

## تعیین بیوآرهای جدایه‌های *Pseudomonas fluorescens* جدا شده از مناطق مهم سیب‌زمینی کاری ایران و بررسی توانایی تولید آنتی‌بیوتیک و سیدروفور در آنها

فاطمه شهریاری<sup>۱</sup>، غلام‌خدا کریمیان<sup>۲</sup> و اصغر حیدری<sup>۳</sup>  
 ۱، ۲، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس  
 ۳، محقق مؤسسه بررسی آفات و بیماریهای گیاهی  
 تاریخ پذیرش مقاله ۸۳/۷/۲۲

### خلاصه

از غده‌ها و خاک مزارع سیب‌زمینی استانهای همدان، اصفهان، اردبیل و تهران، ۱۷۰ جدایه از سودوموناسهای فلورسنت با استفاده از محیط کشت *Pseudomonas agar F* جداسازی گردید. پس از بررسی نقوش الکتروفورزی پروتئین‌های محلول سلولی آنها، ۲۸ جدایه انتخاب و خصوصیات فنوتیپی آنها تعیین گردید. تمام جدایه‌ها روی محیط کشت *Pseudomonas agar F* تولید رنگ فلورسنت نمودند و قادر به هیدرولیز ژلاتین و تولید آرژنین دی‌هیدرولاز و اکسیداز بوده و اکثراً توانایی احیاء نیترات را داشتند. رشد در ۴ درجه سانتی‌گراد و تولید لیسیتیناز در همه جدایه‌ها مثبت و رشد در ۴۱ درجه سانتی‌گراد در تعدادی از جدایه‌ها مثبت بود. اغلب جدایه‌ها از نظر تولید لوان منفی بودند و واکنش HR روی برگ توتون، تولید رنگ غیر فلورسنت و فعالیت پکتولیتیکی در تمام جدایه‌ها منفی بود. تمام جدایه‌ها از فندهای ال-آرابینوز، دی-زایلوز، دی-گالاکتوز و سوکروز تولید اسید و از اسیدهای دی-آلانین و ال-تارتاریک اسید تولید قلیا کردند. استفاده از آدونیتول، اتانول و ژرانیول در تمام جدایه‌ها منفی بود. استفاده از سوربیتول، ترهالوز، مزواینوزیتول، بوتیرات، والرات، فنیل استات، نیکوتینات و بوتیل آمین در تعدادی از جدایه‌ها مثبت و در تعدادی از آنها منفی بود. با توجه به ویژگیهای فنوتیپی بررسی شده، جدایه‌های مورد مطالعه به عنوان *P. fluorescens* شامل بیوآرهای III، IV و V تشخیص داده شدند که بیوآر III این باکتری بیشترین جمعیت را در میکروفلور گیاه سیب‌زمینی داشت. از لحاظ نقوش الکتروفورزی پروتئین نیز بین جدایه‌هایی که در بیوآرهای مختلف باکتری *P. fluorescens* قرار گرفتند اختلافات جزئی وجود داشت. نماینده‌های بیوآرهای مختلف این باکتری در شرایط آزمایشگاهی تولیدکننده آنتی‌بیوتیک و سیدروفور بودند.

### واژه‌های کلیدی: *P. fluorescens*، سیب‌زمینی، بیوآر، ایران

#### مقدمه

موجب کاهش کاربرد مواد شیمیایی در کشاورزی می‌شوند. برخی در خاک‌های باز دارنده طبیعی علیه بیماری‌های خاکزاد متعددی موثرند (۱۸). تولید آنتی‌بیوتیک توسط این باکتری یک فاکتور مهم در توانایی آن جهت جلوگیری از رشد عوامل بیماری‌زای گیاهی می‌باشد. این باکتری جهت کنترل بیماریهای

باکتری *P. fluorescens* دارای انتشار وسیع بوده و به فراوانی در آب، خاک و به ویژه در ریزوسفر گیاهان وجود دارد. مطالعات فراوانی در مورد این باکتری صورت گرفته است. بعضی از جدایه‌ها موجب افزایش رشد و سلامتی گیاه شده و در نتیجه

یک آنالیز عددی با ۱۹۳ جدایه از باکتری *P. fluorescens* متعلق به همه بیووارها به جز بیووار V انجام شد و برای هر بیووار زیرگروه‌هایی تعیین گردید. بیووار I به دو زیر گروه، بیووار II به سه زیر گروه و بیووارهای III و IV نیز هر کدام به دو زیر گروه تقسیم شدند (۵). به طور مشابه یک آنالیز عددی با ۷۲ جدایه از بیووار V این باکتری انجام شد و این بیووار به ۷ زیر گروه تقسیم گردید (۳). در مجموع، توصیف فنوتیپی نشان‌دهنده تنوع زیاد در این گونه می‌باشد که منجر به تقسیم آن به بیووارها و خود بیووارها نیز به زیرگروه‌هایی شده است. همچنین مطالعات مختلف نشان دادند که تنوع ژنومیکی بسیار زیادی در بیووارهای این باکتری وجود دارد و احتمالاً بیووارها مطابق با گونه هستند (۴). مطالعات فراوانی بر وجود تنوع زیاد در این گونه تأکید کرده‌اند. تنوع توصیف شده در *P. fluorescens* می‌تواند مربوط به تنوع زیستگاهی آن (خاک، آب، گیاهان، گوشت و لبنیات، نمونه‌های بالینی انسان و حیوان) باشد. فاکتورهای محیطی نقش اصلی در تکامل تدریجی باکتری‌ها دارند. در حقیقت منبع کربن و متابولیسم انرژی *P. fluorescens* نسبت به محیطی که از آن جداسازی شده متفاوت می‌باشد. تنوع در بین باکتری‌های متعلق به این گونه براساس شرایط محیطی آنها نه تنها در سطح فنوتیپی که در سطح ژنوتیپی نیز دیده می‌شود. با توجه به تنوع زیاد ژنومیکی در این گونه، تاکسونومی آن باید اصلاح شود. در چندین مطالعه اخیر در مورد نیاز طبقه‌بندی مجدد جدایه‌هایی که قبلاً به عنوان *P. fluorescens* شناخته شده‌اند، توافق شده است (۴). تعیین تاکسونومی این گروه فقط با استفاده از مجموعه‌ای از جدایه‌های مناطق مختلف و نماینده‌ای از همه بیووارها امکان‌پذیر خواهد شد و در مطالعات باید همه تکنیک‌های فنوتیپی و ژنومیکی شامل تست‌های متابولیکی، پروفیل پروتئین‌ها، استفاده از پروب‌هایی با دقت متفاوت، هیبریداسیون کمی DNA-DNA و آنالیز RFLP استفاده شود. مطالعات فراوانی در مورد اکولوژی سودوموناس‌های فلورسنت جهت یافتن روش‌های معتبر، سریع و ارزان برای شناسایی تعداد زیادی از جدایه‌ها لازم است (۴).

مرگ گیاهچه حاصل از قارچهای *Rhizoctonia* و *Pythium* بیماریهای ناشی از گونه‌های بیماریزای جنس *Pseudomonas* از قبیل *P. tolaasii* به کار رفته است (۲). جدایه‌های ویژه‌ای از این باکتری که ژن تشکیل دهنده هسته یخ در آنها حذف شد، جهت تولید عوامل بیوکنترل برای به حداقل رساندن خطر سرمازدگی در گیاهانی از قبیل گیلاس، سیب، گلایی، هلو، بادام، گوجه فرنگی، سیب‌زمینی و توت فرنگی مورد بررسی قرار گرفته‌اند که جدایه A506 از این باکتری به صورت تجاری جهت کنترل جراحات سرمازدگی گلایی استفاده شده است (۱). همچنین *P. fluorescens* یکی از چندین گونه باکتریایی معمول است که جهت کنترل بیماریها در فیلوسفر گیاهان به کار رفته است و یک جدایه طبیعی مؤثر از این گونه به صورت تجاری جهت کنترل آتشک گلایی استفاده شده است (۱، ۲). تعدادی از جدایه‌های این باکتری نیز باعث تجزیه بیولوژیکی ترکیبات طبیعی یا ترکیبات سمی تولید شده توسط انسان می‌شوند و در گیاهان متعددی به صورت اپی‌فیت زندگی می‌کنند. بعضی از آنها نیز پاتوژن‌های فرصت طلب گیاهی بوده و ایجادکننده پوسیدگی نرم می‌باشند. به خاطر اهمیت *P. fluorescens* در محیط‌های مختلف، مطالعات اکولوژیکی متعددی در مورد این باکتری صورت گرفته است (۴). در یک مطالعه وسیع فنوتیپی با ۲۶۷ جدایه از سودوموناس‌های غیربیماریزای گیاهی جدا شده از مناطق مختلف، که شامل ۱۷۵ استرین فلورسنت نیز بودند، ۱۴۶ خصیصه غذایی بررسی شد و نشان دادند که گونه *P. fluorescens* بسیار هتروژن می‌باشد. این گونه به ۷ بیوتیپ تقسیم شد که سپس بیوتیپ‌های A، B، C، D و F بیووارهای ۱ تا ۵ نامیده شدند و بیوتیپ‌های E و G به ترتیب گونه‌های *P. chlororaphis* و *P. aureofaciens* معرفی شدند (۱۹) که بعداً گونه *P. chlororaphis* نامیده شدند (۱۱). بیووار V این باکتری یک زیر گروه هتروژن است و جدایه‌های آن اغلب غیر قابل طبقه‌بندی می‌باشند (۱۹). به خاطر هتروژنیته بیووار V اختصاص یک استرین مرجع به آن غیر ممکن شده است. این سیستم چند بیوواری تنها سیستم طبقه‌بندی موجود است و به طور وسیع نیز به کار می‌رود (۴).

سیب‌زمینی به طور تصادفی جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل و در یخچال نگهداری شد. جهت جداسازی باکتری‌های متعلق به گونه *P. fluorescens* از خاک، ۱۰ گرم خاک از هر نمونه در ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر سترون حل و پس از دو ساعت گذاشتن روی شیکر یک قطره از سوسپانسیون حاصله به کمک لوپ پلاتینی سترون روی محیط کشت *Pseudomonas agar F* مخطط گردید. پتری‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴-۴۸ نگهداری شدند و سپس ۳-۴ کلنی به رنگ سبز متمایل به زرد به طور تصادفی انتخاب و جهت اطمینان از خلوص، مجدداً روی محیط کشت مخطط گردیدند. برای جداسازی از سطح غده‌ها نیز پوست ۳۰۰ گرم غده سیب زمینی جدا و سپس روی آن ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون ریخته و از سوسپانسیون حاصل به روش بالا جهت جداسازی باکتری مورد نظر استفاده شد. برای استفاده روزمره، جدایه‌های خالص شده روی محیط کشت PDA (سیب زمینی، قند و آگار) و درون لوله زیر پارافین نگهداری شدند و برای نگهداری میان مدت، از کشت ۲۴ ساعته باکتری سوسپانسیونی در شیشه‌های درپوش‌دار حاوی آب مقطر سترون تهیه و در یخچال نگهداری شد.

الکتروفورز پروتئین استخراج شده در ژل پلی‌اکریل‌امید (SDS-PAGE) (SDS-Polyacrylamid Gel Electrophoresis) تحت عمودی بر مینای روش اصلاح شده لاملی (۱۶) انجام شد. از کشت ۲۴ ساعته جدایه‌ها روی محیط کشت آگار مغذی (NA) سوسپانسیون تهیه و چند بار با آب مقطر یا بافر فسفات یا سرم فیزیولوژی (۰/۹ گرم نمک در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب) با سانتریفوژ ۳-۴ هزار دور به مدت پنج دقیقه شسته شدند. در صورت استفاده از بافر یا سرم فیزیولوژی در نهایت یک بار با آب مقطر شسته و سپس سانتریفوژ شدند. غلظت (optical density) سوسپانسیون نهایی با اسپکتروفتومتر ۱/۵-۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر تنظیم گردید سپس محلولهای I (۷ میلی‌لیتر Tris-Hcl ۱/۵ مولار با pH برابر ۶/۸، ۲/۶ گرم SDS، ۱۶/۸ میلی‌لیتر گلیسرین، ۲ میلی‌گرم برم فنل بلو، ۳ میلی‌لیتر آب مقطر) و II (۸/۸ میلی‌لیتر از محلول I + ۱/۲ میلی‌لیتر مرکاپتوانول) تهیه شدند. به ازای هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری، ۰/۱۶

جدایه‌های این گونه تولید رنگیزه فلورسنت بر روی محیط کشت کینگ ب می‌کنند. عموماً اکسیداز مثبت و قادر به هیدرولیز ژلاتین و آرژنین دی‌هیدرولاز هستند. رشد در ۴ درجه سانتی‌گراد و تولید لیسیتیناز در آنها مثبت و رشد در ۴۱ درجه سانتی‌گراد در تعدادی از آنها مثبت و در تعدادی منفی است. واکنش‌های تولید رنگ غیرفلورسنت، لپانیدن سیب زمینی، هیدرولیز نشاسته و ایجاد فوق حساسیت در توتون در آنها منفی است. بعضی از جدایه‌ها توانایی احیاء نیترات و تولید لوآن را دارند و از قندهای ال-آرابینوز، دی-زابلوز، دی-گالاکتوز و سوکروز تولید اسید و از اسیدهای دی-آلانین و ال-تارتاریک اسید تولید قلیا می‌کنند. استفاده از آدونیتول، اتانول و ژرانیول در آنها منفی است و استفاده از سوربیتول، ترهالوز، مزواینوزیتول، بوتیرات، والرات، فنیل استات، نیکو تینات و بوتیل آمین در آنها متغیر است (۲۰).

امروزه حفظ منابع طبیعی و کاستن از مواد آلاینده هوا، خاک و آب استفاده از روش‌های طبیعی و بیولوژیک را جهت کنترل بیماری‌های گیاهی از اهمیت روزافزونی برخوردار کرده است. کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی برای طبیعت بدون زیان می‌باشد لذا لزوم توجه بیشتر به روش‌های کنترل غیرشیمیایی کاملاً آشکار بوده و در این راستا استفاده از عوامل آنتاگونیست علیه عوامل بیماریزا از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. به همین دلیل لزوم شناسایی و جداسازی عوامل آنتاگونیست بومی مناطق آلوده کشور که دارای قدرت بالقوه مهار عوامل بیماریزا باشند، بسیار ضروری است. این تحقیق به منظور جداسازی و شناسایی بیووارهای *P. fluorescens* مناطق مهم سیب‌زمینی کاری ایران صورت گرفته است تا بتوان از جدایه‌هایی که خاصیت آنتاگونیستی دارند جهت کنترل بیماری‌های سیب زمینی و سایر گیاهان استفاده نمود.

### مواد و روش‌ها

از اوائل مرداد تا اواخر آبان ۱۳۸۰ از مناطق مهم سیب‌زمینی کاری ایران شامل استانهای همدان، اصفهان، اردبیل و شهرستان دماوند نمونه‌هایی از غده‌ها و خاک مزارع

جدول ۱- مشخصات جدایه های مورد بررسی از مناطق مختلف

بیووار	گونه	محل جمع آوری	کد جدایه	شماره جدایه
III	<i>P. fluorescens</i>	اصفهان	S13	۱
III	<i>P. fluorescens</i>	همدان	H2	۲
IV	<i>P. fluorescens</i>	اصفهان	SD1	۳
-	<i>Pseudomonas sp.</i>	همدان (بهار)	H46	۴
III	<i>P. fluorescens</i>	همدان	H17	۵
III	<i>P. fluorescens</i>	همدان (هارون آباد)	H39	۶
III	<i>P. fluorescens</i>	همدان	H25	۷
III	<i>P. fluorescens</i>	دماوند	D3	۸
IV	<i>P. fluorescens</i>	دماوند	D1	۹
III	<i>P. fluorescens</i>	اردبیل (رضی آباد)	AR1	۱۰
V	<i>P. fluorescens</i>	همدان (زرنند)	H4	۱۱
V	<i>P. fluorescens</i>	اصفهان	S12	۱۲
III	<i>P. fluorescens</i>	همدان (نهبوند)	H19	۱۳
III	<i>P. fluorescens</i>	همدان (کبودر آهنگ)	H22	۱۴
III	<i>P. fluorescens</i>	اصفهان	S15	۱۵
III	<i>P. fluorescens</i>	اصفهان	S9	۱۶
III	<i>P. fluorescens</i>	اصفهان	S17	۱۷
III	<i>P. fluorescens</i>	اصفهان	S22	۱۸
III	<i>P. fluorescens</i>	همدان (نهبوند)	H41	۱۹
III	<i>P. fluorescens</i>	اردبیل (الادیق)	AR13	۲۰
III	<i>P. fluorescens</i>	همدان	H5	۲۱
IV	<i>P. fluorescens</i>	اصفهان	S1	۲۲
III	<i>P. fluorescens</i>	دماوند	D14	۲۳
III	<i>P. fluorescens</i>	دماوند	D6	۲۴
V	<i>P. fluorescens</i>	دماوند	D9	۲۵
III	<i>P. fluorescens</i>	دماوند	D7	۲۶
III	<i>P. fluorescens</i>	دماوند	D15	۲۷
-	<i>Pseudomonas sp.</i>	همدان	H20	۲۸

برای سنجش رشد باکتری در ۴ و ۴۱ درجه سانتی گراد از محیط پایه آیر و همکاران با افزودن ۰/۵ درصد گلوکز و ۰/۵ درصد عصاره مخمر و قرار دادن در بن ماری استفاده شد. آزمونهای توان استفاده از منابع مختلف کربو هیدرات به عنوان تنها منبع کربن و انرژی و تولید اسید یا قلیا به روش شاد (۲۰) و با استفاده از محیط پایه آیر و همکاران انجام و نتایج تا ۳۰ روز بعد ارزیابی گردید. منابع کربنی و بنیانهای کربوهیدراتی استفاده شده عبارت بودند از: ال آرابینوز، دی زایلوز، ال تارتاریک اسید، دی آلانین، سوربیتول، ترهالوز، سوکروز، بوتیرات، والرات،

میلی لیتر از محلول II اضافه و به مدت ۵-۴ دقیقه جوشانیده و بلافاصله سرد شد و در سانتریفوژ ده هزار دور به بالا به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید و سپس یک میلی لیتر از محلول رویی با سرنگ برداشته و در لوله های اپندروف در فریزر نگهداری شد. در این روش از ژل جدا کننده (separating gel) ۱۴ درصد و ژل متراکم کننده (stacking gel) پنج درصد استفاده گردید. بعد از تهیه ژل ۴۰ میکرولیتر از هر نمونه در چاهکهای ژل قرار داده شد و الکتروفورز به کمک جریان ۸۰ ولتی تا رسیدن ماده رنگی (برم فنل بلو) به ابتدای ژل زیری و سپس ۱۰۰ ولت و آمپر ثابت در بافر تانک تریس - گلیسین (۳/۲ گرم تریس، ۱۴/۴ گرم گلیسین، ۱ گرم SDS با حجم نهایی یک لیتر و pH : ۸/۳) انجام شد. بعد از اتمام الکتروفورز، ژل در محلول رنگ (۱/۱ درصد کوماسی بلو R-250 در متانل، آب واسید استیک به نسبت حجمی ۵:۵:۱) به مدت حداقل ۲ ساعت رنگ آمیزی و سپس در همان محلول بدون کوماسی بلو رنگبری شد. جهت نگهداری ژلها از اسید استیک ۷ درصد استفاده گردید.

از مجموع ۱۷۰ جدایه باکتری جدا شده از سیب زمینی ۲۸ جدایه بر اساس نقوش الکتروفورزی پروتئین های سلولی به عنوان نماینده انتخاب و مورد بررسیهای فنوتیپی قرار گرفتند. مشخصات این ۲۸ جدایه در جدول ۱ خلاصه شده است.

آزمون اکسیداز به روش کواکس (۱۵) و آزمون آرژنین دی هیدرولاز به روش تورنلی (۲۲) انجام گرفت. آزمون لیسیتیناز بر اساس روش لیبوت و همکاران (۱۷) و آزمون تولید رنگدانه فلورسنت روی محیط کشت King's medium B به روش شاد (۲۰) انجام شد. آزمون تولید لوان روی محیط حاوی ۵ درصد سوکروز و آزمون فعالیت پکتولیتیکی روی برشهای سیب زمینی و همچنین آزمون تولید رنگ غیر فلورسنت به روش شاد (۲۰) انجام گردید. آزمون احیاء نیترات به نیتريت یا تولید گاز ازت بر پایه روش دای (۸) و آزمون تحریک واکنش فوق حساسیت در توتون به روش کلمنت (۱۲) انجام شد. آزمون هیدرولیز ژلاتین به روش شاد (۲۰) و به دو روش درون لوله و روی پتری انجام گردید.

## نتایج و بحث

با بررسی خصوصیات فنوتیپی ۲۸ جدایه منتخب (جدول ۱) بر اساس خصوصیات فنوتیپی ارایه شده توسط سایر محققین (۴، ۹، ۱۹، ۲۰، ۲۱)، جدایه‌های شناسایی شده با داشتن ویژگی‌هایی از قبیل تولید رنگ فلورسنت روی محیط *Pseudomonas agar F* (حاوی ۱۰ درصد گلیسرول در هر لیترا)، اکسیداز مثبت، توانایی هیدرولیز آرژنین دی هیدرولاز و ژلاتین، رشد در ۴ درجه سانتی گراد، تولید لیسیتیناز، عدم تولید رنگ غیر فلورسنت، عدم فعالیت پکتولیتیکی و عدم واکنش فوق حساسیت روی برگ توتون با خصوصیات گونه *P. fluorescens* مطابقت داشتند. جدایه‌های متعلق به گونه *P. fluorescens* در سه گروه قرار گرفتند که در جدول ۲ ذکر گردیده است.

در گروه اول آزمونهای احیاء نیترا، استفاده از ال-آرابینوز، دی زایلوز، ال-تارتاریک اسید، دی-آلانین، سوکروز و دی-گالاکتوز مثبت و آزمونهای استفاده از سوربیتول، ترهالوز، مزواینوزیتول، بوتیرات، والرات، فنیل استات و رشد در ۴۱ درجه سانتیگراد متغیر و استفاده از آدونیتول، نیکو تینات، اتانول، ژرانیول و بوتیل آمین منفی بود و توانایی تولید لوان را نیز نداشتند که با توجه به ویژگیهای گفته شده اعضا این گروه که شامل ۱۹ جدایه بود در بیووار III باکتری *P. fluorescens* قرار گرفتند که با خصوصیات ارایه شده توسط سایر محققین (۴، ۹، ۲۰) مطابقت داشته و فقط اختلاف در آزمون رشد در ۴۱ درجه سانتی گراد مشاهده شد که می‌تواند ناشی از تفاوت جغرافیایی و شرایط آب و هوایی باشد. در گروه دوم آزمون‌های احیاء نیترا، تولید لوان، استفاده از ال-آرابینوز، دی-زایلوز، دی-گالاکتوز، سوربیتول، ترهالوز، مزواینوزیتول، سوکروز، ال-تارتاریک اسید، دی-آلانین و بوتیرات مثبت و استفاده از والرات، آدونیتول، نیکو تینات، اتانول، ژرانیول، فنیل استات، بوتیل آمین و رشد در ۴۱ درجه سانتیگراد منفی بود که این گروه با سه جدایه بیووار IV باکتری *P. fluorescens* را تشکیل دادند و با شناسایی‌های ارایه شده مطابقت داشت (۴، ۹، ۲۰). در گروه سوم آزمونهای احیاء نیترا و تولید لوان منفی

مزواینوزیتول، آدونیتول، نیکوتینات، دی‌گالاکتوز، اتانول، ژرانیول، فنیل استات و بوتیل آمین.

جهت بررسی توانایی تولید آنتی بیوتیک و سیدروفور از جدایه‌های S13, D3, AR1, H4, S15, S17, H5, S1, D6 و D9 که نماینده بیووارهای مختلف باکتری *P. fluorescens* بودند و همچنین در مقابل باکتری عامل ساق سیاه زمینی *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* خاصیت آنتاگونیستی نشان دادند، استفاده گردید.

برای بررسی تولید آنتی بیوتیک از روش ولر و کوک (۲۳) استفاده شد. جدایه‌های آنتاگونیست روی محیط Nutrient agar glucose (یک درصد گلوکز) حاوی کلرید آهن III ( $FeCl_3$ ) به غلظت ۱۰۰۰ میکرومول به صورت نقطه ای کشت شدند. بعد از ۲۴ ساعت رشد در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد، کلنی‌ها بوسیله پنبه استریل پاک گردیدند و با گذاشتن پتری‌ها به صورت وارونه و قراردادن چند قطره کلروفورم روی در آن، باکتریهای باقی مانده از بین برده شدند، پس از تهیه، سوسپانسیون باکتری *P. c. subsp. atrosepticum* به صورت چمنی بر روی محیط پخش گردید و وجود هاله بازدارندگی پس از ۳۶ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. به علت وجود آهن کافی در این محیط سیدروفور تولید نشده و اثرات بازدارندگی موجود، ناشی از تولید آنتی بیوتیک تلقی گردید.

روی محیط NAS (یک درصد سوکروز) و NAS حاوی ۱۰۰۰ میکرومول کلرید آهن III ( $FeCl_3$ )، باکتری آنتاگونیست به صورت نقطه ای کشت داده شد، بعد از ۲۴ ساعت کلنی باکتری بوسیله پنبه سترون پاک گردید. روی در پتری وارونه چند قطره کلروفورم ریخته شد و بعد از یک ساعت پتری‌ها تهویه و به مدت ۴ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند تا آنتی بیوتیک‌های احتمالی تولید شده، غیرفعال گردند. عدم وجود هاله در پتری حاوی کلرید آهن III و وجود هاله در پتری فاقد کلرید آهن III پس از کشت چمنی پاتوژن مؤید وجود سیدروفور خواهد بود.

جدول ۲ - خصوصیات فنوتیپی جدایه‌های *P. fluorescens* جدا شده از سیب زمینی مناطق مختلف ایران.

واکنش بیوورهای مختلف باکتری <i>P. fluorescens</i>	آزمون		
	بیوور III	بیوور IV	بیوور V
تولید رنگ فلورسنت	+	+	+
تولید رنگ غیر فلورسنت	-	-	-
هیدرولیز آرژنین دی هیدرولاز	+	+	+
اکسیداز	+	+	+
احیاء نیترات	-	+	+
لیسیتیناز	+	+	+
فعالیت پکتولیتیکی	-	-	-
تولید HR روی برگ توتون	-	-	-
تولید لوان	-	+	-
رشد در ۴ درجه سانتی گراد	+	+	+
رشد در ۴۱ درجه سانتی گراد	+	-	V
هیدرولیز ژلاتین	+	+	+
استفاده از:			
ال-آرابینوز	+	+	+
دی-زایلوز	+	+	+
ال-تارتاریک اسید	+	+	+
دی-آلانین	+	+	+
سوربیتول	V	+	V
ترهالوز	-	+	V
سوکروز	+	+	+
بوتیرات	V	+	V
والرات	V	-	V
مزواینوزیتول	-	+	-
آدونیتول	-	-	-
نیکوتینات	+	-	+
دی-گالاکتوز	-	+	-
اتانول	-	-	-
ژرانیول	V	-	V
فنیل استات	V	-	-
بوتیل آمین	-	-	-

- واکنش منفی جدایه به آزمون +: واکنش مثبت جدایه به آزمون  
 ۷ (متغیر): بین ۲۱ تا ۸۹ درصد جدایه

و آزمونهای استفاده از ال-آرابینوز، دی زایلوز، دی-گالاکتوز، سوکروز، ال-تارتاریک اسید و دی آلانین مثبت و آزمونهای استفاده از ترهالوز، آدونیتول، اتانول و ژرانیول منفی و سوربیتول، مزواینوزیتول، بوتیرات، والرات، نیکوتینات، فنیل استات و بوتیل آمین متغیر بود. همچنین رشد در ۴۱ درجه سانتی‌گراد در اعضاء این گروه مثبت بود. ۴ جدایه این گروه در

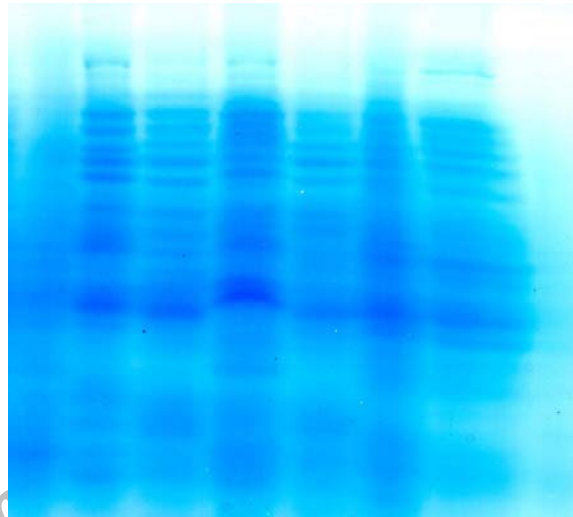
بیوور V باکتری *P. fluorescens* قرار گرفتند که به جز آزمون رشد در ۴۱ درجه سانتی‌گراد در سایر موارد با خصوصیات ارایه شده مشابه بود (۴، ۲۰). با توجه به ویژگیهای فنوتیپی بررسی شده، جدایه‌های مورد مطالعه شامل بیوورهای III، IV و V باکتری *P. fluorescens* بودند که بیوور III این باکتری بیشترین جمعیت را در میکروفلور گیاه سیب زمینی داشت. دو جدایه H20 و H46 نیز وجود داشتند که با خصوصیات گونه *P. fluorescens* مطابق نبودند. در جدایه H20 آزمونهای اکسیداز، هیدرولیز آرژنین دی هیدرولاز، رشد در ۴۱ درجه سانتی‌گراد، تولید لوان، احیاء نیترات، تولید رنگ غیرفلورسنت، فعالیت پکتولیتیکی، استفاده از ترهالوز، آدونیتول، نیکوتینات، اتانول، ژرانیول، فنیل استات و بوتیل آمین منفی و آزمونهای هیدرولیز ژلاتین، تولید لیسیتیناز، رشد در ۴ درجه سانتی‌گراد، استفاده از سوکروز، دی - گالاکتوز، سوربیتول، مزواینوزیتول، دی-زایلوز، ال - آرابینوز، دی - آلانین و ال - تارتاریک اسید مثبت بود. جدایه H46 اکسیداز منفی و آزمونهای هیدرولیز آرژنین دی هیدرولاز، رشد در ۴۱ درجه سانتی‌گراد، احیاء نیترات و استفاده از ترهالوز مثبت و در سایر آزمونها با جدایه H20 مشابه بود.

نقوش الکتروفورزی جدایه‌های AR13، S15، S17، H39، H5، S13، D6 و AR1 که از نظر خصوصیات فنوتیپی در بیوور III باکتری *P. fluorescens* قرار گرفتند در تعداد و محل قرارگیری باندهای قوی و ضعیف به هم شباهت داشتند. جدایه‌های D15، H4 و D9 که توسط تست‌های بیوشیمیایی در بیوور V باکتری *P. fluorescens* قرار گرفتند نیز از لحاظ تعداد و محل قرارگیری باندهای قوی و ضعیف شباهت داشتند. جدایه‌های S1، D1 و SD1 که از لحاظ خصوصیات فنوتیپی در بیوور IV باکتری *P. fluorescens* قرار گرفتند نیز در تعداد و محل قرارگیری باندهای قوی و ضعیف کاملاً به هم شبیه بودند. بیوورهای تشخیص داده شده با روش فنوتیپی از نظر الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی در ژل پلی آکریل آمید دارای تفاوت‌های جزیی بودند. در قسمت فوقانی ژل در مقابل دو باند بیوور IV و V در بیوور III سه باند وجود داشت و در قسمت پایین‌تر در مقابل دو باند موجود در بیوور III و V باندهای در

سودو موناس‌های فلورسنت متابولیت‌های ثانویه مختلفی از قبیل آنتی بیوتیک‌ها تولید می‌کنند که فنازین ۱- کربوکسیلیک اسید (pca)، فنازین ۱- کربوکسامید (pcn)، ۲ و ۴ دی استیل فلوروگلوکوسینول (phl)، پیولوتئورین (plt) و پیروول نیتروین (prm) تعدادی از آنتی بیوتیک‌های تولید شده توسط آنها می‌باشد (۷). در بررسی‌های انجام شده جهت تولید سیدروفور نیز در پتری‌های حاوی NAS که تیمار حرارتی شدند هاله بازدارنده در اطراف باکتری‌های آنتاگونیست به وجود آمد. از آنجایی که آنتی‌بیوتیک‌ها به حرارت حساس می‌باشند، وجود هاله در پتری‌های حاوی NAS که تیمار حرارتی شدند در مقایسه با شاهد و نتایج مثبت بدست آمده از آزمایش تولید رنگ فلورسنت روی محیط *Pseudomonas agar F* توسط باکتری‌های آنتاگونیست تاییدی بر تولید سیدروفور یا موادی با خواص مشابه است. سیدروفورها مواد کلاته کننده آهن سه ظرفیتی با وزن مولکولی کم هستند که تحت شرایط کمبود آهن تولید می‌شوند و با یون آهن کمپلکس تشکیل می‌دهند. این کمپلکس بوسیله پروتئین‌های گیرنده در غشای سلول باکتری به طور اختصاصی شناسایی و جذب می‌گردد. تاکنون سیدروفورهای متعددی شناخته شده‌اند که ساختمان شیمیایی برخی از آنها نیز مشخص گردیده است. سیدروفور تولید شده به وسیله سودوموناس‌های فلورسنت از نوع سودوباکتین یا پیوورین است که نسبت به سیدروفور سایر میکروارگانیسم‌های خاک قدرت رقابت آنها بیشتر است زیرا میل ترکیبی سیدروفور سودوموناس‌های فلورسنت بیشتر از سیدروفور سایر میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. سیدروفورها نقش مهمی در آنتاگونیسم بین میکروارگانیسم‌های مختلف دارند. سیدروفور خارج سلولی برخی از استرین‌ها به نام سودوباکتین سریعاً ریشه‌ها را احاطه کرده و آهن منطقه ریشه را غیر قابل دسترس برای میکروارگانیسم‌های ریزوسفر می‌سازد (۱۰).

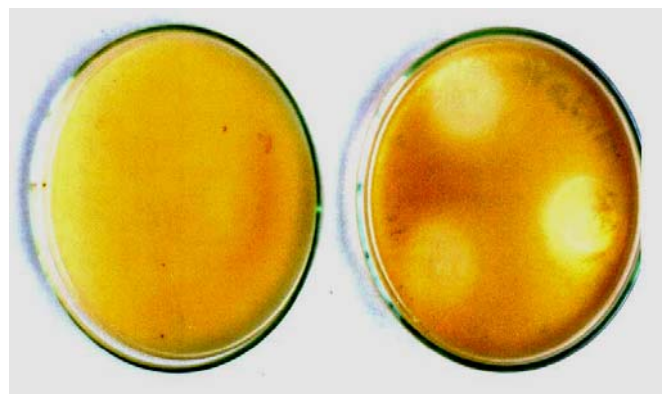
با توجه به متابولیت‌های ثانویه تولید شده توسط سودوموناس‌های فلورسنت می‌توان چنین استنباط کرد که سودوموناس‌های فلورسنت عوامل مؤثری برای کنترل بیولوژیکی می‌باشند. این باکتری‌ها محیط اطراف ریشه را کلنیزه کرده و جمعیت بالایی را تولید می‌کنند و با تولید متابولیت‌های ثانویه

بیووار IV نبود. همچنین در قسمت وسط ژل یک باند قوی در بیووار III مشاهده شد که در مقابل آن در سایر بیووارها باندی وجود نداشت. (شکل ۱).



شکل ۱- نقوش الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی جدایه‌های باکتری *P. fluorescens* جدا شده از سبب زمینی. جدایه‌های D1 و SD1 بیووار IV، H4 و D9 بیووار V و D6 و AR1 بیووار III.

در آزمون بررسی تولید آنتی بیوتیک نیز در همه جدایه‌های آنتاگونیست بکار رفته هاله بازدارنده در مقابل باکتری پاتوژن مشاهده شد در صورتیکه در پتری شاهد پاتوژن به صورت یکدست رشد کرد که در شکل ۲ نشان داده شده است. این امر نشان دهنده تولید یک یا چند نوع آنتی بیوتیک توسط باکتری‌های آنتاگونیست می‌باشد.



شکل ۲- هاله‌های بازدارنده ایجاد شده با تولید مواد آنتی بیوتیکی توسط جدایه‌های *P. fluorescens* علیه *P. c. subsp. Atrosepticum*

رشد گیاه می‌شوند که این باکتریها بعنوان محرک‌های رشد گیاه  
رشد عوامل بیماریزای گیاهی جلوگیری کرده و موجب افزایش

متعددی از قبیل سیدروفور، آنتی بیوتیک و سیانید هیدروژن از  
شناخته شده‌اند (۱، ۶، ۱۳، ۱۴).

## REFERENCES

1. Anonymous. 1997. Consensus Document on Information Used in the Assessment of Environmental Application Involving *Pseudomonas*. [www1.oecd.org/ehsmono.pdf](http://www1.oecd.org/ehsmono.pdf)
2. Anonymous. 2001. *Pseudomonas fluorescens*. [www.Agrobiologicals.com](http://www.Agrobiologicals.com)
3. Barrett, E. J., R. E. Solanes, J. S. Tang, & N. J. Palleroni. 1986. *Pseudomonas fluorescens* biovar V: its resolution into distinct groups and relationships of these groups to other *P. fluorescens* biovars, to *P. putida*, and to psychrotrophic pseudomonads associated with food spoilage. *J. Gen. Microbiol.*, 132: 2709-2721.
4. Bossis, E., P. Lemanceau, X. Latour, & L. Gardan. 2000. The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie* 20: 50-63.
5. Champion, A. B., E. L. Barrett, & N. J. Palleroni. 1980. Evolution in *Pseudomonas fluorescens*. *J. Gen. Microbiol.*, 120: 485-511.
6. Cronin, D., Y. Moenne Loccoz, A. Fenton, C. Dunne, D. N. Dowling, & O'Gara. 1997. Ecological interaction of a biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain producing 2,4-diacetylphloroglucinol with the soft rot potato pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 23: 95-106.
7. Dieter, H., B. Caroline, & K. Christoph. 2000. Biocontrol ability of fluorescent pseudomonas genetically dissected: Importance of positive feedback regulation. [www.bentham.org](http://www.bentham.org).
8. Dye, D. W. 1968. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. I. The amylovora group. *NewZ. J. Sci.*, 11: 590-607.
9. Fahy, P. C. & G. J. Persley. 1983. *Plant Bacterial Disease. A Diagnostic Guide*. Academic Press, Australia, 393pp.
10. Fuchs, R., M. Schafer, V. Geoffroy, & J. M. Meyer. 2002. Siderotyping - A powerful tool for the characterization of pyoverdines. <http://www.bentham.org/ctmc1-1/fuch/fuchsms.htm>
11. Johnson, J. & N. J. Palleroni. 1989. Desoxyribonucleic acid similarities among *Pseudomonas* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 39: 230-235.
12. Klement, Z., C. L. Farkas, & L. Lovrekorich. 1964. Hypersensitivity reaction induced by phytopathogenic bacteria in tobacco leaf. *Phytopathology*, 54: 474-477.
13. Kloepper, J. W. 1983. Effect of seed piece inoculation with plant promoting rhizobacteria on populations of *E. carotovora* on potato roots and daughter tubers. *Phytopathology*, 73: 217-219.
14. Kloepper, J. W., M. N. Schroth, & T. D. Miller. 1986. Effects of rhizosphere colonization by plant growth promoting rhizobacteria on potato development and yield. *Phytopathology*, 70: 1078-1082.
15. Kovacs, N. 1956. Identification of *Pseudomonas solanacearum* by the oxidase reaction. *Nature (Lond)*. 178: 703
16. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature (London)* 227: 680-685.
17. Lelliott, R. A., E. Billing, & A. C. Hayward. 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas*. *J. Appl. Bacteriol.*, 29: 470-489.
18. Lemanceau, P. 1992. Beneficial effects of rhizobacteria on plants: example of fluorescent *Pseudomonas* spp. *Agronomie*, 12: 413-437.
19. Palleroni, N. J. 1984. Gram – negative aerobic rods and cocci: Family I Pseudomonadaceae. In: Krieg, N. R. and Holt, J. G. (Eds), *Bergey's manual of bacteriology*, William and Wilkins, Baltimore, 141-168.
20. Schaad, N. W. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. 3th ed APS Press, 373pp.



21. Stanier, R. Y., N. J. Palleroni, & M. Doudoroff. 1966. The aerobic pseudomonads, a taxonomy study. J. Gen. Microbiol., 43: 159-271.
22. Thornley, M. J. 1960. The differentiation of *Pseudomonas* from other gram negative bacteria on the basis of arginine metabolism. Appl. Bacteriol., 13: 37-52.
23. Waller, D. M. & R. J. Cook. 1993. Suppression of take-all of wheat seed treatments with fluorescent pseudomonads. Phytopathology, 73: 463-469.

Archive of SID