

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها  
 سال پنجم، شماره ۱۷، بهار ۱۳۹۵، صفحه ۴۸-۳۵  
 تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۹/۱۶ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۲/۰۲

## تأثیر اکتوئین و هیدروکسی اکتوئین خارجی بر برخی فعالیت‌های ضد قارچی سویه *Pseudomonas fluorescens* UTPF5 در شرایط شوری

**ارغوان کمالی:** دانشجوی دکتری کنترل زیستی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران، kamaly@ut.ac.ir  
**مسعود احمدزاده:** استاد کنترل زیستی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران، ahmadz@ut.ac.ir  
**اکرم صادقی:** استادیار ژنتیک مولکولی، پژوهشکده پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ایران، aksadeghi@abrii.ac.ir  
**ابراهیم کریمی:** کارشناس ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ایران، ekarimi@abrii.ac.ir

### چکیده

**مقدمه:** باکتری‌های پروبیوتیک گیاهی همچون سودومونادهای فلورسنت با سازوکارهایی از قبیل تولید متابولیت‌ها و آنزیم‌ها دارای سابقه طولانی در کنترل زیستی بیمارگرهای خاکزاد هستند. یکی دیگر از نقش‌های مهم این باکتری‌ها افزایش تحمل گیاه در مقابله با تنش‌های محیطی است. اکتوئین‌ها اسمولیت‌هایی است که نقش مهمی در تحمل به تنش‌های اسمزی محیط ایفا می‌کند.

**مواد و روش‌ها:** میزان تحمل ۲۴ سویه باکتری پروبیوتیک گیاهی به شوری و دما تعیین و تعداد ۶ سویه متحمل برای انجام آزمایشات بعدی انتخاب شد. در مرحله بعد، آزمون کشت متقابل قارچ فوزاریوم سولانی و باکتری‌های رشد یافته در حضور اکتوئین و هیدروکسی اکتوئین به همراه سه غلظت کلرید سدیم انجام و یک سویه از سودوموناس فلورسنس (UTPF5) انتخاب شد. در نهایت، تأثیر اکتوئین، هیدروکسی اکتوئین و سه غلظت مختلف نمک بر جمعیت باکتری، تولید لیپاز، پروتئاز، سیانید هیدروژن، سیدروفور و بیوفیلم تعیین شد.

**نتایج:** در غلظت ۳۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، باکتری رشد یافته در حضور اکتوئین و هیدروکسی اکتوئین درصد بازدارندگی از رشد قارچ را نسبت به شاهد پنج برابر افزایش داد. شوری بر جمعیت باکتری در تیمارهای آب مقطر و اکتوئین، تولید سیانید هیدروژن در هر سه تیمار و تشکیل بیوفیلم در تیمارهای اکتوئین و هیدروکسی اکتوئین تأثیر مثبت و بر جمعیت باکتری در تیمار هیدروکسی اکتوئین، تولید پروتئاز و سیدروفور در هر سه تیمار و تشکیل بیوفیلم در آب مقطر تأثیر منفی داشت. از طرف دیگر اکتوئین جمعیت باکتری، تولید لیپاز و تولید سیانید هیدروژن را در هر سه غلظت کلرید سدیم، تولید سیدروفور را در غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار و تشکیل بیوفیلم را در غلظت ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار افزایش و تولید پروتئاز را در هر سه غلظت کلرید سدیم و تشکیل بیوفیلم را در محیط بدون نمک کاهش داد. هیدروکسی اکتوئین تأثیراتی شبیه به اکتوئین با تفاوت‌های جزئی داشت.

**بحث و نتیجه‌گیری:** اکتوئین و هیدروکسی اکتوئین با تأثیر بر تولید لیپاز، سیانید هیدروژن و تشکیل بیوفیلم موجب تعدیل کاهش کنترل زیستی ایجاد شده در اثر شوری می‌شوند.

**واژه‌های کلیدی:** سودوموناس فلورسنس، اکتوئین، شوری، کنترل زیستی، لیپاز، سیانید هیدروژن، بیوفیلم

\* نویسنده مسؤول مکاتبات

Copyright © 2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

## مقدمه

بیش از ۷۰ سال است که روش‌های کنترل زیستی بیمارگرهای گیاهی خاکزاد توسط باکتری‌ها به عنوان یک روش جایگزین برای روش‌های کنترل شیمیایی معرفی شده‌اند (۱). ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه<sup>۱</sup> در کنترل دامنه وسیعی از قارچ‌های بیماری‌زای ریشه مؤثر هستند (۲). این گروه از باکتری‌ها توانایی کلنیزه کردن ریشه‌های گیاه را دارند، رشد گیاه را تحریک می‌کنند و وقوع بیماری‌های گیاهی را کاهش می‌دهند. هر سویه باکتریایی که حداقل دارای دو ویژگی از سه ویژگی یاد شده باشد در گروه ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه قرار می‌گیرد (۳). در میان باکتری‌هایی که این ویژگی را دارند چندین سویه<sup>۲</sup> از سودوموناس فلورسنس به منظور کنترل زیستی بیمارگرهای خاکزاد استفاده شده‌اند (۴-۶). ساز و کارهای این کنترل بیشتر شامل رقابت برای مواد غذایی، تولید متابولیت‌هایی از قبیل سیدروفورها (۷)، آنتی‌بیوتیک‌ها (۸)، مواد فرار (مانند سیانید هیدروژن) (۹) و آنزیم‌های لیزکننده خارج سلولی (۱۰) هستند. به علاوه مشخص شده است که تشکیل بیوفیلم در باکتری‌ها رشد گیاه را تحریک و از گیاه در برابر بیمارگرهای گیاهی محافظت می‌کند (۱۱). نقش سیدروفور پیوریدین تولید شده توسط بسیاری از گونه‌های سودوموناس در کنترل گونه‌های پیتیوم و فوزاریوم مشخص شده است (۱۲). در شرایط "در شیشه"<sup>۳</sup> سیانید هیدروژن تولید شده توسط کشت سودوموناس فلورسنس<sup>۴</sup> روی محیط جامد، اثر بازدارندگی بر برخی از قارچ‌های بیماری‌زا دارد (۱۳). یکی دیگر از نقش‌های مهم باکتری‌های پروبیوتیک گیاهی<sup>۵</sup> افزایش تحمل گیاه برای مقابله با تنش‌های

محیطی است (۱۴). اکتوئین (تراهیدرو-۲-متیل-۴-پیریمیدین کربوکسیلیک اسید) از مشتقات پیریمیدین‌ها و یک آمینواسید حلقوی است که به طور طبیعی توسط باکتری‌ها تولید می‌شود (۱۵). این ماده که به عنوان یک اسمولیت نقش مهمی در تحمل به تنش‌های اسمزی محیط ایفا می‌کند، نخستین بار در باکتری نمک دوست اکتوتیورودوسپیرا هالوکلیس<sup>۶</sup> شناسایی و پس از آن در تعداد زیادی از باکتری‌های نمک دوست دیگر یافت شد (۱۶). این ترکیب تا کنون در باسیلوس سوبتیلیس<sup>۷</sup>، ایشرشیا کولی<sup>۸</sup>، پانتوئنا اگلومرانس<sup>۹</sup> و گونه‌هایی از سودوموناس، برویباکتریوم و استریپتومایسس (۱۷) دیده شده است. مشتق هیدروکسیله اکتوئین (هیدروکسی اکتوئین) نیز دارای ویژگی‌های مشابه اکتوئین است. این ترکیب در باکتری‌های گرم مثبت عمومیت بیشتری دارد (۱۸). پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر اکتوئین و هیدروکسی اکتوئین خارجی بر فعالیت ضد قارچی سویه سودوموناس فلورسنس (UTPF5) در تنش شوری و در شرایط "در شیشه" انجام شده است. فعالیت ضد قارچی این سویه در شرایط غیر شور در مطالعات قبلی بررسی شده بود (۱۹).

## مواد و روش‌ها

**تهیه و نگهداری سویه‌های باکتری:** تعداد ۲۱ سویه باسیلوس سوبتیلیس، ۱ سویه باسیلوس آمیلولیکوئینفشنس<sup>۱۰</sup> و دو سویه سودوموناس فلورسنس از کلکسیون باکتری‌های آنتاگونیست گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تهران دریافت و نگهداری شد. ویژگی‌های این باکتری‌ها در جدول ۱ ثبت شده است.

جدول ۱- ویژگی‌های ۲۴ سویه باکتریایی آنتاگونیست که در این پژوهش از آن‌ها استفاده شده است.

نام سویه	منبع	محل نمونه برداری	جنس و گونه
UTB10	چغندر قند	قزوین	<i>Bacillus subtilis</i>
UTB11	چغندر قند	کرمانشاه	<i>Bacillus subtilis</i>
UTB12	چغندر قند	کرمانشاه	<i>Bacillus subtilis</i>
UTB13	چغندر قند	کردستان	<i>Bacillus subtilis</i>
UTB14	چغندر قند	تهران	<i>Bacillus subtilis</i>
UTB15	چغندر قند	تهران	<i>Bacillus subtilis</i>
UTB16	چغندر قند	کرمانشاه	<i>Bacillus subtilis</i>
UTB17	چغندر قند	همدان	<i>Bacillus subtilis</i>
UTB18	چغندر قند	اصفهان	<i>Bacillus subtilis</i>
UTB19	چغندر قند	تهران	<i>Bacillus subtilis</i>
UTB20	چغندر قند	مرکزی	<i>Bacillus subtilis</i>
UTB21	چغندر قند	مرکزی	<i>Bacillus subtilis</i>
UTB22	چغندر قند	مرکزی	<i>Bacillus subtilis</i>
UTB23	چغندر قند	لرستان	<i>Bacillus subtilis</i>
UTB24	چغندر قند	فارس	<i>Bacillus subtilis</i>
UTB25	چغندر قند	تهران	<i>Bacillus subtilis</i>
UTB26	چغندر قند	قزوین	<i>Bacillus subtilis</i>
UTB27	چغندر قند	تهران	<i>Bacillus subtilis</i>
UTB28	چغندر قند	فارس	<i>Bacillus subtilis</i>
UTB29	چغندر قند	اصفهان	<i>Bacillus subtilis</i>
UTB30	چغندر قند	کرمانشاه	<i>Bacillus subtilis</i>
UTB96	-	-	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
UTPF5	پیاز	کرج	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
UTPF68	کلزا	مازندران	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

**میزان تحمل سویه‌های باکتری به شوری و دما:**  
سویه‌های باکتری در محیط کشت نوترینت آگار<sup>۱۱</sup> با غلظت‌های مختلف کلرید سدیم (۵، ۷، ۱۰، ۱۱، ۱۲ و ۱۳ درصد) کشت و بیش‌ترین غلظت نمک قابل تحمل برای هر سویه مشخص شد. در مرحله بعد میزان رشد ۲۴ سویه در سه دمای مختلف (۱۰، ۲۸ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد) و در حضور کلرید سدیم (برای باسیل‌ها غلظت ۱۰ درصد و برای سودوموناس‌ها غلظت ۷ درصد) و غیاب آن بررسی و با هم مقایسه شد.

**کشت در محیط حاوی اسمولیت‌ها و کلرید سدیم:**  
برای تمام آزمایشاتی که در ادامه می‌آید استوک اکتوئین و هیدروکسی اکتوئین یکمیلی‌مولار (در محیط مایع) و دو میلی‌مولار (در محیط جامد) تهیه و پس از عبور از فیلتر میلی‌پور ۰/۲ میکرون به محیط‌های در حال سرد شدن اضافه شد. به محیط‌های شاهد آب مقطر، سترون اضافه شد. در تمام آزمایشات غلظت‌های صفر، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم استفاده شد.

**آزمون کشت متقابل:** برای این آزمایش از روش کیل<sup>۱۲</sup> و همکاران (۲۰) با تغییراتی به شرح زیر استفاده شد. به این ترتیب که باکتری (از کشت ۲۴ ساعته) به شکل نقطه‌ای روی محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار<sup>۱۳</sup> به فاصله ۰/۵ سانتی متر از لبه تشتک پتری کشت داده شد. به شکل همزمان قطعه‌ای از محیط کشت حاوی قارچ فوزاریوم سولانی<sup>۱۴</sup> (کشت ۷ روزه) نیز در وسط تشتک پتری قرار گرفت. هر تیمار در چهار تکرار انجام شد. پس از اینکه کلونی شاهد پتری را پر کرد، درصد بازدارندگی برای هر تیمار مطابق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\times 100 = \frac{\text{میزان رشد قارچ درون پتری حاوی باکتری} - \text{میزان رشد قارچ درون پتری شاهد}}{\text{میزان رشد قارچ درون پتری شاهد}}$$

بیرنگ در اطراف کلونی باکتری‌ها نشانه فعالیت پروتئازی باکتری است.

**بررسی تولید سیانید هیدروژن:** این آزمایش از روش آلستروم و برنز<sup>۱۹</sup> (۲۳) انجام شد. بدین منظور ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون کشت ۲۴ ساعته هر یک از باکتری‌ها در تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت نوترینت آگار همراه با اسید آمینه گلايسین به طور یکنواخت پخش شد. سپس، کاغذهای صافی آغشته به محلول معرف شامل: کربنات کلسیم دو درصد و اسید پیکریک ۰/۵ درصد در قسمت درب تشتک پتری قرار داده شد. تشتک‌ها توسط نوار پارافیلیم کاملاً درزگیری شدند تا از خروج هر گونه متابولیت فرار و گازی شکل از جمله سیانید هیدروژن جلوگیری شود. این ظروف به شکل واژگون به مدت ۷۲ ساعت درون انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. یک تشتک پتری نیز به عنوان شاهد بدون تلقیح با باکتری در نظر گرفته شد. در صورت تولید سیانید هیدروژن کاغذ صافی آغشته به معرف از رنگ زرد اولیه به رنگ کرم (+) قهوه‌ای روشن (++) قهوه‌ای تیره (+++) و آجری (++++) تغییر رنگ پیدا می‌کند.

#### اندازه‌گیری میزان تولید سیدروفور به روش

**اسپکتروفوتومتری:** این آزمون بر اساس روش کاستاندا<sup>۲۰</sup> و همکاران (۲۴) انجام گرفت. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها در محیط مایع سوکسینات به ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت تازه سوکسینات منتقل شد. این محیط‌ها به مدت ۴۰ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۱۲۰ دور در دقیقه روی شیکر نگهداری شد. سلول‌های باکتری با سانتریفیوژ کردن در ۱۰۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شد. پس از حذف رسوب باکتری میزان جذب مایع

#### تعیین جمعیت باکتری با استفاده از روش

**اسپکتروفوتومتری:** میزان مشخصی از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط کشت نوترینت برات<sup>۱۵</sup> به ارلن‌های حاوی محیط‌های تازه (حاوی غلظت‌های مختلف نمک و اسمولیت‌ها) اضافه شد. ارلن‌ها به مدت ۲۴ ساعت داخل شیکر انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۱۲۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. سپس، یک میلی‌لیتر از محتوای هر ارلن به ویال‌های سترون منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه در ۸۰۰۰g و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. مایع رویی خالی شد، به هر ویال یک میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل اضافه، از هر تیمار ۱۰۰ میکرولیتر به چاهک‌های میکروپلیت اضافه و جذب هر تیمار در طول موج ۶۲۵ نانومتر با دستگاه پلیت ریدر خوانده شد.

#### بررسی تولید لیپاز: بر اساس روش شاد<sup>۱۶</sup> و همکاران

(۲۱) محیطی شامل ۱۰ گرم پپتون، ۵ گرم کلرور سدیم، ۰/۱ گرم کلرور کلسیم، ۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب تهیه شد. ۱۰ میلی‌لیتر توین ۸۰ اتوکلاو شده به محیط در حال سرد شدن (قبل از توزیع در تشتک پتری‌ها) افزوده شد. باکتری به شکل خطی کشت داده شد. پس از ۴۸ ساعت وجود هاله رسوبی در اطراف هر یک از کلونی‌ها که نشان دهنده فعالیت لیپازی باکتری است، بررسی شد.

#### بررسی تولید پروتئاز: به منظور بررسی توانایی تولید

آنزیم پروتئاز در باکتری‌ها مطابق روش مارهوفر<sup>۱۷</sup> و همکاران (۲۲) از محیط اسکیم میلک آگار<sup>۱۸</sup> حاوی ۱۵ گرم پودر شیر، ۰/۵ گرم عصاره مخمر و ۹/۱۳ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر استفاده شد. باکتری‌ها روی این محیط به شکل نقطه‌ای کشت شدند. تشکیل هاله

چاهک‌ها تخلیه و پلیت‌ها هوا خشک شدند. پلیت‌ها به مدت پنج دقیقه با ۲۰۰ میکرولیتر رنگ کریستال ویوله دو درصد رنگ آمیزی شدند. پس از گذشت این مدت زمان، رنگ‌های اضافی از طریق قرار دادن پلیت‌ها در مسیر جریان آب لوله شهری شسته و در دمای آزمایشگاه هوا خشک شدند. پس از خشک شدن پلیت‌ها، تشکیل بیوفیلم به شکل حلقه‌های ارغوانی رنگی درون چاهک‌ها قابل مشاهده است. در نهایت، ۲۰۰ میکرولیتر استیک اسید ۳۳ درصد به هر چاهک اضافه و جذب نوری<sup>۲۳</sup> رنگ کریستال ویوله موجود در حلال رنگ‌بر در طول موج ۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه پلیت ریدر خوانده شد.

**محاسبات آماری:** تمام آزمایشات به شکل فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین صفات به روش حداقل تفاوت معنادار ( $P \text{ value} < 0/05$ ) با استفاده از نرم افزار SAS انجام گرفت. در مواردی که روش ال اس دی<sup>۲۴</sup> قادر به جداسازی میانگین‌ها نبود همچون، مواردی که تعداد میانگین‌ها کم یا نامتعادل بود از روش چند دامنه‌ای دانکن در سطح آماری ۰/۰۵ استفاده شد. نرم‌افزار MINITAB آزمایش شد.

## نتایج

### میزان تحمل سویه‌های باکتری به شوری و دما:

نتایج این پژوهش نشان داد که تمام سویه‌های آزمایش شده تحمل خوبی به شوری داشتند و علاوه بر دمای بهینه ۲۸ درجه سانتی‌گراد در دماهای ۱۰ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد نیز قادر به رشد بودند (جدول ۲). ۶ سویه برای انجام آزمایشات بعدی انتخاب شد. سویه‌های

روی در طول موج ۴۰۰ نانومتر و با استفاده از دستگاه پلیت ریدر خوانده شد. داده‌های به دست آمده با استفاده از فرمول زیر به مول در لیتر تبدیل شد.

$$A = \text{میزان جذب} = e = \text{ضریب جذب مولی}$$

$$B = \text{قطر کوت} = C = \text{غلظت ماده}$$

### مقایسه میزان تشکیل بیوفیلم با استفاده از روش.

**میکروتیتر پلیت:** این آزمون بر اساس روش میکروتیتر پلیت (۲۵) با تغییراتی به شرح زیر انجام شد.

کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط کشت نوترینت براث در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد تهیه شد. سپس، یک میلی‌لیتر از این محیط کشت به ۱۰ میلی‌لیتر از محیط سترون اضافه و کدورت آن از طریق خواندن جذب نوری سوسپانسیون بین ۰/۰۹ تا ۰/۱ در طول موج ۶۲۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر تنظیم شد. این سوسپانسیون حاوی حدود  $10^6$  کلونی باکتری در هر میلی‌لیتر است. سپس، از این سوسپانسیون ۲۵۰ میکرولیتر به هر چاهک میکروپلیت انتقال داده شد. در این صورت در هر چاهک نزدیک به  $10^5 \times 2/5$  واحد تشکیل دهنده کلونی<sup>۲۱</sup> باکتری موجود است. چاهک‌های شاهد تنها حاوی محیط سترون بودند. سطح پلیت‌ها پوشیده شد و انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت، محلول مواد غذایی و سوسپانسیون میکروبی از چاهک‌ها خارج شد و هر چاهک سه مرتبه توسط ۳۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژیک استریل شسته شد. همچنین، پلیت‌ها به منظور حذف سلول‌های غیرمتصل<sup>۲۲</sup> در حین شستن به شدت تکان داده شدند. سپس، باکتری‌های متصل به دیواره و کف چاهک، با ۲۵۰ میکرولیتر اتانول ۹۶ درصد تثبیت شدند. پس از ۱۵ دقیقه، محتویات

UTPF5 بر خلاف بقیه سویه‌ها در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد بیشتر از دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد بود. میزان تحمل به نمک و رشد در دماهای کم و زیاد در سویه UTB14 نسبت به سایر سویه‌ها کمتر بود.

UTB16، UTB27، UTB96 و UTPF68 قادر به تحمل غلظت بیش از ۱۰ درصد کلرید سدیم بودند و همچنین رشد آن‌ها در دمای ۱۰ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد در حضور نمک بیشتر از سایر سویه‌ها بود. رشد سویه

جدول ۲- میزان رشد ۲۴ سویه باکتری در ۳ دمای مختلف و در حضور نمک و عدم حضور آن و بیش‌ترین میزان نمک قابل تحمل برای هر

سویه

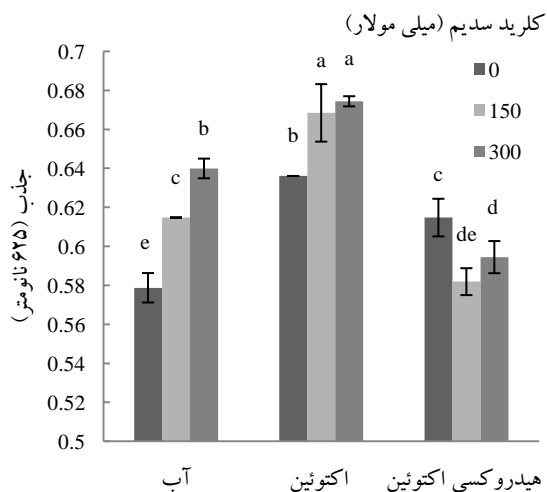
رشد در حضور یا عدم حضور نمک در دماهای مختلف						میزان تحمل نمک (درصد)	نام سویه
۴۵ درجه سانتی‌گراد		۲۸ درجه سانتی‌گراد		۱۰ درجه سانتی‌گراد			
+ کلرید سدیم	- کلرید سدیم	+ کلرید سدیم	- کلرید سدیم	+ کلرید سدیم	- کلرید سدیم		
۲	۳	۲	۳	۰	۲	۱۳	UTB10
۰	۲	۰	۳	۰	۳	۵	UTB 11
۰	۳	۰	۳	۰	۲	۵	UTB 12
۱	۳	۲	۳	۰	۲	۱۳	UTB 13
۰	۳	۰	۳	۰	۳	۵	UTB 14
۲	۳	۲	۳	۰	۲	۱۳	UTB 15
۲	۳	۲	۳	۱	۲	۱۳	UTB16
۲	۳	۲	۳	۰	۲	۱۳	UTB 17
۰	۳	۰	۳	۰	۲	۵	UTB 18
۰	۳	۰	۳	۰	۲	۵	UTB 19
۲	۳	۲	۳	۰	۲	۱۳	UTB 20
۰	۲	۰	۳	۰	۲	۵	UTB 21
۲	۳	۲	۳	۰	۲	۱۳	UTB 22
۰	۲	۰	۳	۰	۲	۵	UTB 23
۲	۳	۲	۳	۰	۲	۱۳	UTB 24
۰	۲	۰	۳	۰	۲	۵	UTB 25
۲	۳	۲	۳	۰	۲	۱۳	UTB 26
۲	۳	۲	۳	۱	۲	۱۳	UTB 27
۰	۲	۰	۳	۰	۲	۵	UTB 28
۰	۲	۰	۳	۰	۲	۵	UTB 29
۰	۳	۰	۳	۰	۲	۵	UTB 30
۲	۳	۲	۳	۰	۲	۱۱	UTB 96
۰	۱	۰	۳	۰	۲	۵	UTPF5
۲	۳	۲	۳	۱	۲	۱۲	UTPF68

اعداد صفر، ۱، ۲ و ۳ به ترتیب نشان‌دهنده عدم رشد، رشد کم، رشد متوسط و رشد زیاد باکتری هستند.

جدول ۳- درصد بازدارندگی از رشد فوزاریوم سولانی توسط ۵ سویه باکتری در سه غلظت نمک و در حضور آب مقطر، اکتوئین و هیدروکسی اکتوئین

نام سویه	بازدارندگی از رشد (درصد)								
	۳۰۰ میلی مولار) کلرید سدیم			۱۵۰ میلی مولار) کلرید سدیم			صفر میلی مولار) کلرید سدیم		
	آب مقطر	اکتوئین	هیدروکسی اکتوئین	آب مقطر	اکتوئین	هیدروکسی اکتوئین	آب مقطر	اکتوئین	هیدروکسی اکتوئین
UTB16	۳۱/۴	۲۵/۷	۳۱/۴	۳۵/۷	۳۱/۴	۳۴/۳	۳۱/۴	۳۵/۷	۳۴/۳
UTB27	۴۲/۸۵	۴۰	۴۲/۸۵	۴۲/۸۵	۳۸/۶	۳۴/۳	۴۲/۸۵	۴۲/۸۵	۳۷/۱
UTB96	۴۰	۴۲/۸۵	۴۰	۳۵/۷	۳۵/۷	۴۲/۸۵	۴۰	۳۵/۷	۳۴/۳
UTPF5	۴۲/۸۵	۴۲/۸۵	۴۰	۴۵/۷	۴۲/۸۵	۴۲/۸۵	۴۰	۴۲/۸۵	۲۸/۶
UTPF68	۲۸/۶	۱۴/۳	۲۸/۶	۲۸/۶	۰	۰	۰	۲۸/۶	۰
UTB14	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰

یافت. در صورتی که در حضور هیدروکسی اکتوئین عکس این مطلب صادق بود و تیمار توام شوری و هیدروکسی اکتوئین تأثیر منفی بر جمعیت باکتری داشت.



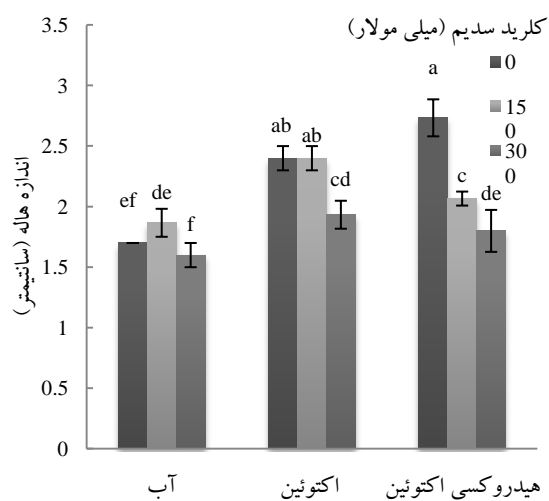
شکل ۱- تأثیر اکتوئین، هیدروکسی اکتوئین و شوری بر جمعیت سویه سودوموناس فلورسنس (UTPF5)

#### تأثیر اکتوئین، هیدروکسی اکتوئین و شوری بر

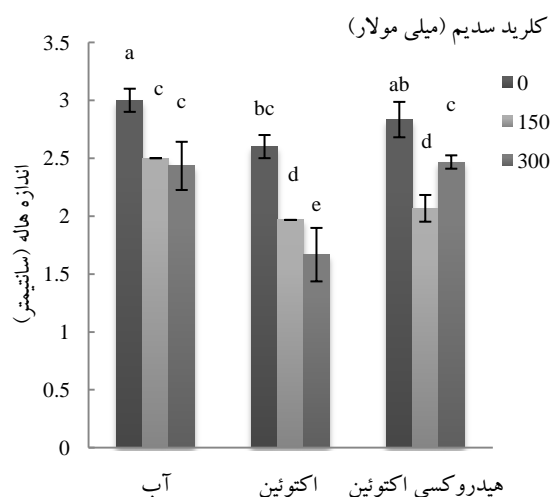
درصد بازدارندگی: همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، سویه UTPF5 که در محیط کشت حاوی اکتوئین و هیدروکسی اکتوئین رشد یافته بود، در غلظت ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی مولار کلرید سدیم در مقایسه با شاهد (باکتری رشد یافته در محیط حاوی آب مقطر) ویژگی بازدارندگی بیشتری بر رشد قارچ فوزاریوم سولانی داشت به گونه‌ای که در غلظت ۳۰۰ میلی مولار کلرید سدیم درصد بازدارندگی تیمار اکتوئین و هیدروکسی اکتوئین (به ترتیب ۲۸/۶ و ۲۲/۸۵) برابر تیمار شاهد (۵/۷) بود. با توجه به این نتیجه، سویه UTPF5 برای انجام آزمون‌های بعدی انتخاب شد.

#### تأثیر اکتوئین، هیدروکسی اکتوئین و شوری بر

جمعیت باکتری با استفاده از روش اسپکتروفوتومتری: همان‌طور که در شکل ۱ دیده می‌شود اکتوئین، هیدروکسی اکتوئین و دو غلظت ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی مولار کلرید سدیم تأثیر مثبت معناداری بر جمعیت باکتری داشتند. تأثیر مثبت شوری در حضور اکتوئین افزایش



شکل ۲- تأثیر اکتوئین و هیدروکسی اکتوئین و شوری بر تولید لپاز در سویه سودوموناس فلورسنس (UTPF5)



شکل ۳- تأثیر اکتوئین و هیدروکسی اکتوئین و شوری بر تولید پروتئاز در سویه سودوموناس فلورسنس (UTPF5)

#### تأثیر اکتوئین، هیدروکسی اکتوئین و شوری بر

تولید سیدروفور: شوری تأثیر منفی در خور توجه و معناداری بر تولید سیدروفور در هر سه تیمار اسمولیت داشت. در غلظت ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم، اکتوئین و هیدروکسی اکتوئین میزان تولید سیدروفور را نسبت به شاهد به طور معناداری افزایش دادند و این افزایش در مورد هیدروکسی اکتوئین بیشتر بود (شکل ۴).

#### تأثیر اکتوئین، هیدروکسی اکتوئین و شوری بر

تولید لپاز: در غلظت صفر میلی مولار کلرید سدیم، اکتوئین و هیدروکسی اکتوئین میزان تولید لپاز را در مقایسه با شاهد (آب مقطر) به طور معناداری افزایش دادند و این افزایش در مورد هیدروکسی اکتوئین بیشتر بود. در غلظت ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی مولار کلرید سدیم نیز اکتوئین و هیدروکسی اکتوئین باعث افزایش تولید لپاز شدند (شکل ۲).

#### تأثیر اکتوئین، هیدروکسی اکتوئین و شوری بر تولید

پروتئاز: به طور کلی شوری تأثیر منفی بر تولید پروتئاز در هر سه تیمار آب مقطر، اکتوئین و هیدروکسی اکتوئین داشت و همان‌طور که در شکل مشهود است اکتوئین و هیدروکسی اکتوئین در هر سه غلظت میزان تولید پروتئاز را نسبت به شاهد کاهش دادند (شکل ۳).

#### تأثیر اکتوئین، هیدروکسی اکتوئین و شوری بر

تولید سیانید هیدروژن: تأثیر ۳۰۰ میلی مولار کلرید سدیم بر تولید سیانید هیدروژن در هر سه تیمار اسمولیت مثبت بود. اکتوئین در هر سه غلظت نمک میزان تولید سیانید هیدروژن را افزایش داد. در حالی که افزودن هیدروکسی اکتوئین به محیط کشت حاوی نمک و یا بدون نمک تأثیری بر تولید سیانید هیدروژن نداشت (جدول ۴).

جدول ۴- تأثیر اکتوئین و هیدروکسی اکتوئین و شوری بر تولید سیانید هیدروژن در سویه سودوموناس فلورسنس (UTPF5)

مواد حل شونده سازگار			غلظت نمک
هیدروکسی اکتوئین	اکتوئین	آب مقطر	طعام (میلی مولار)
+	++	+	۰
+	++	+	۱۵۰
++	+++	++	۳۰۰

تولید سیانید هیدروژن: تولید اندک: +، تولید متوسط: ++،

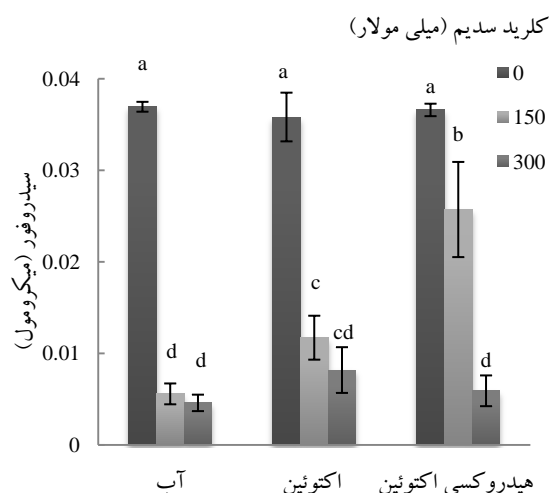
تولید زیاد: +++



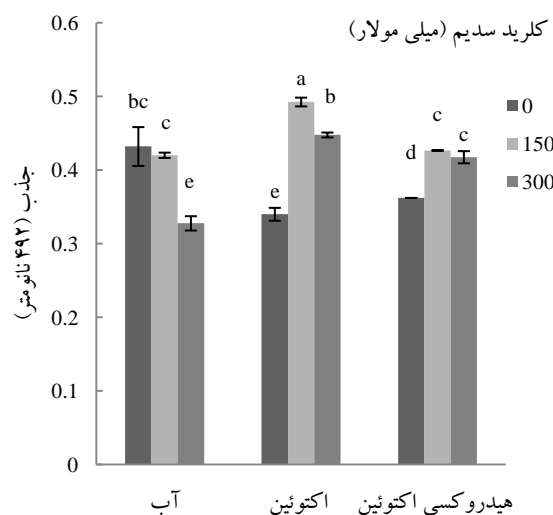
هیدروکسی اکتوئین باعث کاهش میزان تشکیل بیوفیلم نسبت به شاهد شدند، اما در غلظت‌های ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، اکتوئین و هیدروکسی اکتوئین تشکیل بیوفیلم را در مقایسه با شاهد به طور معناداری افزایش دادند (شکل ۵).

### بحث و نتیجه‌گیری

توانایی رشد سودوموناس‌ها (۲۶ و ۲۷) و باسیلوس‌ها (۲۸ و ۲۹) در غلظت‌های زیاد نمک گزارش شده است. مطابق نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر توانایی تحمل نمک به شکل رشد در محیط کشت حاوی ۱۳ و ۱۲ درصد نمک به ترتیب برای باسیلوس‌ها و سودوموناس‌ها دیده شد. اگرچه توانایی بازدارندگی قارچ بیمارگر فوزاریوم در میان باکتری‌های بررسی شده در این پژوهش دیده شد، اما تأثیر منفی نمک بر ویژگی بازدارندگی باکتری‌های مورد مطالعه یکسان نبود. این تأثیر منفی از ۹ تا ۱۰۰ درصد متغیر بود. تأثیر منفی نمک بر توانایی بازدارندگی در میان باسیلوس‌ها و سودوموناس‌هایی با میزان متفاوتی از تحمل به نمک دیده می‌شود. در مطالعات انجام شده بر روی توانایی بازدارندگی سودوموناس‌ها در شرایط شور و غیرشور این تنوع دیده شده است (۳۰). اگرچه توانایی رشد باکتری‌های مورد مطالعه در غلظت‌های افزایشی نمک کاهش یافت اما غلظت‌های کمتر نمک (۱۵۰ تا ۳۰۰ میلی‌مولار) موجب افزایش جمعیت باکتری شد. مطابق نتایج نشان داده شده در شکل ۱ تأثیر نمک بر رشد سویه سودوموناس فلورسنس (UTPF5) مثبت بود. تأثیر متفاوت نمک بر رشد باکتری‌های متحمل به نمک در جنس *استریپتومایسس* نیز گزارش شده است (۱۷). توانایی بازدارندگی این سویه در حضور نمک ۸۷ درصد کاهش یافت، در صورتی که رشد باکتری در



شکل ۴- تأثیر اکتوئین و هیدروکسی اکتوئین و شوری بر تولید سیدروفور در سویه سودوموناس فلورسنس (UTPF5)



شکل ۵- تأثیر اکتوئین و هیدروکسی اکتوئین و شوری بر تشکیل بیوفیلم در سویه سودوموناس فلورسنس (UTPF5)

### تأثیر اکتوئین، هیدروکسی اکتوئین و شوری بر

تشکیل بیوفیلم: تأثیر نمک، اکتوئین و هیدروکسی اکتوئین بر تشکیل بیوفیلم منفی بود، اما اثر متقابل اکتوئین و هیدروکسی اکتوئین و شوری باعث افزایش معنادار تشکیل بیوفیلم شد. بدین ترتیب که در غلظت صفر میلی‌مولار کلرید سدیم اکتوئین و

حضور همین مقدار نمک به میزان ۱۰ درصد افزایش یافت. اگرچه افزایش توانایی بازدارندگی در حضور نمک در سودوموناس‌ها (۳۰) و استرپتومایسس‌ها (۳۱) گزارش شده است، اما به نظر می‌رسد ساز و کار تأثیر نمک بر بازدارندگی و رشد جمعیت باکتری متفاوت است. گزارش‌های اندکی مبنی بر پتانسیل تولید متابولیت‌های ضد میکروبی در باکتری‌های محرک رشد در تنش شوری وجود دارد. مطابق گزارش خارخاره<sup>۲۵</sup> و همکاران (۲۶)، بازدارندگی از رشد ماکروفومینا فازئولینا<sup>۲۶</sup> توسط سویه‌ای از سودوموناس فلورسنس در شرایط شوری (۴۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم) گویای توانایی این سویه برای بقا و تولید متابولیت‌های بازدارنده در چنین شرایطی است. پژوهش حاضر برای نخستین بار به بررسی ارتباط میان اکتوئین و مشتق هیدروکسیله آن (هیدروکسی اکتوئین) با میزان بازدارندگی از رشد قارچ توسط باکتری در شرایط تنش شوری می‌پردازد. بر اساس نتایج به دست آمده از این پژوهش، اکتوئین و هیدروکسی اکتوئین اگرچه خود به تنهایی موجب افزایش کنترل زیستی نمی‌شوند، اما در صورت اعمال شوری (غلظت ۳۰۰ میلی‌مولار) که خود کاهش دهنده کنترل زیستی است، این کاهش را تعدیل می‌کنند. ممکن است علت این تعدیل، تأثیر اکتوئین و هیدروکسی اکتوئین بر یکی از ساز و کارهای کنترل زیستی در شرایط تنش شوری باشد. در پژوهشی که توسط کریمی<sup>۲۷</sup> و همکاران (۳۱) انجام شد، شوری تأثیر مثبت بر ویژگی کنترل زیستی دو جدایه استرپتومایسس متحمل به نمک داشت. یکی از این دو جدایه تولیدکننده اکتوئین بود (۱۷). نتایج نشان می‌دهند که شوری تأثیر چندانی بر تولید لیپاز در تیمار شاهد ندارد. اما اثر مثبت تیمار اکتوئین و هیدروکسی بر تولید لیپاز را

کاهش می‌دهد. اکتوئین و هیدروکسی اکتوئین صرف نظر از شوری موجب افزایش میزان لیپاز می‌شوند و همین افزایش می‌تواند علت افزایش ویژگی بازدارندگی باکتری رشد یافته در حضور اکتوئین و هیدروکسی اکتوئین در مقایسه با آب مقطر باشد. در مورد پروتئاز شوری باعث کاهش تولید پروتئاز در هر سه تیمار می‌شود و می‌تواند یکی از علت‌های کاهش بازدارندگی باشد. اکتوئین در هر سه غلظت شوری موجب کاهش تولید پروتئاز نسبت به شاهد شدند و بنابراین، تولید پروتئاز ساز و کاری نیست که از طریق آن اکتوئین بازدارندگی را در شرایط شوری تعدیل می‌کند. در پژوهش حاضر، شوری ۳۰۰ میلی‌مولار باعث افزایش تولید سیانید هیدروژن در هر سه تیمار شد. دشوال و کومار<sup>۲۸</sup> (۳۲) گزارش کردند که گونه‌های مختلف سودوموناس در غلظت‌های صفر تا یک درصد کلرید سدیم سیانید هیدروژن را به میزان بهینه تولید می‌کنند اما با افزایش غلظت کلرید سدیم از ۱/۲۵ به ۲/۲۵ درصد زمان تولید این متابولیت از ۲۴ ساعت به ۴۸ ساعت می‌رسد. اکتوئین به همراه نمک (۳۰۰ میلی‌مولار) بیش‌ترین تأثیر مثبت را بر تولید سیانید هیدروژن می‌گذارد. بنابراین، تولید سیانید هیدروژن هم می‌تواند یکی از علت‌های افزایش ویژگی بازدارندگی باکتری رشد یافته در حضور اکتوئین در مقایسه با آب مقطر باشد. شوری باعث کاهش شدید و ناگهانی سیدروفور در هر سه تیمار اسمولیت شد. دشوال و کومار (۳۲) نیز گزارش کردند که در گونه‌های مختلف سودوموناس تولید سیدروفور در غلظت‌های بیشتر از یک درصد کلرید سدیم به تأخیر می‌افتد. در پژوهشی که توسط تانک و ساراف<sup>۲۹</sup> (۳۳) انجام شد، تولید سیدروفور توسط گونه‌هایی از سودوموناس حتی در

## References

- (1) Weller DM., Raaijmakers JM., McSpadden- Gardener BB., Thomashow LS. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annals Review of Phytopathology* 2002; 40: 309- 48.
- (2) Beneduzi A., Ambrosini A., Passaglia LMP. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology* 2012; 35 (4): 1044- 51.
- (3) Haas D., Defago G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology* 2005; 3 (4): 307-9.
- (4) O'Sullivan DJ., O'Gara F. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Review* 1992; 56 (4): 662- 76.
- (5) Glick BR. The enhancement of plant-growth by free living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 1995; 41 (2): 109- 17.
- (6) Vidhyaekaran P., Muthamilan M. Evaluation of a powder formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pfl for control of rice sheath blight. *Biocontrol Science and Technology* 1999; 9 (1): 67- 74.
- (7) Kloepper JW., Leong J., Teintze M., Schroth MN. *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease-suppressive soils. *Current Microbiology* 1980; 4 (5): 317- 20.
- (8) Thomashow LS., Weller DM. Role of antibiotics and siderophores in biocontrol of take-all disease of wheat. *Plant Soil* 1990; 129 (1): 93- 99.
- (9) Keel C., Voisard C., Berling CH., Kahr G., Défago G. Iron sufficiency, a prerequisite for the suppression of tobacco black root-rot by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 under gnotobiotic conditions. *Phytopathology* 1989; 79 (5): 584- 9.

حضور ۶ درصد کلرید سدیم انجام شد، اما زمان تولید سیدروفور از ۳۰ ساعت به ۷۲ ساعت افزایش یافت که می‌تواند توسط تأثیر کلرید سدیم بر رشد جدایه‌ها توجیه شود. مطابق گزارش خارخاره و همکاران (۲۶)، با افزایش غلظت کلرید سدیم (از صفر تا ۵۰۰ میلی‌مولار) کاهش رشد باکتری به کاهش تدریجی غلظت سیدروفور تولیدشده توسط سویه UTPF5 منجر شد. اکتوئین و هیدروکسی اکتوئین اگر چه این کاهش را در غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار نمک تعدیل می‌کنند، اما توانایی تعدیل آن را در غلظت ۳۰۰ میلی‌مولار ندارند. اگر چه شوری تشکیل بیوفیلم توسط باکتری را کاهش داد، اما تیمار اکتوئین و هیدروکسی اکتوئین همراه با نمک موجب افزایش تشکیل بیوفیلم شد. بنابراین، ممکن است یکی دیگر از علت‌های تعدیل ویژگی‌های بازدارندگی باکتری رشد یافته در حضور اکتوئین و هیدروکسی اکتوئین در مقایسه با آب مقطر در غلظت ۳۰۰ میلی‌مولار تأثیر مثبت این دو اسمولیت بر تشکیل بیوفیلم باشد. به طور کلی، می‌توان نتیجه گرفت که اکتوئین و هیدروکسی اکتوئین احتمالاً با تأثیر بر تولید لپاز، سیانید هیدروژن و تشکیل بیوفیلم موجب تعدیل کاهش کنترل زیستی ایجادشده در اثر شوری می‌شوند. انتقال ژن‌های سنتزکننده اکتوئین به باکتری‌هایی که توانایی بازدارندگی خوبی در شرایط غیرشور دارند و یا استفاده از آنتاگونیست‌هایی که تولیدکننده اکتوئین نیز هستند ممکن است آثار منفی ناشی از تنش شوری یا حتی سایر تنش‌های محیطی بر ویژگی‌های بازدارندگی را کاهش دهد.

- (10) Nielsen MN., Sorensen J. Chitinolytic activity of *Pseudomonas fluorescens* isolates from barley and sugar beet rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology* 1999; 30 (3): 217- 27.
- (11) Bogino PC., Oliva Mde L., Sorroche FG., Giordano W. The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. *International Journal of Molecular Science* 2013; 14 (8): 15838-59.
- (12) Whipps JM. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 2001; 52 (1): 487- 511.
- (13) Blumer C., Haas D. Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Archives of Microbiology* 2000; 173 (3): 170- 77.
- (14) Ahmadzadeh M. Biological control of plant diseases: plant probiotic bacteria. First edition. Tehran: University of Tehran Press; 2012.
- (15) Khmelenina VN., Mustakhimov II., Reshetnikov AS., Kalyuzhnaya MG., Trotsenko A. Genetic and biochemical aspects of ectoine biosynthesis in moderately halophilic and halotolerant methylotrophic bacteria. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 2010; 4 (5): 446- 58.
- (16) Galinski EA., Pfeiffer HP., Truper HG. 1, 4, 5, 6- Tetrahydro- 2- methyl- 4- pyrimidinecarboxylic acid, a novel cyclic amino acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus *Ectothiorhodospira*. *European Journal of Biochemistry* 1985; 149 (1): 135- 9.
- (17) Sadeghi A., Soltani BM., Khayam nekouie M., Salehi Jouzani G., Hadavand Mirzaei H., Sadeghizadeh M. Diversity of the ectoines biosynthesis genes in the salt tolerant *Streptomyces* and evidence for inductive effect of ectoines on their accumulation. *Microbiological research* 2014; 169 (9- 10): 699- 708.
- (18) Pastor JM., Salvador M., Argandona M., Bernal V., Reina- Bueno M., Csonka LN., et al. Ectoines in cell stress protection: uses and biotechnological production. *Biotechnology Advances* 2010; 28 (6):782-801.
- (19) Afsharmanesh H., Ahmadzadesh M., Javan Nikkah M., Behboudi K. Characterization of the antagonistic activity of a new indigenous strain of *pseudomonas fluorescens* isolated from onion rhizosphere. *Journal of Plant Pathology* 2010; 92 (1): 187- 94.
- (20) Keel C., Weller DM., Natsch A., D'efago G., Cook RJ., Thomashow LS. Conservation of the 2, 4- diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent *Pseudomonas* strains from diverse geographic locations. *Applied and Environmental Microbiology* 1996; 62 (2): 552- 63.
- (21) Schaad NW., Jonse JB., Chun W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3<sup>rd</sup> edition. USA: APS Press; 2001.
- (22) Maurhofer M., Keel C., Defago G. Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 with enhanced production. *Plant Pathology* 1995; 44 (1): 40- 50.
- (23) Alstrom S., Burns RG. Cyanide production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition. *Biology and Fertility of Soils* 1989; 7 (3): 232- 8.
- (24) Castaneda GC., Munoz TJJ., Videa JRP. A spectrophotometric method to determine the siderophore production by strains of fluorescent *Pseudomonas* in the presence of copper and iron. *Journal of Microchemical* 2005; 81 (1): 35- 40.
- (25) Fletcher M. The effects of culture concentration and age, time, and temperature on bacterial attachment to polystyrene. *Canadian Journal of Microbiology* 1977; 23 (1): 1- 6.

- (26) Khare E., Singh S., Maheshwari D K., Arora NK. Suppression of charcoal rot of chickpea by fluorescent *Pseudomonas* under saline stress condition. *Current Microbiology* 2011; 62 (5): 1548- 53.
- (27) Tewari S., Arora NK. Multifunctional exopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa* PF23 involved in plant growth stimulation, biocontrol and stress amelioration in sunflower under saline conditions. *Current Microbiology* 2014; 69 (4): 484- 94.
- (28) Principe A., Alvarez F., Castro MG., Zachi L., Fischer SE., Mori GB., et al. Biocontrol and PGPR features in native strains isolated from saline soils of srgentina. *Current Microbiology* 2007; 55 (4): 314- 22.
- (29) Kumar GP., MH Ahmad SK., Desai S., Amalraj ELD., Rasul A. In vitro Screening for abiotic stress tolerance in potent biocontrol and plant growth promoting strains of *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. *International Journal of Bacteriology* 2014: 1- 6.
- (30) Rangarajan S., Saleena LM., Vasudevan P., Nair S. Biological suppression of rice diseases by *Pseudomonas* spp. under saline soil conditions. *Plant and Soil* 2003; 251 (1): 73- 82.
- (31) Karimi E., Sadeghi A., Abbaszade-Dehaji P., Dalvand Y., Omidvari M., Kakuei-Nezhad M. Biocontrol activity of salt tolerant *Streptomyces* isolates against phytopathogens causing root rot of sugar beet. *Biocontrol Science and Technology* 2012; 22 (3): 333- 49.
- (32) Deshwal VK., Kumar P. Effect of salinity on growth and PGPR activity of *Pseudomonads*. *Journal of Academia and Industrial Research* 2013; 2 (6): 353- 56.
- (33) Tank N., Saraf M. Salinity-resistant plant growth promoting rhizobacteria ameliorates sodium chloride stress on tomato plants. *Journal of Plant Interaction* 2010; 5 (1): 51- 8.

- <sup>1</sup>- Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)
- <sup>2</sup>- Strain
- <sup>3</sup>- In vitro
- <sup>4</sup>- *Pseudomonas fluorescens*
- <sup>5</sup>- Plant probiotic bacteria
- <sup>6</sup>- *Ectothiorhodospira halochloris*
- <sup>7</sup>- *Bacillus subtilis*
- <sup>8</sup>- *Escherichia coli*
- <sup>9</sup>- *Pantoea agglomerans*
- <sup>10</sup>- *Bacillus amyloliquefaciens*
- <sup>11</sup>- Nutrient Agar (NA)
- <sup>12</sup>- Keel
- <sup>13</sup>- Potato Dextrose Agar (PDA)
- <sup>14</sup>- *Fusarium solani*
- <sup>15</sup>- Nutrient Broth (NB)
- <sup>16</sup>- Shad
- <sup>17</sup>- Maurhofer
- <sup>18</sup>- Skim Milk Agar (SMA)
- <sup>19</sup>- Alstrom and Burnz
- <sup>20</sup>- Castaneda
- <sup>21</sup>- cfu
- <sup>22</sup>- Planktonic
- <sup>23</sup>- OD
- <sup>24</sup>- LSD
- <sup>25</sup>- Khare
- <sup>26</sup>- *Macrophomina phaseolina*
- <sup>27</sup>- Karimi
- <sup>28</sup>- Deshwal and Kumar
- <sup>29</sup>- Tank and Saraf



## Effect of exogenous ectoines on some antifungal activity of *Pseudomonas fluorescens* UTPF5 under salt conditions

**Arghavan Kamaly**

Ph.D student of biological control, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Science and Engineering, College of Agriculture Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran, Kamaly@ut.ac.ir

**Masoud Ahmadzadeh\***

Professor of biological control, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Science and Engineering, College of Agriculture Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran, Ahmadz@ut.ac.ir

**Akram Sadeghi**

Assistant Professor of Molecular Genetics, Microbial Biotechnology and Biosafety Department, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, aksadeghi@abrii.ac.ir

**Ebrahim Karimi**

M.Sc of Plant Pathology, Microbial Biotechnology and Biosafety Department, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, ekarimi@abrii.ac.ir

### Abstract

**Introduction:** Plant probiotic bacteria like fluorescent pseudomonads are worldly used against soil-borne pathogens through mechanisms such as production of bacterial metabolites and enzymes. These bacteria can also help plants to tolerate environmental stresses. Ectoine is a compatible solution which plays an important role in environmental osmotic stresses.

**Materials and methods:** Tolerance of 24 bacterial strains to salt and heat was tested and 6 tolerant strains were chosen. Then dual culture of *Fusarium solani* and bacteria grown in presence of ectoine and hydroxy ectoine with 3 NaCl concentrations (0, 150 and 300 mM) was done and *Pseudomonas fluorescens* UTPF5 was selected. Finally the effect of ectoine, hydroxyectoine and NaCl on bacterial population, lipase, protease, siderophore and hydrogen-cyanide production and biofilm formation was investigated.

**Results:** In 300 mM NaCl, the bacterium grown in presence of ectoines, increased the inhibition percentage 5- times more than control. NaCl had a positive effect on bacterial population in water and ectoine, hydrogen-cyanide production in all treatment and biofilm formation in ectoine and hydroxyectoine and negative effect on bacterial population in hydroxyectoine, protease and siderophore production in all treatments and biofilm formation in water. On the other hand, ectoine increased lipase and hydrogen-cyanide production and biofilm formation in 300 mM NaCl and siderophore production in 150 mM. Hydroxyectoine had similar effects with little differences.

**Discussion and conclusion:** Ectoine and hydroxyectoine moderate the biocontrol reduction in presence of NaCl through positive effect on lipase and hydrogen-cyanide production and biofilm formation.

**Key words:** *Pseudomonas fluorescens* UTPF5, Ectoine, Salinity, Biocontrol, Lipase, Hydrogen cyanide, Biofilm

---

\* Corresponding author

**Received:** December 7, 2014 / **Accepted:** April 22, 2015