

## مقایسه اثر محیط‌های کشت آلی روی میزان جمعیت تیپ وحشی و تیپ جهش یافته *Pseudomonas fluorescens* VUPf5 باکتری بیوکنترل

۱. آرزو لگزیان\*؛ ۲. روح‌اله صابری ریشه؛ ۳. پیمان خدایگان

۱، ۲ و ۳. دانشجویان سابق کارشناسی ارشد، استادیاران بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی،

دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان

(تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۱۰ - تاریخ تصویب: ۹۴/۱/۲۴)

### چکیده

در این تحقیق رشد دو سویه باکتری *Pseudomonas fluorescens* VUPf5 و *P. fluorescens* VUPf5-1 (باکتری جهش یافته مشابه جهش یافته سیستم تنظیمی *gac*) در محیط‌های کشت آلی ارزیابی شد. این جهش خودبه‌خودی تولید ترکیبات ضد قارچی سیانید هیدروژن، آنتی‌بیوتیک فنازین و آنزیم پروتئاز را در سویه بیوکنترل *Pseudomonas fluorescens* VUPf5 متوقف کرد. با استفاده از محیط‌های کشت آلی همراه یا بدون سولفات روی سعی شد که جمعیت جهش یافته‌ها تا حد امکان کاهش یابد. با هدف افزایش رشد جمعیت VUPf5 و کاهش رشد جمعیت VUPf5-1، شش منبع کربنی (ملاس چغندرقد، نشاسته، سیب‌زمینی، خرما، شکر، سیب)، سه منبع ازتی (سویا، اوره، سولفات آمونیوم) و یک منبع کربنی-ازتی (جوانه گندم) بررسی شدند. محیط کشت 13B (ملاس چغندرقد، جوانه گندم، سویا، شکر، سیب و سولفات منگنز)، محیط کشت بهتری از لحاظ جمعیت باکتری VUPf5 ( $10^8 \times 5/56$  سلول باکتری در هر میلی‌لیتر) در مقایسه با محیط‌های کشت دیگر شناخته شد و اختلاف جمعیت باکتری در مقایسه با سایر محیط‌ها معنی‌دار بود. محیط کشت ID (ملاس چغندرقد، جوانه گندم، سویا، شکر، سیب و سولفات روی) سبب کاهش چشمگیری در تکثیر پرگنه‌های جهش یافته شد. نتایج به‌دست آمده می‌تواند مبنای قابل اعتمادی برای تکثیر بهینه عامل بیوکنترل در فرایندهای فرمانتاسیون را فراهم کند.

**کلیدواژگان:** بهینه‌سازی، تکثیر، جهش یافته، سودوموناس.

### مقدمه

(De fago 1999). یکی از موانع موجود در کاربرد تجاری و تکثیر انبوه باکتری‌های مفید، طراحی فرایندی است که علاوه بر تکثیر انبوه، باعث جلوگیری از تغییرات ناخواسته ژنتیکی و افزایش ثبات جدایه‌ها شود. مشکل اساسی که در فرایند تکثیر انبوه باکتری‌های مفید پدید می‌آید، ایجاد جهش در ژن‌هایی است که در تولید متابولیت‌های ثانویه دخیل هستند. مشخص شده است

منابع کربن برای تمامی فعالیت‌هایی که به تولید مثل، تشکیل فرآورده‌ها و بقای سلول منجر می‌شوند، مورد نیاز است. نیتروژن، ۱۴-۸ درصد از وزن خشک باکتری‌ها و قارچ‌ها را تشکیل می‌دهد. طیف وسیعی از ترکیبات آلی و معدنی را می‌توان برای برآوردن نیاز میکروارگانیسم‌ها به نیتروژن استفاده کرد (Duffy and

پرگنه‌های جهش‌یافته خودبه‌خودی در فرمانتورهای صنعتی است. با ایجاد جهش در سیستم *gac* در یک حجم کوچک محیط کشت و سپس، انتقال زادمایه به حجم‌های بزرگ‌تر جمعیت جهش‌یافته‌ها بسیار افزایش می‌یابد (Chancey et al. 1999). لذا، بهینه‌سازی محیط‌های کشت به‌منظور ممانعت از تکثیر بالای جهش‌یافته‌ها امری ضروری است. بنابراین، در این پژوهش، دستیابی به محیط‌های کشت ارزان و آلی برای افزایش جمعیت باکتری بیوکنترل *VUPf5* و کاهش جمعیت تیپ جهش‌یافته آن، بررسی شده است.

### مواد و روش‌ها

#### تهیه و نگهداری سویه‌های باکتری

باکتری تیپ وحشی *Pseudomonas fluorescens VUPf5* که از ریزوسفر درخت هلو، از منطقه شمال ایران، جداسازی شده است و جدایه‌های جهش‌یافته (*VUPf5-1*) این سویه که از آزمایش‌های پیشین تهیه شده بود، برای انجام آزمون‌ها انتخاب شدند. سویه تیپ وحشی (*VUPf5*) در بین ۹۰۰ جدایه بیشترین میزان بازدارندگی از قارچ *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*، عامل بیماری پاخوره غلات، را از خود نشان داد. این سویه در شرایط آزمایشگاه ۱۰۰ درصد از رشد قارچ جلوگیری کرد و در شرایط گلخانه‌ای توانست ۸۵ درصد باعث کاهش بیماری در گیاه گندم شود. *VUPf5* قابلیت تولید بسیاری از متابولیت‌های مؤثر در بیوکنترل مانند *HCN*، پروتئاز خارج سلولی، متابولیت‌های فرار، سیدروفور و آنتی‌بیوتیک فنازین را داراست (Lagzian et al. 2013b) و دلیل انتخاب این استرین خصوصیات بیوکنترلی حائز اهمیت آن است. ضمن تکثیر این سویه در شرایط کشت مایع پرگنه‌های متفاوتی (*VUPf5-1*) از لحاظ خصوصیات ظاهری، بیوشیمیایی و ژنتیکی ایجاد شدند که با توجه به خصوصیات موجود، احتمال ایجاد جهش در ژن‌های *gacS* و *gacA* در آن می‌رفت (Lagzian et al. 2013a). پرگنه‌های جهش‌یافته ایجاد شده برخلاف تیپ وحشی، خصوصیات بیوکنترلی بسیار ضعیفی داشتند و توانایی کنترل بیمارگر عامل پاخوره غلات را نداشتند. (جدول ۱).

برای نگهداری سویه‌های مذکور چند لوب از باکتری کشت‌شده روی محیط (NA) Nutrient Agar به محیط

که بسیاری از فرایندهای تنظیم بیان ژن در سودوموناس‌های بیمارگر و مفید با سیستم‌های دوجزئی تنظیم می‌شوند. یکی از شناخته‌شده‌ترین این سیستم‌ها که در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه ضد قارچی در سودوموناس‌های مفید نیز دخالت مستقیم دارد، سیستم دوجزئی پروتئینی *GacS/GacA* است. این سیستم شامل سنسورکیناز *GacS* و تنظیم‌کننده پاسخ محیطی *GacA* است (Heeb and Haas 2001, Arons et al. 2000). سیستم *GacS/GacA* تولید طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانویه و آنزیم‌های خارج سلولی مؤثر در بیوکنترل بیماری‌های گیاهی را کنترل می‌کند (Heeb and Haas 2001). هنگام برهم‌کنش با سیگنال‌های محیطی، گیرنده‌ها فسفریله و سپس، پاسخ‌های تنظیمی توسط انتقال فسفر فعال می‌شود (Appleby et al. 1996). ایجاد جهش در ژن‌های سیستم *GacS/GacA* سبب می‌شود تا جدایه‌های آنتاگونیست نتوانند بسیاری از متابولیت‌های ثانویه مؤثر در بیوکنترل بیماری‌های گیاهی را تولید کنند. به‌طوری که، در سویه جهش‌یافته *gacA* باکتری *Pseudomonas chlororaphis* 30-84 پروتئاز خارج سلولی، *HCN*، آنتی‌بیوتیک فنازین و بسیاری از پروتئین‌ها تولید نمی‌شوند. همچنین، سطح رونویسی ژن‌های تنظیمی *rsmX*، *rsmY*، *rsmZ*، *pip*، *phzR*، *phzI*، *spoS* و *rsmE* که در ویژگی‌های بیوکنترلی این باکتری علیه بیمارگر خاکزی پاخوره غلات مؤثر است، بسیار کاهش یافته است (Wang et al. 2013). باکتری آنتاگونیست *P. fluorescens* CHA0 قابلیت خوبی در تولید سالیسیلیک اسید، آنتی‌بیوتیک‌های پیرول نیتیرین، ۲ و ۴ - دی استیل فلوروگلوکوسینول، آنزیم *TSO* (Tryptophan side chain oxidase)، *HCN* (Hydrogen cyanid) و پروتئاز خارج سلولی داشت و بیمارگر خاکزی مرگ گیاهچه خیار را به‌خوبی کنترل کرد. در مقایسه جهش‌یافته‌های خودبه‌خودی سیستم *GacS/GacA* این جدایه، بیمارگر را کنترل نکرد (Haas 2003 and Keel).

ایجاد جهش در ژن‌های *gacA* و *gacS* در محیط‌های کشت، فراوانی بالایی دارد (Chancey et al. 2001, Bull et al. 1999). هنگام تولید انبوه باکتری، یکی از مشکلات به‌وجودآمده، افزایش تصاعدی

میلی‌لیتری دربدار (حاوی ۴۰ میلی‌لیتر گلیسرول استرون) در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند (Kim et al. 1997).

Nutrient Broth Yeast (NBY) (شامل ۰/۸ گرم، عصاره مخمر ۰/۵ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استرون) اضافه شد. سوسپانسیون حاصل درون لوله‌های ۲

جدول ۱. مشخصات و خصوصیات باکتری‌های مورد استفاده در این آزمایش

خصوصیات	VUPf5 <sup>۱</sup>	VUPf5-1 <sup>۲</sup>
مورفولوژی پرگنه‌ها روی محیط KB	گرد، برجسته، نارنجی و نیم شفاف	صاف، مات، سفید، قطر پرگنه‌ها بزرگ‌تر
پروتئاز خارج سلولی	+	-
سیانید هیدروژن	+	-
آنتی‌بیوتیک فنازین	+	-
هاله بازدارندگی (mm) <sup>۳</sup>	۱۷	*

۱. (Lagzian et al. 2013b)، ۲. (Lagzian et al. 2013a) و ۳. در آزمایش کشت متقابل با قارچ عامل پاخوره گندم (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*)

انتخاب محیط کشت مناسب برای تکثیر سویه *P. fluorescens* VUPf5 آماده‌سازی محیط کشت سی و یک محیط کشت با استفاده از منابع مختلف کربن و ازت تهیه شد (جدول ۲). به‌منظور تهیه محیط‌های

کشت عصاره‌های سویا، سیب‌زمینی، سیب، جوانه گندم و خرما، به‌ترتیب ۱۰۰، ۲۵۰، ۱۰۰، ۴۰، ۱۰۰ گرم از هرکدام به‌مدت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه جوشانده و پس از عبور از پارچه ململ، حجم عصاره آن‌ها با آب مقطر به ۱ لیتر رسانده شد (Safari Asl et al. 2010).

جدول ۲. منابع کربن و ازت مورد استفاده در تهیه بسترهای کشت برای تکثیر سویه VUPf5

آزمایش اول (A)	
منابع (میزان مصرف در لیتر)	
ازت	کربن
سولفات آمونیوم ۲ گرم	ملاس چغندر قند ۱۰ گرم، نشاسته ۵ گرم، عصاره پودر سیب ۱۵ میلی‌لیتر
سولفات آمونیوم ۲ گرم	ملاس چغندر قند ۱۰ گرم، نشاسته ۵ گرم
سولفات آمونیوم ۲ گرم، عصاره سویا ۱۵ میلی‌لیتر	ملاس چغندر قند ۱۰ گرم
اوره ۲ گرم، عصاره سویا ۱۵ میلی‌لیتر	ملاس چغندر قند ۱۰ گرم
عصاره سویا ۱۵ میلی‌لیتر	ملاس چغندر قند ۱۰ گرم، عصاره سیب‌زمینی ۷۵ میلی‌لیتر
اوره ۲ گرم	ملاس چغندر قند ۱۰ گرم
سولفات آمونیوم ۲ گرم	ملاس چغندر قند ۱۰ گرم
-	ملاس چغندر قند ۱۰ گرم، عصاره پودر سیب ۱۵ میلی‌لیتر
عصاره سویا ۱۵ میلی‌لیتر، سولفات منگنز ۱۰ میلی‌گرم	ملاس چغندر قند ۱۰ گرم
عصاره سویا ۱۵ میلی‌لیتر، سولفات منگنز ۱۰ میلی‌گرم	عصاره سیب‌زمینی ۷۵ میلی‌لیتر
اوره ۲ گرم، عصاره سویا ۱۵ میلی‌لیتر	عصاره سیب‌زمینی ۷۵ میلی‌لیتر
سولفات آمونیوم ۲ گرم	عصاره سیب‌زمینی ۷۵ میلی‌لیتر، نشاسته ۵ گرم
سولفات آمونیوم ۲ گرم	عصاره سیب‌زمینی ۷۵ میلی‌لیتر، نشاسته ۵ گرم، عصاره سیب ۱۵ میلی‌لیتر
عصاره سویا ۱۵ میلی‌لیتر، سولفات منگنز ۱۰ میلی‌گرم	عصاره سیب‌زمینی ۷۵ میلی‌لیتر، عصاره پودر سیب ۱۵ میلی‌لیتر
-	عصاره مخمر ۵ گرم به همراه محیط آماده آگار مغذی مایع ۸ گرم (NBY)

## ادامه جدول ۲

آزمایش دوم (B)	
منابع (میزان مصرف در لیتر)	
کد	کربن
1B	عصاره سیب‌زمینی ۷۵ میلی‌لیتر، عصاره سیب ۱۵ میلی‌لیتر، شکر ۳۰ گرم
2B	عصاره خرما ۱۵ میلی‌لیتر، عصاره سیب ۱۵ میلی‌لیتر، شکر ۳۰ گرم
3B	عصاره جوانه گندم ۲۵۰ میلی‌لیتر، عصاره سیب ۱۵ میلی‌لیتر، شکر ۳۰ گرم
4B	عصاره جوانه گندم ۲۵۰ میلی‌لیتر، عصاره سیب ۱۵ میلی‌لیتر، شکر ۳۰ گرم
5B	عصاره سیب‌زمینی ۷۵ میلی‌لیتر، عصاره سیب ۱۵ میلی‌لیتر، شکر ۳۰ گرم
6B	ملاس چغندر قند ۱۰ گرم، عصاره سیب‌زمینی ۷۵ میلی‌لیتر، شکر ۳۰ گرم
7B	ملاس چغندر قند ۱۰ گرم، عصاره سیب‌زمینی ۷۵ میلی‌لیتر، عصاره سیب ۱۵ میلی‌لیتر، شکر ۳۰ گرم
8B	ملاس چغندر قند ۱۰ گرم، عصاره سیب‌زمینی ۷۵ میلی‌لیتر، عصاره خرما ۱۵ میلی‌لیتر، شکر ۳۰ گرم
9B	ملاس چغندر قند ۱۰ گرم، عصاره سیب‌زمینی ۷۵ میلی‌لیتر، عصاره سیب ۱۵ میلی‌لیتر، شکر ۳۰ گرم
10B	ملاس چغندر قند ۱۰ گرم، عصاره سیب‌زمینی ۷۵ میلی‌لیتر، عصاره خرما ۱۵ میلی‌لیتر، عصاره جوانه گندم ۲۵۰ میلی‌لیتر، عصاره سیب ۱۵ میلی‌لیتر، شکر ۳۰ گرم
11B	ملاس چغندر قند ۱۰ گرم، عصاره خرما ۱۵ میلی‌لیتر، عصاره پودر سیب ۱۵ میلی‌لیتر، شکر ۳۰ گرم
12B	ملاس چغندر قند ۱۰ گرم، عصاره خرما ۱۵ میلی‌لیتر، عصاره پودر سیب ۱۵ میلی‌لیتر، شکر ۳۰ گرم
13B	ملاس چغندر قند ۱۰ گرم، عصاره جوانه گندم ۲۵۰ میلی‌لیتر، عصاره سیب ۱۵ میلی‌لیتر، شکر ۳۰ گرم
14B	ملاس چغندر قند ۱۰ گرم، عصاره جوانه گندم ۲۵۰ میلی‌لیتر، عصاره سیب ۱۵ میلی‌لیتر، شکر ۳۰ گرم
15B	ملاس چغندر قند ۱۰ گرم، عصاره سیب‌زمینی ۷۵ میلی‌لیتر، عصاره سیب ۱۵ میلی‌لیتر، شکر ۳۰ گرم
16b	ملاس چغندر قند ۱۰ گرم، عصاره جوانه گندم ۲۵۰ میلی‌لیتر، عصاره سیب ۱۵ میلی‌لیتر، شکر ۳۰ گرم
17B	عصاره مخمر ۵ گرم به همراه محیط آماده آگار مغذی مایع ۸ گرم (NB۷)

شد، کدورت سوسپانسیون به کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر (در طول موج ۵۴۰ نانومتر) سنجیده شد. هم‌زمان جمعیت سلول باکتری در هر میلی‌لیتر از محیط کشت NB، با روش سری رقت تعیین شد. مطابقت تعداد سلول در هر میلی‌لیتر و میزان دانسیته نوری حاصل از هر رقت تعیین و منحنی رشد ترسیم شد. برای محاسبه جمعیت‌ها در تمامی آزمایش‌ها از منحنی مذکور استفاده شد.

**تعیین جمعیت باکتری در محیط‌های کشت**  
 ۱۰۰ میلی‌لیتر از هر محیط غذایی سترون‌شده در یک فلاسک ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری توسط ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ۲۴ ساعته باکتری مایه‌زنی شد. فلاسک‌های ارلن به مدت ۲۴ ساعت روی تکان‌دهنده با ۱۲۰ دور در دقیقه و دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. تعیین جمعیت باکتری پس از ۲۴ ساعت از کشت باکتری انجام

KB (King B) منتقل و به صورت انبوه به کمک میله شیشه‌ای L شکل کشت داده شدند، میزان مصرف سولفات روی در تیمارهای مربوط به آزمایش اول و دوم جدول ۳، ۶۰ و ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. این آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با هفت تیمار و سه تکرار انجام شد (Duffy and De fago 2000). به منظور محاسبه درصد رشد پرگنه‌های تغییر یافته، هر ۲۴ ساعت یک مرتبه پرگنه‌ها براساس خصوصیات مورفولوژیکی مندرج در جدول ۱ (Lagzian et al. 2013a, ) Lagzian et al. 2013b) ارزیابی و شمارش شدند.

### محاسبات آماری

تجزیه و تحلیل‌های آماری به روش ANOVA ( $P \leq 0.05$ ) و مقایسه میانگین با روش LSD با استفاده از نرم‌افزار SAS.9.0 انجام شد.

### بررسی درصد رشد جهش‌یافته‌های پدید آمده در محیط‌های کشت آلی

باکتری تیپ وحشی *P. fluorescens* VUPf5 و سویه تغییر یافته (VUPf5-1) آن، در فلاسک‌های ارلن‌مایر محتوی محیط کشت NBY در دمای ۲۷ درجه سلسیوس و با دور ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت رشد داده شدند. محیط کشت‌های منتخب در فلاسک‌های ارلن‌مایر ۱۰۰ میلی‌لیتری به مقدار ۴۰ میلی‌لیتر تهیه شد. سپس، به میزانی که در جدول ۳ ذکر شده است از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها به هر محیط کشت اضافه شد. محیط‌های کشت در دمای ۲۷ درجه سلسیوس، روی گرداننده با دور ۱۵۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، از محیط‌ها سری رقت تهیه شد. سپس، حدود ۱۵ تا ۴۰ میکرولیتر از هر محیط به پتری‌های حاوی محیط کشت

جدول ۳. ارزیابی میزان رشد باکتری‌های تیپ وحشی و جهش‌یافته در مقایسه با هم در بسترهای کشت منتخب

آزمایش اول (C) <sup>۱</sup>	
کد محیط	بسترهای کشت
1C	ملاس چغندر قند، عصاره جوانه گندم، عصاره پودر سیب، شکر، عصاره سویا، سولفات منگنز
2C	ملاس چغندر قند، عصاره جوانه گندم، عصاره پودر سیب، شکر، عصاره سویا، سولفات روی
3C	ملاس چغندر قند، عصاره جوانه گندم، عصاره سیب، شکر، سولفات آمونیوم، سولفات منگنز
4C	ملاس چغندر قند، عصاره جوانه گندم، عصاره سیب، شکر، سولفات آمونیوم، سولفات روی
5C	عصاره سیب‌زمینی، عصاره سیب، شکر، عصاره سویا، سولفات منگنز
6C	عصاره سیب‌زمینی، عصاره سیب، شکر، عصاره سویا، سولفات روی
7C	عصاره مخمر به همراه محیط آماده آگار مغذی مایع (NBY)
آزمایش دوم (D) <sup>۲</sup>	
کد محیط	بسترهای کشت
1D	ملاس چغندر قند، عصاره جوانه گندم، عصاره پودر سیب، شکر، عصاره سویا، سولفات روی
2D	ملاس چغندر قند، عصاره جوانه گندم، عصاره سیب، شکر، سولفات آمونیوم، سولفات منگنز
3D	عصاره سیب‌زمینی، عصاره سیب، شکر، عصاره سویا، سولفات منگنز
4D	عصاره مخمر به همراه محیط آماده آگار مغذی مایع (NBY)

۱. میزان مصرف سولفات روی ۶۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استفاده شده است. میزان مصرف سایر ترکیبات در محیط‌های کشت مطابق جدول ۲ است. به هر محیط کشت میزان مساوی ( $3 \times 10^9$  سلول) از سویه‌های تیپ وحشی (VUPf5) و جهش‌یافته (VUPf5-1) اضافه شد. ۲. میزان مصرف سولفات روی ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استفاده شده است. میزان مصرف سایر ترکیبات در محیط‌های کشت مطابق جدول ۲ است. به هر محیط کشت میزان مساوی ( $3 \times 10^9$  سلول) از سویه‌های تیپ وحشی (VUPf5) و جهش‌یافته (VUPf5-1) اضافه شد.

جدول ۴، تیمارهای 14A و 15A بهترین محیط‌های کشت از لحاظ میزان جمعیت VUPf5 بودند. تیمار 14A شامل عصاره سیب‌زمینی، عصاره پودر سیب، عصاره سویا، سولفات منگنز (دارای  $10^1 \times 3/18$  سلول باکتری) اختلاف بدون معنی با تیمار 15A داشت که یک محیط

### نتایج و بحث

#### اثر محیط‌های کشت روی میزان جمعیت *P. fluorescens* VUPf5

در این آزمایش تیمارها براساس نتایج تجزیه واریانس دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد بوده‌اند. مطابق

از مقایسه تیمارهای 9A با 10A و 4A با 11A مشخص شد که سیب‌زمینی نسبت به محیط‌هایی که تنها منبع کربنی آن‌ها ملاس چغندر بود، به افزایش قابل توجه جمعیت باکتری منجر شد و این اختلاف‌ها معنی‌دار است. با وجود اینکه ملاس چغندر حاوی ۴۷ تا ۵۰ درصد ساکارز و سایر قندهای کتوز، رافینوز، گالاکتینول، فروکتوز و گلوکز (به میزان بسیار ناچیز) و نیز حاوی پروتئین (بسیار اندک)، عناصر معدنی و ویتامین است، همچنین، به دلیل داشتن غلظت بالای ساکارز می‌تواند به تنهایی زیست‌توده بالایی را ایجاد کند، ولی چون ملاس چغندر حاوی برخی ترکیبات بازدارنده از رشد است و همچنین، می‌تواند pH محیط را اسیدی کند، در نتیجه اثر آن نسبت به عصاره سیب‌زمینی و گلوکز روی میزان رشد باکتری و فعالیت ضد قارچی آن ضعیف‌تر بوده است (Imrie 1969). تأثیر سیب‌زمینی در میزان رشد سلولی و فعالیت ضد قارچی را می‌توان به نوع ترکیبات موجود در سیب‌زمینی (کربوهیدرات ۱۶/۹ درصد، پروتئین ۱ درصد، لیپید ۱ درصد، خاکستر ۱ درصد از ۲۰ درصد ماده خشک موجود در سیب‌زمینی) و همچنین، انواع ویتامین‌ها (به‌ویژه گروه B و C)، عناصر معدنی مختلف (پتاسیم، فسفر، منگنز، کلسیم و سدیم) و ریزمغذی‌های آن نسبت داد (Roshandel et al. 2006).

کشت آماده و گران‌قیمت (نسبتاً غنی) شامل عصاره مخمر به همراه محیط آماده آگار مغذی (NBY) است. محیط کشت 14A نشان داد که عصاره سویا و سیب‌زمینی آن نسبت به سایر محیط‌های این آزمایش، اختلاف جمعیت معنی‌داری را سبب شده است. به طوری که، طبق گزارش‌های صفری اصل و همکاران، در محیط کشت حاوی عصاره سویا و سیب‌زمینی باکتری *Bacillus subtilis* رشد خوبی داشت (Safari et al. 2010). عصاره سویا نه تنها سبب افزایش بیومس باکتریایی می‌شود، بلکه براساس گزارش‌های سو و همکاران، عصاره سویا، گلوکز و عصاره خیسانده ذرت در محیط‌های کشت سبب افزایش تولید فنازین در سویه *Pseudomonas sp. M18* می‌شود و افزایش تولید متابولیت‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها سبب افزایش فعالیت بیوکنترلی باکتری و کنترل بیشتر بیمارگر می‌شود (Su et al. 2010). از مقایسه محیط‌های کشت 14A و 10A استنباط می‌شود که عصاره پودر سیب، سبب افزایش تکثیر چشمگیر شده است و اختلاف محیط‌ها از لحاظ جمعیت باکتری معنی‌دار بود. تیمارهای 4A (شامل ملاس چغندر، اوره و عصاره سویا)، 6A (شامل ملاس چغندر، اوره) و 11A (شامل عصاره سیب‌زمینی، اوره و عصاره سویا) در یک گروه قرار گرفتند و کمترین میزان جمعیت سویه VUPF5 را شامل شدند.

جدول ۴. ارزیابی میزان رشد باکتری تیپ وحشی در بسترهای طبیعی

آزمایش اول (A)	
کد	بستر کشت
1A	ملاس چغندر، نشاسته، عصاره پودر سیب، سولفات آمونیوم
2A	ملاس چغندر، نشاسته، سولفات آمونیوم
3A	ملاس چغندر، سولفات آمونیوم، عصاره سویا
4A	ملاس چغندر، اوره، عصاره سویا
5A	ملاس چغندر، عصاره سیب‌زمینی، عصاره سویا
6A	ملاس چغندر، اوره
7A	ملاس چغندر، سولفات آمونیوم
8A	ملاس چغندر، عصاره پودر سیب
9A	ملاس چغندر، عصاره سویا، سولفات منگنز
10A	عصاره سیب‌زمینی، عصاره سویا، سولفات منگنز
11A	عصاره سیب‌زمینی، اوره، عصاره سویا
12A	عصاره سیب‌زمینی، نشاسته، سولفات آمونیوم
13A	عصاره سیب‌زمینی، نشاسته، عصاره سیب، سولفات آمونیوم
14A	عصاره سیب‌زمینی، عصاره پودر سیب، عصاره سویا، سولفات منگنز
15A	عصاره مخمر به همراه محیط آماده آگار مغذی مایع (NBY)
	جمعیت باکتری <sup>۱</sup> (تعداد سلول باکتری در میلی‌لیتر)
	۱/۸×۱۰ <sup>۱۰</sup> cd
	۱/۶۸×۱۰ <sup>۱۰</sup> cd
	۲/۱×۱۰ <sup>۱۰</sup> c
	۳/۳۳×۱۰ <sup>۸</sup> g
	۱/۹×۱۰ <sup>۱۰</sup> c
	۲×۱۰ <sup>۸</sup> g
	۳×۱۰ <sup>۹</sup> f
	۵/۳۳×۱۰ <sup>۹</sup> f
	۱/۴۵×۱۰ <sup>۱۰</sup> de
	۱/۹۲×۱۰ <sup>۱۰</sup> c
	۸/۶۶×۱۰ <sup>۸</sup> g
	۱/۳۱×۱۰ <sup>۱۰</sup> e
	۲/۲۱×۱۰ <sup>۱۰</sup> b
	۳/۱۸×۱۰ <sup>۱۰</sup> a
	۳/۸۱×۱۰ <sup>۱۰</sup> a

ادامه جدول ۴

آزمایش دوم (B)		
کد	بستر کشت	جمعیت باکتری <sup>۱</sup> (تعداد سلول باکتری در میلی‌لیتر)
1B	عصاره سیب‌زمینی، عصاره سیب، شکر، عصاره سویا، سولفات منگنز	۳/۲۲×۱۰ <sup>۱۱</sup> cd
2B	عصاره خرما، عصاره سیب، شکر، عصاره سویا، سولفات منگنز	۲/۵۶×۱۰ <sup>۹</sup> f
3B	عصاره جوانه گندم، عصاره سیب، شکر، عصاره سویا، سولفات منگنز	۴/۷۶×۱۰ <sup>۱۱</sup> abc
4B	عصاره جوانه گندم، عصاره سیب، شکر، عصاره سویا، عصاره خاک	۳/۷۵×۱۰ <sup>۱۱</sup> cd
5B	عصاره سیب‌زمینی، عصاره سیب، شکر، عصاره سویا، عصاره خاک	۲/۷۲×۱۰ <sup>۱۱</sup> d
6B	ملاس چغندرقد، عصاره سیب‌زمینی، شکر، عصاره سویا	۲/۷×۱۰ <sup>۱۱</sup> d
7B	ملاس چغندرقد، عصاره سیب‌زمینی، عصاره سیب، شکر، عصاره سویا، سولفات منگنز	۲/۴۸×۱۰ <sup>۱۱</sup> de
8B	ملاس چغندرقد، عصاره سیب‌زمینی، عصاره خرما، شکر، عصاره سویا، سولفات منگنز	۲/۳۶×۱۰ <sup>۱۱</sup> de
9B	ملاس چغندرقد، عصاره سیب‌زمینی، عصاره سیب، شکر، عصاره سویا، عصاره خاک	۲/۷۱×۱۰ <sup>۱۱</sup> d
10B	ملاس چغندرقد، عصاره سیب‌زمینی، عصاره خرما، عصاره جوانه گندم، عصاره سیب، شکر، عصاره سویا، عصاره خاک	۵/۹۶×۱۰ <sup>۱۱</sup> a
11B	ملاس چغندرقد، عصاره خرما، عصاره پودر سیب، شکر، عصاره سویا، سولفات منگنز	۳/۵×۱۰ <sup>۹</sup> f
12B	ملاس چغندرقد، عصاره خرما، عصاره پودر سیب، شکر، عصاره سویا، عصاره خاک	۵/۹۳×۱۰ <sup>۹</sup> f
13B	ملاس چغندرقد، عصاره جوانه گندم، عصاره سیب، شکر، عصاره سویا، سولفات منگنز	۵/۵۶×۱۰ <sup>۱۱</sup> ab
14B	ملاس چغندرقد، عصاره جوانه گندم، عصاره سیب، شکر، عصاره سویا، عصاره خاک	۳/۹۸×۱۰ <sup>۱۱</sup> bcd
15B	ملاس چغندرقد، عصاره سیب‌زمینی، عصاره سیب، شکر، سولفات آمونیوم، عصاره خاک	۹/۵۸×۱۰ <sup>۹</sup> ef
16B	ملاس چغندرقد، عصاره جوانه گندم، عصاره سیب، شکر، سولفات آمونیوم، عصاره خاک	۳/۸۴×۱۰ <sup>۱۱</sup> de
17B	عصاره مخمر به همراه محیط آماده آگار مغذی مایع (NBY)	۲/۵۹×۱۰ <sup>۱۱</sup> de

۱. هر عدد میانگین سه تکرار است و میانگین‌ها با استفاده از روش LSD مقایسه شدند. اعداد ستون که حروف مشترک دارند، با یکدیگر اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد ندارند.

چغندرقد، عصاره سیب‌زمینی، عصاره سیب، شکر، سولفات آمونیوم و عصاره خاک) در یک گروه قرار گرفتند و کمترین میزان جمعیت باکتری را داشتند. مقایسه محیط‌های کشت 9B و 15B نشان داد که عصاره سویا به‌عنوان یک منبع ازتی بهتر در برابر سولفات آمونیوم، عمل کرد و اختلاف این محیط‌ها معنی‌دار بود (جدول ۴). از آنجا که عصاره سویا حاوی ۲۷ درصد پروتئین و ۵۳ درصد کربوهیدرات است (Ma et al. 1997, Daharani Aiyer 2004) و تقریباً تمام اسیدهای آمینه ضروری را دارد که در منابع از آن به‌عنوان منبع پروتئینی کامل یاد می‌شود، در برابر سولفات آمونیوم که فقط حاوی ۲۱ درصد نیتروژن به شکل یون آمونیوم مثبت و ۲۴ درصد سولفور به شکل آنیون سولفات است، منبع بهتر و کامل‌تری محسوب می‌شود. همچنین، وجود سولفات آمونیوم در محیط کشت می‌تواند سبب کاهش pH شود. از آنجا که عصاره خرما در تیمار 2B نسبت به تیمار 1B نشان داد که در

در آزمایش دوم (جدول ۲)، تیمارها براساس نتایج تجزیه واریانس دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد بودند. تیمارهای 10B (شامل ملاس چغندرقد، عصاره سیب‌زمینی، عصاره خرما، عصاره جوانه گندم، عصاره سیب، شکر، عصاره سویا و عصاره خاک) و 13B (شامل ملاس چغندرقد، عصاره جوانه گندم، عصاره سیب، شکر، عصاره سویا و سولفات منگنز) بهترین محیط‌های کشت از لحاظ میزان جمعیت VUPf5 در این آزمایش بودند و این دو تیمار اختلاف معنی‌داری نداشتند (جدول ۴). با توجه به پیچیده بودن محیط 10B استفاده از محیط کشت 13B در مراحل بعدی آزمایش‌ها منطقی‌تر به نظر می‌رسد. تیمارهای 2B (شامل عصاره خرما، عصاره سیب، شکر، عصاره سویا و سولفات منگنز)، 11B (شامل ملاس چغندرقد، عصاره خرما، عصاره پودر سیب، شکر، عصاره سویا و سولفات منگنز)، 12B (شامل ملاس چغندرقد، عصاره خرما، عصاره پودر سیب، شکر، عصاره سویا و عصاره خاک) و 15B (شامل ملاس

غنی از ۱۷ اسیدآمینه و به‌ویژه اسیدهای آمینه ضروری لیزین، متیونین و ترئونین هستند (Beeson et al. 1947, Arshad et al. 2007, Kumar et al. 2011). حال آنکه سیب‌زمینی بیشترین ماده موجود در آن کربوهیدرات نشاسته (۱۶/۹ درصد از کل ۲۰ درصد ماده خشک موجود در آن) است (Roshandel et al. 2006). بنابراین، جوانه گندم به‌عنوان یک ترکیب مغذی و کامل است و در این پژوهش باعث افزایش جمعیت بالایی در تیمارهای مذکور شد.

تفاوت بین محیط‌های کشت 3B و 4B در آزمایش دوم جدول ۴ در جایگزین کردن سولفات منگنز با عصاره خاک بود که نشان داد، سولفات منگنز در افزایش بیومس باکتری نقش مؤثرتری دارد. در گزارشی که صفری اصل و همکاران روی باکتری *Bacillus subtilis* تهیه و اجرا کردند، فهمیدند که وجود سولفات منگنز تفاوت معنی‌داری را در افزایش جمعیت این باکتری سبب می‌شود (Safari Asl et al. 2010).

#### اثر محیط‌های کشت روی میزان جمعیت جهش‌یافته خودبه‌خودی *P. fluorescens* VUPf5-1

در این آزمایش‌ها نیز تیمارها براساس نتایج تجزیه واریانس دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد بودند. مطابق جدول ۵، در محیط 1C (شامل ملاس چغندر قند، عصاره جوانه گندم، عصاره پودر سیب، شکر، عصاره سویا و سولفات منگنز) نسبت به محیط کشت‌های دیگر درصد جمعیت باکتری‌های جهش‌یافته به میزان ۱۱/۷ درصد کمتر بود. درصد جهش‌یافته‌ها در محیط کشت 3C، ۴۵/۴ درصد و در محیط کشت 5C در حدود ۲۷/۶ درصد مشاهده شد. بیشترین درصد رشد جهش‌یافته‌ها (۶۱/۲) در محیط کشت 7C (NBY) وجود داشت و با مطالعات دافی و دفاگو مطابقت داشت که در حدود ۶۰ درصد گزارش شده بود (Duffy and De fago 2000). در محیط‌های کشت مایع مختلف جهش‌یافته‌های *gac* رشد خوبی دارند، هرچند که ممکن است تراکم سلولی آن‌ها از تیپ وحشی کمتر باشد، میزان جمعیت جهش‌یافته‌ها در حد بالایی است (Poritsanos et al. 2006). دافی و دفاگو نشان دادند که میزان جمعیت جهش‌یافته‌ها با توجه به حجم محیط متغیر است. در

افزایش جمعیت خیلی مؤثر نبوده است و نیز وجود عصاره سیب‌زمینی با سویا در تیمار 14A در بین تیمارهای آزمایش اول جدول ۴ نشان داد که سبب افزایش جمعیت شده است، بنابراین، این‌طور به نظر می‌رسد که تنها وجود عصاره سیب‌زمینی باعث افزایش جمعیت در محیط 10B نسبت به محیط 13B شده است.

کوستا و همکاران اهمیت ملاس چغندر قند را به‌عنوان یک محیط پایه در افزایش میزان رشد سلولی جدایه CPA- *Pantoea agglomerans* 2 ثابت کردند (Costa et al. 2001). از آنجا که استفاده از قندهای خالصی مانند گلوکز، فروکتوز، ساکارز، لاکتوز و قندهای دیگر در میکروبیولوژی صنعتی باعث بالا رفتن هزینه تمام‌شده برای تولید محصول می‌شود، بنابراین، در بسیاری موارد از پسماندهای کشاورزی و صنعتی که از این قندها غنی‌اند مثل ملاس (منبع کربوهیدرات ارزان) استفاده می‌شود (Vazquez et al. 2003, Behravan et al. 1997). هرچند در آزمایش اول جدول ۴ مشخص شد که ملاس چغندر قند به تنهایی و بدون منبع کربن دیگری نتوانست سبب افزایش چشمگیری در میزان رشد شود، در ترکیب با جوانه گندم این دو بهتر توانستند عمل کنند.

از مقایسه محیط‌های کشت 7B، 8B، 9B و 10B این‌طور به نظر رسید که جوانه گندم تأثیر بسزایی در تولید بیومس این باکتری دارد و اختلاف تیمارها معنی‌دار است. همچنین، محیط کشت 3B و 13B در مقایسه با محیط 1B و 14A به ترتیب تأثیر خوبی در افزایش جمعیت نشان دادند و مشخص شد که جوانه گندم سبب افزایش بیشتری در جمعیت، نسبت به محیط حاوی سیب‌زمینی می‌شود و اختلاف آن‌ها معنی‌دار است. جوانه گندم شامل ۲۷ تا ۳۰ درصد پروتئین (عمدتاً آلبومین و گلوبولین)، ۸ تا ۱۱ درصد چربی (عمدتاً غیراشباع)، ۱۵ تا ۲۰ درصد قند (عمدتاً مالتوز، ساکارز و رافینوز) و ۸ تا ۱۰ درصد سلولز و همی سلولز است (Dunford and Zhang 2003)؛ در فرایند جوانه‌زدن ویتامین‌ها، املاح و پروتئین به مقدار زیادی افزایش می‌یابد (Ahmed et al. 2010, Kumar et al. 2011). همچنین، باید اشاره کرد که در شروع روند جوانه‌زدن، نشاسته موجود در دانه شکسته و به قندهای ساده ساکاروز و به‌خصوص مالتوز تبدیل می‌شود. پروتئین‌ها نیز به اسیدهای آمینه تغییر شکل می‌دهند که جوانه گندم



تیمارهای آزمایش اول شامل شد و عکس آن در مورد سایر محیط‌ها صادق بود. هرچند این پرگنه‌ها ممکن است به نظر برسد که می‌تواند جهش‌یافته سیستم تنظیمی دیگری نیز باشد، با توجه به تولید نکردن HCN و بسیاری از متابولیت‌های ثانویه دیگر و همچنین، داشتن خصوصیات مرفولوژیکی و بیوشیمیایی خاص خود نسبت به تیپ اصلی (Heeb and Haas 2001, Oliver 2000)، قطعیت بیشتری بر جهش در سیستم تنظیمی GacS/GacA می‌رود (Lagzian et al. 2013b). اما به‌طور کلی مهم‌ترین عیب جهش‌یافته‌های VUPf5-1 علاوه بر تولید نکردن بسیاری از متابولیت‌های ثانویه و آنزیم‌ها، ناکارایی آن‌ها در کنترل بیمارگرهای خاکزی مانند بیماری پاخوره غلات با عامل *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* است (Lagzian et al. 2013b).

طی انبوه‌سازی در فرایندهایی شبیه به فرمانتورهای صنعتی، میزان جهش‌یافته‌ها به‌طور تصاعدی بالا می‌رود و مقادیر آن‌ها ۷، ۲۳ و ۶۱ درصد بعد از انتقال به ترتیب به ظرف‌های ۲۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌لیتری بوده است (Duffy and De'fago, 2000). بنابراین، پایین نگه‌داشتن جمعیت جهش‌یافته‌های خودبه‌خودی در کشت نهایی از طریق بهینه‌سازی شرایط رشدی زادمایه میکروبی، می‌تواند به صرفه‌جویی در فرایند تکثیر انبوه باکتری بیوکنترل در مقیاس وسیع کمک کند.

نتایج این آزمایش نشان داد که محیط 1C دارای بیشترین میزان رشد سلول باکتری تیپ وحشی است و اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها دارد (جدول ۵). همچنین، این محیط کشت در افزایش میزان رشد سلول‌های جهش‌یافته، کمترین میزان ممکن را در بین

جدول ۵. بررسی درصد رشد جهش‌یافته‌ها در محیط‌های کشت

آزمایش اول (C)			
Mutant <sup>2</sup> (درصد پرگنه)	VUPf5 <sup>1</sup> (درصد پرگنه)	محیط‌های کشت <sup>۳</sup>	کد محیط
۱۱/۷	۸۸/۳a	عصاره پودر سیب، شکر، عصاره سویا، سولفات منگنز	1C
۱۰۰	۰e	عصاره پودر سیب، شکر، عصاره سویا، سولفات روی	2C
۴۵/۴	۵۴/۶c	عصاره پودر سیب، شکر، سولفات آمونیوم، سولفات منگنز	3C
۱۰۰	۰e	عصاره پودر سیب، شکر، سولفات آمونیوم، سولفات روی	4C
۲۷/۶	۷۲/۴b	عصاره سیب‌زمینی، عصاره سیب، شکر، عصاره سویا، سولفات منگنز	5C
۱۰۰	۰e	عصاره سیب‌زمینی، عصاره سیب، شکر، عصاره سویا، سولفات روی	6C
۶۱/۲	۳۸/۸d	عصاره مخمر به همراه محیط آماده آگار مغذی مایع (NBY)	7C
آزمایش دوم (D)			
Mutant <sup>2</sup> (درصد پرگنه)	VUPf5 <sup>1</sup> (درصد پرگنه)	محیط‌های کشت <sup>۴</sup>	کد محیط
-	۱۰۰a	عصاره پودر سیب، شکر، عصاره سویا، سولفات روی	1D
۴۵/۲	۵۴/۸c	عصاره پودر سیب، شکر، سولفات آمونیوم، سولفات منگنز	2D
۲۷/۶	۷۲/۴b	عصاره سیب‌زمینی، عصاره سیب، شکر، عصاره سویا، سولفات منگنز	3D
۶۱/۲	۳۸/۸d	عصاره مخمر به همراه محیط آماده آگار مغذی مایع (NBY)	4D

۱ و ۲. هر عدد میانگین ۳ تکرار است و میانگین‌ها با استفاده از روش LSD مقایسه شدند. اعداد ستون که حروف مشترک دارند، با یکدیگر اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد ندارند. ۳. سولفات روی ۶۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استفاده شده است. ۴. سولفات روی ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استفاده شده است.

30-84 *chlororaphis* (Maddula et al. 2006) دیده شده است. سنتز نشدن این آنزیم‌ها می‌تواند موجب تغییر در مصرف منابع ازتی و کربنی در این سویه‌ها شود. *CstA*

عدم کارایی در تولید برخی متابولیت‌های ثانویه و آنزیم‌ها مثل فنازین، HCN، اگزوپروتئاز، لیپاز و ژلاتیناز در جهش‌یافته‌های *gac* باکتری *Pseudomonas*

می‌تواند سبب رونویسی ژن‌های *csrB* و *csrC* (همولوگ *rsm x* و *rsm y*) شود که مسیر فسفریله‌شدن *UvrY* از طریق استیل فسفات انجام می‌شود (Tomenius et al. 2005). استیل فسفات به‌عنوان یک سیگنال عمومی برای تغذیه سیستم‌های دوجزئی مختلف پیشنهاد شده است (Wolfe 2005). با وجود این، در مورد *BarA/UvrY* استیل فسفات فقط در غیاب *BarA* و با اضافه‌کردن گلوکز به محیط کشت، فسفریلاسیون را وساطت می‌کند. همچنین، بررسی‌ها نشان داده است که *BarA* به pH محیط کشت بسیار وابسته است و بیشترین میزان رونویسی از ژن‌های *csrB* و *csrC* در pH ۷ انجام می‌شود (Mondragon et al. 2006).

در آزمایش دوم مربوط به جدول ۳ نیز تیمارها براساس نتایج تجزیه واریانس دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد بوده‌اند. در این آزمایش میزان مصرف سولفات روی ۱۰ میلی‌گرم بود و این میزان برای کاهش جمعیت جهش‌یافته‌ها، مفید واقع شد (جدول ۵). بهترین تیمار مربوط به تیمار ID (شامل ملاس چغندرقد، عصاره جوانه گندم، عصاره پودر سیب، شکر، عصاره سویا و سولفات روی) است که در آن هیچ‌گونه پرگنه جهش‌یافته‌ای ایجاد نشد (صفر درصد) و بدترین تیمار مربوط به تیمار 4D (NBY) بود. همچنین، وجود  $Zn^{2+}$  در ساختار ژنومی باکتری‌ها و در نتیجه در حفظ ژنتیکی آن‌ها نیز بسیار با اهمیت تلقی شده است به‌طوری‌که، در ژن *aprA* که ژن اصلی و مسئول سنتز پروتئاز خارج سلولی در *P. fluorescens* CHA0 است با ژن تولید پروتئاز آلکالین در *P. aeruginosa* تا ۶۲ درصد شباهت دارند و شامل یک موتیف اختصاصی برای باندشدن با  $Ca^{2+}$  و  $Zn^{2+}$  هستند (Duong et al. 1992). همچنین، دافی و دفاگو گزارش‌هایی در مورد نقش برخی عناصر مثل روی، مس، کبالت و همچنین، محیط کشت‌های رقیق (۱/۱۰X) برای کاهش درصد جهش در عوامل بیوکنترل باکتریایی بیان کرده‌اند (Duffy and De'fago 2000).

#### نتیجه‌گیری کلی

نتایج نشان داد محیط کشت‌هایی که می‌توانند باعث افزایش جمعیت تیپ وحشی شوند، لزوماً به افزایش

(carbon storage regulator) ابتدا، به‌عنوان یک تنظیم‌کننده سنتز گلیکوژن شناخته شد (Romeo et al. 1993)؛ اما بعد، مشخص شد که در داخل سلول باکتری نقش‌های دیگری نیز (سیستم‌های دوجزئی، تحرک و تشکیل بیوفیلم) دارد. خانواده *CsrA* پروتئین باندشونده با RNAهای کوچک تنظیمی در سیستم تنظیمی *BarA/UvrY* در میان Eubacteria است. همچنین، این پروتئین همولوگ *RsmA* در سیستم تنظیمی *GacS/GacA* است. *CsrA* یک تنظیم‌کننده مهم در متابولیسم کربن محسوب می‌شود (Romeo 1998). رونویسی ژن‌های *csrA* در جهش‌یافته‌های *gac* در باکتری *Pseudomonas chlororaphis* 30-84 کاهش چشمگیری داشته است (Wang et al. 2013). این کاهش رونویسی متعاقباً کاهش بیان ژن مذکور احتمالاً می‌تواند سبب تغییر منبع کربنی مورد استفاده در باکتری جهش‌یافته شود.

در محیط‌هایی که سولفات روی (۶۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) اضافه شد (آزمایش اول جدول ۵)، کاهش چشمگیری در میزان جمعیت تیپ وحشی مشاهده شد که احتمالاً حاکی از ایجاد سمیت ناشی از وجود این غلظت ماده در محیط‌های کشت است، به‌طوری‌که، جهش‌یافته‌ها بیشتر از تیپ‌های وحشی بودند و گاهی فقط جهش‌یافته‌ها در این محیط‌ها رشد کردند. این موضوع را شاید بتوان با ارتباط بین سیستم *GacS/GacA* و کنترل منفی آن نسبت به بیان برخی ژن‌ها (Heeb and Haas 2001)، مثل سیگما فاکتور توضیح داد، به‌طوری‌که، غیرفعال‌بودن سیستم تنظیمی *GacS/GacA* باعث بیش‌فعال‌بودن سیگما فاکتور شده است و مقاومت جهش‌یافته‌ها را نسبت به شرایط نامساعد محیطی (سمیت ایجادشده در محیط کشت) بالا می‌برد و اهمیت و لازم‌بودن بهینه‌سازی محیط کشت برای کاهش درصد جهش‌یافته‌ها بیشتر از پیش احساس می‌شود، زیرا درصد جمعیت جهش‌یافته‌ها در محیط‌های کشت با شرایط مناسب پایین آمد.

اهمیت محیط کشت و شرایط رشدی باکتری در میزان کارایی و تولید متابولیت‌ها بسیار حائز اهمیت است. وقتی تغییر در ژن پروتئین *BarA* (همولوگ *GacS*) در یک سویه از *E. coli* ایجاد شود در محیط کشت‌های حاوی گلوکز، *UvrY* (همولوگ *GacA*)

کاهش جمعیت جهش‌یافته‌های *gac* در فرایند تولید انبوه نیز قابل توصیه باشد. به‌طور کلی با توجه به ناکارآمد بودن جهش‌یافته‌های VUPf5-1 در کنترل بیماری‌گری مثل پاخوره غلات، پایین نگه‌داشتن جمعیت آن در کشت نهایی از طریق بهینه‌سازی شرایط رشدی زادمایه میکروبی، می‌تواند به صرفه‌جویی در فرایند تکثیر انبوه باکتری بیوکنترل در مقیاس وسیع کمک کند، استفاده از محیط‌های کشت کربن و ازت ارزان و آلی می‌تواند نیل به این هدف را ممکن سازد.

جمعیت جهش‌یافته‌ها منجر نمی‌شوند. تغییر رفتار تغذیه‌ای در سویه‌ها در این پژوهش به‌طور بسیار جالبی خودنمایی کرد. هرچند این پرگنه‌ها ممکن است که جهش‌یافته سیستم تنظیمی دیگری به نظر برسد، اما به‌دلیل تولید نکردن سیانید هیدروژن نسبت به تیپ اصلی قطعیت بیشتری بر جهش در سیستم تنظیمی *GacS/GacA* می‌رود. با توجه به شباهت رفتاری جهش‌یافته‌های خودبه‌خودی VUPf5-1 به جهش‌یافته‌های سیستم تنظیمی *GacS/GacA* این پژوهش شاید بتواند برای

## REFERENCES

- Ahmed LF, Rezq AA, Atti MRA (2010) Additional effect of defatted wheat germ protein isolate on nutritional value and functional properties of yogurts and biscuits. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 4(8): 3139-3147.
- Appleby JL, Parkinson JS, Bourret RB (1996) Signal transduction via the multistep phosphorelay: not necessarily a road less traveled. *Cell* 86: 845-848.
- Arons S, Abbas A, Adams C, Fenton A, O'GARA F (2000) A regulatory RNA (PrrB RNA) modulates expression of secondary metabolite genes in *Pseudomonas fluorescens* F113. *Journal of Bacteriology* 182: 3913-3919.
- Arshad MU, Anjum FM, Zahoor T (2007) Nutritional assessment of cookies supplemented with defatted wheat germ. *Food chemistry* 102:123-128.
- Ashofteh F, Ahmadzadeh M, Fallahzadeh-Mamaghani V (2009) Effect of mineral components of the medium used to grow biocontrol strain UTPF61 of *Pseudomonas fluorescens* on its antagonistic activity against Sclerotinia wilt of sunflower and its survival during and after the formulation process. *Journal of Plant Pathology* 91: 607-613.
- Behravan J, Fazly Bazzaz BS, Salimi Z (2003) Optimization of dextran production by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 using cheap and local sources of carbohydrate and nitrogen. *Biotechnology Applied Biochemistry* 38: 267-269.
- Beeson WM, Lehrer WP, Woods E (1947) Peas, supplemented with wheat germ or corn germ as a source of protein for growth. *Journal of Nutrition* P. 266.
- Bull CT, Duffy B, Voisard C, De'fago G, Keel C, Haas D (2001) Characterization of spontaneous *gacS* and *gacA* regulatory mutants of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHA0. *Antonie Leeuwenhoek* 79: 327-336.
- Chancey ST, Wood DW, Pierson III (1999) Two-component transcriptional regulation of N-acetyl-homoserine lactone production in *Pseudomonas aureofaciens*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2294-2299.
- Costa E, Teixido N, Usall J, Amares E, Vinas I (2001) Production of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 using commercial products and by-products. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56: 367-371.
- Daharani Aiyer PV (2004) Effect of C:N ratio on alpha amylase production by *Bacillus licheniformis* SPT 27. *African Journal of Biotechnology* 3: 519-522.
- Duffy BK, De'fago G (1999) Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2429-2438.
- Duffy BK, De'fago G (2000) Controlling instability in *gacS-gacA* regulatory genes during inoculant production of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3142-3150.
- Dunford NT, Zhang M (2003) Pressurized solvent extraction of wheat germ oil. *Food Research International* 36: 905-909.
- Duong F, Lazdunski A, Cami B, Murgier M (1992) Sequence of a cluster of genes controlling synthesis and secretion of alkaline protease in *Pseudomonas aeruginosa*: relationships to other secretory pathways. *Gene* 121:47-54.
- Haas D, De'fago G (2005) Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Review of Microbiology* 3: 307-319.

- Haas D, Keel C** (2003) Regulation of antibiotic production in root colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annual Review of Phytopathology* 41: 117-153.
- Heeb S, Haas D** (2001) Regulatory Roles of the GacS/GacA two-component system in plant associated and other gram-negative bacteria. *International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 1351-1363.
- Imrie FKE** (1969) Fermentation media. Sugar and molasses. *Process Biochemistry* p. 34-35.
- Kademi A, Fakhreddine L, Abdelkader NA, Barrati JC** (1999) Effect of culture conditions on growth and esterase production by the moderate thermophile *Bacillus circulans* MAS2. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 23: 188-193.
- Kim DS, Cook RJ, Weller DM** (1997) *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. *Phytopathology* 87: 551-558.
- Kumar p, Yadava RK, Gollen B, Kumar S, Verma RK, Yadav S** (2011) Nutritional contents and medicinal properties of wheat: a review. *Life sciences and medicine research volume: LSMR-22*.
- Lagzian A, Saberi Riseh R, Khodaygan P, Sedaghati E, Dashti H** (2013<sub>a</sub>) Introduced *Pseudomonas fluorescens* VUPf5 as an important biocontrol agent for controlling *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* the causal agent of take-all disease in wheat. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 46(17): 2104-2116.
- Lagzian A, Saberi Riseh R, Khodaygan P, Sedaghati E, Dashti H** (2013<sub>b</sub>) Biocontrol performance evaluation of spontaneous mutants of *Pseudomonas fluorescens* VUPf5 generated during proliferation. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 46(17): 2087-2095.
- Ma CY, Liu WS, Kwok KC, Kwok F** (1997) Isolation and characterization of proteins from soymilk residue (okara). *Food Research International* 29: 799-805.
- Maddula VSRK, Zhang Z, Pierson EA, Pierson LSIII** (2006) Quorum sensing and phenazines are involved in biofilm formation by *Pseudomonas chlororaphis* strain 30-84. *Microbial Ecology* 52: 289-301.
- Mondragon V, Franco B, Jonas K, Suzuki K, Romeo T, Melefors O, Georgellis D** (2006) pH-dependent activation of the BarA-UvrY two-component system in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 188:8303-8306.
- Oliver JD** (2000) The viable but nonculturable state and cellular resuscitation. In: Bell CR, Brylinsky M, Johnson-Green P, editors. *Microbial biosystems: new frontiers*. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Nova Scotia, Canada; p: 723-730.
- Poritsanos N, Selin C, Fernando WGD, Nakkeeran S, De kievit TR** (2006) A GacS deficiency does not affect *Pseudomonas chlororaphis* PA23 fitness when growing on canola, in aged batch culture or as a biofilm. *Canadian Journal of Microbiology* 52: 1177-1188.
- Raaijmakers JM, Vlami M, de Souza JT** (2002) Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek. Journal of Microbiology* 81: 537-547.
- Romeo T, Gong M, Liu MY, Brun-Zinkernagel AM** (1993) Identification and molecular characterization of *csrA*, a pleiotropic gene from *Escherichia coli* that affects glycogen biosynthesis, gluconeogenesis, cell size, and surface properties. *Journal of Bacteriology*, 175(15): 4744-4755.
- Romeo T** (1998) Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Molecular Microbiology* 29(6): 1321-1330.
- Roshandel S, Taheri E, Babai GH, Morshedi E** (2006) Health management of potato. Hadian. Iran. (In Persian).
- Safari Asl F, Rohani H, Falahati Rastegar M, Jahanbakhsh V** (2010) Effect of carbon and nitrogen sources on the growth and antifungal activity of *Bacillus subtilis* against *Pythium aphanidermatum*. *Journal of Plant Protection* 24: 53-61. (In Persian).
- Su J-J, Zhou Q, Zhang H-Y, Li Y-Q, Huang X-Q, Xu Y-Q** (2010) Medium optimization for phenazine-1-carboxylic acid production by a *gacA qscR* double mutant of *Pseudomonas* sp. M18 using response surface methodology. *Bioresource Technology* 101: 4089-4095.
- Thomashow L, Weller D** (1996) Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites. *International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions* 1: 187-235.
- Tomenius H, Pernesting AK, Mendenz-Catala CF, Georgellis D, Nomrmark S, Melefors O** (2005) Genetic and functional characterization of the *Escherichia coli* BarA-UvrY two-component system: point mutations in the HAMP linker of the BarA sensor give a dominant-negative phenotype. *Journal of Bacteriology* 187: 7317-7324.
- Vazquez M, Santos V, Parajo JC** (1997) Effect of the carbon source on the carotenoid profiles of *Phaffia rhodozyma* strains. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 19: 263-268.
- Wang D, Lee S-H, Seeve C, Myoung YuJ, Pierson LSIII, Pierson EA** (2013) Roles of the Gac-Rsm pathway in the regulation of phenazine biosynthesis in *Pseudomonas chlororaphis* 30-84. *MicrobiologyOpen* 2(3): 505-524.
- Wolfe AJ** (2005) The acetate switch. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 69:12-50.