جداسازی، شناسایی و بررسی خصوصیات محرک رشد سودوموناس‌های فلورسنت ریزوسفری نهال‌های پسته

گلنار حسنی[1]، عبدالرضا اخگر[2]، احمد تاج‌آبادی‌پور[3]، نازنین خاکی‌پور[4]

1- دانشجوی کارشناسی ارشد خاک‌شناسی دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان
2- استادیار گروه خاک‌شناسی دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان
3- دانشیار گروه خاک‌شناسی دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان
4- استادیار گروه خاک‌شناسی دانشگاه آزاد واحد سوادکوه

hasanigolnar@gmail.com

چکیده

در این تحقیق، ابتدا جمعیت باکتری‌های ریزوسفری نهال‌های پسته تعیین و سپس بر اساس خاصیت فلورسنت، تعداد 52 جدایه به عنوان باکتری‌های سودوموناس فلورسنت جداسازی گردید. نتایج شناسایی گونه نشان داد، 49 جدایه متعلق به گونه *Pseudomonas fluorescens* و سه تا از جدایه‌ها به دلیل عدم تطابق نتایج با مندرجات کتاب Bergey به‌صورت *Pseudomonas* sp. گزارش گردیدند. بررسی خصوصیات محرک رشد جدایه‌ها نشان داد که تعداد 32 جدایه (61%) از جدایه‌ها قادر به مصرف ACC و تعداد 50 جدایه (96%) از جدایه‌ها قادر به تولید سیدروفور بودند. هم‌چنین تمامی جدایه‌ها توانایی تولید اکسین و حل کردن فسفات‌های نامحلول را داشتند.

کلمات کلیدی: اکسین، ACC دآمیناز، حل‌کنندگی فسفات، سودوموناس فلورسنت، سیدروفور

مقدمه

موجودات زنده خاکزی شامل میکروارگانیسم‌ها، گیاهان و جانوران می‌باشند. میکروارگانیسم‌های خاک بخش مهمی از اکوسیستم‌های خاک را تشکیل می‌دهند. حضور و فعالیت جامعه زنده میکروارگانیسم‌ها در ریزوسفر بسیار چشمگیرتر از خاک اطراف این منطقه می‌باشد (Bartel, 1997). دلیل این تفاوت، وجود مواد غذایی در ترشحات ریشه است. در بین میکروارگانیسم‌های ریزوسفری، باکتری‌ها به دلیل سرعت رشد زیاد و توانایی آنها در استفاده از منابع متنوع کربن و انرژی از جمعیت بالاتری در ریزوسفر برخوردارند (Glick, 1995). در میان باکتری‌های ریزوسفری، توجه زیادی به گروه باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه (PGPR) شده است. این باکتری‌ها می‌توانند به‌طور مستقیم و غیرمستقیم موجب افزایش یا تحریک رشد گیاه شوند (Glick, 1995). باکتری‌های جنس سودوموناس و به‌ویژه گروه سودوموناس‌های فلورسنت از جمله مهم‌ترین باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه بوده که می‌توانند از طریق مکانیسم‌هایی مانند افزایش انحلال ترکیبات نامحلول فسفر، تأمین آهن از طریق تولید سیدروفور، تولید هورمون‌های گیاهی و تولید آنزیم ACC دآمیناز باعث بهبود و افزایش رشد گیاه شوند.

مواد و روش‌ها

به‌منظور جداسازی باکتری‌های ریزوسفری نهال‌های پسته، تعداد 10 نمونه خاک از مناطق پسته‌خیز شهرستان رفسنجان از عمق صفر تا 30 سانتی‌متری در محدوده‌ی سایه‌انداز درخت انتخاب گردید. نمونه‌های خاک پس از هوا خشک کردن، کوبیدن و الک کردن به 10 گلدان 3 کیلوگرمی منتقل گردیدند. بذرهای پسته (رقم بادامی زرندی) پس از جداسازی پوست سخت و ضد عفونی سطحی به مدت 24 ساعت در یک ظرف سر بسته استریل خیسانده شدند. برای جوانه‌دار کردن، بذرها بر روی واتر- آگار در دمای 25 درجه‌ی سلسیوس و درون انکوباتور نگه‌داری شدند. در هر گلدان تعداد 6 بذر جوانه‌دار شده کشت و گلدان‌ها برای مدت دو ماه در شرایط گلخانه نگهداری شدند. پس از گذشت این مدت ریشه نهال‌های پسته از خاک خارج و 10 گرم از خاک ریزوسفری به همراه ریشه به‌منظور جداسازی باکترهای سودوموناس فلورسنت به آزمایشگاه منتقل گردید. برای تشخیص و جداسازی باکتری‌های سودوموناس فلورسنت پس از تهیه سری رقت، از هر یک از رقت‌ها درون پلیت‌های حاوی King B پخش گردید. پلیت‌های حاوی کلنی‌های رشد یافته در محیط کشت King B در معرض نور UV قرار داده شدند و از کلنی‌های دارای خاصیت فلورسنت در رقت‌های بالا و به طور تصادفی تعداد 52 جدایه انتخاب و پس از اطمینان کامل از خلوص جدایه‌ها تا زمان استفاده، بر روی محیط کشت شیبدار و درون یخچال نگه‌داری شدند.

تعداد 52 جدایه سودوموناس فلورسنت جداسازی شده از ریزوسفر پسته بر اساس آزمون‌های پیشنهاد شده توسط Bossis و همکاران (2000) شناسایی شدند. به‌این منظور بر روی تمامی جدایه‌ها، آزمون‌های گرم، تحرک جدایه‌ها، هیدرولیز آرژینین، اکسیداز، کاتالاز، رشد در دمای 4 و 41 درجه سلسیوس، هیدرولیز ژلاتین، توان استفاده از قندهای ترهالوز و آرابینوز، تولید لوان و احیای نیترات انجام گرفت.

به‌منظور بررسی توانایی تولید اکسین جدایه‌ها از روش Benet و همکاران (2001) با کمی تغییرات استفاده شد. 50 میکرولیتر از سوسپانسیون هر یک از جدایه‌های رشد یافته در محیط TSB به 20 میلی‌لیتر محیط TSB حاوی50 میکروگرم در میلی‌لیتر ال- تریپتوفان منتقل و برای 72 ساعت تکان داده شد. پس از گذشت این مدت سوسپانسیون‌های مذکور سانتریفیوژ و 1 میلی‌لیتر از محلول رویی هر نمونه با 4 میلی‌لیتر از معرف سالکوسکی مخلوط گردید. مخلوط حاصل به مدت 20 دقیقه در دمای اتاق نگه‌داری و سپس با استفاده از اسپکتروفتومتر میزان جذب نور در طول موج 535 نانومتر قرائت شد. مقدار تولید اکسین توسط هر جدایه از مقایسه‌ی جذب نور آن با منحنی استاندارد تهیه شده از غلظت‌های مختلف ایندول استیک اسید محاسبه گردید.

به‌منظور ارزیابی توانایی جدایه‌ها در استفاده از ACC به عنوان تنها منبع نیتروژن، ابتدا هر جدایه در محیط TSB کشت داده شد. پس از کشت مجدد هر جدایه در TSB، مقدار50 میکرولیتر از سوسپانسیون تازه‌ی هر جدایه به 20 میلی‌لیتر از محیط حداقل DF ، 20 میلی‌لیتر DF حاوی ACC 3 میلی‌مولار و DF حاوی 2 گرم در لیتر سولفات آمونیوم منتقل و به مدت 48 ساعت روی شیکر تکان داده شد. در آخر دانسیته نوری (OD) این محیط‌ها به عنوان معیاری از رشد باکتری در آن محیط، در طول موج 405 نانومتر به‌وسیله‌ی دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد.

در آزمون بررسی توان حل فسفات‌های معدنی از محیط کشت Sperber (1958) استفاده شد. پس از کشت هر جدایه در محیط TSB مقدار50 میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به 25 میلی‌لیتر محیط اسپربر مایع منتقل گردید. نمونه‌ها به مدت 120 ساعت بر روی شیکر تکان داده شدند. پس از این مدت pH نمونه‌ها قرائت و بلافاصله سوسپانسیون باکتری سانتریفیوژ و 1 میلی‌لیتر از محلول رویی با 3 میلی‌لیتر آب مقطر و 1 میلی‌لیتر معرف آمونیوم مولیبدات- وانادات مخلوط گردید. بعد از گذشت 20 دقیقه، میزان جذب نور با استفاده از اسپکتروفتومتر در 470

نانومتر قرائت گردید. مقدار فسفر آزاد شده توسط هر جدایه با استفاده از منحنی استاندارد تهیه شده از غلظت‌های مختلف K_2HPO_4 محاسبه شد.

به منظور ارزیابی توانایی تولید سیدروفور جدایه‌ها از محیط CAS Blue Agar استفاده شد (Alexander & Zuberer, 1991). در این روش ابتدا سوسپانسیون جدایه‌ها به طور جداگانه تهیه، سپس باکتری‌ها با روش تلقیح قطره گذاری در محیط CAS-Agar کشت داده شدند. توانایی تولید سیدروفور از روی تغییر رنگ محیط CAS-Agar از آبی به نارنجی و با اندازه‌گیری هاله نارنجی رنگ تشکیل شده در اطراف کلنی باکتری‌ها و در فواصل زمانی مختلف ارزیابی گردید.

نتایج و بحث

وجه تمایز سودوموناس‌های فلورسنت از سایر سودوموناس‌ها، تولید پیگمان‌هایی است که در برابر نور فرا بنفش خاصیت فلورسنس دارند. در انتخاب باکتری‌های مورد نظر از کلنی‌های دارای خاصیت فلورسنت تعداد 52 کلنی باکتری از پلیت‌های حاصل از رقت‌های بالای خاک ریزوسفری نهال‌های پسته به صورت تصادفی برداشته و خالص‌سازی شدند. نتایج آزمون‌های تعیین گونه نشان داد که همه‌ی جدایه‌ها به جزء جدایه‌های 26، 41 و 46 در گونه ***P. fluorescens*** قرار گرفتند. جدایه‌های مذکور به صورت ***Pseudomonas*** sp. گزارش شدند. جدایه‌های 26 و 46 به دلیل منفی بودن آزمون هیدرولیز آرژینین و آزمون اکسیداز احتمالاً در یکی از گونه‌های ***P. syrngae*** یا ***P. viridiflava*** قرار می‌گیرند.

نتایج حاصل از آزمون تولید IAA جدایه‌های مورد مطالعه در محیط TSB حاوی50 میکروگرم در میلی‌لیتر ال- تریپتوفان نشان داد که تمامی جدایه‌ها قادر به تولید IAA بودند و در دامنه‌ای از 0/68 تا 7/63 میکروگرم در میلی‌لیتر تغییر می‌کرد. بیشترین مقدار تولید IAA مربوط به جدایه‌های 39 و 40 با مقادیر به ترتیب 7/52 و 7/63 میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و کمترین آن مربوط به جدایه 15 با مقدار 0/68 میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. نتایج بررسی جدایه‌ها از نظر توان مصرف ACC به‌عنوان تنها منبع نیتروژن نشان داد که از میان 52 جدایه سودوموناس فلورسنت، تعداد 32 جدایه قادر به استفاده از ACC به‌عنوان تنها منبع نیتروژن بودند. رشد قابل ملاحظه این جدایه‌ها در محیط DF حاوی ACC در مقایسه با DF به عنوان شاهد منفی می‌تواند حاکی از این باشد که این جدایه‌ها با دارا بودن آنزیم ACC دآمیناز توانسته‌اند ACC را هیدرولیز و از آن به‌عنوان منبع نیتروژن استفاده کنند (Jacobson *et al.*, 1994). نتایج حاصل از آزمون توان حل فسفات‌های معدنی در محیط کشت مایع Sperber نشان داد که همه‌ی جدایه‌های مورد مطالعه توانایی آزاد کردن فسفر از تری‌کلسیم فسفات موجود در محیط کشت را داشتند. بیشترین مقدار فسفر حل شده در محیط کشت حاوی تری‌کلسیم فسفات مربوط به جدایه‌های 52، 6 و 32 (به ترتیب 505/75 و 503/17 و 502/35 میلی‌گرم در لیتر) و کمترین مقدار متعلق به جدایه‌های 26 و 46 (به ترتیب 213/73 و 220/83 میلی‌گرم در لیتر) بود. هم‌چنین مقایسه pH سوسپانسیون‌های باکتری نشان داد که در جدایه 52 که بیشترین توان حل‌کنندگی را داشت pH از 7/2 به 3/58 و در جدایه 26 با کمترین توان حل کنندگی، pH از 7/2 به 4/88 کاهش یافته بود. نتایج حاصل از آزمون توان تولید سیدروفور نشان داد به جزء جدایه‌های 26 و 46 سایر جدایه‌های مورد مطالعه توانایی تولید سیدروفور را داشتند و بیشترین مقدار تولید سیدروفور مربوط به جدایه‌های 14 و 24 بودند.

منابع

Alexander DB and Zuberer DA, 1991. Use of chrome azurol s reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. Biol. Fert. Soils 12:39-45.

Bartel B, 1997. Auxin biosynthesis. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48:51-66.

Benet E, Tuzan S, Chanway CP and Enebak S, 2001. Alteration in plant growth and in root hormone levels of lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. Can. J. Microbiol. 47:793-800.

Bossis E, Lemenceau P, Latour X and Gardan L, 2000. The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. Agron. J. 20:51-63.

Glick BR, 1995. The enhancement of plant growth by free-Living bacteria. Can. J. Microbiol. 41:109-117.

Jacobson CB, Pasternak JJ and Glick BR, 1994. Partial purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the plant growth promoting rhizobaterium *Pseudomonas putida* GR12-2. Can. J. Microbial 40:1019-1025.

Sperber JI, 1958. The incidence of apatite solubilizing organisms in the rhizospher. Aust. J. Agric. Res 9:778-781.