بررسی توان انحلال فسفات های نامحلول و تولید سیدروفور توسط باکتری های *Pseudomonas fluorescens* متحمل به خشکی

رخساره خلیلی[1*] ، حسینعلی علیخانی[2]، مهدی زارعی[3] ، عاطفه اسماعیلی[4] و لیلا محمدی[5]

1 و4- دانشجویان کارشناسی ارشد گروه مهندسی علوم خاک دانشکده فناوری و مهندسی کشاورزی دانشگاه تهران

2- دانشیار گروه مهندسی علوم خاک دانشکده فناوری و مهندسی کشاورزی دانشگاه تهران

3- استادیار بخش علوم خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

5- کارشناس گروه مهندسی علوم خاک دانشکده فناوری و مهندسی کشاورزی دانشگاه تهران

*E-mail : rokhsareh_khalili@ yahoo.com

چکیده

در این تحقیق به منظور بررسی توان انحلال فسفات معدنی و تولید سیدروفور باکتری های *Pseudomonas fluorescens* متحمل به خشکی ابتدا میزان تحمل به خشکی 55 جدایه *Pseudomonas fluorescens* مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس 6 جدایه که نسبت به سایر جدایه ها دارای بیشترین میزان تحمل به خشکی بودند انتخاب و از نظر توان انحلال فسفات معدنی و تولید سیدروفور بر اساس نسبت قطر هاله به کلنی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل نشان داد که تمام جدایه های متحمل به خشکی دارای توان انحلال فسفات معدنی و تولید سیدروفور بودند.

کلمات کلیدی: ***Pseudomonas fluorescens***، توان انحلال فسفات، توان تولید سیدروفور، متحمل به خشکی

مقدمه

باکتری های جنس *Pseudomonas* گرم منفی، میله ای شکل، هوازی، متحرک (به وسیله تاژک های قطبی)، کموارگانوتروف و کاتالاز مثبت می باشند. باکتری های این جنس احتیاجات غذایی ساده ای دارند. در محیط های کشت با مقادیر مناسبی از مواد آلی و pH خنثی و در محدوده دماهای مزوفیلی رشد می کنند. با کتری های جنس *Pseudomonas* می توانند رنگدانه های محلول در آب تولید کنند و آن را در محیط کشت منتشر نمایند. دو نوع از رنگدانه های سنتز شده توسط این گروه شامل رنگدانه های فلورسنت[1] و رنگدانه های غیر فلورسنت یا پیووردین ها هستند که براین اساس گونه های یک جنس در دو گروه *Pseudomonas fluorescen*t و *Pseudomonas non-fluorescent* قرار می گیرند(Euzeby, 2008).

در میان باکتری های محرک رشد گیاه باکتری های جنس *Pseudomonas* به دلیل توزیع گسترده آن ها در خاک ، توانایی کلونیزاسیون فراریشه بسیاری از گیاهان و تولید طیف متنوعی از متابولیت از اهمیت ویژه ای برخوردارند. *Pseudomonas fluorescens* به علت فعالیت های گوناگون اش از باکتری های فراریشه ای مهم محرک رشد گیاه می باشد (Suresh et al., 2010). این باکتری ها دارای طیف گسترده ای از صفات محرک رشد گیاهی مانند تولید هورمون اکسین (Patten and Glick, 1996) ، تولید آنزیم کیتیناز (Ajit et al., 2006) و ACC- دآمیناز[2]

1- Flourescent pigments

2- 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase

(Pentos et al., 2003) ، توان حل کنندگی فسفات (Rashid et al., 2004) ، تولید متابولیت هایی چون سـیدروفور (Mayer, 2000) ، سالیسیلیک اسـید (Maurhofer et al., 1998) و سـیانید هیـدروژن (Schippers et al., 1990) می باشند که به طور مستقیم یا غیر مستقیم باعث افزایش رشد گیاه می گردند.

مواد و روشها

به منظور ارزیابی میزان تحمل جدایه ها به سطوح مختلف خشکی از توان رشد آنها در محیط کشت NB حاوی مقادیر 0 ،298/587-،438/40 ،548/838 گرم پلی اتیلن گلیکول 6000 به ازای هر لیتر محیط کشت NB استفاده شد. پتانسیل های آبی سطوح فوق برابر 0، 10- ، 20- و 30- بار می باشد که بر اساس معادله Michel و Kaufman (1973) محاسبه شده اند. توان رشد جدایه ها در هر یک از سطوح خشکی (0، 10- ، 20- و 30- بار) به طور جداگانه و با سه تکرار بررسی شد. قبل از سنجش توان رشد جدایه ها در هر یک از سطوح خشکی ابتدا عمل یکسان سازی تعداد سلول جدایه ها انجام گرفت. مقدار 1000 میکرولیتر از سوسپانسیون جدایه ها با جمعیت تنظیم شده (cfu/ml 108×1) به ارلن های حاوی محیط کشت NB+PEG (با سطوح مختلف خشکی) تلقیح شد. میزان رشد جدایه ها در سطوح مختلف خشکی پس از 24 ساعت با اندازه گیری چگالی نوری(OD) محیط رشد آنها در طول موج 600 نانومتر، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین شد.

برای اندازه گیری نیمه کمی توان جدایه ها در انحلال فسفات های نامحلول معدنی از محیط کشت اسپربر حاوی نمک تری کلسیم فسفات ($Ca_3(PO_4)$ استفاده شد (Sperber, 1958). مایه زنی با استفاده از روش قطره گذاری و در سه تکرار (در سه پلیت جداگانه) برای هر جدایه انجام گرفت. جدایه ها در انکوباتور در دمای 28 درجه سانتی گراد نگهداری شدند. بعد از مدت 3، 6 و 12 روز قطر کلنی ها و قطر هاله اطراف آنها در هر تکرار اندازه گیری شد و متوسط سه تکرار برای هر باکتری محاسبه گردید. ظهور هاله ای شفاف در اطراف کلنی درون پلیت بیانگر توان انحلال فسفات های نامحلول معدنی می باشد.

آزمون توان تولید سیدروفور توسط جدایه ها با استفاده از روش پیشنهادی Schwyn و Nielands (1987) و بر اساس استفاده از محیط کشت پایه ای به نام کروم آزول- اس (CAS) صورت گرفت. مایه زنی با استفاده از روش قطره گذاری و در سه تکرار (در سه پلیت جداگانه) برای هر جدایه انجام گرفت. در فواصل زمانی 2، 4 و 9 روز پس از مایه زنی نسبت قطر هاله به قطر کلنی (HD/CD) برای هر باکتری محاسبه شد. هاله ی نارنجی رنگ اطراف کلنی ها نشان دهنده ی توان تولید سیدروفور بود.

نتایج و بحث

بر اساس جدول تجزیه واریانس، تفاوت جدایه ها از نظر میزان رشد (OD 600nm) در سطوح مختلف پلی اتیلن گلیکول و نیز از نظر میزان کاهش رشد[1] نسبت به شاهد در سطوح مختلف پلی اتیلن گلیکول در سطح 0/1 درصد معنی دار بود. تمام جدایه ها در سطح 10- بار، 92/72 درصد از جدایه ها در سطح 20- بار و 14/55 درصد از جدایه ها در سطح 30- بار قادر به رشد بودند. با افزایش میزان پلی اتیلن گلیکول مصرفی میزان رشد جدایه ها به طور معنی

[1]Reduced Percent =RP

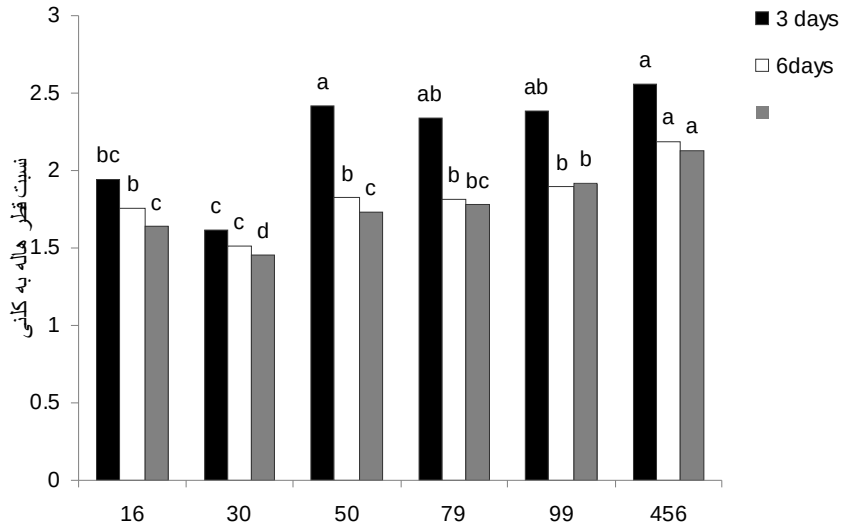
داری کاهش یافت. جدایه 79 در مقایسه با سایر جدایه ها از بیشترین تحمل به خشکی برخورداربود (جدول 1).

جدول 1- مقایسه میانگین وضعیت رشد (OD 600nm) و میزان کاهش رشد (RP) جدایه ها در سطوح مختلف PEG برای آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح 5%.

شماره جدایه	OD & RP	سطوح مختلف پلی اتیلن گلیکول			
		0 (شاهد)	10- بار	20- بار	30- بار
30	OD	1/374 a	0/846a	0/218d	0/120f
	RP	0	38/34e	84/03a	91/26a
16	OD	1/361 ab	0/737 bc	0/582 a	0/150 f
	RP	0	45/62 cde	56/72b	88/91 ab
456	OD	1/358 ab	0/728 bc	0/147 e	0/153 f
	RP	0	46/38 cde	89/15 a	88/70ab
99	OD	1/183ab	0/718 c	0/472c	0/193e
	RP	0	39/26 e	60/05b	83/83cd
50	OD	1/196ab	0/502e	0/530abc	0/258cd
	RP	0	57/98 ab	55/64b	78/41e
79	OD	1/259ab	0/479 e	0/552ab	0/329a
	RP	0	61/38ab	55/42b	73/35f

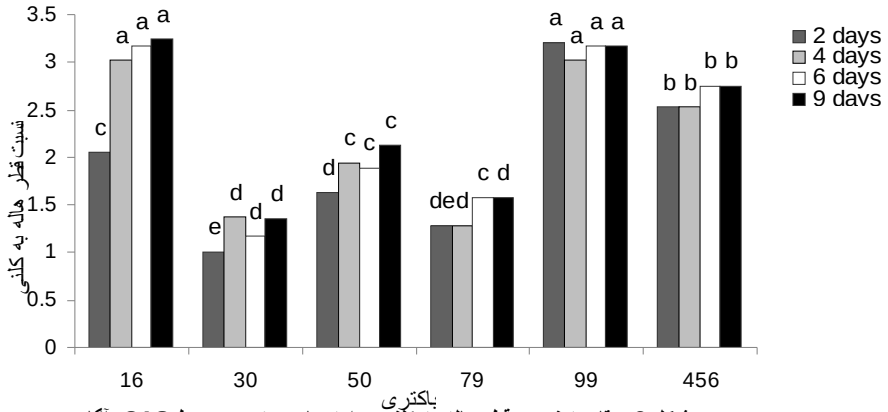
میانگین های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک، فاقد اختلاف معنی دار می باشند.

تعداد 6 جدایه *Pseudomonas fluorescens* که دارای بیشترین میزان رشد در سطح 30- بار بودند به عنوان متحمل ترین جدایه ها به خشکی انتخاب شدند و از نظر توان انحلال فسفات معدنی در محیط کشت اسپربر و نیز توان تولید سیدروفور در محیط CAS آگار مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس جدول تجزیه واریانس، 6 جدایه *Pseudomonas fluorescens* متحمل به خشکی از نظر توان انحلال فسفات معدنی دارای اختلاف معنی داری در سطح 0/1 درصد بودند. مقایسه میانگین نسبت قطر هاله به کلنی در جدایه های متحمل به خشکی نشان داد که بیشترین توان حل کنندگی فسفات معدنی با نسبت قطر هاله به کلنی 2/31 مربوط به جدایه 456می باشد (شکل 1).



شکل 1- مقایسه نسبت قطر هاله به کلنی جدایه های متحمل به خشکی در محیط اسپربر معدنی

Ahmad و همکاران (2005) 72 جدایه از باکتری های مختلف ریزوسفری را مورد بررسی قرار دادند که بیش از 80 درصد از باکتری های جنس *Bacillus* و 55/5 درصد از باکتری های جنس *Pseudomonas* ، حل کننده فسفات بودند. بر اساس جدول تجزیه واریانس، تفاوت 6 جدایه متحمل به خشکی از نظر توان تولید سیدروفور بر اساس شاخص نسبت قطر هاله به قطر کلنی در سطح 0/1 درصد معنی دار شد. بر اساس نتایج حاصله، جدایه شماره 16 با نسبت قطر هاله به کلنی برابر 3/24، پس از 9 روز از عمل مایه زنی روی محیط CAS- آگار بیشترین توان تولید سیدروفور را نسبت به سایر جدایه ها داشت (شکل 2).



شکل 2- مقایسه نسبت قطر هاله به کلنی جدایه های برتر در محیط CAS- آگار

نتیجه‌گیری

تمام جدایه های *Pseudomonas fluorescens* متحمل به خشکی دارای توان حل فسفات معدنی و تولید سیدروفور بودند.

منابع

Ahmad F, Ahmad I and Sahir Khan M, 2005. Indolacetic acid production by indigenous isolates of azotobacter and fluorescent pseudomonas in the presence and absence of tryptophan. Turkey Journal Biobiology 29:29-34.

Ajit NS, Verma R and Shanmugan V, 2006. Extracellular chitinas of fluorescent Pseudomonase antifungal to Fusarium oxysporum f.sp. dianti causing carnation wilt. Curr. Microbiol 52:310-316.

Euzeby JP, 2008. List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. URL: www. bacterio.cict.fr/.

Meyer DM, 2000. Pyoverdins: Pigments siderophores and potential taxanomic markers of fluorescent Pseudomonas Species. Arch Microbiol 174:135-142.

Patten CL and Glick BR, 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. Canadian Journal Microbiol 42:207-220.

Penrose DM and Glick BR, 2003. Methods for Isolating and characterizing ACC deaminase-containing Plant growth- promoting rhizobacteria Physiol Plant 118: 10-15.

Rashid M, Khalil S, Ayub N, Alma S and Latif F, 2004. Organic Acids Productions Solubilization by Phosphate Solubilizing microorganisms (PSM) under in vitro conditions. Pakestan Journal Soil Science 7:187-196.

Schippers B, Bakker AW, Bakker PAHM and Vanpeer R, 1990. Beneficial and deleterious of HCN Production Pseudomonas on rhizosphere interaction. Plant Soi 129:75-83.

Suresh A, Pallavi P, Srinivas P, Praveen Kumar V, Chandra SJ and Ram Reddy S, 2010. Plant growth promoting activities of fluorescent pseudomonads associated with some crop plants. African Journal of Microbiology Research 4(14):1491-1494.