وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات خاک و آب

روش‌های آزمایشگاهی برای اندازه‌گیری ویژگی‌های محرک رشدی گیاه با استفاده از باکتری‌ها

وحید اله جهاندیده مهجن آبادی، کاظم خاوازی، هوشنگ خسروی،
مهدیه شمشیری‌پور، خدیجه اربابی، اکرم اوتادی و ندا علیزاده

شماره ثبت: ۶۴۱
۱۴۰۲

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

روش‌های آزمایشگاهی برای اندازه‌گیری ویژگی‌های محرک رشدی گیاه با استفاده از باکتری‌ها

نگارندگان

وحید اله جهاندیده مهجن آبادی، عضو هیات علمی موسسه تحقیقات خاک و آب کشور
کاظم خاوازی، عضو هیات علمی موسسه تحقیقات خاک و آب کشور
هوشنگ خسروی، عضو هیات علمی موسسه تحقیقات خاک و آب کشور
مهدیه شمشیری‌پور، محقق موسسه تحقیقات خاک و آب کشور
خدیجه اربابی، کارشناس موسسه تحقیقات خاک و آب کشور
اکرم اوتادی، کارشناس موسسه تحقیقات خاک و آب کشور
ندا علیزاده، کارشناس موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

نشریه فنی: 641

1402

مشخصات اثر

عنوان: روش‌های آزمایشگاهی برای اندازه‌گیری ویژگی‌های محرک رشدی گیاه با استفاده از باکتری‌ها

نگارندگان: وحید اله جهاندیده مهجن آبادی، کاظم خاوازی، هوشنگ خسروی، مهدیه شمشیری‌پور، خدیجه اربابی، اکرم اوتادی و ندا علیزاده

ناشر: موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

کارشناس انتشارات: سمانه پورمنصور

ویراستار ادبی: زهرا محمدی

طراح جلد: راضیه محمدی

سال انتشار: 1402

حق چاپ برای ناشر محفوظ است.

این اثر با شماره 64786 در تاریخ 1402/11/8 در مرکز اطلاعات و مدارک علمی کشاورزی به ثبت رسیده است.

نقل مطالب با ذکر منبع بلامانع است.

نشانی: کرج، میدان استاندارد، جاده مشکین‌دشت، بلوار امام خمینی (ره)، موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

کد پستی: 3177993545 **صندوق پستی:** 311-31785

نمابر : 02636210121 **تلفن:** 36201900- 026

وب‌سایت: http://www.swri.ir **پست الکترونیکی:** info@swri.ir

مسئولیت صحت مطالب به عهده نگارندگان است.

فهرست مطالب

عنوان صفحه

1- مقدمه 1
2- اندازه‌گیری سنتز ایندول-3-استیک اسید 2
2-1- وسایل و تجهیزات 3
2-2- مواد و واکنشگرها 4
2-3- روش کار 5
2-4- شیوه ارزیابی نتایج آزمون 6
3- اندازه‌گیری سنتز سیدروفور 7
3-1- وسایل و تجهیزات 8
3-2- مواد و واکنشگرها 8
3-3- روش کار 10
3-4- شیوه ارزیابی نتایج آزمون 11
4- اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ACC-دآمیناز 11
4-1- بررسی فعالیت آنزیم ACC-دآمیناز به صورت نیمه کمی 12
4-1-1- وسایل و تجهیزات 12
4-1-2- مواد و واکنشگر ها 13
4-1-3- روش کار 14
4-1-4- شیوه ارزیابی نتایج آزمون 14
4-2- بررسی فعالیت آنزیم ACC-دآمیناز با اندازه‌گیری کمی آلفاکتوبوتیرات..... 15
4-2-1- وسایل و تجهیزات 15
4-2-2- مواد و واکنشگرها 16
4-2-3- روش کار 17
4-2-4- شیوه ارزیابی نتایج آزمون 19
5- اندازه‌گیری سنتز سیانید هیدروژن (HCN)..... 20
5-1- وسایل و تجهیزات 20

2-5- مواد و واکنش گرها 21
3-5- روش کار 21
4-5- شیوه ارزیابی نتایج آزمون 22
6- اندازه‌گیری سنتز اگزوپلی‌ساکارید (EPS) 23
1-6- وسایل و تجهیزات 24
2-6- مواد و واکنشگرها 25
3-6- روش کار 25
4-6- شیوه ارزیابی نتایج آزمون 26
فهرست منابع 27

1- مقدمه

اصطلاح «باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه (PGPR)[1]» نخستین بار در سال 1978 توسط Kloepper و Schroth گفته می‌شوند که در شرایط معین و با استفاده از یک یا چند سازوکار خاص موجب افزایش رشد گیاه می‌شوند (Hungria *et al.*, 2010; Adesemoye *et al.*, 2009). توانایی افزایش رشد گیاه توسط باکتری‌ها، تنها به باکتری‌های ریزوسفری و باکتری‌های مستقر در سطح ریشه[2] منحصر نبوده و باکتری‌های آزادزی خاک و انواع ساکن در فیلوسفر[3] (به‌ویژه برگ‌ها) نیز از این ویژگی برخوردار هستند (Jahandideh Mahjen Abadi *et al.*, 2020; 2021). اگرچه بیشتر مطالعات انجام شده در این زمینه مربوط به باکتری‌های ریزوسفری است اما به‌دلیل وجود توانایی باکتری‌های ساکن در سایر زیستگاه‌ها برای افزایش رشد گیاه، پیشنهاد شده است که از عبارت جامع‌تر باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPB)[4] استفاده شود (Bashan and De-Bashan, 2005).

برای توضیح چگونگی تأثیر این باکتری‌ها بر رشد گیاه سازوکارهای مختلفی یادآوری شده است که به‌طور کلی به دو گروه سازوکارهای مستقیم و سازوکارهای غیر مستقیم تقسیم‌بندی می‌شوند. یک باکتری محرک رشد گیاه می‌تواند در مراحل مختلف رشد گیاه با استفاده از یک یا چند سازوکار مختلف رشد گیاه را تحت تأثیر قرار داده و منجر به تحریک و یا افزایش رشد گیاه شود. در سازوکار مستقیم باکتری‌ها با تولید موادی که معمولاً در مقادیر اندک تولید می‌کنند به‌طور مستقیم بر رشد گیاهان تأثیر می‌گذارند (Bashan and De-Bashan, 2005). در سازوکار مستقیم باکتری‌ها قادر به تثبیت نیتروژن مولکولی، حل‌کنندگی فسفر و آهن و تولید هورمون‌های گیاهی (مانند اکسین‌ها، جیبرلین‌ها، سیتوکنین‌ها و اتیلن) هستند. آن‌ها همچنین می‌توانند مقاومت گیاهان را در مقابل تنش‌هایی مانند خشکی، شوری، سمیت عناصر سنگین و آفت‌کش‌ها افزایش دهند. از این‌رو سازوکارهایی مانند تولید هورمون‌های گیاهی و بهبود قابلیت‌دسترسی گیاه به عناصر غذایی که مستقیماً رشد گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهند به‌عنوان سازوکارهای مستقیم محسوب می‌شوند. سازوکارهای غیر مستقیم

---

[1]- Plant growth promoting rhizobacteria
[2]- Rhizoplane
[3]- Phyllosphere
[4]- Plant growth promoting bacteria

باکتری‌های محرک رشد گیاه، شامل کنترل زیستی عوامل بیماریزای گیاهی است. باکتری‌های محرک رشد گیاه با تولید متابولیت‌های باکتریایی قادر به کنترل عوامل بیماریزای گیاهی هستند. این باکتری‌ها با اختلال در رشد قارچ‌ها، نماتدها و باکتری‌های بیماریزای گیاهی قادر به حفاظت گیاه در مقابل آنها هستند. در اغلب مطالعات، رقابت برای عناصر غذایی (از طریق تولید سیدروفور) و زیستگاه، مقاومت القایی سیستمیک[1] و تولید متابولیت‌های ضد قارچی مانند آنتی‌بیوتیک و سیانید هیدروژن (HCN)[2] به‌عنوان سازوکارهای غیر مستقیم تحریک رشد گیاه توسط PGPR شناخته شده‌اند (Lugtenberg and Kamilova, 2009; Glick, 2012; Ahemad and Kibret, 2014). هدف از این دستورالعمل ارائه روش‌های آزمایشگاهی برای اندازه‌گیری ویژگی‌های محرک رشدی گیاه با استفاده از باکتری‌ها است. تعدادی از روش‌های ویژگی‌های محرک رشدی گیاه مانند تثبیت زیستی نیتروژن و توانایی انحلال فسفات به‌طور مجزا در دستورالعمل‌های جدا آورده شده‌اند. از این‌رو در این دستورالعمل به آن‌ها اشاره‌ای نشده است.

2- اندازه‌گیری سنتز ایندول -3-استیک اسید[3]

ایندول-3-استیک اسید، یکی از اکسین‌های فعال فیزیولوژیکی در گیاهان است و نقش اساسی در رشد و توسعه گیاهان دارد. این هورمون از اهمیت ویژه‌ای در الگودهی سلول‌ها و ساختار گیاه، تنظیم رشد ریشه و ساقه، تنظیم فتوتروپیسم، تنظیم شکل سلول‌ها، تنظیم جوانه‌زنی و تنظیم رسیدن میوه و بذر، برخوردار است. هورمون IAA به‌وسیله باکتری‌ها، قارچ‌ها و گیاهان تولید می‌شود. مسیرهای عمده بیوسنتز ایندول-3-استیک اسید شامل مسیر ایندول-3-استآمید (IAM)[4]، مسیر ایندول-3-پیروات (IPA)[5] و مسیر تریپتامین است. بیوسنتز هورمون ایندول3--استیک اسید به‌وسیله باکتری‌ها، بیشتر از مسیر IAM و گاهی از مسیر IPA انجام می‌شود. تریپتوفان به‌عنوان پیش ماده تولید ایندول-3-استیک اسید است. آنزیم تریپتوفان مونواکسیژناز[6] تریپتوفان را به IAM تبدیل می‌کند. سپس

[1] - Induced systemic resistance
[2] - Hydrogen cyanide
[3] - Indol-3-acetic acid
[4] - Indole-3-acetamide
[5] - Indole-3-pyruvate
[6] - Monooxigenase-2-tryptophan

ایندول استامید هیدرولاز IAM را به IAA و آمونیوم تبدیل می‌کند. باکتری‌های محرک رشد گیاه مانند مانند *Rhizobium*، *Azospirillum*، *Bacillus* و *Pseudomonas* به‌عنوان باکتری‌های تولیدکننده IAA شناخته می‌شوند. این باکتری‌ها می‌توانند با تولید IAA منجر به افزایش رشد ریشه‌ها و جذب عناصر غذایی، افزایش تحمل به تنش‌های محیطی مانند خشکی و شوری و بهبود توسعه گیاه شده و در نتیجه به بهبود عملکرد گیاه کمک کنند. از این‌رو، باکتری‌های تولیدکننده IAA می‌توانند به عنوان یک راه حل برای بهبود رشد و توسعه گیاهان و افزایش مقاومت آن‌ها در برابر شرایط تنشی استفاده شوند. برای اندازه‌گیری توانایی سنتز ایندول-3-استیک اسید به‌وسیله باکتری‌ها می‌توان به‌صورت زیر عمل نمود (Gordon and Weber, 1951):

2-1- وسایل و تجهیزات

- انکوباتور (گرم‌خانه) با قابلیت تنظیم دما و چرخش هوای داخلی
- اسپکتروفوتومتر
- میکروسانتریفیوژ با سرعت تا 20000 دور بر دقیقه
- شیکر انکوباتور با قابلیت تنظیم دما و سرعت چرخش تا 200 دور در دقیقه
- سمپلر به حجم 1000-100 میکرولیتر
- سر سمپلر استریل به حجم 1000-100 میکرولیتر
- فلاسک ارلن‌مایر 50 میلی‌لیتری
- بالن ژوژه 1000 میلی‌لیتری
- بالن ژوژه 50 میلی‌لیتری
- میکروتیوب به حجم 1/5 میلی‌لیتر
- پی‌پت
- ترازوی آزمایشگاهی
- هود لامینار
- اتوکلاو
- فیلتر میکروپور (0/22 میکرومتر)

- شیکر
- لوپ (فیلدوپلاتین)

2-2- مواد و واکنش‌گرها

- $FeCl_3.6H_2O$ 0/5 مولار: میزان 15/135 گرم $FeCl_3.6H_2O$ را پس از توزین در مقداری آب مقطر حل نموده و سپس در بالن ژوژه 1000 میلی‌لیتری با آب مقطر به حجم یک لیتر برسانید.

- معرف سالکوسکی[1]: 7/5 میلی‌لیتر $FeCl_3.6H_2O$ 0/5 مولار را با پی‌پت برداشته و در یک بالن ژوژه 1000 میلی‌لیتری بریزید. سپس 250 میلی‌لیتر آب مقطر و در آخر 150میلی‌لیتر اسید سولفوریک 98% را به آرامی به این مخلوط اضافه کنید. معرف حاصل که زرد رنگ و شفاف است را در بطری تیره رنگ نگهداری نمایید.

نکته: هنگام مخلوط کردن این مواد واکنش گرمازای شدیدی رخ می‌دهد، از این‌رو حتماً اضافه کردن اسید با احتیاط و به‌آرامی انجام داده و بالن را در هنگام اضافه کردن مواد اصلاً تکان ندهید تا مانع پرتاب شدن قطرات محلول به بیرون شود. همچنین، مواد داخل آن را به هم نزده و به بالن دست نزنید. پس از چند دقیقه که دمای محلول کاهش پیدا کرد آن را به هم زده و درپوش را روی بالن قرار دهید.

- محیط کشت TSB[2] همراه با 50 میکروگرم در میلی‌لیتر ال- تریپتوفان[3]: به‌منظور تهیه این محیط کشت، مقدار توصیه شده (مندرج روی بسته‌بندی ماده) از محیط کشت پودری آماده TSB را با توجه به حجم مورد نیاز در میزان مناسب از آب مقطر حل کرده و بسته به تعداد نمونه‌ها، فلاسک‌های ارلن‌مایر 50 میلی‌لیتر دارای 25 میلی‌لیتر از محیط کشت را آماده و اتوکلاو کنید. هر کدام از فلاسک‌های ارلن‌مایر می‌بایست دارای 50 میکروگرم در میلی‌لیتر و یا 0/00005 گرم در میلی‌لیتر ال- تریپتوفان باشد. پس برای هر فلاسک ارلن‌مایر دارای 25 میلی‌لیتر محیط کشت TSB، 0/00125 گرم مورد نیاز است. می‌توانید مقادیر را برای کل

[1] - Salkowski
[2] - Tryptic soy broth
[3] - L-tryptophan

نمونه‌ها حساب و فیلتر نمایید؛ بدین صورت که اگر 10 نمونه (10 فلاسک ارلن‌مایر) دارید، مقدار 0/0125 گرم ال- تریپتوفان را در زیر هود لامینار در مقدار مشخصی آب مقطر (پنج میلی‌لیتر) حل نموده و پس از فیلتر کردن با فیلتر میکروپور 0/22 میکرومتر، به هر فلاسک ارلن‌مایر دارای 25 میلی‌لیتر محیط کشت TSB استریل، 0/5 میلی‌لیتر اضافه نمایید.

- محیط کشت TSB: به‌منظور تهیه این محیط کشت، مقدار توصیه شده (مندرج روی بسته‌بندی ماده) از محیط کشت پودری آماده TSB را با توجه به حجم مورد نیاز در میزان مناسب از آب مقطر حل کرده و بسته به تعداد نمونه‌ها، فلاسک‌های ارلن‌مایر 50 میلی‌لیتر دارای 25 میلی‌لیتر از محیط کشت را آماده و اتوکلاو کنید.

- محلول استاندارد ایندول استیک اسید: 1000 میلی‌لیتر از محیط کشت TSB را تهیه نمایید. سپس 0/05 گرم از IAA را داخل آن ریخته و به مدت 20 دقیقه روی شیکر قرار دهید. از محلول استوک (مادری) حاصل که غلظت آن معادل 50 mg/l است غلظت‌های صفر، دو، چهار، شش، هشت، 10 و ... میلی‌گرم در لیتر تهیه نمایید (برای اینکار مقادیر صفر، دو، چهار، شش، هشت، 10 و ... میلی‌لیتر از محلول استوک را در بالن ژوژه‌های 50 میلی لیتری ریخته و با محیط کشت TSB به حجم برسانید).

2-3- روش کار

- باکتری مطالعه شده را در محیط TSB در زیر هود لامینار کشت دهید. به این صورت که از کلنی خالص باکتری به ارلن دارای 25 میلی‌لیتر محیط کشت TSB تلقیح کرده و آن‌را به مدت 48 ساعت روی یک شیکر انکوباتور با دمای 28 درجه سلسیوس و دور 120rpm قرار دهید.

- در زیر هود لامینار از سوسپانسیون باکتری کشت داده شده در TSB، میزان 50 میکرولیتر با جمعیت یکسان (1×10^8 CFU[1]/ml) در سه ارلن دارای 25 میلی‌لیتر محیط کشت TSB بدون ال - تریپتوفان و همچین در سه ارلن دارای 25 میلی‌لیتر محیط کشت TSB همراه با ال - تریپتوفان (50 میکروگرم در میلی‌لیتر) کشت داده و دوباره 48 ساعت در 28 درجه سلسیوس روی شیکر انکوباتور قرار دهید.

[1]- Colony forming unit

- پس از گذشت این زمان و در دمای آزمایشگاه، 1/5 میلی لیتر سوسپانسیون باکتری را داخل میکروتیوب ریخته و با دور معادل 15000 دور در دقیقه به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ کنید.

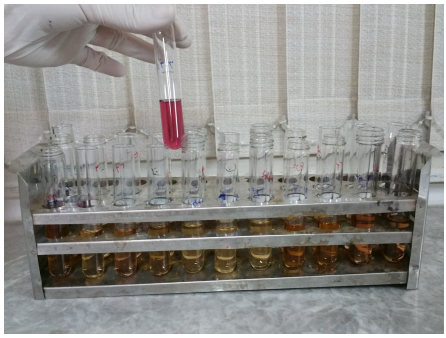
- مقدار یک میلی‌لیتر از محلول شفاف بالایی را به‌وسیله سمپلر به داخل لوله آزمایش کوچک (10-12 میلی‌لیتری) ریخته و چهار میلی‌لیتر معرف سالکوسکی به آن اضافه و مخلوط حاصل را به مدت 20 دقیقه در دمای آزمایشگاه و در تاریکی نگهداری کنید.

- همچنین از هر کدام از غلظت‌های استانداردهای ساخته شده به مقدار یک میلی لیتر در داخل لوله آزمایش ریخته و سپس چهار میلی‌لیتر از معرف سالکوسکی به آن اضافه و مخلوط حاصل را به مدت 20 دقیقه در دمای آزمایشگاه و در تاریکی نگهداری کنید.

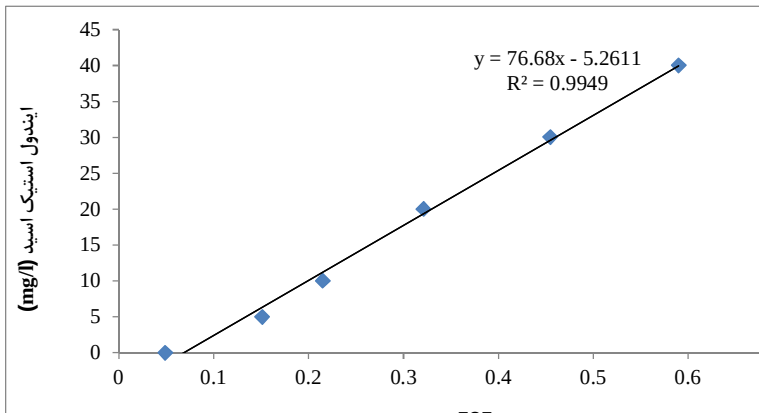
- دستگاه اسپکتروفتومتر را با محیط کشت TSB بدون تلقیح صفر نمایید و سپس میزان جذب نور مخلوط مورد آزمایش و همچنین استانداردها را در 535 نانومتر قرائت کنید.

2-4- شیوه ارزیابی نتایج آزمون

در شکل 1 تغییرات رنگ نمونه باکتری دارای توانایی تولید ایندول-3-استیک اسید قابل مشاهده است. برای بدست آوردن مقدار ایندول-3-استیک اسید تولید شده به‌وسیله باکتری‌ها نخست منحنی استاندارد آن را رسم نمایید. برای انجام اینکار نمودار مقدار جذب و غلظت استاندارد را در نرم‌افزار اکسل رسم نموده و بهترین معادله (خطی، y=ax-b) با R^2 بالا را بدست آورید. با استفاده از این معادله و قرار دادن مقادیر جذب به جای X، مقدار ایندول-3- استیک اسید (Y) بر حسب میلی‌گرم در لیتر بدست می‌آید (شکل 2).



شکل 1- تغییرات رنگ نمونه باکتری دارای توانایی تولید ایندول استیک اسید.



شکل 2- نمودار استاندارد ایندول -3-استیک اسید.

3- اندازه‌گیری سنتز سیدروفور

سیدروفورها مولکول‌های آلی با وزن مولکولی کم هستند که توسط باکتری‌ها و برخی قارچ‌ها در شرایط کمبود آهن تولید می‌شوند. وظیفه اصلی آن‌ها، جذب آهن از محیط و انتقال آن به داخل سلول است. سیدروفورها دارای تمایل بالا به اتصال به آهن فریک (Fe^{+3}) هستند که می‌توانند با آن کلات پایداری را تشکیل دهند و در نتیجه قابلیت جذب آن را افزایش دهند. باکتری‌هایی که سیدروفور تولید می‌کنند، باکتری‌های تولیدکننده سیدروفور یا تولیدکنندگان سیدروفور نامیده می‌شوند. برخی از معروف‌ترین باکتری‌های تولیدکننده سیدروفور شامل *Pseudomonas aeruginosa* و *Bacillus subtilis* هستند. سیدروفورها نه تنها برای بقای باکتری‌ها مهم هستند، بلکه به دلیل افزایش قابلیت دسترسی آهن، رشد و عملکرد گیاهان را بهبود می‌دهند. سیدروفورها را می‌توان با توجه به قسمت‌هایی که به آهن متصل می‌شوند به سه گروه اصلی کاتکول‌ها[1]، هیدروکسامات‌ها[2] و کربوکسیلات‌ها[3] تقسیم کرد. برای اندازه‌گیری توانایی سنتز سیدروفور به‌وسیله باکتری می‌توان به‌صورت زیر عمل نمود (Alexander and Zuberer, 1991):

[1] - Catecolates
[2] - Hydroxamate
[3] - Carboxylate

3-1- وسایل و تجهیزات

- قاشقک توزین (اسپاتول)
- لوپ (فیلدوپلاتین)
- فیلتر میکروپور (0/22 میکرومتر)
- پلیت یا پتری‌دیش هشت سانتی‌متری
- پی‌پت یک میلی‌لیتری
- استوانه مدرج 10 و 100 میلی لیتری
- فلاسک ارلن‌مایر 50 و 1000 میلی لیتری
- ترازوی آزمایشگاهی
- سمپلر به حجم 1000-10 میکرولیتر
- سر سمپلر استریل به حجم 1000-10 میکرولیتر
- انکوباتور (گرم‌خانه) با قابلیت تنظیم دما و چرخش هوای داخلی
- اتوکلاو
- هود لامینار
- دستگاه pH متر
- شیکر انکوباتور با قابلیت تنظیم دما و سرعت چرخش تا 200 دور در دقیقه

3-2- مواد و واکنش‌گرها

- محلول معرف Fe-CAS: در ابتدا $FeCl_3.6H_2O$ یک میلی‌مولار را تهیه نمایید، بدین صورت‌که 0/027 گرم $FeCl_3.6H_2O$ را توزین نموده و در 100 میلی‌لیتر آب مقطر حل نمایید. سپس محلول اسیدکلریدریک 10 میلی‌مولار را با حل نمودن 0/1 میلی‌لیتر اسید کلریدریک در 100 میلی‌لیتر آب مقطر تهیه کنید. این دو محلول با هم مخلوط شود (محلول A). 0/06 گرم از ماده CAS[1] را توزین و در 50 میلی‌لیتر آب مقطر حل نمایید (محلول B). سپس 0/072 گرم HDTMA[2] را توزین و در 40 میلی‌لیتر آب مقطر حل کنید

[1] - Chrome Azurol S (CAS)
[2] - Hexadecyl trimethyl ammonium bromide

(محلول C). برای تهیه معرف Fe-CAS، 10 میلی‌لیتر محلول A را به 50 میلی‌لیتر محلول B اضافه نموده و سپس به‌آرامی و همراه با تکان دادن پیوسته 40 میلی‌لیتر محلول C را به آنها اضافه نمایید. در پایان محلول آبی تیره بدست می‌آید که پس از استریل شدن تا 50 درجه سلسیوس سرد می‌شود.

- محلول بافر: برای تهیه محلول بافر، 30/24 گرم PIPES[1] را توزین نموده و در 750 میلی‌لیتر محلول نمکی حل نمایید. برای تهیه محلول نمکی 0/3 گرم KH_2PO_4، 0/5 گرم NaCl و یک گرم NH_4Cl را در 750 میلی‌لیتر آب مقطر حل کنید. pH این محلول می‌بایست با استفاده از محلول KOH 50 درصد روی 6/8 تنظیم شود. حجم مخلوط حاصل پس از افزودن 15 گرم آگار به 800 میلی‌لیتر رسانده شود. محلول بافر را اتوکلاو نموده و سپس تا 50 درجه سلسیوس سرد شود.

- محلول غذایی: برای تهیه محلول غذایی دو گرم گلوکز، دو گرم مانیتول، 0/493 گرم $MgSO_4.7H_2O$، 0/011 گرم $CaCl_2$، 0/00117 گرم $MnSO_4.H_2O$، 0/0014 گرم $H3BO_3$، 0/04 گرم $CuSO_4.5H_2O$، 0/0012 گرم $ZnSO_4.7H_2O$ و 0/001 گرم $Na_2MoO_4.2H_2O$ را توزین و در70 میلی‌لیتر آب مقطر حل کنید (یادآوری می‌شود این مواد را یک به یک توزین نموده و در آب حل نمایید). این محلول پس از استریل شدن تا دمای 50 درجه سلسیوس سرد شود.

- محلول کازوآمینواسید: سه گرم کازوآمینواسید در 30 میلی‌لیتر آب مقطر حل شود و سپس آن را با گذراندن از فیلتر میکروپور 0/22 میکرومتر، استریل نمایید.

نکته: اگر کازوآمینواسید موجود نباشد می‌توان از کازِئین به جای آن استفاده کرد.

- محیط کشت CAS-Agar: در زیر هود لامینار محلول غذایی به محلول بافر اضافه شده و سپس محلول کازوآمینواسید به آن‌ها اضافه شود. در ادامه همراه با به هم زدن آرام و بدون ایجاد حباب، محلول معرف Fe-CAS را به آن‌ها اضافه و در پلیت‌ها توزیع نمایید. رنگ نهایی این محیط در پلیت‌ها آبی تیره و یا به اصطلاح آبی کله غازی است.

[1]- 1.4-piperazinethanesulfonic acid

- محیط کشت TSB: به منظور تهیه این محیط کشت، مقدار توصیه شده (مندرج روی بسته‌بندی ماده) از محیط کشت پودری آماده TSB را با توجه به حجم مورد نیاز در میزان مناسب از آب مقطر حل کرده و بسته به تعداد نمونه‌ها، فلاسک‌های ارلن‌مایر 50 میلی‌لیتر دارای 25 میلی‌لیتر از محیط کشت را آماده و اتوکلاو کنید.

3-3- روش کار

- باکتری مورد مطالعه را در محیط TSB در زیر هود لامینار کشت دهید. به این صورت که از کلنی خالص باکتری به فلاسک ارلن‌مایر دارای 25 میلی‌لیتر محیط کشت TSB تلقیح کرده و آن‌را به مدت 48 ساعت روی یک شیکر انکوباتور با دمای 28 درجه سلسیوس و دور 120rpm قرار دهید.

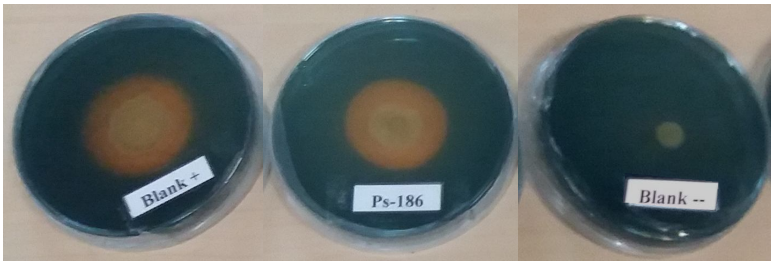
- همانند شکل 3، در زیر هود لامینار پنج میکرولیتر از سوسپانسیون تازه باکتری با جمعیت یکسان (1×10^8 CFU/ml) با روش قطره‌گذاری در وسط پلیت دارای محیط کشت CAS-Agar تلقیح کنید. هم‌زمان از یک باکتری شاهد مثبت (Sid+) و یک باکتری شاهد منفی (Sid-) نیز تلقیح در پلیت جداگانه انجام شود.

- پلیت‌ها در انکوباتور در دمای 28 درجه به مدت 96 ساعت نگهداری شوند.

شکل 3- روش قطره‌گذاری باکتری.

4-3- شیوه ارزیابی نتایج آزمون

توانایی تولید سیدروفور از روی تغییر رنگ محیط CAS-Agar از آبی به نارنجی مشخص است (شکل 4). قطر هاله نارنجی‌رنگ تشکیل‌شده در اطراف کلنی باکتری‌ها و قطر کلنی در فواصل زمانی 24، 48، 72 و 96 ساعت تعیین شود. میزان تولید سیدروفور در هر باکتری از نسبت قطر هاله به قطر کلنی بدست می‌آید.



شکل 4- مقایسه توان تولید سیدروفور در باکتری مورد مطالعه و باکتری‌های شاهد مثبت و منفی.

4- اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ACC-دآمیناز[1]

اتیلن متابولیتی ضروری برای رشد و توسعه طبیعی گیاهان است. این هورمون تقریباً به‌وسیله تمام گیاهان و همچنین از راه فرآیندهای مختلف زیستی و غیرزیستی در خاک‌ها تولید می‌شود و در ایجاد تغییرات فیزیولوژیک مختلف در گیاهان دارای اهمیت است. اتیلن - افزون‌بر نقش تنظیم کننده‌گی رشد گیاه، همچنین به‌عنوان هورمون شناخته می‌شود. معمولاً در شرایط طبیعی اتیلن در بافت‌های گیاه بسیار کم است ولی در شرایطی که گیاه تحت یکی از عوامل تنشی قرار می‌گیرد مقدار اتیلن در گیاه به میزان قابل توجهی افزایش پیدا می‌کند. این اتیلن تولید شده، اتیلن تنشی نامیده می‌شود (Bhattacharyya and Jha, 2012). درواقع، در شرایط تنش تولید ترکیباتی مانند ACC افزایش می‌یابد که حد واسط تولید اتیلن است. باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه که دارای توان تولید آنزیم ACC-دآمیناز هستند، رشد و توسعه گیاه را با کاهش سطوح اتیلن، تحریک تحمل شوری و کاهش تنش خشکی در

[1]- Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase

گیاهان بهبود می‌بخشند (Ghosh *et al.*, 2018). در حال حاضر، گونه‌های باکتریایی که دارای فعالیت ACC-دآمیناز هستند، در طیف گسترده‌ای از جنس‌ها مانند *Acinetobacter*، *Achromobacter*، *Agrobacterium*، *Alcaligenes*، *Azospirillum*، *Bacillus*، *Burkholderia*، *Enterobacter*، *Pseudomonas*، *Ralstonia*، *Serratia*، *Rhizobium* و غیره شناسایی شده‌اند. ACC تولید شده به وسیله ACC-سنتاز در بافت‌های گیاهی از ریشه‌های گیاه خارج شده و توسط باکتری‌های مجاور جذب می‌شود. در نتیجه، باکتری‌ها ACC را به آمونیاک و 2-اکسوبوتانوات[1] هیدرولیز می‌کنند. این هیدرولیز ACC باعث کاهش غلظت ACC در باکتری‌ها و انتقال مداوم ACC از ریشه‌های گیاه به باکتری می‌شود. در صورت نبودن ACC-دآمیناز، به‌دلیل وجود پیش‌ماده ACC، تولید اتیلن افزایش می‌یابد که این امر منجر به ایجاد عکس‌العمل‌های تنشی شامل جلوگیری از رشد گیاه می‌شود (Glick, 2014).

4-1- بررسی فعالیت آنزیم ACC-دآمیناز به صورت نیمه کمی

آزمون نیمه کمی توان تولید آنزیم ACC-دآمیناز به روش زیر انجام می‌شود (Dell'Amico *et al.*, 2005):

4-1-1- وسایل و تجهیزات

- قاشقک توزین (اسپاتول)
- لوپ (فیلدوپلاتین)
- ترازوی آزمایشگاهی
- هود لامینار
- فلاسک ارلن‌مایر 50 میلی‌لیتری
- استوانه مدرج 25 و 50 میلی‌لیتری
- سمپلر به حجم 200 میکرولیتر
- سر سمپلر استریل به حجم 200 میکرولیتر

[1] - Oxobutanoate

- انکوباتور (گرم‌خانه) با قابلیت تنظیم دما و چرخش هوای داخلی
- فریزر دمای 20-
- اسپکتروفتومتر
- فیلتر میکروپور (0/2 میکرومتر)
- شیکر انکوباتور، با قابلیت تنظیم دما و سرعت چرخش تا 200 دور در دقیقه
- دستگاه pH متر

4-1-2- مواد و واکنشگر ها

- محیط کشت DF (Dworkin Foster): نخست محلول عناصر میکرو را بسازید؛ بدین صورت که 10 میلی‌گرم H_3BO_3، 11/19 میلی‌گرم $MnSO_4.H_2O$، 124/6 میلی‌گرم $ZnSO_4.7H_2O$، 78/22 میلی‌گرم $CuSO_4.5H_2O$ و 10 میلی‌گرم MoO_3 را در 100 میلی‌لیتر آب مقطر حل نمایید. سپس 100 میلی‌گرم $FeSO_4.7H_2O$ را در 10 میلی‌لیتر آب مقطر حل کنید. در پایان چهار گرم KH_2PO_4، شش گرم Na_2HPO_4، 0/2 گرم $MgSO_4.7H_2O$، دو گلوکز، دو گرم گلوکونیک اسید، دو گرم سیتریک اسید، 0/1 میلی‌لیتر از محلول عناصر میکرو و 0/1 میلی‌لیتر از محلول $FeSO_4.7H_2O$ را در یک لیتر آب مقطر حل نموده و سپس pH آن‌را روی 7/2 تنظیم نمایید. فلاسک‌های ارلن‌مایر 50 میلی‌لیتر دارای 20 میلی‌لیتر از محیط کشت DF را آماده و اتوکلاو کنید.

- محیط کشت DF دارای دو گرم در لیتر $(NH_4)_2SO_4$: مقدار دو گرم $(NH_4)_2SO_4$ را به ترکیبات فوق اضافه نموده و سپس pH آن‌را روی 7/2 تنظیم نمایید. در ادامه فلاسک‌های ارلن‌مایر 50 میلی‌لیتر دارای 20 میلی‌لیتر از محیط کشت محیط کشت DF دارای دو گرم در لیتر $(NH_4)_2SO_4$ را آماده و اتوکلاو کنید.

- محیط کشت DF دارای ACC سه میلی‌مولار: نخست یک لیتر محیط کشت DF را مطابق فوق تهیه نمایید. سپس فلاسک‌های ارلن‌مایر 50 میلی‌لیتر دارای 20 میلی‌لیتر از محیط کشت DF را آماده و اتوکلاو کنید. در زیر هود لامینار میزان 0/3033 گرم ACC را در مقدار معینی آب مقطر استریل (پنج میلی‌لیتر) حل نموده و سپس با فیلتر میکروپور 0/22 میکرومتر فیلتر نمایید. به هر فلاسک ارلن‌مایر 100 میکرولیتر از محلول ACC اضافه و بهم بزنید.

نکته: از آنجایی‌که از یک لیتر محیط کشت DF، 50 فلاسک ارلن‌مایر دارای 20 میلی‌لیتر محیط کشت بدست می‌آید پس غلظت طوری تنظیم شد (انحلال 0/3033 گرم ACC در پنج میلی‌لیتر آب مقطر استریل) که به ازای هر فلاسک ارلن‌مایر 100 میکرولیتر محلول ACC آماده شود.

- محیط کشت TSB: به منظور تهیه این محیط کشت، مقدار توصیه شده (مندرج روی بسته‌بندی ماده) از محیط کشت پودری آماده TSB را با توجه به حجم مورد نیاز در میزان مناسب از آب مقطر حل کرده و بسته به تعداد نمونه‌ها، فلاسک‌های ارلن‌مایر 50 میلی‌لیتر دارای 25 میلی‌لیتر از محیط کشت را آماده و اتوکلاو کنید.

4-1-3- روش کار

- باکتری مورد مطالعه را در محیط TSB در زیر هود لامینار کشت دهید. به این صورت که از کلنی خالص باکتری به ارلن دارای 50 میلی‌لیتر محیط کشت TSB تلقیح کرده و آن‌را به مدت 48 ساعت روی یک شیکر انکوباتور با دمای 28 درجه سلسیوس و دور 120rpm قرار دهید.

- در زیر هود لامینار 50 میکرولیتر از سوسپانسیون تازه هر جدایه با جمعیت یکسان (1×10^8 CFU/ml) را به فلاسک ارلن‌مایر دارای 20 میلی‌لیتر از سه محیط: DF حاوی ACC سه میلی‌مولار، محیط کشت DF دارای دو گرم در لیتر سولفات آمونیوم 0/5 مولار (به‌عنوان شاهد مثبت) و محیط DF فاقد ACC و سولفات آمونیوم (به‌عنوان شاهد منفی) اضافه نمایید و به مدت 48 ساعت روی شیکر انکوباتور با دمای 28 درجه سلسیوس و دور 120rpm قرار دهید.

- دستگاه اسپکتروفتومتر را با محیط کشت DF بدون تلقیح صفر نمایید و سپس میزان جذب نور برای هر سه محیط را در 405 نانومتر قرائت کنید.

4-1-4- شیوه ارزیابی نتایج آزمون

جذب نوری این سه محیط در طول موج مورد نظر به‌عنوان نشانه‌ای از رشد باکتری در این محیط‌ها است. توان تولید آنزیم ACC-دآمیناز، بر اساس میزان رشد باکتری در محیط حاوی ACC در مقایسه با رشد (جذب نور) آن در محیط‌های شاهد، ارزیابی شود. هرچه

میزان جذب نور در محیط حاوی ACC بیشتر باشد توانایی باکتری در مصرف ACC و یا عبارت دیگر توانایی باکتری در تولید آنزیم ACC-دآمیناز بیشتر است.

4-2- بررسی فعالیت آنزیم ACC-دآمیناز با اندازه‌گیری کمی آلفاکتوبوتیرات

به‌منظور اندازه‌گیری توان تولید آنزیم ACC-دآمیناز به‌صورت کمی میزان تولید آلفا-کتوبوتیرات به روش زیر اندازه‌گیری می‌شود (Penrose and Glick, 2003):

4-2-1- وسایل و تجهیزات

- قاشق توزین (اسپاتول)
- لوپ (فیلدوپلاتین)
- ترازوی آزمایشگاهی
- هود لامینار
- فلاسک ارلن‌مایر 50 میلی‌لیتری
- میکروتیوب 1/5 میلی لیتری
- لوله سانتریفیوژ 20 و 50 میلی‌لیتری
- بالن ژوژه 100 و 1000 میلی‌لیتری
- سمپلر به حجم 1000-10 میکرولیتر
- سر سمپلر استریل به حجم 1000-10 میکرولیتر
- انکوباتور (گرم‌خانه) با قابلیت تنظیم دما و چرخش هوای داخلی
- اسپکتروفتومتر
- شیکر انکوباتور، با قابلیت تنظیم دما و سرعت چرخش تا 200 دور در دقیقه
- سانتریفیوژ یخچال‌دار
- ورتکس
- PH متر

4-2-2- مواد و واکنشگرها

- محلول ACC 0/5 مولار: میزان 0/5055 گرم ACC را در 10 میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل نموده و سپس با فیلتری دارای منافذی با قطر 0/22 میکرومتر فیلتر و در دمای 20- نگهداری شود.

- Tris HCl 0/1 مولار با pH 7/6 و 8/5: میزان 15/75 گرم Tris HCl را پس از توزین در مقداری آب مقطر حل نموده و سپس در بالن ژوژه 1000 میلی‌لیتری با آب مقطر به حجم برسانید. pH در دو سری جداگانه روی 7/6 و 8/5 تنظیم شود.

- معرف 4،2-دی نیتروفنیل هیدرازین[1] 0/2 درصد: میزان 0/2 گرم 4،2-دی نیتروفنیل هیدرازین را پس از توزین در مقداری آب مقطر حل نموده و سپس در بالن ژوژه 100 میلی‌لیتری با آب مقطر به حجم برسانید.

- NaOH دو نرمال: میزان هشت گرم NaOH را پس از توزین در مقداری آب مقطر حل نموده و سپس در بالن ژوژه 100 میلی‌لیتری با آب مقطر به حجم برسانید.

-HCl 0/56 مولار و دو مولار: به طور جداگانه مقادیر 46/43 و 165/83 میلی‌لیتر HCl را در مقداری آب مقطر حل نموده و سپس هر کدام را در بالن ژوژه 1000 میلی‌لیتری با آب مقطر به حجم برسانید.

- تولوئن

- محیط کشت DF: نخست محلول عناصر میکرو را بسازید؛ بدین صورت که 10 میلی‌گرم H_3BO_3، 11/19 میلی‌گرم $MnSO_4.H_2O$، 124/6 میلی‌گرم $ZnSO_4.7H_2O$، 78/22 میلی‌گرم $CuSO_4.5H_2O$ و 10 میلی‌گرم MoO_3 را در 100 میلی‌لیتر آب مقطر حل نمایید. سپس 100 میلی‌گرم $FeSO_4.7H_2O$ را در 10 میلی‌لیتر آب مقطر حل کنید. در پایان چهار گرم KH_2PO_4، شش گرم Na_2HPO_4، 0/2 گرم $MgSO_4.7H_2O$، دو گلوکز، دو گرم گلوکونیک اسید، دو گرم سیتریک اسید، 0/1 میلی‌لیتر از محلول عناصر میکرو و 0/1 میلی‌لیتر از محلول $FeSO_4.7H_2O$ را در یک لیتر آب مقطر حل نموده و سپس pH آن‌را روی 7/2 تنظیم و اتوکلاو کنید.

[1] - 2,4-Dinitrophenylhydrazine

- محیط کشت TSB: به منظور تهیه این محیط کشت، مقدار توصیه شده (مندرج روی بسته‌بندی ماده) از محیط کشت پودری آماده TSB را با توجه به حجم مورد نیاز در میزان مناسب از آب مقطر حل کرده و بسته به تعداد نمونه‌ها، فلاسک‌های ارلن‌مایر 50 میلی‌لیتر دارای 25 میلی‌لیتر از محیط کشت را آماده و اتوکلاو کنید.

- محلول استاندارد آلفا کتوبوتیرات[1] 100 میلی مولار: مقدار 0/0497 گرم از نمک آلفا کتوبوتیرات را در چهار میلی‌لیتر Tris HCl 0/1 مولار حل نموده و سپس pH آن را روی 8/5 تنظیم نمایید. از محلول آلفا کتوبوتیرات 100 میلی‌مولار، محلول 10 میلی مولار در Tris HCl 0/1 میلی‌مولار بسازید. سپس با محلول‌های 0/1، 0/2، 0/4، 0/6، 0/8 و 10 میکرومول آلفا کتوبوتیرات در Tris HCl 0/1 مولار را از محلول 10 میلی مولار آلفا کتوبوتیرات در حجم 200 میکرولیتر تهیه نمایید.

4-2-3- روش کار

- باکتری مطالعه شده را در محیط TSB در زیر هود لامینار کشت دهید. به این صورت که از کلنی خالص باکتری به ارلن دارای 25 میلی‌لیتر محیط کشت TSB تلقیح کرده و آن‌را به مدت 48 ساعت روی یک شیکر انکوباتور با دمای 28 درجه سلسیوس و دور 120rpm قرار دهید.

- در زیر هود لامینار 50 میکرولیتر از سوسپانسیون دوباره در 25 میلی‌لیتر محیط کشت TSB ریخته شود و به‌مدت 48 ساعت روی یک شیکر انکوباتور با دمای 28 درجه سلسیوس و دور 120rpm قرار دهید.

- محتویات فلاسک ارلن‌مایر به لوله سانتریفیوژ منتقل و برای 10 دقیقه با سرعت g 8000 در دمای چهار درجه سلسیوس سانتریفیوژ شده و سپس محلول رویی حذف شود.

- رسوب تشکیل شده توسط محیط کشت DF شستشو داده شود. بدین صورت که رسوب تشکیل شده دوباره در پنج میلی لیتر محلول DF سوسپانسیون شده و سپس برای 10 دقیقه با سرعت g 8000 در دمای چهار درجه سلسیوس سانتریفیوژ و محلول رویی حذف شود.

[1] - α-ketobutyrate

- رسوب تشکیل شده دوباره در 7/5 میلی‌لیتر محلول DF سوسپانسیون شده و به لوله‌های 20 میلی‌لیتری جدید منتقل شود.

- سپس 45 میکرولیتر محلول ACC 0/5 مولار را به سوسپانسیون اضافه نمایید (تا غلظت ACC نهایی سه میلی‌مولار به دست آید) و سپس به مدت 24 ساعت روی شیکر انکوباتور در دمای 28 درجه سلسیوس و دور 120rpm قرار دهید تا فعالیت آنزیم القاء شود.

- سوسپانسیون به مدت 10 دقیقه و در دمای چهار درجه سلسیوس و دور 8000 g سانتریفیوژ شود و سپس محلول رویی حذف شود.

- رسوب تشکیل شده با پنج میلی‌لیتر Tris HCl 0/1 مولار و pH برابر 7/6 سوسپانسیون و در دور 8000 g به مدت 10 دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردد و سپس مایع رویی حذف شود.

- شستشو دو بار تکرار شده تا اطمینان حاصل شود که رسوب حاصل فاقد محیط کشت باکتری است.

- رسوب تشکیل شده در یک میلی‌لیتر Tris HCl 0/1 مولار و pH برابر 7/6 سوسپانسیون شده و پس از انتقال به یک میکروتیوب 1/5 میلی‌لیتری، در دور 16000 g به‌مدت پنج دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس سانتریفیوژ شود و سپس مایع رویی حذف شود.

- رسوب تشکیل شده با پنج میلی‌لیتر Tris HCl 0/1 مولار و pH برابر 7/6 سوسپانسیون شده و سپس 30 میکرولیتر تولوئن اضافه و به مدت 30 ثانیه ورتکس شود.

- مقدار 200 میکرولیتر از سوسپانسیون به‌طور جداگانه به سه میکروتیوب 1/5 میلی‌لیتری منتقل شود (یکی برای شاهد و دو تا برای دو تکرار هر جدایه باکتری).

- به هر میکروتیوب مقدار 20 میکرولیتر از محلول ACC 0/5 مولار اضافه شود. برای مدت کوتاهی ورتکس شود و سپس در دمای 30 درجه سلسیوس به مدت 15 دقیقه انکوبه شود.

- پس از افزودن یک میلی‌لیتر HCl 0/56 مولار، سوسپانسیون ورتکس و به مدت پنج دقیقه در 16000g و در دمای اتاق سانتریفیوژ شود.

- یک میلی‌لیتر از مایع رویی برداشته شده و با 800 میکرو لیتر HCl 0/56 مولار درون یک لوله آزمایش کوچک ورتکس شود.

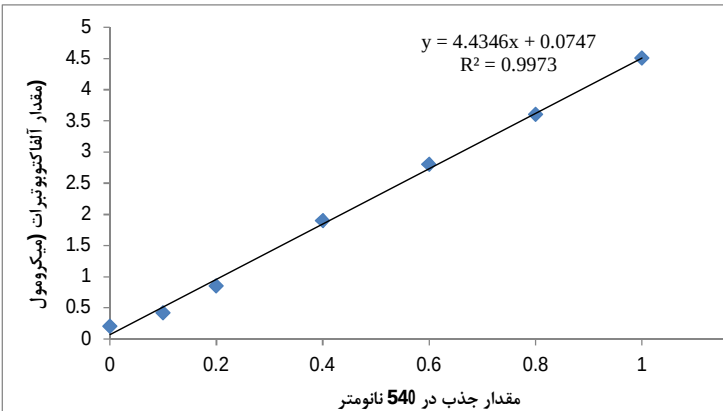
- 300 میکرولیتر از محلول 4،2-دی نیتروفنیل هیدرازین (محلول 0/2 4،2-دی نیتروفنیل هیدرازین در HCl دو مولار) به لوله آزمایش اضافه و ورتکس شود. محتویات هر لوله در دمای 30 درجه سلسیوس به مدت 30 دقیقه انکوبه شوند. سپس دو میلی‌لیتر NaOH دو مولار به نمونه‌ها اضافه نموده و مخلوط گردد تا یکنواخت شود.

- 300 میکرولیتر از محلول 4،2-دی نیتروفنیل هیدرازین (محلول 0/2 درصد 4،2-دی نیتروفنیل هیدرازین در HCl دو مولار) به لوله‌های آزمایش دارای محلول‌های استاندارد اضافه و ورتکس شود. محتویات هر لوله در دمای 30 درجه سلسیوس به مدت 30 دقیقه انکوبه شوند. سپس دو میلی‌لیتر NaOH دو مولار به نمونه‌ها اضافه نموده و مخلوط گردد تا یکنواخت شود.

- با استفاده از اسپکتروفتومتر میزان جذب نور این مخلوط مورد آزمایش و همچنین میزان جذب نور استانداردها را در 540 نانومتر قرائت کنید.

4-2-4- شیوه ارزیابی نتایج آزمون

برای بدست آوردن مقدار آنزیم بر اساس آلفا کتوبوتیرات در ابتدا منحنی استاندارد آلفا کتوبوتیرات تهیه شود. برای اینکار نمودار مقدار جذب و غلظت استاندارد در نرم‌افزار اکسل رسم شده و بهترین معادله (خطی، y=ax-b) با R^2 بالا را بدست آورید. با استفاده از این معادله و قرار دادن مقادیر جذب به جای X، مقدار آلفاکتوبوتیرات (Y) بر حسب میکرومول بدست می‌آید (شکل 5).



شکل 5- نمودار استاندارد آلفا کتوبوتیرات.

5- اندازه‌گیری سنتز سیانید هیدروژن (HCN)[1]

سیانید هیدروژن یک ترکیب معدنی بدون رنگ و بسیار سمی است. سیانید هیدروژن از انتقال الکترون جلوگیری کرده و تأمین انرژی سلول را مختل می‌کند که منجر به مرگ موجودات زنده می‌شود. سیانید هیدروژن می‌تواند توسط برخی از باکتری‌ها به عنوان یک متابولیت ثانویه تولید شود. بسیاری از جنس‌های باکتریایی از جمله گونه‌های *Alcaligenes*، *Aeromonas*، *Bacillus*، *Pseudomonas* و *Rhizobium* دارای توانایی تولید سیانید هیدروژن هستند. این باکتری‌ها از HCN به عنوان مکانیزم دفاعی در برابر عوامل بیماری‌زای خاکزی محیط خود و افزایش غیرمستقیم رشد گیاه استفاده می‌کنند. برای اندازه‌گیری توانایی سنتز سیانید هیدروژن به‌وسیله باکتری می‌توان به‌صورت زیر عمل نمود (Donate-Correa *et al.*, 2005):

5-1- وسایل و تجهیزات

- قاشقک توزین (اسپاتول)
- سمپلر به حجم 100 میکرولیتر
- سر سمپلر استریل به حجم 100 میکرولیتر
- میله شیشه‌ای خمیده
- کاغذ صافی
- پنس
- لوپ (فیلدوپلاتین)
- پارافیلم
- پلیت یا پتری‌دیش
- استوانه مدرج (25 و 1000 میلی‌لیتری)
- فلاسک ارلن‌مایر (50 و500 میلی‌لیتری)
- بالن ژوژه 50 و 2000 میلی‌لیتری
- هود لامینار

[1] - Hydrogen cyanide

- انکوباتور (گرم‌خانه) با قابلیت تنظیم دما و چرخش هوای داخلی
- اتوکلاو
- شیکرانکوباتور با قابلیت تنظیم دما و سرعت چرخش تا 200 دور در دقیقه
- ترازوی آزمایشگاهی

2-5- مواد و واکنش گرها

- معرف پیکرات سدیم: میزان دو گرم کربنات سدیم را پس از توزین در مقداری آب مقطر حل نموده و سپس در بالن ژوژه 100 میلی‌لیتری با آب مقطر به حجم برسانید. سپس میزان 0/5 گرم اسیدپیکریک را توزین و در مقداری آب مقطر حل نموده و سپس در بالن ژوژه 100 میلی‌لیتری با آب مقطر به حجم برسانید. محتوی هر دو بالن را در داخل فلاسک ارلن‌مایر 500 میلی‌لیتری ریخته و بهم بزنید. محلول زرد شفاف خواهید داشت که می‌بایست به صورت تازه مصرف شود.

- محیط کشت TSB: به‌منظور تهیه این محیط کشت، مقدار توصیه شده (مندرج روی بسته‌بندی ماده) از محیط کشت پودری آماده TSB را با توجه به حجم مورد نیاز در میزان مناسب از آب مقطر حل کرده و بسته به تعداد نمونه‌ها، فلاسک‌های ارلن‌مایر 50 میلی‌لیتر دارای 25 میلی‌لیتر از محیط کشت را آماده و اتوکلاو کنید.

- محیط کشت TSA[1] غنی شده با گلایسین: به‌منظور تهیه این محیط کشت، مقدار توصیه شده (مندرج روی بسته بندی ماده) از محیط کشت پودری آماده TSA را در یک لیتر آب مقطر حل نموده و سپس میزان 4/4 گرم گلایسین به آن اضافه و اتوکلاو کنید. در ادامه پس از کاهش دما در پلیت‌های با قطر 10 سانتی‌متر توزیع نمایید.

3-5- روش کار

- باکتری مطالعه شده را در محیط TSB در زیر هود لامینار کشت دهید. به این صورت که از کلنی خالص باکتری به فلاسک ارلن‌مایر دارای 25 میلی‌لیتر محیط کشت TSB تلقیح

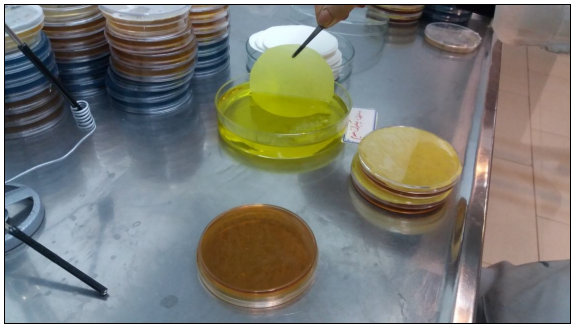
[1] - Tryptic soy agar

کرده و آن‌را به مدت 48 ساعت روی یک شیکر انکوباتور با دمای 28 درجه سلسیوس و دور 120rpm قرار دهید.

- میزان 100 میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با جمعیت یکسان ($1x10^8$ CFU/ml) را روی سطح پلیت‌های دارای TSA ریخته و با میله شیشه‌ای خمیده استریل پخش کنید.

- کاغذهای صافی استریل (مناسب با درب پلیت) را با کمک پنس استریل به معرف پیکرات‌سدیم آغشته کرده و روی درب پلیت (از داخل) قرار دهید (شکل 6).

نکته: کاغذ صافی آغشته با معرف پیکرات‌سدیم به صورتی روی درب پلیت قرار گیرد که محلول از آن خارج نشده و به سطح محیط کشت ریخته نشود.



شکل 6- کاغذ صافی آغشته به معرف پیکرات سدیم.

- درب پلیت‌ها را با پارافیلم بپوشانید و آن‌ها را به مدت 120 ساعت در انکوباتور با دمای 28 درجه سلسیوس قرار دهید.

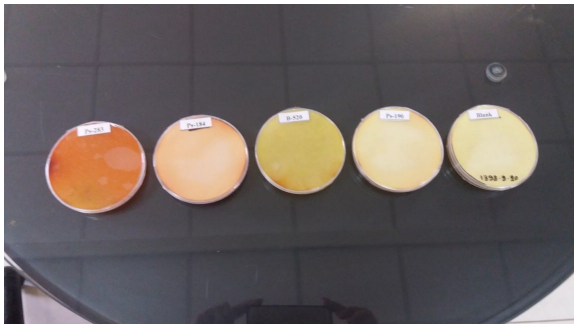
نکته: درب پلیت‌ها به صورت کامل پوشانده شود به‌طوریکه در صورت مثبت بودن نتیجه آزمون، گاز متصاعد شده خارج نشود.

4-5- شیوه ارزیابی نتایج آزمون

توان تولید سیانید هیدروژن به وسیله باکتری را از روی تغییر رنگ کاغذ صافی مطابق جدول 1 ارزیابی نمایید (شکل 7).

جدول 1- تعیین توان تولید سیانید هیدروژن.

رنگ کاغذ معرف	درجه‌بندی سطوح تولید سیانید هیدروژن	توان تولید HCN
زرد	1	عدم تولید
کرم	2	حداقل
نارنجی	3	نسبتاً کم
قهوه‌ای روشن	4	نسبتاً زیاد
آجری	5	حداکثر



شکل 7- تغییر رنگ پلیت‌ها بر حسب شدت تولید گاز سیانید هیدروژن توسط باکتری‌ها.

6- اندازه‌گیری سنتز اگزوپلی‌ساکارید (EPS)[1]

اگزوپلی‌ساکاریدها کربوهیدرات‌های پیچیده‌ای هستند که توسط بسیاری از ریزجانداران به محیط اطراف خود ترشح می‌شوند. این ترکیبات در طی مراحل رشد میکروبی در محیط رها می‌شوند و ازآنجایی‌که متصل به سطح سلول میکروبی نیستند می‌توان آن‌ها را از پلی‌ساکاریدهای کپسوله شده که متصل به سطح سلول هستند متمایز کرد. اگزوپلی-ساکاریدهای میکروبی در دو گره هموپلی‌ساکاریدها (سلولز، دکستران، موتان، آلترنان، پولولان، لوان و کوردلان) و هتروپلی‌ساکاریدها (ژلان و زانتان) قرار می‌گیرند. یکی از مکانیسم‌هایی که توسط آن EPS می‌تواند رشد گیاه را افزایش دهد، بهبود کلونیزاسیون ریشه است. سویه‌های خاصی از ریزوباکترهای مفید، مانند *Azospirillum* و *Rhizobium*،

[1] - Exopolysaccharide

EPS تولید می‌کنند که آن‌ها را قادر می‌سازد به ریشه گیاهان متصل شوند. این اتصال می‌تواند به باکتری‌ها کمک کند تا یک رابطه سودمند دوجانبه با گیاه ایجاد نموده و عناصر غذایی و ترکیبات محرک رشد را مبادله کنند. این امر می‌تواند منجر به بهبود رشد و عملکرد گیاه شود. EPS همچنین می‌تواند جذب عناصر غذایی توسط گیاه را افزایش دهد. به‌عنوان مثال، EPS تولید شده توسط باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن می‌تواند به تشکیل گره در ریشه لگوم‌ها کمک نموده و دسترسی نیتروژن را برای گیاه افزایش دهد. EPS می‌تواند به انحلال فسفر و سایر عناصر غذایی در خاک کمک کند و آها را برای جذب توسط گیاه بیشتر در دسترس قرار دهد. EPS می‌تواند همچنین گیاهان را از عوامل تنش‌زای محیطی مانند خشکی و بیماری محافظت کند. برخی از گونه‌های باکتری‌ها EPS تولید می‌کنند که می‌تواند با کاهش هدر رفت آب از گیاه و افزایش توانایی گیاه برای جمع‌آوری آب، به گیاهان در تحمل خشکی کمک کند. EPS همچنین می‌تواند با تشکیل یک مانع فیزیکی در برابر عوامل بیماری‌زا، گیاهان را در برابر آن‌ها محافظت کنند. در نهایت، EPS می‌تواند مقاومت سیستمیک را در گیاه ایجاد کند. این امر زمانی اتفاق می‌افتد که EPS تولید شده توسط باکتری‌ها واکنشی را در گیاه ایجاد می‌کند که منجر به فعال شدن مکانیسم‌های دفاعی در برابر عوامل بیماری‌زا و سایر عوامل تنش‌زا می‌شود. افزون‌بر این، EPS می‌تواند به عنوان یک مولکول سیگنال‌دهنده عمل کند که ژن‌ها و مسیرهای محرک رشد گیاه را فعال می‌کند. برای اندازه‌گیری توانایی سنتز اگزوپلی‌ساکاریدها به‌وسیله باکتری می‌توان به‌صورت زیر عمل نمود (Moraine and Rogovin, 1966; Bhagat et al., 2021):

6-1- وسایل و تجهیزات

- قاشقک توزین (اسپاتول)
- لوپ (فیلدوپلاتین)
- شیکر انکوباتور، با قابلیت تنظیم دما و سرعت چرخش تا 200 دور در دقیقه
- انکوباتور (گرم‌خانه) با قابلیت تنظیم دما و چرخش هوای داخلی
- ترازوی آزمایشگاهی

- فالکون 50 میلی‌لیتری
- سمپلر به حجم 100 میکرولیتر
- سر سمپلر 100 میکرولیتر استریل
- سانتریفیوژ با سرعت تا 5000 دور بر دقیقه
- فلاسک ارلن‌مایر 50 و 2000 میلی‌لیتری
- هود لامینار
- کاغذ صافی

6-2- مواد و واکنش‌گرها

- محیط کشت TSB: به‌منظور تهیه این محیط کشت، مقدار توصیه شده (مندرج روی بسته‌بندی ماده) از محیط کشت پودری آماده TSB را با توجه به حجم مورد نیاز در میزان مناسب از آب مقطر حل کرده و بسته به تعداد نمونه‌ها، فلاسک‌های ارلن‌مایر 50 میلی‌لیتر دارای 25 میلی‌لیتر از محیط کشت را آماده و اتوکلاو کنید.

- محیط کشت MY: برای تهیه یک لیتر محیط کشت MY 10 گرم گلوکز، پنج گرم پپتون، سه گرم عصاره مالت، سه گرم عصاره مخمر، 40/5 گرم NaCl، 4/85 گرم $MgSO_4.7H_2O$، 3/5 گرم $MgCl_2.6H_2O$، یک گرم KCl، 1/8 $CaCl_2$، 0/013 گرم NaBr و 0/303 گرم NaHCO را در یک لیتر آب مقطر حل نمایید. سپس فلاسک‌های ارلن‌مایر 50 میلی‌لیتر دارای 25 میلی‌لیتر از محیط کشت را آماده و سپس استریل نمایید.

6-3- روش کار

- باکتری مورد مطالعه را در محیط TSB در زیر هود لامینار کشت دهید. به این صورت که از کلنی خالص باکتری به ارلن دارای 25 میلی‌لیتر محیط کشت TSB تلقیح کرده و آن‌را به مدت 48 ساعت روی یک شیکر انکوباتور با دمای 28 درجه سلسیوس و دور 120rpm قرار دهید.

- در زیر هود لامینار 50 میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی با جمعیت 10^8 CFU/ml را به فلاسک ارلن‌مایر دارای 25 میلی‌لیتر محیط کشت MY اضافه کنید و به مدت پنج شبانه‌روز در دمای 28 درجه سلسیوس روی یک شیکر انکوباتور با دور 120 rpm قرار دهید.

- سوسپانسیون به دست آمده را از کاغذ صافی عبور دهید.

- فالکون 50 میلی‌لیتری را توزین نمایید.

- یک حجم از سوسپانسیون را با سه حجم الکل اتانول 96% مخلوط و به مدت 30 دقیقه در دور 5000 rpm سانتریفیوژ نمایید. برای انجام اینکار می‌توانید 10 میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی را با 30 میلی‌لیتر الکل اتانول 96% در فالکون 50 میلی‌لیتری مخلوط کنید.

- مایع رویی خارج و فالکون به همراه رسوب باقی مانده به مدت یک شب در آون با دمای 50 درجه سلسیوس قرار داده شود.

- فالکون به همراه رسوب خشک شده توزین شود.

6-4- شیوه ارزیابی نتایج آزمون

برای بدست آوردن مقدار اگزوپلی‌ساکارید از فرمول زیر استفاده شود:

$$EPS = (W1-W2) \times 1000/V$$

EPS: اگزوپلی‌ساکارید (گرم بر لیتر)

W1: وزن فالکون و رسوب (گرم)

W2: وزن فالکون (گرم)

V: حجم سوسپاسیون باکتری مخلوط شده با الکل اتانول (میلی‌لیتر)

فهرست منابع

Adesemoye, A., Torbert, H. and Kloepper, J. 2009. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. Microbial Ecology, 58: 921-929.

Ahemad, M. and Kibret, M. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. Journal of King saud University-science, 26: 1-20.

Alexander, D. and Zuberer, D. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. Biology and Fertility of soils, 12 :39-45.

Bashan, Y. and De-Bashan, L. 2005. Plant growth-promoting. Encyclopedia of soils in the environment, 1: 103-115.

Bhagat, N. Raghav, M. Dubey, S. and Bedi, N. 2021. Bacterial exopolysaccharides: Insight into their role in plant abiotic stress tolerance. Journal of Microbiology and Biotechnology, 31(8): 1045-1059.

Bhattacharyya, P.N. and Jha, D.K. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28: 1327-1350.

Dell'Amico, E., Cavalca, L. and Andreoni, V. 2005. Analysis of rhizobacterial communities in perennial Graminaceae from polluted water meadow soil, and screening of metal-resistant, potentially plant growth-promoting bacteria. FEMS Microbiology Ecology, 52: 153-162.

Donate-Correa, J., León-Barrios, M. and Pérez-Galdona, R. 2005. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in Chamaecytisus proliferus (tagasaste), a forage tree-shrub legume endemic to the Canary Islands. Plant and Soil, 266: 261-272.

Ghosh, P.K., De, T.K. and Maiti, T.K. 2018. Role of ACC deaminase as a stress ameliorating enzyme of plant growth-promoting rhizobacteria useful in stress agriculture: a review. Role of Rhizospheric Microbes in Soil: 57-106.

Glick, B.R. 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. Scientifica, 2012.

Glick, B.R. 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. Microbiological research, 169: 30-39.

Gordon, S.A. and Weber, R.P. 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. Plant physiology, 26: 192.

Hungria, M., Campo, R.J., Souza, E.M. and Pedrosa, F.O. 2010. Inoculation with selected strains of Azospirillum brasilense and A. lipoferum improves yields of maize and wheat in Brazil. Plant and soil, 331: 413-425.

Jahandideh Mahjen Abadi, V.A., Sepehri, M., Rahmani, H.A., Dolatabad, H.K., Shamshiripour, M. and Khatabi, B. 2021. Diversity and abundance of culturable nitrogen□fixing bacteria in the phyllosphere of maize. Journal of Applied Microbiology.

Jahandideh Mahjen Abadi, V.A., Sepehri, M., Rahmani, H.A., Zarei, M., Ronaghi, A., Taghavi, S.M. and Shamshiripour, M. 2020. Role of Dominant Phyllosphere Bacteria with Plant Growth–Promoting Characteristics on Growth and Nutrition of Maize (Zea mays L.). Journal of soil science and plant nutrition, 20: 2348-2363.

Lugtenberg, B. and Kamilova, F. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. Annual review of microbiology, 63: 541-556.

Moraine, R. and Rogovin, P. 1966. Kinetics of polysaccharide B□1459 fermentation. Biotechnology and Bioengineering, 8: 511-524.

Penrose, D.M. and Glick, B.R. 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase□containing plant growth□promoting rhizobacteria. Physiologia plantarum, 118: 10-15.

MINISTRY OF AGRICULTURE – JAHAD
Agricultural Research, Education and Extension Organization
Soil and Water Research Institute

Laboratory Methods for Measurement of Plant Growth-Promoting Traits using Bacteria

Vahid Alah Jahandideh Mahjenabadi, Kazem Khavazi, Houshang Khosravi, Mahdieh Shamshiripour, Khadijeh Arbabi, Akram Otadi and Neda Alizadeh

2023