دوازدهمین کنگره علوم خاک ایران
تبریز، 12 الی 14 شهریور 1390
(بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک)

جداسازی و شناسایی جدایه‌های سودوموناس فلورسنت از ریزوسفر سویا و ارزیابی توان تولید سیدروفور و حلالیت فسفات معدنی آن‌ها

مرضیه مقامی[1]، محسن علمایی[2]، میرحسن رسولی‌صدقیانی[3]،اسماعیل دردی پور[2]

1- دانشجوی کارشناسی ارشد بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

2- استادیار گروه خاکشناسی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

3- استادیار گروه علوم خاک دانشگاه ارومیه

maghami.marzieh@yahoo.com

چکیده

این تحقیق با هدف جداسازی باکتری‌های تولید کننده سیدروفور از گونه‌های *Pseudomonas fluorescens* و نیز ارزیابی توان حلالیت فسفات معدنی نامحلول انجام گرفت. به این منظور 30 جدایه سودوموناس فلورسنت از مزارع سویا در استان گلستان جداسازی شدند. توان تولید سیدروفور جدایه‌ها با استفاده از محیط CAS-Agar بطور نیمه‌کمی مورد ارزیابی قرار گرفت که بهترین‌جدایه، جدایه P1/15 با متوسط نسبت قطر هاله به کلنی 3/10 میلی‌متر در روز بود. توان حلالیت فسفات معدنی جدایه‌ها با استفاده از محیط پیکوفسکی (PKV) مایع انجام گرفت، که جدایه P2/7 با حلالیت 44/28 میلی‌گرم در لیتر بیشترین میزان حلالیت را داشت.

کلمات کلیدی: باکتری‌های حل کننده فسفات (PSB)[1]، ریزوباکترهای محرک رشد گیاه(PGPR)[2]، سودوموناس فلورسنت، سیدروفور

مقدمه

ریزوسفر به لایه‌ی نازک یک الی دو میلی‌متری خاک اطراف ریشه اطلاق می‌شود که بسته به شکل هندسی ریشه‌ی گیاهان بخش قابل ملاحظه‌ای (در حدود 5 تا 40 درصد) از خاک موجود در اطراف سیستم ریشه‌ای یک گیاه را تشکیل می‌دهد. باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه به انواع باکتری‌های مفید در این ناحیه اطلاق می‌گردد (Alexander and Zuberer, 1993). باکتری‌های سودوموناس از سری باکتری‌های محرک رشد (PGPR) هستند که به عنوان یک کنترل‌کننده بیولوژیکی نیز عمل می‌کنند. وجه تمایز سودوموناس‌های فلورسنت، تولید پیگمان‌هایی است که در برابر نور فرابنفش (245 نانومتر) و بویژه در شرایط کمبود آهن، خاصیت فلورسنس دارند. این

[1] - Phosphate solubilizing bacteria
2- Plant growth-promoting rhizobacteria

باکتری‌ها با خاصیت فلورسنت از گروه باکتری‌های تولید کننده سیدروفورها هستند. سیدروفورها ترکیبات کلات آهن با وزن ملکولی کم هستند (کمتر از 1000 دالتون) که توسط باکتری‌ها و قارچها برای مقابله با کمبود آهن تولید می‌شوند (Hofte *et al*, 1991). باکتری‌های جنس سودوموناس ها از دسته باکتری‌هایی هستند که توانایی انحلال فسفات معدنی را نیز دارا می‌باشند. میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات به گروهی از میکروارگانیسم‌ها اطلاق می‌گردد که قادرند از طریق مکانیسم‌هایی چون ترشح اسیدهای آلی سبب آزادسازی فسفر از ترکیبات نامحلول معدنی خاک گردند (Rodriguez *et al*, 1999).

مواد و روش‌ها

به منظور جداسازی سودوموناس‌های فلورسنت، 15 مزرعه سویا در سطح استان گلستان انتخاب شد که از هر مزرعه حداقل 3 بوته به‌طور تصادفی به آزمایشگاه انتقال داده شد. سپس 10 گرم خاک فریشه‌ای به همراه ریشه به ارلن‌های حاوی 90 میلی‌لیتر محلول بافر منتقل گردید. سپس مخلوط به مدت 30 دقیقه روی دستگاه شیکر با سرعت 150 دور در دقیقه قرار داده شد و پس از آن‌که سوسپانسیون چند دقیقه به حالت سکون گذاشته شد از محلول رویی یک میلی-لیتر به لوله‌های آزمایش حاوی 9 میلی‌لیتر محلول 0/1 درصد پیتون سترون اضافه کرده و عمل رقت‌سازی را تا رقت 10^{-6} ادامه داده. سپس 0/1 میلی‌لیتر از سه‌رقت آخر را با در نظرگرفتن سه تکرار برای هرتیمار با استفاده از روش کشت پخش سطحی برروی محیط جامد king B کشت گردید. ظروف کشت به مدت 48 ساعت در دمای 28 درجه سانتی‌گراد داخل انکوباتور قرار داده شدند و پس از این مدت اقدام به جداسازی پرگنه‌هایی گردید که در برابر لامپ UV خاصیت فلورسنتس نشان می‌دهند، بدین منظور با تاباندن لامپ UV دستی بر روی ظرف پتری کشت-شده پرگنه‌هایی که دارای پرتوافشانی واضح‌تری بودند را انتخاب کرده و سپس از هر پرگنه یک حلقه برداشته و روی محیط king B به روش خطی توزیع گردید و تک کلنی‌های با پرتوافشانی در زیر تابش لامپ UV را به‌عنوان باکتری خالص بر روی محیط king B ذخیره نموده و به منظور اطمینان بیشتر، جدایه‌های مذکور از نظر شکل ظاهری، تحرک در محیط نیمه جامد، آزمون‌های گرم، اکسیداز و کاتالاز مورد ارزیابی قرار گرفتند (رسولی صدقیانی و همکاران 1384).

به‌منظور برآورد توانایی تولید سیدروفور، از محیط کشت CAS-blue agar استفاده شد. برای تهیه‌ی این محیط بر اساس روش اصلاح شده‌ی Alexander و Zuberer (1991) چهار محلول شامل: محلول معرف Fe-CAS، محلول بافر محلول غذایی و محلول کازآمینواسید بطور مجزا تهیه، و سپس باهم مخلوط شدند. پلیت‌های حاوی محیط CAS- Agar پس از انجماد با تیغ استریل به چهار قسمت مساوی تقسیم شدند و از سوسپانسیون تازه جدایه‌ها با جمعیت (49×10^9 CFU/ml) به اندازه‌ی 5 میکرولیتر در وسط هر قسمت با روش قطره‌گذاری تلقیح شدند. توانایی تولید سیدروفور از روی تغییر رنگ آبی به نارنجی و با اندازه‌گیری قطر هاله نسبت به قطر کلنی تشکیل شده در فواصل زمانی 24، 48 و 72 ساعت ارزیابی گردید (Alexander and Zuberer, 1993) میانگین این مقایسات در جدول 1 آمده است. به‌منظور اندازه گیری میزان حلالیت فسفر در محیط مایع، 50 میکرولیتر از سوسپانسیون تازه باکتری به 25 میلی‌لیتر محیط PKV بر حسب گرم در لیتر شامل (glucose=10، $(NH_4)_2 SO_4$=0/5، NaCl=۰/2، KCl=0/2، $MgSO_4.7H_2O$=0/1، $MnSO_4.7H_2O$=0/5، $FeSO_4.7H_2O$=0/5، yeast extract=0/5) منتقل گردید. سپس نمونه‌ها به مدت 120 ساعت بر روی شیکر با سرعت 120 دور در دقیقه و دمای 28 درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس سوسپانسیون باکتری سانتریفیوژ (دور 10000 به مدت 10 دقیقه) و یک میلی‌لیتر از محلول رویی با 3 میلی‌لیتر آب مقطر و 1 میلی‌لیتر معرف آمونیوم مولیبدات وانادات مخلوط گردید. بعد از گذشت 20

دقیقه از زمان انکوباسیون نمونه‌ها در دمای آزمایشگاه، میزان جذب نور با استفاده از اسپکتروفتومتر در 470 نانومتر قرائت شد. میزان حلالیت فسفر توسط باکتری با مقایسه این جذب با منحنی استاندارد تهیه شده از غلظت‌های مختلف KH_2PO_4 محاسبه گردید (Jeon *et al*, 2003). آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن انجام گردید.

.جدول 1: میانگین میزان تولید سیدروفور و حلالیت فسفات معدنی سودوموناس‌های فلورسنت

نام جدایه	قطر هاله به قطرکلنی(mm)			حلالیت فسفات (mg/lit)	نام جدایه	قطر هاله به قطر کلنی(mm)			حلالیت فسفات (mg/lit)
	24ساعت	48 ساعت	72 ساعت			24 ساعت	48 ساعت	72 ساعت	
P1/1	۲/۱۵ k	۲/۲۶ k	۲/۳۷ fgh	۳۵/۶۵ b	P5/1	۲/۴۴ fgh	۲/۵۹ fg	۲/۳۶ fgh	۱۸/۰۰ efg
P1/4	۳/۰۱ ab	۳/۰۴ ab	۲/۸۵ bc	۱۹/۳۹ efg	P5/2	۲/۲۴ ijk	۲/۲۶ k	۲/۳۲ fghi	۱۷/۸۷ fg
P1/9	۱/۵ m	۱/۷۳ m	۱/۴۸ no	۱۶/۴۷ gh	P5/3	۲/۳۲ hij	۲/۴۹ ghi	۲/۴۰ fg	۱۹/۸۷ efg
P1/15	۲/۹۹ b	۳/۱۸ a	۳/۱۵ a	۱۶/۲۳ gh	P5/4	۲/۲۵ ijk	۲/۳۴ ijk	۲/۳۳ fghi	۱۸/۵۲ efg
P1/19	۲/۶۹ dc	۳ bc	۲/۹۲ b	۱۲/۲۹ i	P10/1	۲/۳۱ hij	۲/۴۴ ghij	۲/۳۶ fgh	۱۶/۵۸ gh
P2/1	۲/۴۵ efgh	۲/۳ jk	۲/۱۳ ij	۳۵/۰۶ b	P10/2	۲/۵۲ ef	۲/۷۱ ef	۲/۶۲ de	۲۲/۲۷ ef
P2/4	۲/۱۷ jk	۲/۴ hijk	۲/۰۳ jk	۲۹/۷۷ cd	P10/3	۱/۵۱ m	۱/۶۸ m	۱/۵۸ nm	۱۶/۷۶ gh
P2/7	۳/۱۴ ab	۳ bc	۲/۷۴ bcd	۴۴/۲۸ a	P10/4	۱/۴۷ m	۱/۵۱ no	۱/۴۳ no	۱۹/۹۴ efg
P3/1	۲/۷۸ c	۳/۱۴ a	۳/۱۲ a	۱۹/۷۹ efg	P10/5	۲/۳۱ hij	۲/۵۲ gh	۲/۴۳ fg	۱۷/۶۳ gh
P3/2	۳/۱۵ a	۲/۹۹ bc	۲/۳۸ fgh	۲۸/۴۲ d	P11/1	۱/۵ m	۱/۳۹ o	۱/۲۹ o	۱۲/۰۷ i
P3/3	۱/۷۲ l	۱/۹۱ l	۱/۸۷ kl	۲۰/۲۵ efg	P11/4	۳/۰۲ ab	۲/۸۷ cd	۲/۶۷ d	۲۰/۵۵ efg
P3/4	۲/۳۴ ghi	۲/۳۴ ijk	۲/۲۱ ghij	۱۸/۲۲ efg	P13/2	۲/۴۸ efg	۲/۸۱ de	۲/۱۸ hij	۳۲/۷۳ bc
P4/1	۲/۳۰ hij	۲/۳۱ jk	۲/۲۶ fghi	۲۲/۳۲ e	P13/3	۳/۰۰b	۳/۰۶ ab	۳/۱۱ a	۳۳/۱۷ b
P4/7	۲/۴۳ fgh	۲/۴ hijk	۲/۲۲ ghij	۱۳/۴۷ h	P13/6	۲/۳۳ ghi	۲/۴۷ghi	۲/۴۷ ef	۱۶/۷۶ gh
P4/12	۱/۵۴ m	۱/۶۳ mn	۱/۷ lm	۱۶/۴۱ gh	P13/9	۲/۵۹ de	۲/۵۵ gh	۲/۲۳ ghij	۳۰/۶۶ cd

در هر ستون میانگین‌های دارای حروف یکسان اختلاف معنی‌داری ندارند.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که هر دو آزمون میزان تولید سیدروفور و میزان حلالیت فسفات معدنی در 30 جدایه مورد آزمایش در سطح 5 درصد معنی‌دار بوده است. از میان جدایه‌های مورد آزمایش، جدایه‌ی P15/1 با متوسط نسبت قطر هاله به قطرکلنی 3/10 بیشترین و جدایه‌ی P11/1 با نسبت قطر هاله به کلنی 1/39 کمترین

تولید سیدروفور را داشتند (جدول 1). نتایج حاصل از آزمون تولید سیدروفور نشان می‌دهد سویه‌های سودوموناس فلورسنت مورد استفاده در این بررسی قابلیت نسبتا خوبی در تولید سیدروفور دارند که با نتایج سایر پژوهشگران نظیر رسولی‌صدقیانی و همکاران (1384) مطابقت داشت. هاله اطراف کلنی همه‌ی سویه‌های مورد استفاده در این تحقیق نارنجی تا نارنجی مایل به قرمز می‌باشد. در تحقیقی Milagres و همکاران (2003) بیان داشتند که در محیط CAS-Agar سیدروفورهای منوهیدروکسامات و تری هیدروکسامات به ترتیب رنگ نارنجی مایل به قرمز و نارنجی ایجاد می‌کنند، در حالی که کمپلکس‌های کاتکولی موجب تغییر رنگ محیط از آبی به ارغوانی تا قرمز مایل به ارغوانی می‌گردند. با استناد به گزارشات مذکور، می‌توان گفت که اکثر سیدروفورهای تولید شده توسط سویه‌های سودوموناس فلورسنت مورد بررسی از نوع هیدروکسامات باشند. بیشترین مقدار حلالیت فسفر نیز مربوط به جدایه‌ی P2/7 با حلالیت 44/28 میلی‌گرم در لیتر و کمترین مربوط به جدایه‌ی P11/1 با حلالیت 12/07 میلی گرم در لیتر بود (جدول1). توانایی انحلال فسفات در محیط به عوامل مختلفی بستگی دارد که از آن جمله می‌توان به نوع و مقدار اسیدهای آلی، نوع منبع کربنی مورد استفاده میکروارگانیسم‌ها، نوع منبع فسفاته (مینرالوژی و ترکیب شیمیایی منبع فسفاته)، سایر عناصر مانند فلزات سنگین و نوع محیط کشت اشاره نمود. تمامی این عوامل قادر هستند پتانسیل انحلال فسفات در میکروارگانیسم‌ها را تحت تاثیر قرار دهند (Milagres *et al*, 2003). به طور کلی وجود مقادیر زیاد فسفر در خاک‌های آهکی و عدم دسترسی آن از مشکلات خاک های کشور ما می‌باشد. با استفاده از کودهای بیولوژیک می‌توان با افزایش حلالیت فسفر معدنی، مقدار قابلیت در دسترسی آن را افزایش داد.

منابع

1- رسولی‌صدقیانی ح، خاوازی ک، رحیمیان ح ، ملکوتی م ج و اسدی رحمانی ه، 1384. ارزیابی توان سویه-های بومی سودوموناس‌های فلورسنت ریزوسفر گندم برای تولید سیدروفور، مجله خاک و آب، جلد 19، شماره 2. صفحه‌های 133 تا 143.

2- Alexander D B, Zuberer D A, 1993. Responses by iron-efficient oat cultivation with siderophore- producing bacteria in a calcareous soil. Biol Fert soils 16:118-124.

3- Boopathi E, Rao K S. 1999. A siderophore from *Pseudomonas putida* type A1: Structural and biological characterization. Biochimica et Biophysica Acta 1435:30-40.

4- Hofte M, Seong K Y, Jurkevitch E, and Verstraete W. 1991. Pyoverdin production by the plant growth beneficial *Pseudomonas* strain $7SNK_2$: Ecological significance in soil. Plant soil 130:249-257.

5- Jeon JS, Lee SS, Kim HY, Ahn TS and Song HG.2003. Plant growth promoting in soil by some inoculated microorganism. J. Microbiol 41: 271-276.

6- Milagres A. M.F and Machuca A. and Napoleao D. 2003. Use of CAS-agar plate modified to study the effect of different variables on the siderophore production by *Aspergillus.* Appl Microbiol 36: 177-181.

7- Rodriguez H and Fraga R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotech adv 17: 319-339.