تولید آنزیم‌های لیتیک پروتئاز، لیپاز و آمیلاز توسط سودوموناس‌های فلورسنت

[۱]مهتاب امیدواری، [۲]مسعود احمدزاده، [۳]عباس شریفی تهرانی، [۴]کاظم خاوازی، [۵]مجتبی مهربانیان و [۶]پیمان عباس‌زاده دهجی

[۱]کارشناس ارشد گیاه‌پزشکی، [۲]استادیار گروه گیاه‌پزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، [۳]استاد گروه گیاه‌پزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، [۴]استادیار پژوهش موسسه تحقیقات خاک و آب، [۵]دانشجوی کارشناسی ارشد خاکشناسی دانشگاه تهران و [۶]دانشجوی دکتری خاکشناسی دانشگاه تهران

مقدمه

باکتری‌های محرک رشد گیاه (**Plant Growth Promoting Rhizobacteria; PGPR**) با استفاده از مکانیسم‌های مختلف آنتاگونیستی اثرات مضر بیمارگرهای گیاهی را خنثی یا تعدیل نموده و بدین طریق موجب افزایش رشد گیاه می‌شوند [۴]. فعالیت بیوکنترل در ***Pseudomonas* spp.** از طریق تولید برخی از آنتی بیوتیک¬ها، آنزیم¬های لیتیک و رقابت بر سر منابع غذایی صورت می¬گیرد [۱]. تولید برخی آنزیم¬های تجزیه کنندهٔ دیوارهٔ سلولی توسط ریز موجودات بعنوان یک مکانیزم احتمالی درکنترل بیولوژیک آنها مطرح شده است[۸].

مواد و روش:

تولید پروتئاز:

به منظور بررسی تولید آنزیم پروتئاز توسط باکتریها از محیط **Skim milk agar) SMA**) مطابق روش مارهوفر و همکاران(۱۹۹۵) با کمی تغییر استفاده شد. این محیط شامل ۱۵ گرم پودر شیر**(Skim milk)** ، ۰/۵ گرم عصاره مخمر و ۹/۱۳ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر می باشد. باکتری¬ها به صورت نقطه ای در پتری¬های حاوی محیط **SMA** کشت داده شدند ودر دمای ۲۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. تشکیل یک هاله بیرنگ در اطراف کلونی باکتری¬ها نشانه فعالیت پروتئاز است [۲].

تولید لیپاز:

محیطی شامل ۱۰ گرم پپتون، ۵ گرم کلرور سدیم، ۰/۱گرم کلرور کلسیم، ۱۵ گرم آگار و ۱ لیتر آب را تهیه می کنیم. ۱۰ سی سی توین ۸۰ را جداگانه اتوکلاو کرده و به محیط درحال سرد شدن می افزاییم. باکتری¬ها به صورت نقطه ای در پتری¬های حاوی محیط لیپاز کشت داده شدند ودر دمای ۲۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. پس از چند روز هاله رسوبی در اطراف محل رشد باکتری دیده می شود که نشان دهنده هیدرولیز شدن توبین است [۵].

در هر دو آزمایش قطر هاله تولید شده آندازه‌گیری شد.

تولید آمیلاز:

به محیط کشت آگار غذایی ۰/۲ درصد نشاسته محلول افزوده و پس از اتوکلاو کردن در پتری می ریزیم و باکتری را به صورت خطی کشت می دهیم پس از چند روز با ریختن محلول لوگول (ید در یدور پتاسیم) در صورتی که باکتری نشاسته را هیدرولیز کرده باشد هاله بی رنگی در اطراف محل رشد باکتری ایجاد می شود [۶].

بحث و نتیجه‌گیری:

تمامی جدایه¬ها به جز جدایهٔ **UTPF94** تولید پروتئاز کردند. متوسط میزان تولید ۵ میلی متر و دامنهٔ آن از صفر برای**UTPF94** تا ۹ میلی متر برای جدایه¬های**UTPF30** و **UTPF92** متغیر بود. از ۳۲ جدایهٔ مورد مطالعه، میزان تولید پروتئاز ۸ جدایه بیش از مقدار متوسط است که می¬توانند به طور نسبی به عنوان جدایه¬های برتر محسوب شدند. نتایج حاصل از ارزیابی تولید لیپاز نشان داد که در محیط اختصاصی تولید لیپاز ۲۲ جدایه¬ها قادر به تولید لیپاز بودند. متوسط قطر هاله ۰/۹ سانتی متر و دامنهٔ آن از حداقل ۰ تا حداکثر ۱/۸ سانتی متر متغیر بود. نتایج حاصل

نشان داد که جدایه¬های **UTPF75** و **UTPF92** قوی¬ترین جدایه از نظر تولید لیپاز می¬باشند. توان تولید آمیلاز جدایه¬ها نشان داد که تمامی جدایه¬ها به جز جدایهٔ **UTPF93** توانایی تولید آمیلاز را دارا بودند. نتایج حاصل از اندازه¬گیری قطر هاله روی محیط اختصاصی تولید آمیلاز نشان داد که دامنهٔ تولید آمیلاز جدایه¬ها در این آزمایش از صفر برای جدایهٔ **UTPF93** تا ۲ سانتی متر برای جدایهٔ **UTPF54** متغیر و متوسط قطر هاله تولید شده توسط جدایه‌ها ۱ سانتیمتر بود (جدول ۱). مطالعات مختلف نشان داده¬اند که پتانسیل آنتاگونیستی سودوموناس¬های فلورسنت بر علیه بیمارگر¬های خاکزاد به آنزیم¬های لیتیک تولید شده توسط این باکتری¬ها مربوط است [۳ و ۷].

جدول ۱- نتایج حاصل از ارزیابی توان تولید آنزیم‌های لیتیک پروتئاز و لیپاز سودوموناس‌های فلورسنت

نام جدایه	UTPF2	UTPF10	UTPF17	UTPF18	UTPF24	UTPF27	UTPF30	UTPF32	UTPF45	UTPF54	UTPF59	UTPF60	UTPF61	UTPF63	UTPF65	UTPF68
پروتئاز (قطر هاله میلی متر)	۲	۸	۴	۳	۵	۱	۹	۳	۸	۳	۷	۳	۴	۴	۵	۵
لیپاز (قطر هاله سانتیمتر)	۰	۰/۴	۰/۸	۱/۴	۱/۲	۰	۱/۲	۰/۹	۱	۰	۰/۸	۰/۷	۰	۰/۵	۰/۵	۰
آمیلاز (قطر هاله سانتیمتر)	۰/۸	۰/۷	۱/۳	۰/۵	۰/۸	۱/۱	۱/۹	۰/۸	۱/۸	۲	۰/۵	۰/۴	۰/۵	۰/۹	۰/۸	۰/۷

نام جدایه	UTPF75	UTPF76	UTPF81	UTPF82	UTPF83	UTPF84	UTPF85	UTPF86	UTPF87	UTPF88	UTPF90	UTPF92	UTPF93	UTPF94	UTPF95	UTPF CHAO
پروتئاز (قطر هاله میلی متر)	۵	۵	۳	۲	۳	۴	۲	۲	۵	۸	۶	۹	۷	۰	۵	۱
لیپاز (قطر هاله سانتیمتر)	۱/۸	۰	۰/۷	۰/۵	۰/۵	۱/۵	۰	۰	۰/۸	۰/۴	۰/۹	۱/۸	۰	۱/۶	۰	۱/۲
آمیلاز (قطر هاله سانتیمتر)	۰/۱	۰/۷	۰/۷	۰/۶	۰/۷	۰/۵	۰/۷	۱/۳	۰/۷	۰/۷	۱	۰/۴	۰	۰/۷	۰/۶	۱/۶

منابع:

[1]Elasri, M., Delorme, S., Lemanceau, P., Stewart, G., laue, B., Glickmann, E., Ogar, P.M., Dessaux, Y. 2001. Acyl-homoserine lactone production is more common among plant-associated *Pseudomonas* spp. Than among soilbrone *Pseudomonas* spp. Appl Environ Microbiol. 67:1198-1209.

[2]Maurhofer, M., Reimmann, C., Schmidli-sacherer, P., Heeb, S., Haas, D., and Defago, G. 1998. Salicylic acid biosynthetic genes expressed in Pseudomonas fluorescens strain P3 improve the induction of system resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. Phytopathol. 88: 678-684.

[3]Meena, B., Marimuthu, T., Vidhyasekaran , P., Velazha- han, R. 2001. Biological control of root rot of groundnut with antagonistic *Pseudomonas fluorescens* strains. J. Plant Dis. Protect . 108: 369-381.

[4]Ping ,L.and Boland, W.2004.Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*.Trends. plant. Sci.9(6)

[5]Sierra, G. 1957. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. Antonie Van Leeuwenhoek Ned. Tijdschr. Hyg. 23: 15-22.

[6]Society of American Bacteriologists. 1951. Manual of Microbiological Methods. McGraw-Hill, New York, 315 pp.

[7]Velazhahan, R., Samiyappan, R., Vidhyasekaran, P. 1999. Relationship between antagonistic activities of *Pseudomonas fluorescens* strains against Rhizoctonia solani and their production of lytic enzymes. J. Plant Dis. Protect . 106, 244-250.

[8]Whipps, J.M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany. 52: 487-511