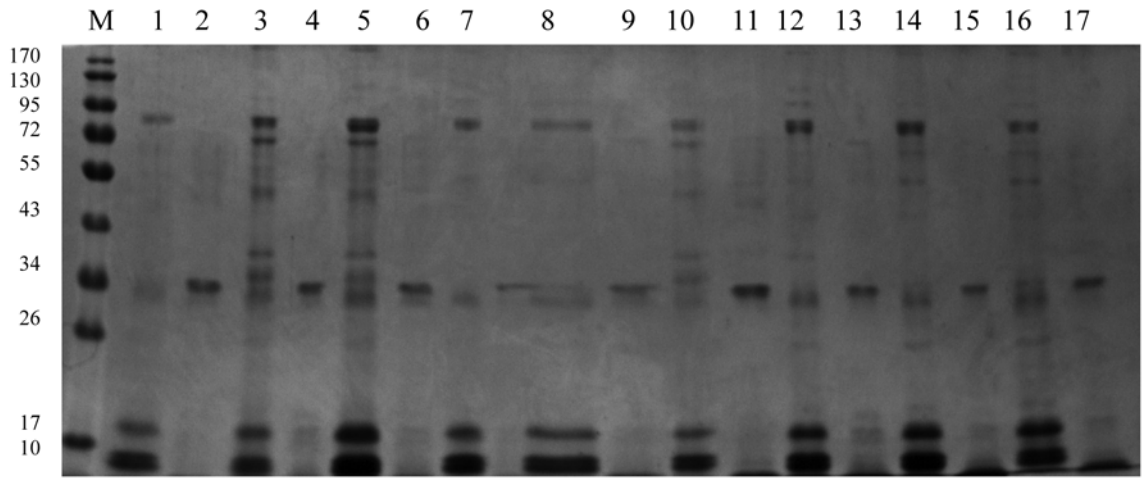


نمودار ۲: فراوانی باسیلوس تورنجینسیس در مناطق مختلف.

بحث

باسیلوس تورینجینسیس یک باکتری میله‌ای اسپوردار و هوازی است، که در خاک برخی از مناطق به وفور یافت می‌شود. در دهه‌ی ۱۹۷۰ این باکتری به خاطر وجود سم‌های ضدآفات محصولات گیاهی (لارو حشرات) از اهمیت ویژه‌ای 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 می‌باشد که برای لارو حشرات کشنده است. مطالعات جدید نشان داده است که این سم رشد برخی از سلول‌های سرطانی را کاهش می‌دهد. پژوهش‌های دیگر نشان می‌دهد که در خاک کشورهای مختلف، سویه‌های این باکتری دارای ظرفیت های متفاوت ژنتیکی در کدکردن توکسین می‌باشند، برای مثال هیچ کدام از ژن‌های سویه A1هاکمن از کشور عراق از لحاظ توالی مشابه ژن‌های کدکننده سم های Cyt، Cry و Vip در سوش استاندارد نبودند (۱۴).

دراین پژوهش تنوع و پراکندگی سویه‌های بومی باکتری باسیلوس تورنجینسیس در زیستگاه‌های مختلف استان فارس مورد مطالعه قرار گرفت که بر اساس تولید سم، آزمون‌های 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. هم‌چنین 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 نمونه‌های خاک باغات شهر شیراز جداسازی شد. این نتیجه نشان دهنده تمایل این باکتری به مناطق نمناک و معتدل می‌باشد که با نتایج صالحی



تصویر ۱: الکتروفورز پروتئین ۹ نمونه جداسازی شده از استان فارس. M: مارکر. ۱۷، ۱۵، ۱۳، ۱۱، ۹، ۷، ۵، ۳، ۱ پروتئین‌های جداسازی شده خام. ۱۸، ۱۶، ۱۴، ۱۲، ۱۰، ۸، ۶، ۴، ۲ پروتئین‌های برش داده شده با آنزیم پروتئیناز K با غلظت ۶۰ μg/M.

(Salehi) و همکاران در سال ۲۰۰۸ مطابقت دارد. یکی از روش‌های متداول شناسایی باسیلوس تورنجینسیس، تعیین سروتیپ بر اساس آنتی‌ژن‌های تاژک (flagellar) می‌باشد که گران قیمت است و نیاز به طراحی آنتی بادی‌های اختصاصی دارد. اما با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی، شناسایی سریع تیپ‌های بیوشیمیایی مختلف باسیلوس تورنجینسیس قابل انجام است. بنابراین بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی، جدایه‌ها در سه سروتیپ، تورنجینسیس، کورستاکی و سوتو قرار گرفتند (۱۵ و ۱۰).

از طرف دیگر در این مطالعه سم بلوری جدایه‌های جداسازی شده بر اساس الکتروفورز بر روی ژل پلی‌آکریل آمید ۱۰٪ مورد مطالعه قرار گرفت. پروتئین‌های Cry در برابر سویه‌های خاص حشرات و سلول‌ها بسیار انتخابی عمل می‌کنند. جدایه‌های مختلف از نظر الگوی پروتئینی به یکدیگر مشابه بوده و پروتئین‌های مختلف در اندازه‌های مختلف تولید می‌کنند. وزن مولکولی این پروتئین‌ها تقریبا در اکثر نمونه‌ها ۸۸، ۳۴، ۱۸ و ۱۵ کیلودالتون بود که از این نظر با نتایج میزوکی و همکاران مطابقت دارد (۳). جداسازی نمونه‌های باسیلوس تورینجنسیس از این منطقه جغرافیایی با هدف جداسازی و شناسایی سویه‌ها و سم صورت گرفت که متعاقباً در تحقیقات بعدی از سم در درمان سلول‌های سرطانی استفاده شود تا نقش این بلور پروتئین در کلینیک مورد ارزیابی قرار گیرد.

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 جدایه‌های 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 حمایت‌های مالی و اجرائی کمال امتنان را دارند.

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 Biotechhnol. 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 cytocidal 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.

Journal of Microbial World
Volume 3, No. 1, May 2010

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

Elham Moazamian[1], Nima Bahador[2], Manochehr Rasouli[3], Negar Azarpira[4]

[1]Lecturer, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Fars, Iran
[2]Assistant Professor, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Fars, Iran
[3]Assistant Professor, Department of Immonology, Professor Alborzi Clinical Microbiology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
[4]Associate 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

Correspondence to: Manochehr Rasouli
E-mail: Rasouliman@yahoo.com
Journal of Microbial World 2010 3(1): 24-30