بررسی تنوع و جمعیت سودوموناس‌های فلورسنت در برخی از خاکهای ایران

میرحسن رسولی صدقیانی، حشمت اله رحیمیان، کاظم خاوازی، محمدجعفرملکوتی وهادی اسدی

به ترتیب دانشجوی دکتری خاکشناسی دانشگاه تربیت مدرس، استاد دانشگاه مازندران، عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات خاک وآب، استاد دانشگاه تربیت مدرس و عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات خاک وآب

مقدمه

ریزوسفر به لایه نازکی از خاک اطراف ریشه اطلاق می‌شود که موجودات زنده آن ناحیه از نظر کمی وکیفی تحت تاثیر فعالیت‌های ریشه (نظیر تنفس و ترشحات ریشه‌ای) قرار دارند. باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه (PGPR) به انواع باکتری‌های مفید مستقر در این ناحیه اطلاق می‌گردد(Kloepper و Schroth, ۱۹۷۸). این باکتری‌ها به دو صورت "مستقیم" یعنی تحریک رشد گیاه از طریق مکانیسم‌های تغذیه‌ای وفیزیولوژیکی مانند تولید هورمون, حل‌کنندگی فسفات, تسریع فرآیند معدنی‌شدن و یا "غیرمستقیم" یعنی کنترل عوامل بیماری‌زا از طریق تولید ترکیبات مختلف مانند سیانید, سیدروفور, متابولیت‌های ضدقارچ و آنتی‌بیوتیک‌ها به رشد بهتر گیاه کمک می‌کنند. سودوموناس های فلورسنت از مهمترین جامعه میکروبی ریزوسفر بشمار می روند و وجه تمایز آنها از سایر سودوموناس‌ها، تولید پیگمان هایی است که در برابر نور طول موج کوتاه فرابنفش (۲۵۴ نانومتر) بویژه در شرایط کمبود آهن خاصیت فلورسانس دارند. به این پیگمان‌های با خاصیت فلورسنت و محلول در آب سیدروفور(siderophore) و اختصاصاً در مورد سودوموناس‌ها پیووردین یا سودوباکتین گفته می‌شود. برای افتراق گونه‌های فلورسنت پاتوژن‌های گیاهی از سایر فلورسنت‌ها، از آزمون آرژینین‌دی‌هیدرولاز استفاده می‌شود که پاتوژن‌های گیاهی آرژینین‌دی‌هیدرولاز منفی می‌باشند(Hendricks و همکاران، ۲۰۰۱). سویه‌های گونه P. putida از نظر آزمون‌های ذوب ژلاتین، استفاده از قند ترهالوز، رشد در دماهای ۴۱ و ۴ درجه سانتی‌گراد به‌ترتیب منفی، منفی و مثبت هستند. سویه‌های گونه P. fluorescens از نظر آزمون‌های ذوب ژلاتین، استفاده از قند ترهالوز، رشد در دماهای ۴۱ و ۴ درجه سانتی‌گراد به‌ترتیب مثبت، مثبت، منفی و مثبت می‌باشند (Bossis و همکاران، ۲۰۰۰). این تحقیق به منظور جداسازی و شناسایی سویه‌های بومی سودوموناس‌های فلورسنت از ریزوسفر گندم مناطق مختلف کشور انجام گردید. این در حالی است که اطلاع دقیقی از فراوانی، گونه‌های غالب و وضعیت استقرار آنها بر روی ریشه گندم وجود ندارد.

مواد روش‌ها

به منظور جداسازی و ارزیابی جمعیت باکتری‌های سودوموناس، تعداد ۵۲ نمونه مرکب خاک ریزوسفری در مرحله پنجه‌دهی گندم از مزارع استان‌های آذربایجان شرقی، آذربایجانغربی، زنجان، همدان، کرمانشاه، فارس، تهران، خراسان، کردستان و یزد تهیه گردید. تعیین جمعیت باکتری‌های سودوموناس با استفاده از روش شمارش کلنی انجام شد. برای تهیه رقت‌های ده‌تایی از محلول بافر فسفات (PBS) با pH= ۷/۲ و محیط کشت KingB استفاده گردید. پس از ۲۴ الی ۴۸ ساعت رشد در دمای ۲۸°C پلیت‌ها با استفاده از لامپ UV از نظر وجود کلونی‌های با خاصیت پرتوافشان (فلورسنس) بررسی و کلونی‌های مورد نظر شمارش شدند. به منظور اطمینان بیشتر، جدایه‌های مذکور از نظر شکل ظاهری، تحرک در محیط نیمه جامد و آزمون گرام مورد بررسی قرار گرفتند که نتایج حاکی از جداسازی سودوموناس‌های فلورسنت بود. بدین‌ترتیب تعداد ۲۱۲ جدایه انتخاب و

برای آزمایش‌های بعدی روی محیط شیبدار حاوی محیط کشت KingB و همچنین آب مقطراستریل نگهداری شدند.

به منظور بررسی تنوع طبیعی سویه‌ها از نظر پلی‌مورفیسم الگوی پروتئین‌ها، این جدایه‌ها توسط الکتروفورز پروتئین‌های محلول بر روی ژل‌پلی‌اکریل آمید(SDS-PAGE) با یکدیگر مقایسه شده و گروههای پروتئین-پلی‌مورفیک (PPT)تعیین گردیدند. الکتروفورز با استفاده از سیستم ناپیوسته لاملی (۵) روی ژل جدا کننده ۱۰٪ و لایه فشرده کننده ۵٪ پلی‌اکریل آمید به ابعاد ۱×۱۲۰×۱۵۰ میلی‌متر در شدت جریان ثابت ۱۸ میلی آمپر انجام شد.

برای ارزیابی تنوع جدایه ها از نظر قرارگرفتن در گونه‌های مختلف، از آزمایش‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی مندرج در کتاب Bergey استفاده شد. برای این منظور بر روی کلیه جدایه‌ها آزمون‌های کاتالاز، اکسیداز، تحرک در محیط نیمه جامد، آزمون ذوب ژلاتین، رشد در دمای ۴۱°C، آزمون هیدرولیز آرژی‌نین، توانایی تشکیل لوان از ساکارز، آزمون سیترات و استفاده از قندهای ترهالوز، مزواینوزیتول و گلوکز انجام گرفت. بدین‌ترتیب با استفاده از نتایج آزمایشهای میکروسکوپی و آزمونهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی شناسایی سویه‌ها تا حد گونه انجام گرفت(۲و ۵) و ایزوله های منتسب به گونه های فلورسنس، پوتیدا و آئروژینوزا تفکیک شدند.

نتایج و بحث

از کل نمونه‌های خاک ریزوسفری ارقام مختلف گندم در مناطق یاد شده، ۲۰۱ جدایه منتسب به گروه سودوموناس‌های فلورسنت جداسازی گردیدند. سویه‌های جدا شده در برابر اشعه UV ، خاصیت پرتوافشانی (فلورسانس) از خود نشان داده و به رنگ‌های سبز، آبی و زرد و با شدت‌های مختلف پرتوافشانی مشاهده گردیدند. جمعیت باکتری‌های گروه سودوموناس‌های فلورسنت در نمونه‌های مختلف متفاوت بود و تراکم جمعیت آنها از $۱/۵۱\times۱۰^{۵}$ تا $۶/۴\times۱۰^{۸}$ سلول باکتری به ازاء هر گرم نمونه (خاک ریزوسفری) متغیر بود. میانگین کل تراکم این باکتری‌ها در نمونه‌ها $۹/۶۱\times۱۰^{۷}$ سلول باکتری درگرم خاک بود. همچنین نتایج نشان داد تراکم جمعیت سودوموناس‌ها در نمونه خاک استان‌های آذربایجان‌غربی و فارس بالاتر از میانگین جمعیت و در نمونه‌های سایر استانها تراکم جمعیت پایین‌تر از میانگین بود.

مقایسه انواع پروتئین‌ها با نقش یکسان یکی از روش هایی است که به منظور ارزیابی شباهت‌ها و تفاوت‌ها در بررسی تنوع در جمعیت میکروارگانیسم‌ها بکار برده‌شده است. نتایج حاصل از بررسی جدایه‌ها از نظر الگوی پروتئین‌ها نشان ازوجود تفاوت‌ها و شباهت‌های قابل توجه در جمعیت سودوموناس‌ها داشت. تفاوت‌ها از دو نظر تعداد باندها و وزن آنها محسوس بود. نتایج گروه‌بندی خوشه‌ای (Clustering Analysis) نتایج حاصل از الکتروفورز پروتئین‌ها تفاوت‌ها و شباهت‌های محسوسی را نشان داد.کلاستر حاصله در سطح ۹۰ درصد تشابه جدایه با یکدیگر، وجود ۱۶ گروه الکتروفورزی یا پلی‌مورفیک-پروتئین را نشان داد. گروه‌ها از ۱ تا ۱۶ نامگذاری شدند. تعداد جدایه درگروه‌های مختلف متغیر و گروه الکتروفورزی ۵ بزرگترین گروه را تشکیل داد که ۱۶/۶۶ درصد جدایه‌های بررسی شده را در خود جا داد. شناسایی سویه‌ها از نظر قرار گرفتن آنها در گونه‌های مختلف فلورسنت جنس سودوموناس با استفاده از نتایج آزمون‌های میکروسکوپی، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی انجام گرفت و جدایه‌های متعلق به گونه‌های Pseudomonad fluorescens، Pseudomonas putida و Pseadomonas aeruginosa مشخص گردیدند. نتایج آزمونهای اکسیداز، کاتالاز، آرژینین‌دی‌هیدرولاز، سیترات وگلوکز در هر سه گونه مثبت بود. سویه‌های فلورسنس برخلاف پوتیدا و آئروژینوزا توانایی استفاده از تری‌هالوز و مزواینوزیتول را داشتند. ذوب ژلاتین تنها در سویه‌های پوتیدا منفی بود. تنها سویه‌های آئروژینوزا توانستند در دمای ۴۱ درجه رشد نمایند. در مرحله اول با استفاده از لامپ UV دستی، ۲۱۲ جدایه جداسازی گردیده بود که ۲۰۱ ایزوله در داخل گونه های فوق قرار گرفتند. از این جدایه‌ها ۵۲/۷۳ درصد (۱۰۶ جدایه)، ۴۴/۲۷ درصد (۸۹ جدایه) و ۳ درصد (۶ جدایه) آنها را به ترتیب گونه‌های پوتیدا، فلورسنس و آئروژینوزا تشکیل دادند. ترتیب افزایش تعداد گونه‌های مختلف سودوموناس بصورت زیر بود:

P. putida > *P. fluorescens* >> *P. aeruginosa*

بنابراین غالب سودوموناس‌های ریزوسفر گندم از گونه پوتیدا بود و شاید این غالبیت بدلیل توان رقابتی بالا و کلونیزاسیون موثر آن روی ریشه در مقایسه با سایر گونه‌ها باشد.

سودوموناس‌ها به ویژه گونه‌های پوتیدا و فلورسنس با استقرار در ریشه گیاهان از راه‌های مختلفی رشد آنها را تحریک می‌نمایند. مطالعه بیشتر این گونه‌ها از نظر تولید مواد تحریک کننده رشد گیاهی، نویدبخش افق های روشنی در افزایش و تقویت رشد گیاهان است، چه افزایش عملکرد با تلقیح بذری و خاکی بذور غلات با سویه‌های فلورسنت سودوموناس توسط محققین زیادی گزارش شده است (۳).

منابع مورد استفاده

1- Bossis. E, P., X. L Lemanceau, , and L. Gardan. 2000. The taxonomy of Pseudomonas fluorescens and Pseudomonas putida: current status and need for revision. Aronomie. 20: 51-63.

2- Hendricks, D., P. H. A. Sneath and J. G. Holt. 2001. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd Ed. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.

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

4- Kloepper, J. W. and M. N. Schroth. 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. Proceeding of the international Conference on Plant Pathogenic Bacteria, 2: 879-882

5- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.