مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۵، شماره ۳، سال ۱۳۸۳ (۷۳۹-۷۳۱)

مطالعه تولید برخی از متابولیتهای ضد میکروبی بوسیله تعدادی از سودوموناسهای فلورسنت

مسعود احمدزاده[۱]، عباس شریفی تهرانی[۲] و خلیل طالبی جهرمی[۳]
۱، ۲، ۳، استادیار، استاد، استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران
تاریخ پذیرش مقاله ۸۲/۱۱/۱۵

خلاصه

تولید متابولیتهای ضد میکروبی توسط ریزوباکتریهای آنتاگونیست به عنوان یک عامل مهم درکاهش بسیاری از بیماریهای ریشه می باشد. سیانید هیدروژن ، پروتئاز، سیدروفور و تعدادی از ترکیبات آنتی بیوتیک که بوسیله سودموناسهای فلورسنت تولید میگردد از نظر ساختمان شیمیایی شناسایی شده است که ۲،٤- دی استیل فلورو گلوسینول از مهمترین آنها میباشد. جدایه‌های Pf15, Pf16, Pf26, Pf27 و نیز استرین CHA0 *Pseudomonas fluorescens* رشد بهترین تأثیر را در جلوگیری از رشد گونه *P.ultimum* در شرایط آزمایشگاهی داشتند. جدایه Pf6 هیچگونه تأثیری در کاهش رشد این گونه نداشت. در مورد قارچ *R. solani* ، جدایه‌های Pf16, Pf26 و Pf32 و نیز استرین CHA0 بهترین تأثیر را در جلوگیری از رشد قارچ داشتند. جدایه های Pf6, Pf10, Pf21 و Pf24 هیچگونه تأثیری در کاهش رشد قارچ نداشتند. از بین ریزوباکتریهای آنتاگونیست مورد استفاده جدایه های Pf2، Pf15, Pf16, Pf22, Pf26, Pf27, Pf31 Pf9 و Pf32 و نیز استرین CHA0 تولید سیانید هیدروژن کردند. ۸ جدایه شامل Pf2 Pf1, Pf6, Pf12, Pf15, Pf21، Pf27 و Pf32 و نیز استرین CHA0 تولید پروتئاز کردند. اغلب جدایه ها تولید سیدروفور کردند .جدایه های Pf1, Pf16, Pf26, Pf27 و Pf32 و نیز استرین CHA0 با توجه به اندازه قطر هاله نارنجی رنگ اطراف کلنی باکتریها بیشترین تولید سیدروفور را داشتند. هیچیک از جدایه های مورد آزمایش نتوانستند درون لوله آزمایش حاوی محیط سلولاز باعث تغییر رنگ کاغذ صافی بشوند. از بین ۱۹ باکتری مورد آزمایش ، ۱۵ جدایه تولید مقادیر قابل اندازه گیری از آنتی بیوتیک دی استیل فلوروسینول ، ۲ جدایه مقادیر غیر قابل تشخیص و ۲ جدایه نیز اصلا تولید آنتی بیوتیک نکردند. بیشترین تولید آنتی بیوتیک مربوط به استرین CHAO به میزان ۱۱/٤ میکروگرم در میلی لیتر بود . جدایه های Pf 29 و Pf 31 مقادیر بسیار کم و جدایه های Pf 3 و Pf 21 تولید آنتی بیوتیک نکردند.

واژه‌های کلیدی : سودوموناسهای فلورسنت، ریزوباکتریها ، دی استیل فلوروگلوسینول ، سیدروفور

مقدمه

اغلب سودوموناسهای فلورسنت جدا شده از خاک با جلوگیری از رشد عوامل بیماریزا در اثر تولید موادی نظیرآنتی بیوتیک، سیدروفور، سیانید هیدروژن و پروتئاز و همچنین از طریق مستقیم با تولید هورمونهای گیاهی باعث افزایش رشد گیاه می‌شوند (۴، ۹). متابولیتهای ضد میکروبی به عنوان یک عامل مهم در کاهش بسیاری از بیماریهای ریشه می باشد. علاوه بر سیدروفور، سیانید هیدروژن وپروتئاز، تاکنون تعدادی از ترکیبات آنتی بیوتیک که بوسیله باکتریهای گروه سودوموناسهای فلورسنت تولید میگردد از نظر ساختمان شیمیایی شناسایی شده است که اغلب ترکیباتی از گروه فنازین‌ها، پیرول‌ها و مشتقات اندول می‌باشند. تعدادی آنتی بیوتیک که حاوی ازت

مکاتبه کننده: مسعود احمدزاده

نیستند شناخته شده که۲،۴- دی استیل فلورو گلوسینول از مهمترین آنها میباشد (۸). این آنتی بیوتیک ضد باکتری، ضد ویروسی و ضد کرمهای دستگاه گوارشی با خاصیت گیاه سوزی می‌باشد (۸). تولید این مواد باید در زمان و مکان مناسب صورت گیرد تا بیماری را بنحو موثری کنترل نماید.

نقش آنتی بیوتیک دی استیل فلورو گلوسینول در کنترل قارچهای *Gaeumannomyces graminis* عامل بیماری پاخوره گندم، *Thielaviopsis bassicola* عامل بیماری پوسیدگی سیاه ریشه توتون ، *Fusarium oxysporum* عامل بیماری پژمردگی گوجه فرنگی و *Pythium ultimum* روی خیار، *Rhizoconia solani* روی پنبه اثبات شده است (۷، ۱۵، ۱۶). با توجه به نتایج متفاوت و متناقض کاربرد ریزوباکتریها در شرایط مزرعه، تحقیقات وسیعی به منظور بررسی این موضوع در حال انجام است. بررسیهای ژنتیکی نشان می‌دهد که تولید آنتی بیوتیک بوسیله سودوموناسهای فلورسنت تحت کنترل یک سیستم دو جزئی پروتئینی است که یکی از آنها به عنوان گیرنده محیطی در شرایط خاصی باعث القای تولید آنتی‌بیوتیک می‌شود. باکتریهای موجود در ناحیه ریزوسفر از گروه سودوموناسهای فلورسنت بطور مستقیم با تولید بعضی تنظیم کننده‌های رشد گیاه، و نیز بصورت غیر مستقیم از طریق کنترل بیولوژیکی بیمارگرها و یا القای مقاومت در گیاهان باعث افزایش رشد آنها می شوند (۱۶). متابولیت‌هایی که توسط باکتری‌ها و قارچهای ناحیه ریزوسفر تولید می‌شود روی بیوسنتز دی استیل فلورو گلوسینول تاثیر می‌گذارد. اسیدفوزاریک که توسط قارچ *F.oxysporum* تولید میشود از تولید آنتی بیوتیک دی استیل فلوروگلوسینول در استرین CHAO ممانعت می‌کند. غلظت اسیدفوزاریک همبستگی زیادی با درجه بازدارندگی ژن *phl*A دارد (۱۳).

تولید ترکیبات آنتی بیوتیک (۴)، سیدروفورهای نوع سودوباکتین (۱۴) ، سیانید هیدروژن (۱۶) و آنزیم پروتئاز (۹) از مهمترین مکانیسم‌های موثر در کنترل بیولوژیکی عوامل بیماریزای گیاهی توسط این باکتریها بشمار می‌رود. بعلاوه تاثیر مثبت این باکتریها روی سایر میکروارگانیسم‌های مفید خاک و میکوریزا و همچنین کمک به قدرت جذب مواد معدنی (بخصوص فسفر و ازت) توسط گیاه از دیگر مکانیسم های موثر در افزایش رشد گیاه می‌باشند (۹). در این تحقیق جدایه‌هایی از سودوموناسهای فلورسنت که در شرایط آزمایشگاهی قدرت کم، متوسط تا خوبی در بازداری از رشد *Pythium ultimum* Trow و *Rhizoctonia solani* Kuehn داشتند از نظر تولید سیانید هیدروژن ، سلولاز، پروتئاز ، سیدروفور با روشهای کیفی و از نظر آنتی بیوتیک دی استیل فلوروگوسینول با استفاده از روش HPLC بررسی ومقایسه شد ند.

مواد و روش‌ها

جداسازی‌باکتریهای آنتاگونیست از ناحیه ریزوسفر و نگهداری آنها

برای جداسازی سودوموناسهای فلورسنت از روش کیل و همکاران (۱۹۹۶) استفاده شد : بذورلوبیا و گندم پس از ضد عفونی سطحی در گلدان حاوی ۴۰۰ گرم خاک کاشته شد. پس از چهار هفته نگهداری در تناوب نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت نور و رطوبت ۷۰٪ ، خاک به آرامی از روی ریشه شسته و سپس ریشه‌ها درون یک ظرف حاوی آب استریل روی شیکر قرار گرفت و بمدت ۳۰ثانیه با اتانول ۷۰ درصد تیمار شد. ریشه‌ها به قطعات یک سانتیمتری بریده و روی محیط اس یک(S1) یا محیط کینگ ب (KB) قرار گرفت. تشتک پتری‌ها بمدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در ۲۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد تا کلنی‌های باکتری ظاهر شود. باکتریهایی که زیر نور ماوراء بنفش از خود خاصیت فلورسنت نشان دادند به محیط آگار مغذی NA منتقل گردیدند.

در محیط اس یک سدیم لائوریل سارکوسین (SLS) از رشد باکتریهای گرم مثبت و تریمتوپریم از رشد سودوموناسهای غیر فلورسنت جلوگیری می‌کنند (۸). باکتریها در محلول ۰/۱ مولار سولفات منیزیم نگهداری و از آنها برای انجام آزمایشها استفاده شد تا یکنواختی در آنها رعایت شود.

باکتری *Pseudomonas fluorescens* استرین CHAO برای مقایسه با سودوموناسهای فلورسنت جداشده از مزارع لوبیا وگندم استفاده شد.

بررسی قدرت بازداری از رشد قارچهای *Pythium ultimum* و*Rhizoctonia solani* درون تشتک پتری - برای بررسی قدرت جلوگیری از رشد قارچهای بیماریزا در شرایط

آزمایشگاهی از روش کیل و همکاران (۱۹۹۶) استفاده شد: باکتریها بصورت نقطه‌ای یا خطی روی محیط کشت مالت آگار به فاصله ۰/۵ سانتی متراز لبه تشتک پتری کشت داده شد و یک ساعت بعد قطعه‌ای از محیط کشت حاوی قارچ مورد نظر در وسط تشتک پتری قرار گرفت. در این روش باکتری را قبلاً بمدت ۸ ساعت در محیط مایع مغذی[1] رشد داده تا درمرحله رشد لگاریتمی قرار گیرد. برای هر باکتری سه تکرار بکار رفت. تشتک پتری‌ها بمدت ۴ تا ۷ روز در دمای ۲۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. وجود هاله بازدارندگی بدون در نظر گرفتن شعاع آن به عنوان واکنش مثبت بازداری از رشد قارچ تلقی شد. برای مقایسه قدرت بازدارندگی، فاصله کلنی باکتری تا میسلیوم قارچ اندازه‌گیری و میانگین آنها براساس آزمون t-student در سطح ۵٪ مقایسه شد.

بررسی تولید برخی متابولیتهای میکروبی مؤثر در خاصیت آنتاگونیستی

تولید سیدروفور

برای بررسی تولید سیدروفور ازمحیط CAS[2] استفاده گردید که از ترکیب سه محلول بدست می آید:

محلول اول: ۳۰/۲۴ گرم پیرازین بیس اتان سولفونیک اسید (PIPES) با ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شد، اسیدیته آن با سود یک نرمال به ۶/۸ رسید و سپس ۵ گرم از ماده کازآمینواسید (casaminoacids) اضافه گردید و به همراه ۱۲ گرم آگار در ۱۲۱ درجه بمدت ۱۵ دقیقه سترون شد.

محلول دوم: ۶۰/۵ میلی گرم از CAS در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد و سپس ۱۰ میلی لیتر از محلول سه ظرفیتی آهن (۱mM $FeCl_3.6H_2O$, 10mM HCl) به آن اضافه شد. در ظرف دیگری ۷۲/۹ میلی گرم از ماده هگزادسیل تری متیل آمونیوم بروماید (HDTMA) با ۴۰ میلی لیتر آب مقطر کاملا مخلوط و سپس با اضافه کردن آن به ظرف اول محلول دوم بدست آمد که بطور جداگانه درون اتوکلاو بمدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۱ درجه سانتیگراد سترون شد.

محلول سوم: ماده $MgCl_2.6H_2O$ را به میزان ۸۱۳ میلی گرم در ۱۰۰ میلی لیتر آب ریخته و بعد از هم زدن اتوکلاو شد.

1 . Nutrient broth

2. Chrome Azurol (S)

محلول دوم و سوم با یکدیگر مخلوط و در حالت بهم خوردن به محلول اول اضافه گردید. محیطی که بدست می آید آبی رنگ است که درون تشتک پتری های سترون ریخته شد. با استفاده از یک لوپ باکتریها به صورت نقطه ای روی این محیط کشت داده شد و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری گردید. در صورتیکه باکتری تولید سیدروفور کند باعث تغییر رنگ محیط به نارنجی می شود که در اثر خارج ساختن آهن از محیط CAS می باشد. اندازه هاله ایجاد شده در اطراف کلنی باکتری با میزان سیدروفور رابطه مستقیمی دارد. میانگین بدست آمده برای هر باکتری بعنوان یک تکرار با استفاده از آزمون t-student با یکدیگر مقایسه شد. هر یک از مقادیر بدست آمده، میانگین سه آزمایش مستقل است.

تولید پروتئاز

با توجه به نقش پروتئاز به عنوان یکی از مکانیسم‌های کنترل بیولوژیکی، تولید این آنزیم در آزمایشگاه بررسی شد. به این ترتیب که ابتدا محیط کشتSMA[3] شامل ۱۵ گرم پودر شیر، ۵ گرم پودر شیر، ۵ گرم عصاره مخمر، ۴ گرم آگار خونی و ۱۳/۵ گرم آگار باکتریولوژیک تهیه و درون اتوکلاو سترون شد. تشتکهای حاوی محیط کشت SMA در ۲۷ درجه بمدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. تشکیل یک هاله بیرنگ در اطراف کلنی باکتری نشانه فعالیت پروتئاز است.

تولید سیانید هیدروژن

برای بررسی تولید سیانید هیدروژن از روش کاستریک و کاستریک (۱۹۸۳) استفاده شد: ابتدا سوسپانسیون هر یک از باکتریها از کشت ۲۴ ساعته بطور جداگانه در یک میلی‌لیتر آب مقطر سترون تهیه و بمقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هر جدایه روی محیط کشت NA پخش شد. قطعاتی از کاغذ صافی به ابعاد ۱×۱ سانتی‌متر در محلول معرف HCN غوطه ور گردید. این محلول شامل: ۵ میلی لیتر اتیل استواستات مس، ۵ میلی گرم متیل بیس– ان – ان – دی متیل آنیلین و ۲ میلی‌لیتر کلروفرم می‌باشد. آنگاه قطعات کاغذ صافی آغشته به معرف مذکور درون درب تشتک تشتک پتری حاوی کشت باکتری آنتاگونیست قرار گرفت و بصورت وارونه در ۲۸ درجه نگهداری شدند. تغییر رنگ

3 . Skim Milk Agar

کاغذ صافی به رنگ آبی پس از ۱۸-۳ ساعت نشانه تولید سیانید هیدروژن می باشد.

تولید سلولاز

محیط لازم برای آزمایش سلولاز شامل ۱ گرم دی فسفات پتاسیم، ۰/۵ گرم نیترات سدیم، ۰/۵ گرم سولفات منیزیوم، ۰/۵ گرم کلرید پتاسیم، ۰/۰۱ گرم سولفات آهن در یک لیتر آب مقطر تهیه شد. درون هر لوله آزمایش ۹ میلی لیتر ریخته و در هر کدام یک کاغذ صافی به ابعاد ۱×۹ سانتیمتر گذاشته شد. بنحوی که نیمی از کاغذ بیرون از سطح مایع قرار گرفت. سپس این مجموعه را سترون نموده و پس از سرد شدن آن یک میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری را وارد لوله کرده و در دمای ۲۵ درجه نگهداری شد. تا ۳ هفته پس از انجام آزمایش، هر روز کاغذهای صافی از نظر هرگونه تغییر رنگ مورد بررسی قرار گرفت. در نمونه شاهد ۱ میلی لیتر محلول ۰/۱ مولار سولفات منیزیم ریخته شد.

استخراج و تشخیص آنتی بیوتیک

بیست و یک جدایه ازسود ومونا‌سهای فلورسنت از نظر تولید آنتی‌بیوتیک براساس روش بونسال و همکاران (۱۹۹۷) مورد بررسی قرارگرفت. باکتری‌ها روی ۴۰۰میکرولیتر محیط مایع کینگ ب کشت داده شد و به مدت ۷۲ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شد با اضافه کردن ۴/۵میکرو لیتر تری فلورواستیک اسید pH محیط به ۲ رسانده شد و دوبار با یک میلی‌لیتراتیل استات استخراج گردید. فاز آلی که حاوی آنتی بیوتیک می‌باشد تبخیر گردید. سپس ۱۰۰میلی لیتر استونیتریل ۳۵ درصد حاوی ۰/۱درصد تری فلورواستیک اسید اضافه شد. عصاره بدست آمده از فیلترهای ۰/۲میکرومترعبور داده شد. اندازه‌گیری کمی آنتی بیوتیک بوسیله دستگاه HPLC شیمادزو مدل 6A انجام گرفت. ستون با ابعاد ۱۵۰×۶ میلیمتر از نوع Shim-Pak GLC-ODS که با روش فاز معکوس در دمای ۴۰درجه سانتیگراد مورد استفاده قرار گرفت. فاز متحرک شامل استونیتریل آب (۳۰:۷۰) حاوی۰/۱ درصد تری فلورواستیک اسید با سرعت یک میلی‌لیتر در دقیقه بود. ردیاب از نوع ماوراء بنفش با طول موج ۲۷۰ نانومتر بود. حجم تزریقی ۵ میکرولیتر بود و برای محاسبه مربوط به منحنی‌ها از کنترل کننده سیستم کروماتوپک‌مجهز به چاپگر استفاده گردید.

نتایج

جداسازی باکتریهای آنتاگونیست از ناحیه ریزوسفر و نگهداری آنها و بررسی قدرت بازداری از رشد قارچ های بیماریزا درون تشتک پتری

کلنی‌های رشد یافته روی محیطهای کشت مورد استفاده که از نظر ظاهری لعاب‌دار وبرجسته بودند و زیر نور ماوراء بنفش از خود خاصیت فلورسنت نشان دادند دو بار خالص سازی و بر اساس واکنشهای بیوشیمیایی افتراقی به عنوان سودمونا‌سهای فلورسنت مورد شناسایی قرار گرفتند (اطلاعات نشان داده نشده است). اثر آنتاگونیستی باکتریها از نظر ایجاد هاله بازدارندگی در مقابل عوامل بیماریزا درون تشتک پتری مورد بررسی قرار گرفت. باکتریها از لحاظ قطر هاله بازدارندگی براساس آزمون t-student در سطح ۰/۰۵ در چهار گروه آماری قرار گرفتند. اعدادی که در جدول ۱ با حروف یکسان نشان داده شده‌اند هیچگونه اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند. جدایه‌های 15 Pf , Pf 16 ,Pf26 ، Pf 27 و استرین CHAO *Pseudomonas fluorescens* بیشترین بازدارندگی را علیه *P. ultimum* روی محیط کشت PDA داشتند (گروه a) . جدایه Pf6 هیچگونه اثر بازدارند گی نداشت و جدایه‌های 3 Pf , Pf 9 , Pf 10, Pf 21 و Pf 31 اثر بسیار کمی در کاهش رشد قارچ داشتند (گروه c). برخی از جدایه در گروه ab (شامل Pf30,Pf2 و Pf32) و بقیه در گروه b (شامل Pf1 , Pf29,Pf22,Pf12, Pf11) قرار گرفتند (جدول ۱).

میانگین‌های بدست آمده برای اثر باکتریها در کاهش رشد قارچ *R.solani* روی محیط کشت PDA درسه گروه آماری قرار گرفت (جدول ۱). سه جدایه نیز قدرت بازداری از رشد قارچ را نداشتند. (جدایه‌های Pf10,Pf6 , Pf21). جدایه‌های Pf26,Pf16, Pf32 و استرینCHAO بیشترین اثر را در بازداری از رشد قارچ *R. solani* داشتند. جدایه‌های Pf32وPf30,Pf22,Pf12,Pf11,Pf2,Pf1 در گروه دوم (bc) و جدایه‌های Pf31,Pf29,Pf9,Pf3 کمترین اثر را در کاهش رشد قارچ داشتند (گروه c).

تولید سیانید هیدروژن

از بین ریزوباکتریهای آنتاگونیست مورد استفاده فقط جدایه‌های Pf2, Pf9, Pf15, Pf16, Pf18, Pf22, Pf26, Pf27, Pf31 و Pf32 و نیز استرین CHA0 تولید سیانید

هیدروژن کردند (جدول ۱). در سایر جدایه‌ها تولید این متابولیت به اثبات نرسید.

تولید پروتئاز

جدایه‌های Pf1, Pf6, Pf12, Pf15, Pf21, Pf27 و Pf32 و نیز استرین CHA0 تولید پروتئاز کردند. هاله ایجاد شده در اطراف کلنی باکتریها از نظر اندازه تقریبا با یکدیگر یکسان بودند (جدول ۱). در سایر جدایه‌ها تولید این آنزیم به اثبات نرسید.

تولید سیدروفور

از نظر تولید سیدروفور روی محیط کشت CAS، جدایه‌های Pf1, Pf16, Pf26, Pf27 و Pf32 و نیز استرین CHA0 با توجه به اندازه قطر هاله نارنجی رنگ اطراف کلنی باکتریها بیشترین تولید سیدروفور را داشتند. جدایه‌های Pf3, Pf6, Pf12, Pf15 Pf18, Pf19, Pf21, Pf22, Pf29, Pf31, نیز بخوبی تولید سیدروفور نمودند. جدایه Pf11 اصلا تولید سیدروفور نکرد. جدایه‌های Pf2, Pf9, Pf10 و Pf30 نیز مقدار کمی تولید کردند (جدول ۱).

تولید سلولاز

هیچیک از جدایه‌های مورد آزمایش نتوانستند درون لوله آزمایش حاوی محیط سلولاز باعث تغییر رنگ کاغذ صافی بشوند. لذا تولید آنزیم سلولاز با این روش به اثبات نرسید.

جدول ۱ - بررسی تعدادی از مکانیسم های آنتاگونیستی در بازداری ازرشد قارچهای *Pythium ultimum* و*Rhizoctonia solani*

تیمارها	میزان آنتی بیوتیک (۱)	سیدروفور (۲)	پروتئاز (۳)	سیانید هیدروژن (۴)	ناحیه بازداری از رشد قارچ روی تشتک پتری *P.ultimum*(۶)	*R.solani*(۶)
CHAO	۱۱/۴	+++	+	+	۳/۲a(۵)	۴/۱a
Pf 1	۰/۹	+++	+	-	۱/۲b	۲/۶bc
Pf 2	۴/۲	+	-	+	۲/۴ab	۲/۷bc
Pf 3	۰	++	-	-	۰/۴c	۱/۳c
Pf 6	۲/۳	++	+	-	۰	۰
Pf 9	۱/۷	+	-	+	۰/۵c	۱/۱c
Pf 10	۱/۳	+	-	-	۰/۹c	۰
Pf 11	۰/۶	-	-	-	۱/۲b	۲/۱bc
Pf 12	۱/۷	++	+	-	۱/۲b	۲/۳bc
Pf 15	۵/۵	++	+	+	۲/۸a	۳/۶b
Pf 16	۸/۳	+++	-	+	۳/۲a	۴/۲a
Pf 21	۰	++	+	-	۰/۸c	۰
Pf 22	۵/۳	++	-	+	۱/۳b	۲/۱bc
Pf 26	۹/۸	+++	-	+	۳/۲a	۴/۲a
Pf 27	۷/۸	+++	+	+	۳/۲a	۳/۶b
Pf 29	بسیار جزئی	++	-	-	۱/۱b	۱/۵c
Pf 30	۲/۹	+	-	-	۲/۳ab	۲/۴bc
Pf 31	بسیار جزئی	++	-	+	۰/۵c	۱/۲c
Pf 32	۳/۷	+++	+	+	۲/۴ab	۴/۳a

۱- میزان آنتی بیوتیک بر حسب میکروگرم در میلی لیتر است.

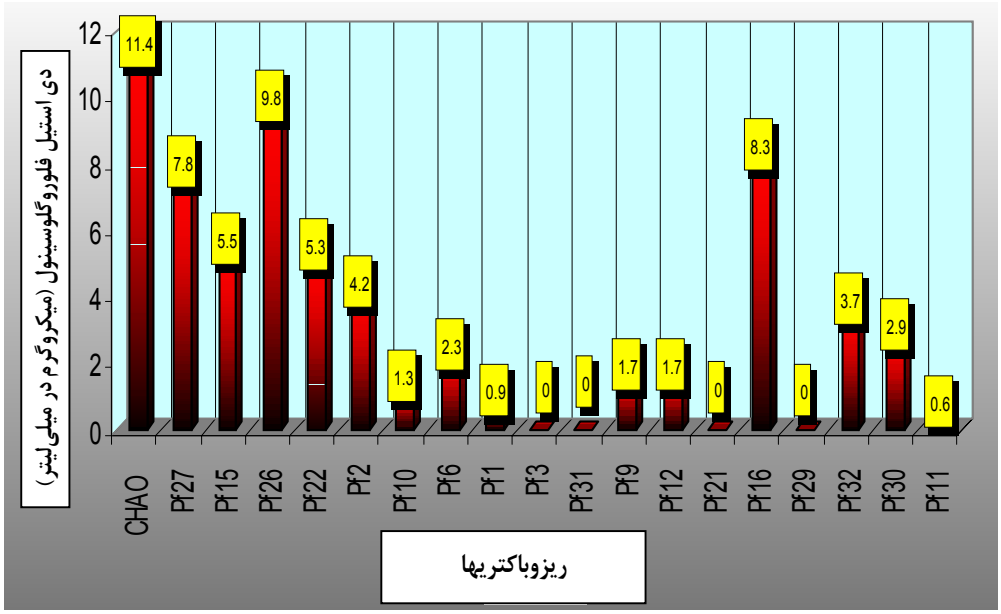
۲- ایجاد هاله نارنجی اطرا ف باکتری روی محیط CAS نشانه تولید سیدروفور میباشد

۳- فعالیت پروتئاز بر اساس بیرنگ نمودن محیط SMA تعیین شد.

۴- تولید سیانید براساس آبی رنگ شدن کاغذ آغشته به معرف تعیین شد.

۵- اعداد هر ستون که با حروف یکسان نشان داده شده اند در سطح ۵٪ بر اساس آزمون t-student اختلاف معنی دار ندارند. هر عدد میانگین سه تکرار است.

۶- فاصله بین میسلیوم قارچ و کلنی باکتری بر حسب سانتیمتر



شکل ۱- بررسی تولید آنتی‌بیوتیک دی‌استیل فلوروگلوسینول در ۱۹ جدایه از سودوموناسهای فلورسنت

استخراج و تشخیص آنتی بیوتیک

ازبین ریزوباکتریهایی که در آزمایشات قبلی اثرات کم، متوسط و زیاد در کنترل قارچهای *P. ultimum* و *R. solani* داشتند ۱۹ جدایه انتخاب و از نظر تولید آنتی بیوتیک دی استیل فلوروسینول به وسیله روش HPLC مورد بررسی قرار گرفتند. منحنی استاندارد (آنتی بیوتیک خالص ppm ۵۰۰ حل شده در استونیتریل) در شرایط مورد آزمایش در زمان ۴/۸ دقیقه مشخص گردید و بر مبنای آن مقدار آنتی بیوتی‌ک تولید شده توسط ریزوباکتریهای مورد آزمایش بر حسب میکروگرم در میلی لیتر محیط کشت محاسبه گردید. بیشترین تولید آنتی‌بیوتیک مربوط به استرین CHAO *Pseudomonas fluorescens* به میزان ۱۱/۴ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. جدایه‌های Pf 29 و Pf 31 مقادیر بسیار کم و جدایه‌های Pf 3 و Pf 21 تولید آنتی بیوتیک نکردند. از بین ۱۹ باکتری مورد آزمایش، ۱۵جدایه تولید مقادیر قابل اندازه‌گیری از آنتی‌بیوتیک دی استیل فلوروسینول ، ۲ جدایه مقادیر غیر قابل تشخیص‌و۲ جدایه نیزاصلا تولید آنتی بیوتیک نکردند (شکل ۱).

بحث

تولیدیک‌یاچند متابولیت ضدمیکروبی بوسیله‌سودوموناسهای فلورسنت و همچنین وجود همبستگی بین تولید هر یک از این متابولیتها با جلوگیری از رشد عوامل بیماریزا در شرایط آزمایشگاه و گلخانه مزیت مهمی در انتخاب یک باکتری به عنوان عامل آنتاگونیست علیه عوامل بیماریزای گیاهی محسوب می شود.

محیط " اس یک" محیطی انتخابی و هم افتراقی برای سودوموناسهای فلورسنت محسوب می‌شود (۵). قدرت انتخابی این محیط بدلیل وجود دو ماده سدیم لائوروویل ساکوزین[1] و آنتی بیوتیک تریمتوپریم[2] است که اولی از رشد میکروارگانیسم‌های گرم مثبت و دومی از رشد سودوموناسهای غیرفلورسنت جلوگیری می کند. همچنین این دو ماده دارای اثر تشدید کننده روی یکدیگر داشته و حذف یکی باعث کاهش تأثیر دیگری می شود. این موضوع با نتایج کارهای گولد و همکاران (۱۹۸۵) مطابقت دارد.

مقایسه نتایج قدرت لایه بازداری از رشد قارچهای بیماریزا نشان داد جدایه هایی که تولید آنتی بیوتیک نکردند و یا مقادیر خیلی کم تولید نمودند قدرت چندانی در جلوگیری از رشد آنها درون تشتک پتری نداشتند . محاسبه ضرایب همبستگی نشان داد که بین تولید هر یک از مواد سیدروفور، سیانید هیدروژن و پروتئاز با قدرت جلوگیری از رشد عوامل بیمارگر مورد آزمایش

1 . Sodium Lauroyl Sarcosine = SLS

2. Trimethoprim

همبستگی معنی داری وجود ندارد. این ریب برای تولید آنتی بیوتیک دی استیل فلوروگلوسینول معنی دار بود. ضریب همبستگی بین قدرت جلوگیری از رشد گونه *P. ultimum* در شرایط آزمایشگاهی با تولید آنتی بیوتیک دی استیل فلوروگلوسینول ۰/۸۶ و ضریب همبستگی بین قدرت جلوگیری از رشد قارچ *R. solani* در شرایط آزمایشگاهی با تولید آنتی بیوتیک دی استیل فلوروگلوسینول ۰/۷۷ تعیین گردید. این اعداد نشان میدهد که بین تولید آنتی بیوتیک و جلوگیری از رشد بیمارگرهای مورد آزمایش رابطه مستقیمی وجود دارد.

در مورد تولید سیانید هیدروژن توسط ریزوباکتریهای مورد استفاده، از بین ۱۹ جدایه تنها ۱۰ جدایه توانست تولید سیانید هیدروژن نموده و کاغذ صافی آغشته به معرف را به رنگ آبی درآورد. بر اساس یک کار تحقیقاتی، حداقل ۴۰ درصد سودوموناسهای که از ریزوسفر سیب زمینی جداسازی شده بودند در شرایط آزمایشگاهی تولید سیانید هیدروژن کردند (۱۴).

۸ جدایه نیز تولید آنزیم پروتئاز کردند. به غیر از یک جدایه از سودوموناسهای فلورسنت بقیه آنها بخوبی تولید سیدروفور کردند. جدایه Pf16 در شرایط آزمایشگاهی اثر بازدارندگی بالایی داشته و همچنین از نظر تولید سیدروفور و سیانید هیدروژن در سطح بالایی بود. این جدایه تولید پروتئاز نکرد. جدایه Pf26 تولید پروتئاز نکرد ولی تولید سیدروفور و سیانید هیدروژن کرد. با توجه به نتایج ضریب همبستگی تولید سیدروفور با قدرت کنترل بیماری در شرایط گلخانه ای به نظر می رسد که همبستگی معنی داری بین این دو وجود ندارد. بر اساس نتایج یک کار تحقیقاتی، سیدروفور تولید شده توسط استرین CHA0 *P. fluorescens* در کنترل بیماریهای پوسیدگی سیاه ریشه توتون و پاخوره گندم اثر چندانی ندارد (۹). همچنین نتایج یک تحقیق نشان داد که تولید سیدروفور توسط گونه *P. putida* استرین WCS417 نقش چندانی در کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی میخک در شرایط گلخانه نداشت . موتانهایی که تولید سیدرفور نمیکردند نیز تاثیر خوبی در کنترل بیماری داشتند اگر چه کلنیزاسیون ریشه بخوبی صورت نگرفت (۱۶). جدایه‌های Pf15, Pf27, Pf27, Pf32 و استرین CHA0 تولید هر سه ماده سیدرفور، پروتئاز و سیانید هیدروژن کردند. جمعیت بومی سودوموناسهای فلورسنت مولد آنتی بیوتیک فلوروگلوسینول که در خاکهای بازدارنده وجود دارند منبع بسیار مهمی برای کنترل بیولوژیکی میباشد(۱۰).

در مقایسه با روشهای مختلفی که برای استخراج و خالص سازی آنتی بیوتیک های فلوروگلوسینول وجود دارد روش بونسال و همکاران (۱۹۹۷) آسان تر و مناسب تر بنظر میرسد . کارآیی استخراج در این روش ۹۰درصد میباشد (۱۲).

در تحقیق دیگری، بیست و دو جدایه از سودوموناسهای فلورسنت که از مناطق مختلف جهان جمع آوری شده بود روی قارچ*Pythium ultimum* مورد بررسی قرار گرفت. از این تعداد هشت استرین تولید فلورو گلوسینول و پایولوتئورین و هفت استرین فقط تولید فلورو گلوسینول کردند و هشت استرین باقیمانده تولید هیچگونه آنتی بیوتیک نکردند. مقایسه این استرینها از نظرتجزیه DNA ریبوزومی نیز نتایج قبلی را تایید نمود. اغلب این استرینها از رشد قارچ *Pythium ultimum* ممانعت کردند . استرینهایی که تولید فلورو گلوسینول بیشتری کردند مجموعه بهتری از نظر حفاظت خیار در مقابل بیماری تشکیل دادند (۱۵). این محققین دریافتند که هیچگونه همبستگی معنی داری بین حفاظت در شرایط آزمایشگاهی و شرایط گلخانه وجود نداشت. همبستگی معنی داری بین مقدار آنتی بیوتیک دی استیل فلور و گلو سینول در آزمایشگاه و حفاظت گوجه فرنگی در مقابل پوسیدگی ریشه و طوقه ناشی از قارچ فوزاریوم وجود داشت ولی در مورد قارچ پیتیوم این رابطه وجود نداشت.

این نتایج نشان می‌دهند که آگاهی از ترشحات و تراوشات سطح ریشه گیاهان می‌تواند در توسعه سیستم‌های مدیریت بیماریهای ریشه گیاهان نقش بسیار مهم و تعیین کننده‌ای داشته باشد(۶، ۱۸).

سپاسگزاری

این تحقیق با استفاده از اعتبارات قطب علمی گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران انجام شده است. از خانم دکتر دفاگو از کشور سوئیس بخاطر ارسال استرین *P. fluorescens* CHAO و نمونه آنتی بیوتیک خالص شده دی استیل فلوروگوسینول و رهنمودهای ارزنده ایشان صمیمانه قدردانی می‌شود.

REFERENCES

1. Bolton H. & Elliot L.F. 1989. Toxin production by a rhizobacterial *Pseudomonas sp.* that inhibits wheat root growth.Plant Soil 114:269-278.
2. Bonsall R. F., D. M. Weller, & L. S. Thomashow. 1997. Quantification of 2, 4 – diacetylphloroglucinol produced by fluorescent Pseudomonas spp. in vitro and in the rhizosphere of wheat. Appl. Environ. Microbiol . 63:951-955 .
3. Castric, K. F. & Castric, P. A. 1983. Method for rapid detection of cyanogonic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 54 :701-702.
4. Fravel, D. R. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseaes . Ann . Rev Phtyopatol . 26:75-91.
5. Gould. W. D., C. Hagedron., T. R. Bardinelii, & R. Zablotowicz. 1985. New selective media for enumeration and recovery of fluorescent Pseudomonads from various habitats. Appl. Environ. Microbiol. 49:28 – 32
6. Hoitink, H., & M. Boehm. 1999. Biocontrol within the context of soil microbial communitis: A substrate - dependent phenomenon. Ann.Rev. Phytopathol. 37:427-46.
7. Howell C. R. & R. D. Stipanovic. 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedling with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic producd by the bacterium. 28 –084:96.
8. Keel, C. D., M. Weller, A. Natsch, G. Defago, R. J. Cook, & L. S. Thomashow. 1996. Conservation of the 2,4– diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent pseudomonads strains from diverse geographic locations. Appl. Environ. Microbiol. 62:552-563
9. Keel, C. & G. Defago. 1997. Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens: mechanisms and ecological impact. In: Gange AC, Brown, VK, eds. Multitrophic interactions in terrestrial system. Oxford: Blackwell Science 27-47.
10. Landa B. B., O. V. Mavrodi, J. M. Raaijmakers, B. B. McSpadden Gardener, L. S. Thomashow, & D. M. Weller. 2002. Diffrential ability of genotypes of 2,4- diacetylphloroglucinol – producing *Pseudomonas fluorescens* strains to colonize the roots of pea plants. Appl. Environ. Microbiol. 68:3226-3237.
11- Maurhofer, M., C. Keel, D. Haas, & G. Defago. 1995. Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 with enhanced production. Plant Pathology,44:40-50.
12. McSpadden Gardener, B. B., K. L. Schroeder, S. E. Kallogger, J. M. Raaijmakers, L. S. Thomashow, & D. M. Weller. 2000. Genotypic and phenotypic diversity of phlD – containing Pseudomonas strains isolated from the rhizosphere of wheat . Appl . Environ . Microbiol . 66:1939-1964
13. Notz, R., M. Maurhofer, H. Dubach, D. Haas, & G. Defago. 2002. Fusaric acid-producing strains of *Fusarium oxysporum* alter 2,4-diacetyl - phloroglucinol bisynthetic gene expression in *Pseudomonas fluorescens* CHAO in vitro and in the rhizosphere of wheat. Appl. Environ. Microbiol. 68: 2229 - 2235.
14. Schippers, B., A. W. Bakker, & A. H. M. Bakker. 1987. Intractions of deleterious and and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. Ann. Rev. Phytopathol. 25:339-59.
15. Sharifi–Tehrani. A., M. Zala, A. Natsch, Y. Moenne–Loccoz, & G. Defago. 1998. Biocontrol of soil- borne fungal plant diseases by 2,4 – diacetylphloroglucinol – producing fluorescent pseudomonads with different restriction profiles of amplified 16S rDNA. Eur. J. Plant Pathol . 104:631-643.
16. Weller, D. M. 1988. Biological control of soil-borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 26: 379 –407.
17. Weller, D. M., J. M. Raaijmakers, B. B. McSpadden Gardener, & L. S. Thomashow. 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. Annu. Rev. Phytopathol.40: 309-348.
18. Whipps J. M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany 52 : 487-511.

Study on Production of Some Antimicrobial Metabolites by Flourescent Pseudomonads

M. AHMADZADEH[1], A. SHARIFI TEHRANI[2] AND KH. TALEBI JAHROMI[3]
1, 2, 3, Assistant Professor, Professor and Assistant Professor,
Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran
Accepted Feb. 4, 2004

SUMMARY

Antimicrobial metabolites produced by antagonistic rhizobacteria are considered an important factor in reducing most root diseases. Hydrogen cyanide, protease,siderophore and some antibiotic compounds produced by fluorescent pseudomonads have been identified and structurally characterized among which 2,4-diacetylphloroglucinol is the most important antibiotic. Isolates Pf27, Pf26, Pf16, Pf15 and CHA0 strain had the most in hibitory effect on *Pythium ultimum* in vitro. Pf6 isolate had no effect on this species. Strains Pf8, Pf15, Pf16, Pf26, Pf27 and CHA0 demonstrated the greatest inhibition on *Rhizoctonia solani*. A total of 11 isolates including Pf2, Pf9, Pf15, Pf16, Pf22, Pf26, Pf27, Pf28, Pf31, Pf32 and CHA0 produced hydrogen cyanide. Fourteen isolates including Pf1, Pf2, Pf6, Pf12, Pf15, Pf21, Pf27, Pf 32 and CHA0 produced protease. Most of the bacteria produced siderophore. Bacterial isolates that generated the gratest amounts of siderophore included Pf1, Pf16, Pf26, Pf27, Pf32 and CHA0. None of the bacterial isolates were able to produce cellulase, being evident from the fact that there was no change of color on filter paper in a tube containing cellulose. Neither *Bacillus subtilis* isolates nor those belonging to *P. fluorescens*, Pf11, Pf17, Pf20 and Pf23, produced any siderophore. Among 19 strains of bacteria tested, only 15 produced detectable levels of 2, 4-diacetylphloroglucinol. Strain CHA0 produced 11.4 mg/ml of the antibiotic, the highest level among *P. fluorescent* studied. Strains Pf29 and Pf31 produced very low amounts of antibiotic and strains Pf3 and Pf21 produced none at all. The effects of growth condition were studied on four strains producing low, intermediate, and high levels of 2, 4-diacetylphloroglucinol.

Key words: Biological control, Fluorescent pseudomonads, Siderophore, Diacetylphloroglucinol, Rhizobacteria

۸-۲۸۰۶۰۳۱

4427190