اندازه‌گیری برخی از فاکتورهای محرک رشد باکتری‌های حل‌کننده سیلیکات و ارزیابی توانایی برخی از این باکتری‌ها در مقاومت به تنش‌های محیطی

الهام عرب عامری [۱]، سید عبدالصاحب حسین [۲]، محسن علمایی [۳]، رضا قربانی نصرآبادی [۴]، سید علیرضا موحدی نائینی [۳]
۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک دانشگاه گرگان، ۲- دانشجوی دکتری بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک دانشگاه گرگان،۳- دانشیار عضو هیئت علمی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ۴- استادیار عضو هیئت علمی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

چکیده

پتاسیم یکی از عناصر غذایی پرمصرف برای گیاهان است که نقش مهمی در رشد و توسعه آن‌ها ایفا می‌کند. در این تحقیق به‌منظور تعیین حضور و میزان کارآیی این باکتری‌ها تعداد ۱۲ نمونه از خاک‌های ریزوسفری مزارع گندم استان گلستان مورد ارزیابی قرار گرفت و تعداد ۴۴ جدایه با استفاده از محیط اختصاصی الکساندروف به عنوان باکتری‌های سیلیکاتی جداسازی شدند. براین‌اساس ۱۴ سویه از باکتری‌هایی که تاثیر بیشتری در آزادسازی پتاسیم داشتند برای تعیین خصوصیات محرک رشد باکتری و مقاومت این باکتری‌ها به تنش‌های محیطی انتخاب شدند. این خصوصیات شامل آزمون توان آزادسازی ایندول‌استیک‌اسید و توانایی تولید سیدروفور می‌باشد. همچنین مقاومت باکتری به رشد در pH های مختلف، رشد در دمای ۴ و ۴۲ درجه و توانایی رشد در تنش‌های شوری مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی‌ها نشان داد بیشترین و کمترین میزان آزادسازی ایندول‌استیک‌اسید در زمان ۹۶ ساعت ۴/۷۱ و ۶/۹ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد. بیشترین میزان تولید سیدروفور در زمان ۱۲۰ ساعت ۴۸/۳ می‌باشد. جدایه شماره ۲۸ و ۱۱ بیشترین مقاومت رشد در pHهای ۶ تا ۱۱، جدایه شماره ۲۴ بیشترین توانایی رشد در تنش شوری ۲۰ تا ۵۰ گرم در لیتر و توانایی رشد در دمای ۴ و ۴۲ درجه را داشتند.

واژگان کلیدی: باکتری‌های سیلیکاتی، ایندول‌استیک‌اسید، سیدروفور

مقدمه

لزوم دستیابی به مواد غذایی سالم و کافی برای جمعیت روز افزون جهانی ایجاب می‌کند که در کنار روش‌های شیمیایی برای افزایش تولید محصولات کشاورزی، از روش‌های بیولوژیک نیز استفاده شود. یکی از شیوه‌های بیولوژیک برای افزایش تولید محصولات کشاورزی استفاده از ریز جانداران خاکزی است. از جمله این موجودات می‌توان به باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه اشاره کرد. این گروه از باکتری‌ها در منطقه ریزوسفر از طریق سازوکارهای مختلفی باعث افزایش رشد و عملکرد گیاه می‌شوند (علیخانی و همکاران ۱۳۸۰). پتاسیم یکی از عناصر ضروری برای رشد و نمو گیاهان زراعی می‌باشد و در حفظ فعالیت آنزیم‌ها، حفظ تورژسانس سلول، افزایش فتوسنتز، کمک در انتقال قند و نشاسته، کمک در جذب نیتروژن و برای سنتز پروتئین ضروری است. علاوه بر متابولیسم گیاه، پتاسیم باعث بهبود کیفیت محصول می‌شود. زیرا پتاسیم در پر کردن دانه، وزن دانه، افزایش مقاومت به بیماری نقش داشته و علاوه بر آن منجر به افزایش مقاومت گیاه در مقابل استرس‌های محیطی می‌شود (طباطبایی ۱۳۸۸). مطالعات مختلفی اثر فرآیندهای بیولوژیکی و مواد مترشحه از ریشه گیاهان و قارچ‌ها را بر روی هوادیدگی کانی‌ها در ناحیه ریزوسفر گزارش کردند (نوروزی و خادمی ۲۰۱۰). مطالعه رضایی (۲۰۱۰) بر روی هوادیدگی کانی‌ها در ریزوسفر ذرت نشان داد که خاک توانسته است مقدار قابل توجهی از نیاز گیاه به پتاسیم را تامین نماید. گرچه کمبود پتاسیم مثل کمبود نیتروژن و فسفر گسترده نیست اما بسیاری از خاک‌ها که در ابتدا از نظر این عنصر غنی بودند به علت برداشت متوالی محصول، رواناب، آبشویی و فرسایش خاک با کمبود این عنصر مواجه شده‌اند (شنگ و هانگ ۲۰۰۲). هو و همکاران (۲۰۰۶) دو سویه از باکتری‌های آزاد کننده پتاسیم را از خاک جداسازی کرده، این دو سویه به طور معناداری قادر به آزادسازی پتاسیم از کانی پتاسیم‌دار موجود در محیط کشت الکساندروف بودند. ساگمارن و جانارتانم (۲۰۰۷) باکتری‌های آزاد کننده پتاسیم را از خاک، سنگ‌ها و نمونه‌های معدنی جداسازی کردند و تاثیر این باکتری‌ها را در آزادسازی پتاسیم از ارتوکلاز، میکروکلین و میکای مسکوویت مطالعه کردند. هان و همکاران (۲۰۰۵) تاثیر باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم و فسفر را بر رشد گیاه بادنجان بررسی کرده و باعث افزایش قابلیت استفاده پتاسیم و فسفر در خاک و بهبود رشد گیاه می‌شوند.

هدف از این تحقیق بررسی توان تولید ایندول‌استیک‌اسید و توانایی تولید سیدروفر باکتری‌های حل‌کننده سیلیکات و ارزیابی توانایی برخی از این باکتری‌ها در مقاومت به تنش‌های محیطی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش، ۲ خصوصیت از ویژگی‌های PGPR شامل توان تولید ایندول‌استیک‌اسید و توانایی تولید سیدروفور باکتری‌های حل‌کننده سیلیکات بر روی ۱۴ جدایه انتخابی مورد ارزیابی قرار گرفت.

اندازه‌گیری کمی توان تولید اسیدایندول‌استیک (IAA)

برای اندازه‌گیری کمی توانایی تولید IAA محیط کشت مایع TSB که دارای ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر L-Tryptophan به‌عنوان پیش ماده تولید اکسین است، تهیه شد و به مقدار ۲۵ میلی‌لیتر در درون ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری توزیع و استریل گردید و ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون میکروبی تازه به درون هر ارلن تلقیح گردید. درب ارلن‌ها با پنبه استریل و فویل آلومینیومی استریل مسدود شد و جداره بیرونی ارلن‌ها با نایلون سیاه رنگ پوشانده شده (به این دلیل که از تجزیه اکسین تولیدی بر اثر تابش نور جلوگیری شود) و بر روی شیکر با دور ۱۰۰ دور در دقیقه و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد ۷۲ و ۹۶ ساعت ۵/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون‌های درون هر ارلن برداشته و به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول شفاف رویی به آرامی جدا و یک میلی‌لیتر از این محلول به ۲ میلی‌لیتر معرف سالکووسکی (شامل ۹۸ میلی‌لیتر اسیدپرکلریک ۳۵درصد، ۲ میلی‌لیتر محلول ۵/۰ مولار $FeCl_3 . 6H_2O$) افزوده شد. نمونه‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفتند و در نهایت شدت رنگ تولید شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل BRITE) در طول موج ۵۳۰ نانومتر قرائت گردید. مقدار اکسین تولیدی با مقایسه شدت جذب با منحنی استاندارد تهیه‌شده از اسیدایندول‌استیک محاسبه شد.

برای رسم منحنی استاندارد اکسین، غلظت‌های ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر IAA تهیه و یک حجم از این محلول با دو حجم از معرف سالکووسکی مخلوط و خوب به‌هم‌خورده شد. پس از ۲۰ دقیقه در طول موج ۵۳۰ نانومتر قرائت انجام شد (ربیو و همکاران، ۲۰۰۰).

جدول ۱- ترکیبات محیط کشت TSA

اجزاء ترکیب	مقدار (گرم در یک لیتر)
Soy flour diagested with pepsin enzyme	۵
Hydrolize casein	۱۵
NaCl	۵

اندازه‌گیری نیمه‌کمی توان تولید سیدروفور

آزمون نیمه‌کمی توان تولید سیدروفر با استفاده از محیط کشت Cas آگار انجام گرفت. برای تهیه‌ی این محیط بر اساس روش اصلاح شده‌ی الکساندر و زوبرر (۱۹۹۳) چهار محلول به‌طور مجزا تهیه، استریل و سپس باهم مخلوط شدند.

ارزیابی توانایی باکتری در مقاومت به تنش‌های محیطی

آزمون رشد در دمای ۴۲ و ۴ درجه: در این آزمون از محیط کشت اختصاصی King B استفاده شد. به این صورت که باکتری‌های مورد نظر را با لوپ فلزی به محیط کشت مذکور تلقیح کرده و در دماهای مورد نظر در انکوباتور نگهداری شد. میزان رشد این باکتری‌ها در دماهای مذکور مورد بررسی قرار گرفت. ترکیبات موجود در محیط بر حسب گرم در لیتر شامل: ۱۰, Pepton ۵/۱ , Glycerol $K_2HPO_4$۲۰ , $MgSO_4.7H_2O$۵/۱ می‌باشد (رسولی صدقیانی و همکاران ۱۳۸۴).

آزمون رشد در pHهای مختلف: این آزمون از محیط کشت اختصاصی King B استفاده شد. برای انجام این تست محیط کشت باکتری را در pHهای ۴ تا ۱۰ تنظیم کرده، سپس باکتری‌های مورد نظر با کمک لوپ فلزی به محیط کشت مذکور تلقیح شد و پس از گرما گذاری، رشد باکتری در pHهای مورد نظر مورد بررسی قرار گرفت (subramaniam ۲۰۱۲).

آزمون رشد در تنش‌های شوری مختلف

این آزمون از محیط کشت اختصاصی King B استفاده شد. به‌این صورت که مقادیر مختلف نمک (۶۰،۵۰،۴۰،۳۰،۲۰) گرم در لیتر به محیط کشت اضافه کرده و میزان رشد باکتری‌ها در تنش‌های شوری مذکور مورد بررسی قرار گرفت (Awad Galal Osman ۲۰۰۹).

نتایج و بحث

اندازه‌گیری کمی توان تولید اسیدایندول‌استیک (IAA): در تحقیق حاضر نیز تمام جدایه‌های بومی spp Pseudomonas توانایی تولید اکسین را در محیط دارای تریپتوفان داشتند که بین جدایه‌های SPP Pseudomonas، در تولید اکسین تفاوت وجود داشت. نتایج این آزمون در جدول شماره ۲ آورده شده است. بیشترین میزان تولید اکسین در زمان ۹۶ ساعت، مربوط به جدایه ۲۴ به میزان ۴/۷۱ میلی‌گرم بر لیتر و کمترین میزان آن متعلق به جدایه ۲۸ به میزان ۶/۹ میلی‌گرم بر لیتر بود.

اندازه‌گیری نیمه‌کمی توان تولید سیدروفور

بررسی توان تولید سیدروفر در ۱۴ جدایه Pseudomonas spp نشان می‌دهد تمامی جدایه‌ها قادر به رشد در محیط CAS-Agar هستند و توانایی تولید سیدروفور را دارند. میزان تولید سیدروفور در بین سویه‌های تولیدکننده متفاوت می‌باشد. با توجه به یکسان بودن مقدار مایه تلقیح نسبت قطر هاله به کلنی می‌تواند معیار مناسبی برای مقایسه میزان تولید سیدروفور بین سویه‌ها به حساب آید. متوسط قطر هاله به کلنی در جدایه‌های مختلف در زمان ۱۲۰ ساعت اندازه‌گیری شد.

جدول ۳- اندازه‌گیری نیمه‌کمی توان تولید سیدروفور در جدایه‌های مختلف باکتری

شماره جدایه	قطر هاله	شماره جدایه	قطر هاله
۱	۲۳/۱	۲۳	۹۶/۱
۵	۵/۲	۲۴	۳۵/۲
۷	۷۸/۱	۲۵	۷۸/۱
۱۱	۴۸/۳	۲۸	۶۳/۲
۱۷	۰۱/۲	۳۹	۳۶/۱
۲۰	۶/۱	۴۰	۶۷/۱
۲۱	۷۵/۱	۴۱	۱۱/۲

با توجه به جدول شماره ۳ جدایه ۱۱ با نسبت قطر هاله به کلنی ۴۸/۳ دارای بیشترین مقدار و جدایه ۱ با نسبت قطر هاله به کلنی ۲۳/۱ دارای کمترین مقدار می‌باشد.

جدول ۲- اندازگیری کمی توان تولید اسیدایندول‌استیک در جدایه‌های مختلف باکتری

شماره جدایه	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت	شماره جدایه	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
۱	۲/۱۷	۵/۱۹	۲۳	۵/۲۲	۶/۳۰
۵	۲/۲۱	۷/۱۳	۲۴	۸/۴۱	۴/۷۱
۷	۹/۲۶	۷/۲۱	۲۵	۵/۱۱	۴/۲۵
۱۱	۷/۱۴	۴/۲۵	۲۸	۱/۵	۶/۹
۱۷	۹/۳۵	۶/۵۸	۳۹	۳/۱۷	۸/۳۰
۲۰	۴/۶	۲/۱۱	۴۰	۵/۴	۸/۱۲
۲۱	۵/۱۳	۵/۱۷	۴۱	۱/۱۶	۱/۱۴

ارزیابی توانایی باکتری در مقاومت به تنش‌های محیطی

آزمون رشد در دمای ۴ و ۴۲ درجه

دما	ایزوله شماره ۱۱	ایزوله شماره ۲۱	ایزوله شماره ۲۴	ایزوله شماره ۲۸	ایزوله شماره ۴۱
۴	++	-	++	+	-
۴۲	+	+	+++	+++	++

بدون رشد (-) رشد متوسط (++) رشد بالا (+++)

آزمون رشد در pH های مختلف

pH	ایزوله شماره ۱۱	ایزوله شماره ۲۱	ایزوله شماره ۲۴	ایزوله شماره ۲۸	ایزوله شماره ۴۱
۴	-	-	-	-	-
۵	-	-	-	-	-
۶	++	-	+	+++	+
۷	+++	+	++	+++	++
۸	+++	++	++	+++	++

۹	++	+	++	++	+
۱۰	+	+	+	++	+

بدون رشد (-) رشد متوسط (++) رشد بالا (+++)

آزمون رشد در درصدهای مختلف نمک

مقدار NaCl (g/l)	ایزوله شماره ۱۱	ایزوله شماره ۲۱	ایزوله شماره ۲۴	ایزوله شماره ۲۸	ایزوله شماره ۴۱
۲۰	++	++	+++	++	++
۳۰	++	+	+++	+	++
۴۰	+	+	++	+	+
۵۰	+	-	++	-	-
۶۰	-	-	-	-	-

بدون رشد (-) رشد متوسط (++) رشد بالا (+++)

سپاسگزاری

با تشکر از همکاری خانم مهندس زینب بسطامی

منابع

رسولی صدقیانی، ح.، خاوری، ک. رحیمیان، ح. ملکوتی، م. ج. و اسدی رحمانی، ه. 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.

طباطبایی ج، ۱۳۸۸. اصول تغذیه معدنی گیاهان، چاپ اول. انتشارات دانشگاه تبریز.

علیخانی، ح. و ن. صالح راستین. ۱۳۸۰. ضرورت تولید انبوه کودهای بیولوژیک محرک رشد گیاه PGPB در راستای نیل به کشاورزی پایدار. مجموعه مقالات ضرورت تولید صنعتی کودهای بیولوژیک در کشور. نشر آموزش کشاورزی، کرج.

Awad Galal, o ., ۲۰۰۹. Study of some characteristics of silicate bacteria. J. Sci. Technol. Vol. ۱۰(۳): ۲۷-۳۵.

Alexander, D. B., and Zumber, D. A. ۱۹۹۳. Responses by iron-efficient and inefficient oat cultivars to inoculation with siderophore–producing bacteria in a calcareous soil. Biol. Fertil. Soils. ۱۶: ۱۱۸-۱۲۴.

Han, H.S., Lee, K.D., ۲۰۰۵. Phosphate and Potassium Solubilizing Bacteria Effect on Mineral Uptake, Soil Availability and Growth of Eggplant. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences ۱(۲):۱۷۶-۱۸۰.

Hu, XF., Chen, J., Guo, JF., ۲۰۰۶. Two phosphate and potassium solubilizing bacteria isolated from Tiannumountain, Zhejiang, China. World Journal of Microbiology and biotechnology ۲۲: ۹۸۳-۹۹۰.

Norouzi, S., and Khademi, H.۲۰۰۹. Potassium release from muscovite and phlogopite as influenced by selected organic acids. J. water Soil. ۲۳: ۱. ۲۶۳-۲۷۳.

Rezaei, F. ۲۰۱۰. Weathering of minerals in clay and silt fraction of corn rhizosphere. M.Sc. Thesis. Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources.

Rubio, M. G. T.,Plata, S. A., Castillo,J. B., and Nieto. P. M. ۲۰۰۰. Isolation of Enterobacteria, Azotobactersp.andPseudomonas sp., producers of Indole-۳-Acetic Acid and siderophores from Colombian Rice Rhizosphere.RevistaLatinoamrican de Microbioloia. ۵: ۱۷۱-۱۷۶.

Sheng XF and huang WY, ۲۰۰۲. Study on the conditions of potassium release by strain NBT of silicate bacteria acientia. Agricultura sinica ۳۵: ۶۷۳-۶۷۷.

Gopalakrishnan,S., Humayun, p., ۲۰۰۱۲. Plant growth-promoting traits of Streptomyces with biocontrol potential isolated from herbal vermicompost.Biocontrol Science and Technology ۲۲(۱۰): ۱۱۹۹-۱۲۱۰.

Sugumaran, P., Janarthanam, B., ۲۰۰۷. Solubilization of potassium containing minerals by bacteria and their effect on plant growth. World Journal of Agricultural science. ۳:۳۵۰-۳۵۵.

Abstract

Potassium is one of the commonly used nutrients for plants that plays an important role in growth and development. The study to determine the effectiveness of the bacteria extant and ۱۲ soil samples were analyzed rhizosphere of wheat fields in Golestan province And ۴۴ strains using proprietary medium Aleksandrov as silicate bacteria were isolated. The ۱۴ strains of bacteria that had a greater effect on potassium release. To characterize the growth of bacteria and bacterial resistance to environmental streses selected . These features include the ability to produce and test the release indole acetic acid is the Siderophore. The resistance of bacteria to grow in different pH and growth at ۴ and ۴۲ degrees and the ability to grow in different salinity investagation. The results showed the highest and lowest release of indole acetic acid is ۷۱.۴ -۹.۶ mg per liter in ۹۶ hours. Most of the production is ۳.۴۸ Siderophore in ۱۲۰ hours. Strains ۲۸ and ۱۱ have the highest growth resistance at pH ۶ to ۱۱, ۲۴ isolates the greatest potential for growth in salinity of ۲۰ to ۵۰% and the ability to grow at ۴ and ۴۲ degrees respectively.