نشریه کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دوره۳، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۳ (۱۵۰-۱۳۹)

مقایسهٔ اثر محیط‌های کشت آلی روی میزان جمعیت تیپ وحشی و تیپ جهش‌یافتهٔ باکتری بیوکنترل *Pseudomonas fluorescens* VUPf5

۱. آرزو لگزیان*؛ ۲. روح‌اله صابری ریسه؛ ۳. پژمان خدایگان
۱، ۲ و ۳. دانشجویان سابق کارشناسی ارشد، استادیاران بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر(عج) رفسنجان

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

چکیده

در این تحقیق رشد دو سویهٔ باکتری *Pseudomonas fluorescens* VUPf5 و *P. fluorescens* VUPf5-1 (باکتری جهش‌یافتهٔ مشابه جهش‌یافتهٔ 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 سویهٔ بیوکنترل *Pseudomonas fluorescens* VUPf5 متوقف کرد. با استفاده از محیط‌های کشت آلی همراه یا بدون سولفات روی سعی شد که جمعیت جهش‌یافته‌ها تا حد امکان کاهش یابد. با هدف افزایش رشد جمعیت VUPf5 و کاهش رشد جمعیت VUPf5-1، شش منبع کربنی (ملاس چغندرقند، نشاسته، سیب‌زمینی، خرما، شکر، سیب)، سه منبع ازتی (سویا، اوره، سولفات آمونیوم) و یک منبع کربنی-ازتی (جوانهٔ گندم) بررسی شدند. محیط کشت 13B (ملاس چغندرقند، جوانهٔ گندم، سویا، شکر، سیب و سولفات منگنز)، محیط کشت بهتری از لحاظ جمعیت باکتری VUPf5 ($۵/۵۶\times۱۰^{۱۰}$ 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 1D (ملاس چغندرقند، جوانهٔ گندم، سویا، شکر، سیب و سولفات روی) سبب کاهش چشمگیری در تکثیر پرگنه‌های جهش‌یافته شد. نتایج به‌دست‌آمده می‌تواند مبنای قابل اعتمادی برای تکثیر بهینهٔ عامل بیوکنترل در فرایندهای فرمانتاسیون را فراهم کند.

کلیدواژگان: بهینه‌سازی، تکثیر، جهش‌یافته، سودوموناس.

مقدمه

منابع کربن برای تمامی فعالیت‌هایی که به تولید مثل، تشکیل فرآورده‌ها و بقای سلول منجر می‌شوند، مورد نیاز است. نیتروژن، ۱۴ـ۸ 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 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 ناخواستهٔ 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

* تلفن: ۰۹۱۵۷۳۳۳۴۱۵
E-mail: lagzian.az@gmail.com

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 ثانویهٔ ضد قارچی در سودوموناس‌های مفید نیز دخالت مستقیم دارد، سیستم دوجزئی پروتئینی GacS/GacA است. این سیستم شامل سنسورکیناز GacS و تنظیم‌کنندهٔ 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 سویهٔ جهش‌یافتهٔ *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*، *rpoS*، *phzI*، *phzR*، *pip* و *rsmE* که در ویژگی‌های بیوکنترلی این باکتری علیه بیمارگر خاکزی پاخورهٔ غلات مؤثر است، بسیار کاهش یافته است (Wang *et al.* 2013). باکتری آنتاگونیست *P. fluorescens* CHA0 قابلیت خوبی در تولید سالیسیلیک اسید، آنتی‌بیوتیک‌های پیرول نیترین، ۲ و ۴ ـ دی استیل فلوروگلوسینول، آنزیم TSO (Tryptophan side chain oxidase)، HCN (Hydrogen cyanid) و پروتئاز خارج سلولی داشت و بیمارگر خاکزی مرگ گیاهچهٔ خیار را به‌خوبی کنترل کرد. در مقایسهٔ جهش‌یافته‌های خودبه‌خودی سیستم GacS/GacA این جدایه، بیمارگر را کنترل نکرد (Haas and Keel 2003).

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

مواد و روش‌ها

تهیه و نگهداری سویه‌های باکتری

باکتری تیپ وحشی *Pseudomonas fluorescens* VUPf5 که از ریزوسفر درخت هلو، از منطقهٔ شمال ایران، جداسازی شده است و جدایه‌های جهش‌یافتهٔ (VUPf5-1) این سویه که از آزمایش‌های پیشین تهیه شده بود، برای انجام آزمون‌ها انتخاب شدند. سویهٔ تیپ وحشی (VUPf5) در بین ۹۰۰ جدایه بیشترین میزان بازدارندگی از قارچ *Gaeumannomyces graminis* var. tritici، عامل بیماری پاخورهٔ 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 جهش‌یافتهٔ ایجادشده برخلاف تیپ وحشی، خصوصیات بیوکنترلی بسیار ضعیفی داشتند و توانایی کنترل بیمارگر عامل پاخورهٔ غلات را نداشتند. (جدول ۱).

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

Nutrient Broth Yeast (NBY) (شامل ۰/۸ گرم، عصارهٔ مخمر ۰/۵ گرم در ۱۰۰میلی‌لیتر آب مقطر سترون) اضافه شد. سوسپانسیون حاصل درون لوله‌های ۲ میلی‌لیتری دربدار (حاوی ۴۰ میلی‌لیتر گلیسرول سترون) در دمای ۸۰- درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند (Kim *et al*. 1997).

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

خصوصیات	VUPf5[1]	VUPf5-1[2]
مورفولوژی پرگنه‌ها روی محیط KB	گرد، برجسته، نارنجی و نیم شفاف	صاف، مات، سفید، قطر پرگنه‌ها بزرگ‌تر
پروتئاز خارج سلولی	+	–
سیانید هیدروژن	+	–
آنتی‌بیوتیک فنازین	+	–
هالهٔ بازدارندگی (mm)[3]	۱۷	۰

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

انتخاب محیط کشت مناسب برای تکثیر سویهٔ *P. fluorescens* VUPf5

آماده‌سازی محیط کشت

سی و یک محیط کشت با استفاده از منابع مختلف کربن و ازت تهیه شد (جدول ۲). به‌منظور تهیهٔ محیط‌های کشت عصاره‌های سویا، سیب‌زمینی، سیب، جوانهٔ گندم و خرما، به‌ترتیب ۱۰۰، ۲۵۰، ۱۰۰، ۴۰، ۱۰۰ گرم از هرکدام به‌مدت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه جوشانده و پس از عبور از پارچهٔ ململ، حجم عصارهٔ آن‌ها با آب مقطر به ۱ لیتر رسانده شد (Safari Asl *et al*. 2010).

جدول ۲. منابع کربن و ازت مورد استفاده در تهیهٔ بسترهای کشت برای تکثیر سویهٔ VUPf5

کد	آزمایش اول (A)	
	منابع (میزان مصرف در لیتر)	
	کربن	ازت
1A	ملاس چغندرقند ۱۰ گرم، نشاسته ۵ گرم، عصارهٔ پودر سیب ۱۵ میلی‌لیتر	سولفات آمونیوم ۲ گرم
2A	ملاس چغندرقند ۱۰ گرم، نشاسته ۵ گرم	سولفات آمونیوم ۲ گرم
3A	ملاس چغندرقند ۱۰ گرم	سولفات آمونیوم ۲ گرم، عصارهٔ سویا ۱۵ میلی‌لیتر
4A	ملاس چغندرقند ۱۰ گرم	اوره ۲ گرم، عصارهٔ سویا ۱۵ میلی‌لیتر
5A	ملاس چغندرقند ۱۰ گرم، عصارهٔ سیب‌زمینی ۷۵ میلی‌لیتر	عصارهٔ سویا ۱۵ میلی‌لیتر
6A	ملاس چغندرقند ۱۰ گرم	اوره ۲ گرم
7A	ملاس چغندرقند ۱۰ گرم	سولفات آمونیوم ۲ گرم
8A	ملاس چغندرقند ۱۰ گرم، عصارهٔ پودر سیب ۱۵ میلی‌لیتر	–
9A	ملاس چغندرقند ۱۰ گرم	عصارهٔ سویا ۱۵ میلی‌لیتر، سولفات منگنز ۱۰ میلی‌گرم
10A	عصارهٔ سیب‌زمینی ۷۵ میلی‌لیتر	عصارهٔ سویا ۱۵ میلی‌لیتر، سولفات منگنز ۱۰ میلی‌گرم
11A	عصارهٔ سیب‌زمینی ۷۵ میلی‌لیتر	اوره ۲ گرم، عصارهٔ سویا ۱۵ میلی‌لیتر
12A	عصارهٔ سیب‌زمینی ۷۵ میلی‌لیتر، نشاسته ۵ گرم	سولفات آمونیوم ۲ گرم
13A	عصارهٔ سیب‌زمینی ۷۵ میلی‌لیتر، نشاسته ۵ گرم، عصارهٔ سیب ۱۵ میلی‌لیتر	سولفات آمونیوم ۲ گرم
14A	عصارهٔ سیب‌زمینی ۷۵ میلی‌لیتر، عصارهٔ پودر سیب ۱۵ میلی‌لیتر	عصارهٔ سویا ۱۵ میلی‌لیتر، سولفات منگنز ۱۰ میلی‌گرم
15A	عصارهٔ مخمر ۵ گرم به همراه محیط آمادهٔ آگار مغذی مایع ۸ گرم (NBY)	

ادامه جدول ۲

کد	آزمایش دوم (B)	
	منابع (میزان مصرف در لیتر)	
	کربن	ازت
1B	عصارهٔ سیب‌زمینی ۷۵ میلی‌لیتر، عصارهٔ سیب ۱۵ میلی‌لیتر، شکر ۳۰ گرم	عصارهٔ سویا ۱۵ میلی‌لیتر، سولفات منگنز ۱۰ میلی‌گرم
2B	عصارهٔ خرما ۱۵ میلی‌لیتر، عصارهٔ سیب ۱۵ میلی‌لیتر، شکر ۳۰ گرم	عصارهٔ سویا ۱۵ میلی‌لیتر، سولفات منگنز ۱۰ میلی‌گرم
3B	عصارهٔ جوانهٔ گندم ۲۵۰ میلی‌لیتر، عصارهٔ سیب ۱۵ میلی‌لیتر، شکر ۳۰ گرم	عصارهٔ سویا ۱۵ میلی‌لیتر، سولفات منگنز ۱۰ میلی‌گرم
4B	عصارهٔ جوانهٔ گندم ۲۵۰ میلی‌لیتر، عصارهٔ سیب ۱۵ میلی‌لیتر، شکر ۳۰ گرم	عصارهٔ سویا ۱۵ میلی‌لیتر، عصارهٔ خاک ۷۵ میلی‌لیتر
5B	عصارهٔ سیب‌زمینی ۷۵ میلی‌لیتر، عصارهٔ سیب ۱۵ میلی‌لیتر، شکر ۳۰ گرم	عصارهٔ سویا ۱۵ میلی‌لیتر، عصارهٔ خاک ۷۵ میلی‌لیتر
6B	ملاس چغندرقند ۱۰ گرم، عصارهٔ سیب‌زمینی ۷۵ میلی‌لیتر، شکر ۳۰ گرم	عصارهٔ سویا ۱۵ میلی‌لیتر
7B	ملاس چغندرقند ۱۰ گرم، عصارهٔ سیب‌زمینی ۷۵ میلی‌لیتر، عصارهٔ سیب ۱۵ میلی‌لیتر، شکر ۳۰ گرم	عصارهٔ سویا ۱۵ میلی‌لیتر، سولفات منگنز ۱۰ میلی‌گرم
8B	ملاس چغندرقند ۱۰ گرم، عصارهٔ سیب‌زمینی ۷۵ میلی‌لیتر، عصارهٔ خرما ۱۵ میلی‌لیتر، شکر ۳۰ گرم	عصارهٔ سویا ۱۵ میلی‌لیتر، سولفات منگنز ۱۰ میلی‌گرم
9B	ملاس چغندرقند ۱۰ گرم، عصارهٔ سیب‌زمینی ۷۵ میلی‌لیتر، عصارهٔ سیب ۱۵ میلی‌لیتر، شکر ۳۰ گرم	عصارهٔ سویا ۱۵ میلی‌لیتر، عصارهٔ خاک ۷۵ میلی‌لیتر
10B	ملاس چغندرقند ۱۰ گرم، عصارهٔ سیب‌زمینی ۷۵ میلی‌لیتر، عصارهٔ خرما ۱۵ میلی‌لیتر، عصارهٔ جوانهٔ گندم ۲۵۰ میلی‌لیتر، عصارهٔ سیب ۱۵ میلی‌لیتر، شکر ۳۰ گرم	عصارهٔ سویا ۱۵ میلی‌لیتر، عصارهٔ خاک ۷۵ میلی‌لیتر
11B	ملاس چغندرقند ۱۰ گرم، عصارهٔ خرما ۱۵ میلی‌لیتر، عصارهٔ پودر سیب ۱۵ میلی‌لیتر، شکر ۳۰ گرم	عصارهٔ سویا ۱۵ میلی‌لیتر، سولفات منگنز ۱۰ میلی‌گرم
12B	ملاس چغندرقند ۱۰ گرم، عصارهٔ خرما ۱۵ میلی‌لیتر، عصارهٔ پودر سیب ۱۵ میلی‌لیتر، شکر ۳۰ گرم	عصارهٔ سویا ۱۵ میلی‌لیتر، عصارهٔ خاک ۷۵ میلی‌لیتر
13B	ملاس چغندرقند ۱۰ گرم، عصارهٔ جوانهٔ گندم ۲۵۰ میلی‌لیتر، عصارهٔ سیب ۱۵ میلی‌لیتر، شکر ۳۰ گرم	عصارهٔ سویا ۱۵ میلی‌لیتر، سولفات منگنز ۱۰ میلی‌گرم
14B	ملاس چغندرقند ۱۰ گرم، عصارهٔ جوانهٔ گندم ۲۵۰ میلی‌لیتر، عصارهٔ سیب ۱۵ میلی‌لیتر، شکر ۳۰ گرم	عصارهٔ سویا ۱۵ میلی‌لیتر، عصارهٔ خاک ۷۵ میلی‌لیتر
15B	ملاس چغندرقند ۱۰ گرم، عصارهٔ سیب‌زمینی ۷۵ میلی‌لیتر، عصارهٔ سیب ۱۵ میلی‌لیتر، شکر ۳۰ گرم	سولفات آمونیوم ۲ گرم، عصارهٔ خاک ۷۵ میلی‌لیتر
16b	ملاس چغندرقند ۱۰ گرم، عصارهٔ جوانهٔ گندم ۲۵۰ میلی‌لیتر، عصارهٔ سیب ۱۵ میلی‌لیتر، شکر ۳۰ گرم	سولفات آمونیوم ۲ گرم، عصارهٔ خاک ۷۵ میلی‌لیتر
17B	عصارهٔ مخمر ۵ گرم به همراه محیط آمادهٔ آگار مغذی مایع ۸ گرم (NBY)	

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 به‌مدت ۲۴ ساعت روی تکان‌دهنده با ۱۲۰ دور در دقیقه و دمای ۲۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند. تعیین جمعیت باکتری پس از ۲۴ ساعت از کشت باکتری انجام شد، کدورت سوسپانسیون به‌کمک 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 دانسیتهٔ نوری حاصل از هر رقت تعیین و منحنی رشد ترسیم شد. برای محاسبهٔ جمعیت‌ها در تمامی آزمایش‌ها از منحنی مذکور استفاده شد.

بررسی درصد رشد جهش‌یافته‌های پدید آمده در محیط‌های کشت آلی

باکتری تیپ وحشی *P. fluorescens* VUPf5 و سویهٔ تغییریافتهٔ (VUPf5-1) آن، در فلاسک‌های ارلن‌مایر محتوی محیط کشت NBY در دمای ۲۷ درجهٔ سلسیوس و با دور ۱۵۰ دور در دقیقه به‌مدت ۲۴ ساعت رشد داده شدند. محیط کشت‌های منتخب در فلاسک‌های ارلن‌مایر ۱۰۰ میلی‌لیتری به مقدار۴۰ 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 درجهٔ 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 KB (King B) منتقل و به‌صورت انبوه به کمک میلهٔ 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). به‌منظور محاسبهٔ درصد رشد پرگنه‌های تغییریافته، 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$۰/۰۵) و مقایسهٔ میانگین با روش LSD با استفاده از نرم‌افزار SAS.9.0 انجام شد.

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

آزمایش اول (C)[1]	
کد محیط	بسترهای کشت
1C	ملاس چغندرقند، عصارهٔ جوانهٔ گندم، عصارهٔ پودر سیب، شکر، عصارهٔ سویا، سولفات منگنز
2C	ملاس چغندرقند، عصارهٔ جوانهٔ گندم، عصارهٔ پودر سیب، شکر، عصارهٔ سویا، سولفات روی
3C	ملاس چغندرقند، عصارهٔ جوانهٔ گندم، عصارهٔ سیب، شکر، سولفات آمونیوم، سولفات منگنز
4C	ملاس چغندرقند، عصارهٔ جوانهٔ گندم، عصارهٔ سیب، شکر، سولفات آمونیوم، سولفات روی
5C	عصارهٔ سیب‌زمینی، عصارهٔ سیب، شکر، عصارهٔ سویا، سولفات منگنز
6C	عصارهٔ سیب‌زمینی، عصارهٔ سیب، شکر، عصارهٔ سویا، سولفات روی
7C	عصارهٔ مخمر به همراه محیط آمادهٔ آگار مغذی مایع (NBY)
آزمایش دوم (D)[2]	
کد محیط	بسترهای کشت
1D	ملاس چغندرقند، عصارهٔ جوانهٔ گندم، عصارهٔ پودر سیب، شکر، عصارهٔ سویا، سولفات روی
2D	ملاس چغندرقند، عصارهٔ جوانهٔ گندم، عصارهٔ سیب، شکر، سولفات آمونیوم، سولفات منگنز
3D	عصارهٔ سیب‌زمینی، عصارهٔ سیب، شکر، عصارهٔ سویا، سولفات منگنز
4D	عصارهٔ مخمر به همراه محیط آمادهٔ 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 (۳×۱۰^{۹} 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 (۳×۱۰^{۹} سلول) از سویه‌های تیپ وحشی (VUPf5) و جهش‌یافته (VUPf5-1) اضافه شد.

نتایج و بحث

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

در این آزمایش تیمارها براساس نتایج تجزیهٔ واریانس دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد بوده‌اند. مطابق جدول ۴، تیمارهای 14A و 15A بهترین محیط‌های کشت از لحاظ میزان جمعیت VUPf5 بودند. تیمار 14A شامل عصارهٔ سیب‌زمینی، عصارهٔ پودر سیب، عصارهٔ سویا، سولفات منگنز (دارای $۳/۱۸\times۱۰^{۱۰}$ سلول باکتری) اختلاف بدون معنی با تیمار 15A داشت که یک محیط

کشت آماده و گران‌قیمت (نسبتاً غنی) شامل عصارهٔ مخمر به همراه محیط آمادهٔ آگار مغذی (NBY) است. محیط کشت 14A نشان داد که عصارهٔ سویا و سیب‌زمینی آن نسبت به سایر محیط کشت‌های این آزمایش، اختلاف جمعیت معنی‌داری را سبب شده است. به‌طوری که، طبق گزارش‌های صفری اصل و همکاران، در محیط کشت حاوی عصارهٔ سویا و سیب‌زمینی باکتری *Bacillus subtilis* رشد خوبی داشت (Safari Asl *et al*. 2010). عصارهٔ سویا نه تنها سبب افزایش بیومس باکتریایی می‌شود، بلکه براساس گزارش‌های سو و همکاران، عصارهٔ سویا، گلوکز و عصارهٔ خیساندهٔ ذرت در محیط‌های کشت سبب افزایش تولید فنازین در سویهٔ *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 مقایسهٔ محیط‌های کشت 14A و 10A استنباط می‌شود که عصارهٔ پودر سیب، سبب افزایش تکثیر چشمگیر شده است و اختلاف محیط‌ها از لحاظ جمعیت باکتری معنی‌دار بود. تیمارهای 4A (شامل ملاس چغندرقند، اوره و عصارهٔ سویا)، 6A (شامل ملاس چغندرقند و اوره) و 11A (شامل عصارهٔ سیب‌زمینی، اوره و عصارهٔ سویا) در یک گروه قرار گرفتند و کمترین میزان جمعیت سویهٔ VUPf5 را شامل شدند.

از مقایسهٔ 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، به‌دلیل داشتن غلظت بالای ساکارز می‌تواند به تنهایی زیست‌تودهٔ 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 عصارهٔ 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 مادهٔ 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).

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

آزمایش اول (A)		
کد	بستر کشت	جمعیت باکتری[1] (تعداد سلول باکتری در میلی‌لیتر)
1A	ملاس چغندرقند، نشاسته، عصارهٔ پودر سیب، سولفات آمونیوم	$۱/۸\times۱۰^{۱۰}$ cd
2A	ملاس چغندرقند، نشاسته، سولفات آمونیوم	$۱/۶۸\times۱۰^{۱۰}$ cd
3A	ملاس چغندرقند، سولفات آمونیوم، عصارهٔ سویا	$۲/۱\times۱۰^{۱۰}$ c
4A	ملاس چغندرقند، اوره، عصارهٔ سویا	$۳/۳۳\times۱۰^{۸}$ g
5A	ملاس چغندرقند، عصارهٔ سیب‌زمینی، عصارهٔ سویا	$۱/۹\times۱۰^{۱۰}$ c
6A	ملاس چغندرقند، اوره	۲×۱۰^{۸} g
7A	ملاس چغندرقند، سولفات آمونیوم	۳×۱۰^{۹} f
8A	ملاس چغندرقند، عصارهٔ پودر سیب	$۵/۳۳\times۱۰^{۹}$ f
9A	ملاس چغندرقند، عصارهٔ سویا، سولفات منگنز	$۱/۴۵\times۱۰^{۱۰}$ de
10A	عصارهٔ سیب‌زمینی، عصارهٔ سویا، سولفات منگنز	$۱/۹۲\times۱۰^{۱۰}$ c
11A	عصارهٔ سیب‌زمینی، اوره، عصارهٔ سویا	$۸/۶۶\times۱۰^{۸}$ g
12A	عصارهٔ سیب‌زمینی، نشاسته، سولفات آمونیوم	$۱/۳۱\times۱۰^{۱۰}$ e
13A	عصارهٔ سیب‌زمینی، نشاسته، عصارهٔ سیب، سولفات آمونیوم	$۲/۲۱\times۱۰^{۱۰}$ b
14A	عصارهٔ سیب‌زمینی، عصارهٔ پودر سیب، عصارهٔ سویا، سولفات منگنز	$۳/۱۸\times۱۰^{۱۰}$ a
15A	عصارهٔ مخمر به همراه محیط آمادهٔ آگار مغذی مایع (NBY)	$۳/۸۱\times۱۰^{۱۰}$ a

ادامه جدول ۴

آزمایش دوم (B)		
کد	بستر کشت	جمعیت باکتری[۱] (تعداد سلول باکتری در میلی‌لیتر)
1B	عصارهٔ سیب‌زمینی، عصارهٔ سیب، شکر، عصارهٔ سویا، سولفات منگنز	$۳/۲۲\times۱۰^{۱۰}$ cd
2B	عصارهٔ خرما، عصارهٔ سیب، شکر، عصارهٔ سویا، سولفات منگنز	$۲/۵۶\times۱۰^{۹}$ f
3B	عصارهٔ جوانهٔ گندم، عصارهٔ سیب، شکر، عصارهٔ سویا، سولفات منگنز	$۴/۷۶\times۱۰^{۱۰}$ abc
4B	عصارهٔ جوانهٔ گندم، عصارهٔ سیب، شکر، عصارهٔ سویا، عصارهٔ خاک	$۳/۷۵\times۱۰^{۱۰}$ cd
5B	عصارهٔ سیب‌زمینی، عصارهٔ سیب، شکر، عصارهٔ سویا، عصارهٔ خاک	$۲/۷۲\times۱۰^{۱۰}$ d
6B	ملاس چغندرقند، عصارهٔ سیب‌زمینی، شکر، عصارهٔ سویا	$۲/۷\times۱۰^{۱۰}$ d
7B	ملاس چغندرقند، عصارهٔ سیب‌زمینی، عصارهٔ سیب، شکر، عصارهٔ سویا، سولفات منگنز	$۲/۴۸\times۱۰^{۱۰}$ de
8B	ملاس چغندرقند، عصارهٔ سیب‌زمینی، عصارهٔ خرما، شکر، عصارهٔ سویا، سولفات منگنز	$۲/۳۶\times۱۰^{۱۰}$ de
9B	ملاس چغندرقند، عصارهٔ سیب‌زمینی، عصارهٔ سیب، شکر، عصارهٔ سویا، عصارهٔ خاک	$۲/۷۱\times۱۰^{۱۰}$ d
10B	ملاس چغندرقند، عصارهٔ سیب‌زمینی، عصارهٔ خرما، عصارهٔ جوانهٔ گندم، عصارهٔ سیب، شکر، عصارهٔ سویا، عصارهٔ خاک	$۵/۹۶\times۱۰^{۱۰}$ a
11B	ملاس چغندرقند، عصارهٔ خرما، عصارهٔ پودر سیب، شکر، عصارهٔ سویا، سولفات منگنز	$۳/۵\times۱۰^{۹}$ f
12B	ملاس چغندرقند، عصارهٔ خرما، عصارهٔ پودر سیب، شکر، عصارهٔ سویا، عصارهٔ خاک	$۵/۹۳\times۱۰^{۹}$ f
13B	ملاس چغندرقند، عصارهٔ جوانهٔ گندم، عصارهٔ سیب، شکر، عصارهٔ سویا، سولفات منگنز	$۵/۵۶\times۱۰^{۱۰}$ ab
14B	ملاس چغندرقند، عصارهٔ جوانهٔ گندم، عصارهٔ سیب، شکر، عصارهٔ سویا، عصارهٔ خاک	$۳/۹۸\times۱۰^{۱۰}$ bcd
15B	ملاس چغندرقند، عصارهٔ سیب‌زمینی، عصارهٔ سیب، شکر، سولفات آمونیوم، عصارهٔ خاک	$۹/۵۸\times۱۰^{۹}$ ef
16B	ملاس چغندرقند، عصارهٔ جوانهٔ گندم، عصارهٔ سیب، شکر، سولفات آمونیوم، عصارهٔ خاک	$۳/۸۴\times۱۰^{۱۰}$ de
17B	عصارهٔ مخمر به همراه محیط آمادهٔ آگار مغذی مایع (NBY)	$۲/۵۹\times۱۰^{۱۰}$ 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.

در آزمایش دوم (جدول ۲)، تیمارها براساس نتایج تجزیهٔ واریانس دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد بودند. تیمارهای 10B (شامل ملاس چغندرقند، عصارهٔ سیب‌زمینی، عصارهٔ خرما، عصارهٔ جوانهٔ گندم، عصارهٔ سیب، شکر، عصارهٔ سویا و عصارهٔ خاک) و 13B (شامل ملاس چغندرقند، عصارهٔ جوانهٔ گندم، عصارهٔ سیب، شکر، عصارهٔ 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 پیچیده‌بودن محیط 10B استفاده از محیط کشت 13B در مراحل بعدی آزمایش‌ها منطقی‌تر به نظر می‌رسد. تیمارهای 2B (شامل عصارهٔ خرما، عصارهٔ سیب، شکر، عصارهٔ سویا و سولفات منگنز)، 11B (شامل ملاس چغندرقند، عصارهٔ خرما، عصارهٔ پودر سیب، شکر، عصارهٔ سویا و سولفات منگنز)، 12B (شامل ملاس چغندرقند، عصارهٔ خرما، عصارهٔ پودر سیب، شکر، عصارهٔ سویا و عصارهٔ خاک) و 15B (شامل ملاس چغندرقند، عصارهٔ سیب‌زمینی، عصارهٔ سیب، شکر، سولفات آمونیوم و عصارهٔ خاک) در یک گروه قرار گرفتند و کمترین میزان جمعیت باکتری را داشتند.

مقایسهٔ محیط‌های کشت 9B و 15B نشان داد که عصارهٔ سویا به‌عنوان یک منبع ازتی بهتر در برابر سولفات آمونیوم، عمل کرد و اختلاف این محیط‌ها معنی‌دار بود (جدول ۴). از آنجا که عصارهٔ سویا حاوی ۲۷ درصد پروتئین و ۵۳ درصد کربوهیدرات است (Ma *et al*. 1997, Daharani Aiyer 2004) و تقریباً تمام اسیدهای‌آمینهٔ 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 عصارهٔ خرما در تیمار 2B نسبت به تیمار 1B نشان داد که در

افزایش جمعیت خیلی مؤثر نبوده است و نیز وجود عصارهٔ 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 عصارهٔ سیب‌زمینی باعث افزایش جمعیت در محیط 10B نسبت به محیط 13B شده است.

کوستا و همکاران اهمیت ملاس چغندرقند را به‌عنوان یک محیط پایه در افزایش میزان رشد سلولی جدایهٔ CPA-2 *Pantoea agglomerans* 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 بالارفتن هزینهٔ 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.* 1997, Behravan *et al.* 2003). هرچند در آزمایش اول جدول ۴ مشخص شد که ملاس چغندرقند به تنهایی و بدون منبع کربن دیگری نتوانست سبب افزایش چشمگیری در میزان رشد شود، در ترکیب با جوانهٔ گندم این دو بهتر توانستند عمل کنند.

از مقایسهٔ محیط‌های کشت 7B، 8B، 9B و 10B این‌طور به نظر رسید که جوانهٔ 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 به‌ترتیب تأثیر خوبی در افزایش جمعیت نشان دادند و مشخص شد که جوانهٔ گندم سبب افزایش بیشتری در جمعیت، نسبت به محیط حاوی سیب‌زمینی می‌شود و اختلاف آن‌ها معنی‌دار است. جوانهٔ 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 همی‌سلولز 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، نشاستهٔ موجود در دانه شکسته و به قندهای سادهٔ ساکاروز و به‌خصوص مالتوز تبدیل می‌شود. پروتئین‌ها نیز به اسیدهای‌آمینه تغییر شکل می‌دهند که جوانهٔ گندم غنی از ۱۷ اسیدآمینه و به‌ویژه اسیدهای‌آمینه ضروری لیزین، متیونین و ترئونین هستند (Beeson *et al.* 1947, Arshad *et al.* 2007, Kumar *et al.* 2011). حال آنکه سیب‌زمینی بیشترین مادهٔ موجود در آن کربوهیدرات نشاسته (۱۶/۹ درصد از کل ۲۰ درصد مادهٔ خشک موجود در آن) است (Roshandel *et al.* 2006). بنابراین، جوانهٔ 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 جایگزین‌کردن سولفات منگنز با عصارهٔ 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 تجزیهٔ واریانس دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد بودند. مطابق جدول ۵، در محیط 1C (شامل ملاس چغندرقند، عصارهٔ جوانهٔ گندم، عصارهٔ پودر سیب، شکر، عصارهٔ 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 مشاهد 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

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 به‌ترتیب 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 تیمارهای آزمایش اول شامل شد و عکس آن در مورد سایر محیط‌ها صادق بود. هرچند این پرگنه‌ها ممکن است به نظر برسد که می‌تواند جهش‌یافتهٔ سیستم تنظیمی دیگری نیز باشد، با توجه به تولیدنکردن 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 تولیدنکردن بسیاری از متابولیت‌های ثانویه و آنزیم‌ها، ناکارایی آن‌ها در کنترل بیمارگرهای خاکزی مانند بیماری پاخورهٔ غلات با عامل *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* است (Lagzian *et al*. 2013b).

جدول ۵. بررسی درصد رشد جهش‌یافته‌ها در محیط‌های کشت

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

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.

عدم کارایی در تولید برخی متابولیت‌های ثانویه و آنزیم‌ها مثل فنازین، HCN، اگزوپروتئاز، لیپاز و ژلاتیناز در جهش‌یافته‌های *gac* باکتری *Pseudomonas chlororaphis* 30-84 (Maddula *et al*. 2006) دیده شده است. سنتزنشدن این آنزیم‌ها می‌تواند موجب تغییر در مصرف منابع ازتی و کربنی در این سویه‌ها شود. CsrA

(carbon storage regulator) ابتدا، به‌عنوان یک تنظیم‌کنندهٔ 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. خانوادهٔ 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 تنظیم‌کنندهٔ 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 و 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، به‌طوری که، 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، به‌طوری که، 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) 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 تغذیهٔ 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 تجزیهٔ 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 1D (شامل ملاس چغندرقند، عصارهٔ جوانهٔ گندم، عصارهٔ پودر سیب، شکر، عصارهٔ سویا و سولفات روی) است که در آن هیچ‌گونه پرگنهٔ 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 به‌طوری که، 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 (۰/۱x) 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

جمعیت جهش‌یافته‌ها منجر نمی‌شوند. تغییر رفتار تغذیه‌ای در سویه‌ها در این پژوهش به‌طور بسیار جالبی خودنمایی کرد. هرچند این پرگنه‌ها ممکن است که جهش‌یافتهٔ سیستم تنظیمی دیگری به نظر برسد، اما به‌دلیل تولیدنکردن 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 کاهش جمعیت جهش‌یافته‌های *gac* در فرایند تولید انبوه نیز قابل توصیه باشد. به‌طور کلی با توجه به ناکارآمدبودن جهش‌یافته‌های VUPf5-1 در کنترل بیمارگری مثل پاخورهٔ غلات، پایین نگه‌داشتن جمعیت آن در کشت نهایی از طریق بهینه‌سازی شرایط رشدی زادمایهٔ 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.

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 deffated 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 IIILS (1999) Two–component transcriptional regulation of N–acyl–homoserine lactone production in *Pseudomonas aureofaciens*. Applied and Environmental Microbiology 65: 2294-2299.

Costa E, Teixdo N, Usall J, Atares 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 eegulatory 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_a) 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_b) 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 Protectection 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 rhadozyma 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.