جداسازی، شناسایی و بررسی پتانسیل تولید سیانیدهیدروژن در برخی از سودوموناس‌های فلورسنت

پیمان عباس‌زاده دهجی، هادی اسدی رحمانی، ناهید صالح راستین، کاظم خاوازی، علی اشرف سلطانی طولارود و کبری ثقفی

به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد گروه مهندسی علوم خاک دانشگاه تهران، استادیار پژوهش موسسه تحقیقات خاک و آب، دانشیار گروه مهندسی علوم خاک دانشگاه تهران، استادیار پژوهش موسسه تحقیقات خاک و آب، دانشجوی کارشناسی ارشد گروه مهندسی علوم خاک دانشگاه تهران وکارشناس آمار موسسه تحقیقات خاک و آب.
abp_1114 @yahoo.com

مقدمه

مطالعات انجام شده نشان داده اند که سودوموناس های فلورسنت بخش مهمّی ازجمعیت باکتری‌های ریزوسفری را تشکیل می دهند. مطالعات گسترده‌ای در خصوص صفات محرک رشدی (PGP) این باکتری‌ها صورت گرفته است [Vlassak و همکاران، ۱۹۹۲]. در چند سال اخیر توجه خاصی به تاثیرات مثبت ومنفی باکتری‌های سودوموناس کلنیزه کننده ریشه شده است. یکی از راه‌هایی که این باکتری‌ها باعث افزایش رشد گیاه می‌شوند ازبین بردن ویا توقف رشد و فعالیت میکرواورگانیسم‌های پارازیت و مضر ریزوسفری است که از طریق مکانیسم‌ها و تولید متابولیت‌های مختلفی اعمال می‌گردد. یکی از متابولیت‌های مهم سیانید هیدروژن (HCN) است [Schippers و همکاران، ۱۹۹۰].

مواد و روشها

جداسازی و شناسایی سویه‌های سودوموناس فلورسنت: به منظور جداسازی باکتری‌های سودوموناس از ریزوسفر کلزا ۲۰ نمونه خاک ریزوسفری (بوته‌های کلزا با خاک اطراف) از مزارع منطقه کرج تهیه و به آزمایشگاه منتقل گردید. به منظور جداسازی ۱۰ گرم ریشه حاوی خاک ریزوسفری درون ارلن حاوی ۹۰ میلی لیتر محلول بافر فسفات (PSB) استریل منتقل و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی شیکر قرار داده شد. پس از تهیه رقت‌های ده‌تایی از نمونه، ۰/۱ میلی لیتر از رقت‌های 10^{-4}، 10^{-5}، 10^{-6} و 10^{-7} بر روی پلیت‌های حاوی محیط کشت KingB منتقل گردید. پلیت‌ها پس از ۲۴ الی ۴۸ ساعت رشد در دمای ۲۸̊C با استفاده از لامپ UV از نظر وجود کلونی‌های با خاصیت پرتوافشان (فلورسنس) ارزیابی گردیده و کلونی‌های مورد نظر جداسازی شدند. به منظور انجام آزمون تولید سیانید هیدروژن علاوه بر ۲۳ سویه جدا شده از ریزوسفر کلزا ۱۵ سویه جدا شده از ریزوسفر گندم و دو سویه خارجی GRP3 و MPFM از کلکسِیون مِیکروبِی موسسه تحقِیقات خاک و آب نیز مورد آزمایش قرار گرفتند. سویه‌های جدا شده از ریزوسفر گندم عبارت بودند از R1، R30، R41، R69، R112، R143، R150، R168 که به گروه سودوموناس پوتیدا تعلق داشتند و R26، R36، R93، R99، R173، R187 که به گروه سودوموناس فلورسنس تعلق داشتند. GRP_3 و MPFM از گروه سودوموناس ائروژینوزا بودند.

آزمایش‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی به منظور شناسایی ایزوله‌های جداشده بر اساس روش‌های طبقه‌بندی شناسایی برجی انجام گرفت و برای این منظور آزمون‌های واکنش گرم، بررسی شکل ظاهری باکتری، کاتالاز، اکسیداز، تحرک در محیط نیمه جامد، آزمون ذوب ژلاتین، رشد در دمای ۴۱̊C، آزمون هیدرولیز آرژینین، آزمون لوان، دنیتریفیکاسیون و استفاده از قندهای ترهالوز و ال- آرابینوز انجام گرفتند [Vlassak و همکاران، ۱۹۹۲].

توان تولیدسیانیدهیدروژن: تعیین توان تولید سیانیدهیدروژن با استفاده از روش دونیت و همکاران [۲۰۰۴] انجام گردید. برای اندازه‌گیری سیانید هیدروژن ابتدا جدایه‌ها در پلیت‌های حاوی محیط TSA غنی شده با گلایسین (۴/۴ گرم در لیتر) کشت داده شدند. د. هر پتری توسط ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری که ۴۸ ساعت اینکوبه شده بود تلقیح شد و سپس یک کاغذ صافی آغشته به محلول معرف، شامل کربنات سدیم ۲٪ واسید پیکریک ۰/۵٪ در درب پلیت قرار داده شد. آنگاه ظروف بصورت واژگون در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد ، به مدت ۵ روز درون انکوباتور قرار داده

شدند. در صورت تولد سیانیدهیدروژن توسط باکتری‌های رشد کرده بر روی سطح محیط کشت، کاغذ صافی آغشته به محلول معرف که درون درب هر ظرف پتری تعبیه شده بود از رنگ اولیه زرد (سطح۱، عدم تولید) به کرم (سطح۲، حداقل تولید)، نارنجی (سطح۳، تولید کم)، قهوه‌ای روشن (سطح۴، تولید نسبتا زیاد) و آجری (سطح۵،تولید زیاد) تغییر رنگ داد.

نتایج و بحث

از کل ۲۰ نمونه خاک ریزوسفری ارقام کلزا در مناطق ذکر شده ۲۳ جدایه منتسب به گروه سودوموناس‌های فلورسنت جداسازی گردید. جدایه‌های جدا شده در برابر اشعه UV خاصیت پرتوافشانی از خود نشان دادند و برای شناسایی آنها تا حد گونه مورد آزمایشهای میکروسکوپی، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی قرار گرفتند. نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی نشان داد که ٪۴۸ سویه‌ها سودوموناس پوتیدا (P1، P2، P3، P4، P7، P13، P14، P15، P17، P18 و P19)، ٪۳۵ سودوموناس فلورسنس (P5، **P6**، P12، P16، P20، P21، P22 و P23) و ٪۱۷ سودوموناس فلورسنس پوتیدا بودند (P8، P9، P10 و P11). این نتایج نشان داد که سودوموناس پوتیدا درصد بالایی از سودوموناس‌ها فلور سنت ریزوسفرکلزا را تشکیل می‌دهد. تحقیقات رسولی و همکاران [۱۳۸۴] نیز نشان داد که از ۲۰۱ سویه جدا شده از ریزسفرگندم بیشتر آنها (٪۵۳) سودوموناس پوتیدا بودند. Vlassak و همکاران [۱۹۹۲] نشان دادند که از ۸۰ جدایه سودوموناس فلورسنت جدا شده از ریزوسفر برنج و موز ۷۶ درصد سوروموناس پوتیدا بودند.

نتایج ارزیابی توان تولید سیانید هیدروژن نشان داد که سویه‌ها توانستند سطوح مختلفی از HCN تولید کنند. ۳۰/۴۳ درصد از سویه‌های جدا شده از ریزوسفر کلزا و ۳۳/۳۳ درصد از سویه‌های جدا شده از ریزوسفر گندم توانستند سیانید هیدروژن تولید کنند. اغلب سودوموناس‌های فلورسنت قادر به تولید سیانید هستند که برای قارچها سمی می‌باشد [Keel و همکاران، ۱۹۸۹]. تقریبا ۴ درصد از گونه‌های سودوموناس جدا شده از ریزوسفر سیب‌زمینی و گندم در خاک‌هایی با تناوب کوتاه و بلندمدت، توانایی تولید سیانید را نشان دادند. حداقل ۴۰ درصد پسودوموناس‌های ریزوسفر سیب‌زمینی درشرایط *In vitro* قادر به تولید سیانید بودند [Schipper و همکاران، ۱۹۸۷]. میزان توان تولید سیانید هیدروژن سویه‌های P6، R1، R99، R173 و GRP3 زیاد (سطح۵)، سویه‌های P5، P12، P16، P20، P21 و R168 نسبتا زیاد (سطح۴)، سویه R159 کم (سطح۳) و سویه P23 حداقل (سطح۲) بود. بقیه سویه‌ها توانایی تولید HCN از گلیسین را نداشتند (سطح۱).

منابع

[۱] رسولی صدقیانی، ح.، ک. خاوازی.، ح. رحیمیان.، م. ج. ملکوتی و هـ اسدی رحمانی. ۱۳۸۴. بررسی تراکم جمعیت و شناسایی سودوموناس‌های فلورسنت در ریزوسفر گندم مناطق مختلف ایران. مجله خاک و آب. جلد ۱۹، شماره ۲، مؤسسه تحقیقات خاک و آب، تهران، ایران .

[2] Donate-Correa, J., Leon-Barrios, M., Perez-Galdona, R.2004. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste), a forage tree-shrub legume endemic to the Canary Island. Plant Soil. 266: 261-272

[3] Keel, C., Voisard, C., Berling, C.H., Kahar, G., and Defago, g.1989.Iron sufficiency aprerequisite for the suppression of tobacco black root rot by *pseudomonas fluorescens* strain CHA0 under gnotobiotic condition. J. Phytopathol. 79: 584-589

[4] Schippers, B., Bakker, A.W., Bakker, P.A.H.M., and Vanpeer, R.1990. Beneficial and deleterious effects of HCN-production *pseudomonads* on rhizosphere interaction.Plant Soil.129: 75-83

[5] Vlassak, K., Vanholm, L., Duchateau, L., Vanderleyden, J., and Demot , R. 1992. Isolation and characterization of *fluorescent pseudomonads* associated with the roots of rice and banana grown in sri lanka.Plant .Soil.145:51-63.