باکتری‌های حل‌کننده فسفات:جداسازی باکتری‌ها و ژن‌های رمزکننده حل‌کنندگی فسفات

محمدرضا ساریخانی [*1]، محمدعلی ملبوبی[2]، ناصر علی‌اصغرزاد[3]
1 و 3- به ترتیب استادیار و استاد گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
2- دانشیار بخش بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشکده بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران
(rsarikhani@yahoo.com)

چکیده
توانایی برخی ریزسازواره‌ها به منظور تبدیل فسفر نامحلول به شکل قابل استفاده مانند ارتوفسفات، ویژگی مهمی در باکتری‌های تحریک‌کننده رشد گیاه می‌باشد. گونه‌هایی از جنس Pseudomonas، *Bacillus*، *Pantoea* و *Rhizobium* از قوی‌ترین حل‌کنندگان فسفات به شمار می‌آیند. روش مرسوم در جداسازی این دسته از باکتری‌ها استفاده از منابع فسفاته معدنی و آلی کم محلول یا نامحلول در محیط کشت‌های جامد یا مایع از طریق پایش تولید فسفات آزاد شده و کاهش pH در محیط مایع یا مشاهده هاله شفاف در اطراف کلنی‌ها و تولید کلنی‌های رنگی (سبز ، آبی و زرد) در صورت استفاده از سوبسترا‌های رنگزا در محیط کشت جامد می‌باشد. انجام پروژه‌های ژنوم باکتریایی و افزایش اطلاعات توالی DNA آنها همراه با افزایش رو به رشد تکنیک‌های مولکولی دست‌یابی به ژن‌های رمزکننده فسفاتاز را از طرق مختلف نظیر PCR کلونینگ، غربالگری کتابخانه ژنومی و استخراج پروتئین و دست یابی به توالی DNA از طریق توالی آمینواسیدی را ممکن می‌سازد، تا بعد از دستیابی به سویه‌های کارامد حل‌کننده فسفات اقدام به جداسازی ژنهای رمزکننده آن نمود و راه را برای به خدمت گرفتن هر چه بیشتر این پتانسیل-های زیستی برای پیشبرد اهداف هموار سازد.
کلمات کلیدی: باکتری‌های حل کننده فسفات، فسفاتاز، فیتاز، روش‌های مولکولی

مقدمه

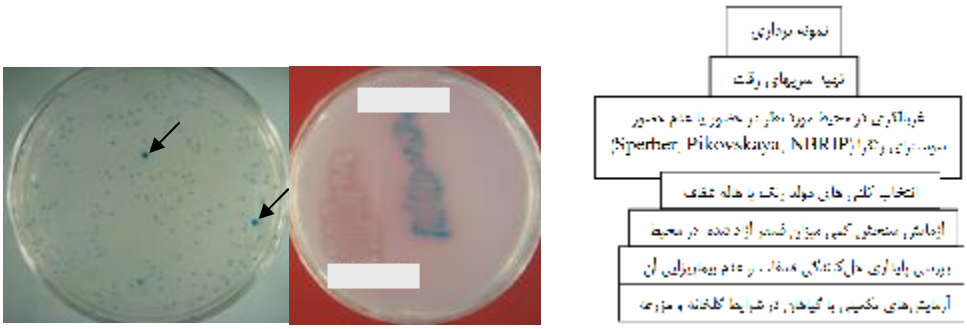
در نیم قرن گذشته بیشترین توجه به باکتری‌های تثبیت‌کننده ازت معطوف بوده است. اما در دو دهه اخیر استفاده از باکتری‌های مفید دیگر برای رفع نیازهای تغذیه‌ای و احیای فلور طبیعی خاک تحت عنوان مهندسی ریزوسفر نیز مورد علاقه پژوهشگران بوده است. در این نوشتار سعی می‌شود روش‌های جداسازی باکتری‌ها حل‌کننده فسفات و سازوکارهای درگیر در انحلال فسفات بیشتر مورد توجه قرار گیرد و در ادامه ژنتیک انحلال فسفات و ژن‌های درگیر در انحلال فسفات از دید زیست فناوری بررسی شود.

باکتری‌های حل‌کننده فسفات

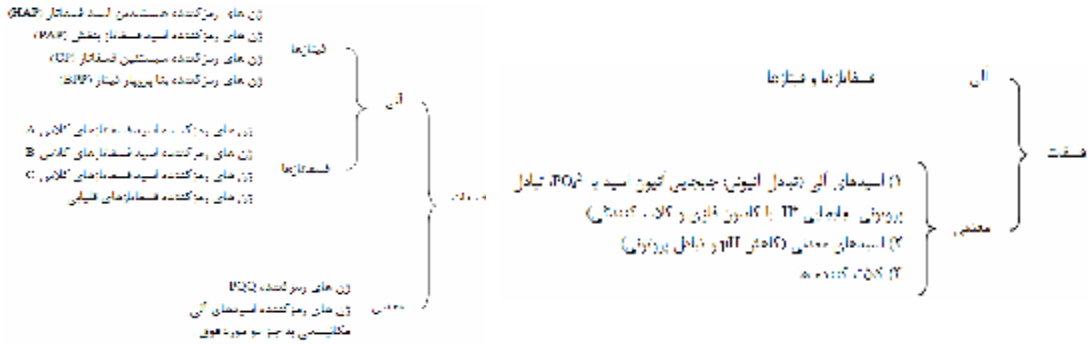
مدارکی مبنی بر نقش ریزسازواره‌های ریزوسفری در انحلال فسفات معدنی به سال 1903 برمی‌گردد (Illmer and Schinner 1992). ریزسازواره‌ها از طریق معدنی‌کردن فسفر آلی و انحلال فسفات‌های رسوب یافته فراهم‌سازی فسفر برای گیاهان را افزایش می‌دهند. این دسته از ریزسازواره‌ها گرچه فسفر را در ساختار سلولی خود به خدمت می‌گیرند، ولی بخشی از آن که در محیط آزاد شده است در اختیار گیاه قرار می‌گیرد. باکتری‌ها در مقایسه با قارچ‌ها در انحلال فسفات بسیار موثرترند و جمعیت بالایی را به خود اختصاص می‌دهند (Khan et al. 2007) گزارش‌های متفاوتی توانایی گونه‌های مختلف باکتری در انحلال فسفات معدنی نامحلول از قبیل تری‌کلسیم فسفات، دی‌کلسیم فسفات، هیدروکسی آپاتیت و سنگ فسفات را بیان داشته‌اند. در بین باکتری‌هایی با این قابلیت، جنس‌های *Pseudomonas*، *Bacillus*، *Rhizobium*، *Burkholderia*، *Agrobacterium*، *Pantoea*، *Achromobacter* و *Flavobacterium* مشاهده می‌شود (Rodriguez and Fraga 1999). باکتری‌های حل‌کننده فسفات به عنوان کود زیستی از سال 1950 مورد استفاده قرار می‌گیرند (Kudashev 1956).

روش شناسایی و جداسازی باکتری‌های حل کننده فسفات

معمولاً جداسازی اولیه مطابق شکل 1 در محیط جامد به طریق تهیه سریهای رقت یا روش‌های کشت‌های غنی شده از نمونه‌های خاک انجام گرفته و سپس توانایی آن در انحلال فسفات در محیط مایع آزمایش شده و بعد از انتخاب باکتری حل‌کننده فسفات کارآمد، زادمایه آن تهیه می‌شود و در شرایط آزمایش گلخانه‌ای و مزرعه‌ای آزمایش‌های تکمیلی بر روی آن در حضور گیاهان مختلف انجام می‌گیرد (Khan et al. 2007). همچنین به خاطر عدم پایداری ویژگی حل-کنندگی فسفات برخی از باکتری‌ها، دوام و پایداری توان حل‌کنندگی آنها با کشت‌های مجدد مورد آزمایش قرار می-گیرد (Illmer and Schinner 1992). با توجه به این که سازوکار انحلال فسفات از طریق تولید اسیدهای آلی و تولید آنزیم‌های فسفاتاز (مانند فیتاز) می‌باشد (شکل2). محیط اختصاصی برای غربالگری فنوتیپی این باکتری‌ها با استفاده از این سازوکار طراحی شده‌اند به گونه‌ای که با حذف هر گونه منبع فسفات قابل استفاده و محلول در محیط کشت از جایگزین‌های مناسب و نامحلول ترکیبات فسفات معدنی یا آلی (از قبیل تری‌کلسیم فسفات یا فیتات سدیم و فیتات کلسیم) استفاده نموده‌اند. در این رابطه به محیط کشت حداقل مانند Sperber و Pikovskaya می‌توان اشاره داشت (Pikovskaya 1948).



شکل 1- مراحل نمونه برداری و غربالگری باکتریهای حل کننده فسفات جهت انتخاب سویه های کارآمد (سمت راست). تولید هاله شفاف و کلنی آبی توسط باکتری‌های حل‌کننده فسفات در محیط غربالگری (سمت چپ) (Sarikhani et al. 2010).



شکل 2- سازوکارهای درگیر در انحلال فسفات معدنی و معدنی شدن فسفات آلی (سمت راست) (استنتاج از Roderiquez and Fraga, 1999) و ژن‌های مرتبط با انحلال فسفات معدنی و آلی (سمت چپ) (استنتاج از Sarikhani et al. 2010; Roderiquez and Fraga, 1999; Thaller et al. 1998).

تشخیص چشمی و حتی برآورد نیمه‌کمی توانایی انحلال فسفات ریزسازواره‌ها به وسیله غربالگری در پلیت امکان‌پذیر است که در آن منطقه شفاف اطراف کلنی‌های میکروبی (شکل 1) در محیط کشت حاوی ترکیبات نامحلول فسفات به عنوان تنها منبع فسفر بررسی می‌شود. همچنین روش بهبود یافته‌ای با استفاده از محیط حاوی بروموفنل بلو ارائه شده

است که در این محیط رنگ آبی در اطراف کلنی‌ها به دلیل کاهش pH در نتیجه آزادسازی اسیدهای آلی بی‌رنگ می‌شود (Rodriguez and Fraga 1999; Nautiyal 1999). با توجه به ایراداتی که برای روش مشاهد منطقه شفاف در اطراف کلنی در محیط Pikovskaya (PKV) گرفته می‌شود، نوتی یال (1999) محیط جدیدی به نام (NBRIP) را ارائه داد وی معتقد است که این روش سه برابر در مقایسه با PKV کارآمدتر است. از آن جهت که فسفاتازها و فیتازها به عنوان آنزیم‌های درگیر در معدنی کردن فسفات آلی شناخته می‌شوند، یکی از راههای جداسازی باکتری‌های حل‌کننده فسفات ارائه روش‌ها و راهکارهایی برای دست یافتن به باکتری‌هایی با فعالیت فسفاتازی و فیتازی بالاست است. استفاده از روش‌های فوق یا حتی روش‌های تلفیقی از قبیل کشت باکتری در محیط جامد در حضور فسفات معدنی یا آلی نامحلول یا کم محلول و پایش تولید هاله شفاف در اطراف کلنی و همچنین استفاده از سوبستراهای رنگزا از قبیل BCIP (5- برومو 4- کلرو 3- ایندولیل فسفات) و پایش تولید کلنی‌های آبی (شکل 1) به دلیل فعالیت فسفاتازی (Malboobi et al. 2009; Sarikhani et al. 2010) و در نهایت بررسی توان حل کنندگی فسفات و میزان آزادسازی فسفات توسط باکتری در محیط های مایع و انجام آزمایش‌های تکمیلی تر با گیاه در شرایط گلخانه‌ای و مزرعه‌ای منجر به جداسازی نمونه‌های کارامدی از این قبیل باکتری‌ها شده است (Malbooi et al 2009).

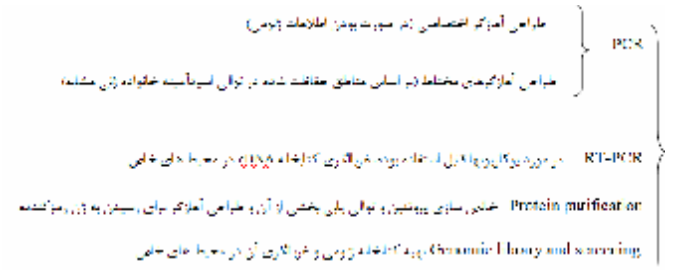
روش‌های جداسازی ژن‌های فسفاتاز و فیتاز از باکتری‌های حل‌کننده فسفات

آنزیم‌های فسفاتاز که فیتازها نیز زیر مجموعه‌ای از آن‌ها می‌باشند، توسط گروه متنوعی از ژن‌ها رمز می‌شوند. به طوری که تالر و همکاران (1998) فسفاتازهای پروکاریوتی را بر اساس نگاره توالی حفاظت شده موجود در توالی آنها در 3 گروه مجزای A، B و C قرار دادند (شکل 2). روش‌های مختلفی تا کنون برای همسانه‌سازی این قبیل از ژن‌ها به کار گرفته شده است (شکل 3). برای نمونه PCR و RT-PCR به ترتیب ساده‌ترین روش برای جداسازی و همسانه‌سازی ژن‌ها از ژنوم یا نسخه‌های رونوشت یک موجود بر اساس اطلاعات ژن‌های همسانه‌سازی شده در گذشته می‌باشد. استفاده از RT-PCR در مورد پروکاریوت‌ها به دلیل طول عمر پایین mRNA، فقدان ساختار اینترونی و عدم وجود دنباله A استفاده نشده است گرچه استفاده از این روش در مورد فسفاتازهای یوکاریوتی قابل استفاده می‌باشد. مشکلات روش‌های فوق زمانی بیشتر می‌شود که اطلاعات ژنوم موجودی در دست نباشد و با یک ژن جدید روبرو باشیم. یکی دیگر از روش های قابل استفاده در جداسازی این گروه از ژن‌ها تهیه کتابخانه ژنومی و غربالگری همسانه‌ها با استفاده از هاله شفاف در اطراف همسانه می‌باشد. البته باید در نظر داشت که تولید هاله شفاف می‌تواند ناشی از رهاسازی آنزیم یا اسیدهای آلی باشد (به نقل از Sarikhani et al. 2010). همچنین ژن‌های مورد نظر می‌توانند از طریق طراحی آغازگرهای مختلط بر اساس مناطق حفاظت شده یا بعد از خالص‌سازی آنزیم و توالی‌یابی قسمتی از توالی اسیدآمینه‌ای آنها برای رسیدن به ژن رمزکننده در ژنوم موجود هدف باشد (Cho et al. 2005).

در طول زمان برخی از روش‌ها برای جداسازی باکتری‌های حل‌کننده فسفات و برخی روش‌ها برای پایش فعالیت فسفاتازی سویه‌ای خاص یا حتی جداسازی ژن مورد استفاده قرار گرفته است. برای نمونه استفاده از BCIP را در مورد قارچ آسپرژیلوس و سوسپانسیون کشت سویا و تشخیص فعالیت فسفاتازی آن گزارش شده است. دیگران نیز برای غربالگری فعالیت فسفاتازی همسانه‌های حاصل از تشکیل کتابخانه ژنومی استفاده از سوبستراهای رنگزا از قبیل pNPP و فنل فتالئین دی فسفات/ متیل گرین که به ترتیب موجب تشکیل رنگ زرد و سبز همسانه‌های با فعالیت فسفاتازی بالا می‌شود، را استفاده نموده و گزارش کردند (به نقل از Sarikhani et al. 2010).

ساریخانی و همکاران (2010) با ارایه روشی برای غربالگری عملکردی کتابخانه ژنومی سویه P13 باکتری *P. putida* با استفاده از BCIP در محیط حداقل Sperber ، جداسازی دو ژن جدید فسفاتازقندی و فیتازی را گزارش دادند. آن‌ها در کار خود با مشاهده رفتار فسفاتازی القایی در محیط Sperber بعلاوه BCIP اقدام به همسانه‌سازی ژن‌های فوق نمودند

(شکل 1). در شکل 3 روش‌های مرسوم برای دستیابی به ژن‌های رمزکننده فسفاتاز/ فیتاز و یا ژنهای درگیر در انحـلال فسفات معدنی به شکلی کلی و خلاصه مشخص می‌باشد.



شکل 3- روش‌های مرسوم در جداسازی ژن‌های فسفاتاز و فیتاز (استنتاج از Cho et al. 2005, Sarikhani et al. 2010).

نتیجه‌گیری

با توجه به نیاز ضروری سلول‌های زنده به فسفر توجه بیشتر پژوهشگران بر گونه‌های میکروبی فعال در زمینـه تولیـد اسیدهای آلی، تولید کننده فسفاتازها و فیتازها معطوف بوده است که با دست‌یابی به یک گونـه مناسـب بتـوان از آن درحیطه‌هایی چون کودهای زیستی برای گیاهان و پروبیوتیک برای دام وطیور استفاده نمود. در این میان باکتری‌های حل‌کننده از جنس *Pseudomonas*، *Bacillus* و*Enterobacter* برای افزایش فراهمی فسفر مورد نیاز گیاه و همچنـین رشد و عملکرد کارآمدتر به نظر می‌رسند. در مرحله نخست رسیدن به یک ریزسازواره با توان حل‌کنندگی فسفات بـالا و در ادامه دستیابی به ژن رمزکننده آن، راه را برای به خدمت گرفتن هر چه بیشتر این توانهای زیستی بـرای پیـشبرد اهداف هموار می‌سازد. نگاهی به پژوهش‌های کلاسیک گذشته و استفاده از روش های مولکولی نوین، آینده‌ای روشن را پیش روی ما ترسیم می‌نماید که برای رسیدن به این مهم تلاش میکـروب شناسـان، خاکـشناسان و زیـست فنـاوران ضروری به نظر می رسد.

منابع

Cho JS, Lee CW, Kang SH, Lee JC, Bok JD, Moon YS,Lee HG,Woo J and Choi YJ, 2005. Molecular cloning of a phytase gene (*phy M*) from *Pseudomonas syringae* MOK1. Current Microbiology, 47:290–294.

Illmer P and Schinner F (1992) Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. Soil Biol. Biochem., 24:389–395.

Khan MS, Zaidi A and Wani PA (2007) Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture-a review.Agronomy for sustainable development. Agron. Sustain., 27:29–43.

Kudashev IS (1956) The effect of phosphobacterin on the yield and protein content in grains of autumm wheat, maize and soybean. Doki. Akad. Skh. Nauk., 8:20-23.

Malboobi MA, Owlia P, BehbahaniM, Sarokhani E, Moradi S, Yakhchali B, Deljou A and Morabbi Heravi K (2009a) Solubilization of organic and inorganic phosphates by three highly efficient soil bacterial isolates. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 25:1471–1477.

Nautiyal CS (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiology Letters, 170:265-270.

Pikovskaya RI (1948) Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. Microbiology, 17:362– 370.

Rodrıguez H and Fraga R (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology Advances, 17:319–339.

Sarikhani MR, Malboobi MA, Aliasgharzadeh N, Greiner R and Yakhchali B (2010) Functional screening of phosphatase-encoding genes from bacterial sources. Iranian Journal of Biotechnology. 8 (4): 257-259.

Thaller MC, Schippa S and Rossolini GM (1998) Conserved sequence motifs among bacterial, eukaryotic, and archaeal phosphatases that define a new phosphohydrolase superfamily. Protein Sci., 7: 1647–1652.