

## بررسی توان تولید آنزیم ACC دامیناز در باکتری‌های جداسازی شده از خاک‌های خشک، شور و شور سدیمی و انتخاب باکتری کارآمد در تولید آنزیم

رضا سلیمانی: استادیار خاکشناسی سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ایران، rssoleimani@ut.ac.ir  
حسینعلی علیخانی\*: استادیار بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشگاه تهران، ایران، halikhan@ut.ac.ir  
حسن توفیقی: دانشیار شیمی خاک، دانشگاه تهران، ایران، htolfghi@ut.ac.ir

### چکیده

**مقدمه:** تنش‌های خشکی، شوری و شور سدیمی، از راه‌های گوناگونی مانند ساخت زیستی اتیلن تنش‌ی مایه کاهش رشد گیاهان می‌شوند. به دلیل توانابودن برخی از باکتری‌های خاک در کاهش تنش و مصرف پیشنیاز تولید اتیلن (ACC)، این پژوهش برای دستیابی به باکتری برتر سازنده آنزیم ACC دامیناز در تنش‌های خشکی، شوری و شور سدیمی خاک‌ها انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** در این پژوهش، با جداسازی 400 باکتری از خاک‌های با قابلیت هدایت الکتریکی و نسبت جذب سدیمی گوناگون، توان تجزیه ACC و ساخت آلفاکتوبوتیرات به‌عنوان معیار ساخت آنزیم ACC دامیناز در باکتری‌های سازنده این آنزیم و اثر تنش‌های خشکی و شوری بر روند رشد باکتری‌ها و توان مصرف ACC بررسی شد.

**نتایج:** پردازش و آزمون داده‌ها نشان داد که نه تنها توانایی ساخت آنزیم ACC دامیناز در میان جدایه‌ها با هم ناهم‌اند بود، بلکه اندازه مصرف ACC در آنها بسیار وابسته به تنش‌های خشکی و شوری بود. در بیشتر جدایه‌های باکتری، با افزایش تنش، روند کاهشی معنی‌داری در مصرف ACC دیده شد؛ اما گونه باکتری باسیلوس سیمپلکس که از خاک‌های شور سدیمی جداسازی شد، افزون بر توانایی ساخت 901 نانو مول آلفاکتوبوتیرات بر میلی گرم پروتئین در ساعت در شرایط بدون تنش، دارای بیشترین پایداری مصرف ACC در تنش‌های خشکی و شوری بود. این باکتری، در برابر دیگر جدایه‌ها، بردباری نسبی بیشتری به تنش‌های خشکی و شوری دارد و تا شوری 40 دسی‌زیمنس بر متر و پتانسیل اسمزی 25 بار، همچنان ACC را مصرف کرد.

**بحث و نتیجه‌گیری:** با بررسی باکتری‌های جداسازی شده آشکار شد که باکتری باسیلوس سیمپلکس، کارایی بیشتری در ساخت آنزیم ACC دامیناز در تنش‌های خشکی و شوری داشت و بردبار به تنش‌های یادشده بود؛ بنابراین، کاربرد این باکتری برای کاهش تنش‌ها در خاک‌های شور و شور سدیمی و مناطق خشک و نیمه‌خشک در شرایط مزرعه پیشنهاد شد.

\* نویسنده مسئول مکاتبات

### واژه‌های کلیدی: باکتری باسیلوس سیمپلکس، آنزیم ACC دامیناز، خشکی، شوری، شور سدیمی

#### مقدمه

کم‌آبی، شوری و شور سدیمی بودن ذاتی خاک‌ها و همچنین شور شدن ثانویه<sup>1</sup> در بسیاری از مناطق خشک و نیمه‌خشک جهان و بخش‌های گسترده‌ای از ایران به‌عنوان یک دشواری و عامل کاهش‌دهنده رشد، کارکرد و کیفیت گیاهان کشاورزی به‌شمار می‌رود. ساخت زیستی حداقل<sup>2</sup> در خاک‌های شور و شور سدیمی به‌دلیل فراوانی و تعادل ناشایست غلظت کاتیون‌ها و آنیون‌های محلول خاک (در خاک‌های شور و شور سدیمی)، درصد سدیم تبادل<sup>3</sup> بیشتر از 15 و نسبت جذب سطحی سدیم<sup>4</sup> بیشتر از 13 (در خاک‌های شور سدیمی) رخ می‌دهد (1). به‌رأی گامالرو و گلیک<sup>5</sup>، برخی از تنش‌ها مانند کم‌آبی و شوری مایه دگرگونی فیزیولوژی گیاه می‌شوند. افزایش ساخت زیستی اتیلن و رسیدن غلظت آن به اندازه کاهش‌دهنده رشد گیاهی یکی از این دگرگونی‌ها است که به آن ساخت اتیلن تنشی گویند (2). سیدیکی<sup>6</sup> و همکاران نیز گزارش کردند که اتیلن ساخته‌شده در پاسخ به تنش شوری، مایه کاهش رشد ریشه و در پی آن کاهش جذب آب و عناصر غذایی و کاهش رشد گیاه می‌شود (3). با کاهش ساخت ACC<sup>7</sup> (1 آمینو سیکلو پروپان 4 کربوکسیلات پیش‌نیاز ساخت اتیلن)، گیاه با کمک باکتری‌های سازنده آنزیم ACC دامیناز، از ساخت بیش از اندازه طبیعی اتیلن در گیاه جلوگیری می‌کند.

ساخت آنزیم ACC دامیناز در باکتری‌های مختلفی از جمله در جنس‌های سودوموناس و باسیلوس گزارش شده است (4). حضور این ژن و فعالیت آنزیم ACC دامیناز بیشتر در سودوموناس فلورسنس جداسازی‌شده از ریزوسفر گیاهان مختلف بررسی شده است. برخی از پژوهشگران، فعالیت‌نداشتن این آنزیم را در سایر گونه‌ها، مانند سودوموناس استاتوری و همچنین در جنس‌های ازتوباکتروانتروباکتر گزارش کرده‌اند (5). استفاده از سویه‌های باکتری بومی با توجه به سازش به شرایط محیطی (6) و برهم‌کنش بهتر با گیاهان هر منطقه می‌تواند اثر بیشتری داشته باشد. یک مدل برای شناخت کارایی ACC دامیناز در کاهش اندازه اتیلن در گیاهان را گلیک و همکاران پیشنهاد کرده‌اند (7). در این مدل آمده است که یک باکتری با توانایی ساخت ACC دامیناز پس از پیوستن به بذر یا ریشه گیاه، مونومرهای ACC را در دو گام جدا کردن و شکستن<sup>8</sup> به آلفا کتوبوتیرات<sup>9</sup> و آمونیوم دگرگون می‌کند. با کاهش ACC در رویه بیرونی، برای پیدایش تعادل میان اندازه ACC در درون و بیرون یاخته‌های ریشه گیاه، اندازه بیشتری از ACC ساخته‌شده خود را به بیرون (در خاک) ترشح می‌کند و با پیدایش یک شیب از درون بافت گیاه به سوی بیرون، مایه کاهش غلظت ACC و در پی آن غلظت اتیلن درون گیاه می‌شود. با این فرایند، باکتری‌های سازنده آنزیم ACC دامیناز باعث می‌شوند

10) آماده و 0/1 میلی‌لیتر از آن روی پلیت دارای محیط کشت آگار مغذی پخش شد. همه پلیت‌ها در دمای 28 درجه سانتیگراد برای 5 روز گرماگذاری شدند. برای خالص‌سازی جدایه‌ها، کلنی‌های پدیدآمده از بالاترین رقت‌های هر نمونه کشت شده گزینش شد و دوباره روی محیط کشت رشد داده شد و تا زمان بهره‌گیری از آنها روی محیط کشت شیدار<sup>15</sup> در یخچال نگهداری شدند.

که اندازه اتیلن به مرز بحرانی برای رشد گیاه نرسد به گونه‌ای که بوته میری گیاهان به‌ویژه در آغاز رشد کاهش می‌یابد.

بنابراین با هدف جداسازی باکتری‌های توانمند در ساخت ACC- دآمیناز از خاک‌های خشک، شوری و شور سدیمی و بررسی توان بردباری در برابر تنش‌های خشکی و شوری آنها این پژوهش انجام شد.

### مواد و روش‌ها

نمونه برداری از خاک‌های معمولی، شور و شور سدیمی به منظور جداسازی باکتری: در آغاز از 60 جایگاه از استان خوزستان از خاک‌های همانندی از دیدگاه شوری و شور سدیمی بودن نمونه برداری خاک‌ها از مزارع گندم انجام شد. خاک ریزوسفری با استفاده از پروتکل مربوطه با روش تکان دادن ملایم ریشه‌ها به مدت 10 دقیقه در یک لیتر آب استریل دارای 0/9 درصد کلرید سدیم آماده شد (8). برای جداسازی باکتری‌ها، حدود 250 گرم از نمونه خاک‌ها، در دمای 4 درجه سانتیگراد نگهداری شد. سپس pH، قابلیت هدایت الکتریکی<sup>10</sup>، عصاره اشباع، غلظت کلسیم به روش کمپلکسومتری<sup>11</sup>، غلظت سدیم و پتاسیم به روش فلیم فتومتری<sup>12</sup> اندازه‌گیری شد و با توجه به این نتایج، نسبت جذب سطحی سدیم نیز برآورد گردید (9).

جداسازی<sup>13</sup> و خالص‌سازی<sup>14</sup> باکتری‌ها: در این گام در آغاز سوسپانسیون همگن خاک آماده شد. به این گونه که 10 گرم خاک به ارلن مایر 250 میلی‌لیتری دارای 90 میلی‌لیتر آب مقطر سترون، ریخته و در شیکر با 120 دور در دقیقه در دمای 28 درجه سانتیگراد برای 30 دقیقه گذاشته شد. سپس سری‌های رقت (از 10<sup>-1</sup> تا 9

در آن محیط اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری کمی آلفا کتوبوتیرات: برای این کار از روش پنروز و گلیک بیره‌گیری شد (10). در این روش از 16 جدایه برتر از باکتری‌های غربال‌شده در گام‌های پیشین، سوسپانسیون باکتری با بهره‌گیری از محیط کشت TSB<sup>18</sup> آماده شد. سپس 50 میکرولیتر از آن به 30 میلی‌لیتر محیط کشت در ارلن ریخته شد و به مدت 12 ساعت روی شیکر با چرخش 180 دور در دقیقه و دمای 28 درجه سانتیگراد گذاشته شد. آنگاه سوسپانسیون درون ارلن، در دمای 4 درجه سانتیگراد به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ (8000 g) شد. یاخته‌های مانده در ته لوله پس از شستشو با مایع حداقل DF، در 7/5 میلی‌لیتر از همان محیط سوسپانسیون شد و همه آن درون ارلن 50 میلی‌لیتری سترون ریخته شد. سپس به اندازه 45 میکرولیتر از محلول نیم‌مولار ACC به سوسپانسیون باکتری یادشده افزوده شد و به مدت 24 ساعت روی شیکر (با چرخش 150 دور در دقیقه و دمای 30 درجه سانتیگراد) گذاشته شد تا فعالیت آنزیم برانگیخته شود. پس از سانتریفیوژ (8000g) به مدت 10 دقیقه و در دمای 4 درجه سانتیگراد، یاخته‌های مانده در ته لوله با 5 میلی‌لیتر از Tris-HCl یک‌دهم مولار با pH برابر 7/5 شسته شدند. یاخته‌های مانده در ته لوله در یک میلی‌لیتر از محلول شستشوی یادشده حل شد و همه آن به لوله میکروسانتریفیوژ ریخته شد و در دمای 4 درجه سانتیگراد سانتریفیوژ (10000g) برای 5 دقیقه) گردید. محلول رویی دور ریخته شد و پس از اینکه یاخته‌های مانده در ته لوله در 600 میکرولیتر از Tris-HCl یک‌دهم مولار در pH برابر 7/5 آب آویز شدند به اندازه 30 میکرولیتر تولوئن به آن افزوده شد و برای

ارزیابی کیفی جدایه‌ها از دیدگاه توان ساخت ACC-دآمیاز: برای انجام این آزمایش از سه سری ظروف پلیت دارای محیط کشت DF<sup>16</sup> بهره‌برداری شد:

1 ظروف پلیت دارای محیط کشت DF و ACC (به‌عنوان تنها منبع نیتروژن)

2 شاهد مثبت: ظروف پلیت دارای محیط کشت DF و کلرید آمونیوم (منبع نیتروژنی پایه)

3 شاهد منفی: ظروف پلیت دارای محیط کشت DF بدون هر گونه منبع نیتروژنی

سپس مایه‌زنی و انکوباسیون انجام شد و اندازه‌گیری‌های پدیدآمده در ظروف پلیت با شاهد سنجیده و ارزیابی شدند (8).

همچنین توانایی جدایه‌ها در ساخت آنزیم ACC دآمیاز در محیط مایع با بهره‌برداری از روش بهبودیافته پنروز و گلیک<sup>19</sup> آزمایش شد (10). برای این کار، یک لوب از هر جدایه به 25 میلی‌لیتر محیط کشت TSB در ارلن‌های 100 میلی‌لیتری مایه‌زنی شد. پس از 24 ساعت از رشد باکتری در دمای 28 درجه سانتیگراد، به اندازه 50 میکرولیتر از سوسپانسیون هر جدایه به 25 میلی‌لیتر محیط کشت در سه محیط زیر و در 4 تکرار مایه‌زنی و برای 24 ساعت روی شیکر با دمای 28 درجه سانتیگراد و دور 80rpm تکان داده شد:

1 محیط کشت DF

2 محیط کشت DF همراه با 100 میکرولیتر ACC 0/3 مولار

3 محیط کشت DF همراه با 100 میکرولیتر سولفات آمونیوم

دانشیه نوری این محیط‌ها در طول موج 540 نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر همانند شناسه‌ای از رشد باکتری

تولونی شده با 100 میکرولیتر سود 0/1 نرمال مخلوط شد. 50 میکرولیتر از هر نمونه با بافر Tris-HCl (8/5 pH) و معرف کوماسی بلو تیمار شد و پس از 30 دقیقه مقدار پروتئین با مقایسه جذب نوری با منحنی استاندارد (حاصل از پروتئین خالص آلبومین) در طول موج 595 نانومتر تعیین شد.

آزمون بردباری در برابر تنش خشکی جدایه‌های باکتری: به منظور ارزیابی توان بردباری جدایه‌ها، اندازه گوناگونی از تنش خشکی، از توان رشد آنها در محیط کشت تریپتیک سوی برات دارای غلظت‌های گوناگون پلی اتیلن گلیکول 6000<sup>۲۰</sup> بهره‌گیری شد. پایه معادله میشل و کافن<sup>۲۱</sup>، غلظت‌های صفر، 202/2، 295/7، 367/7، 428/4 و 481/9 گرم پلی اتیلن گلیکول 6000 برای هر کیلوگرم محیط کشت تریپتیک سوی برات برابر پتانسیل‌های آبی 0، 5، 10، 15، 20 و 25 بار بود (12). اندازه رشد جدایه‌ها با اندازه‌گیری چگالی نوری<sup>۲۲</sup> محیط رشد آنها در طول موج 600 نانومتر، با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد و درصد کاهش رشد هر جدایه در اندازه‌های پلی اتیلن گلیکول به کاررفته در برابر رشد همان جدایه در محیط تریپتیک سوی برات برآورد گردید. 3 تکرار از محیط تریپتیک سوی برات مایه‌زنی نشده دارای اندازه‌های گوناگون پلی اتیلن گلیکول نیز همانند شاهد برای اندازه‌گیری میزان چگالی نوری این محیط در شرایط یادشده آماده شد (13).

آزمون بردباری در برابر تنش شوری جدایه‌های باکتری: برای این کار، توان رشد جدایه‌های باکتری در محیط کشت تریپتیک سوی برات دارای اندازه‌های گوناگون نمک‌های کلرید سدیم، کلرید کلسیم و کلرید منیزیم

30 ثانیه ورتکس<sup>۱۹</sup> شد. آنگاه به اندازه 200 میکرولیتر از سوسپانسیون یادشده جداگانه به یک لوله شاهد و سه لوله میکروسانتریفیوژ 1/5 میلی لیتری جدید ریخته شد. به اندازه 20 میکرولیتر از محلول ACC نیم مولار به هر یک از لوله‌های میکروسانتریفیوژ دارای 200 میکرولیتر از یاخته‌های باکتری افزوده شدند. لوله‌ها در آغاز ورتکس و سپس به مدت 15 دقیقه در دمای 30 درجه سانتیگراد نگهداری شدند. آنگاه یک میلی لیتر اسید کلریدریک 0/56 مولار به هر لوله افزوده شد و محلول نهایی درون هر لوله با بهره‌گیری از ورتکس آمیخته و در دمای اتاق، سانتریفیوژ (10000g) به مدت 5 دقیقه (نگهداری گردید). یک میلی لیتر از محلول رویی درون هر لوله میکروسانتریفیوژ برداشته و با 800 میکرولیتر از اسید کلریدریک 0/56 مولار، درون یک لوله آزمایش کوچک ورتکس شد. 300 میکرولیتر از محلول 4، 2 دی نیترونیل نیدرازین (محلول 0/2 درصد 4، 2 دی نیترونیل نیدرازین در اسید کلریدریک دو مولار) به هر لوله افزوده شد، با انجام ورتکس، هر لوله به مدت 30 دقیقه در دمای 30 درجه سانتیگراد خوابانده شد. پس از آن به محلول یادشده 2 میلی لیتر سود 2 مولار افزوده و آمیخته گردید تا یکنواخت شود. در پایان، دانسیته نوری (OD) در طول موج 540 نانومتر به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (برای آماده‌سازی محلول‌های استاندارد از ماده خالص آلفا کتوبوتیرات بهره‌گیری شد). نتایج برحسب نانومول آلفا کتوبوتیرات بر میلی گرم پروتئین در ساعت گزارش شد. برای اندازه‌گیری مقدار پروتئین نمونه‌ها از روش برادفورد استفاده شد (11). براساس این روش، 100 میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری

سانتیگراد به مدت یک دقیقه، اتصال<sup>۲۶</sup> در دمای 55 درجه سانتیگراد به مدت 1 دقیقه، طویل شده<sup>۲۷</sup> در دمای 72 درجه سانتیگراد به مدت 2 دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای 72 درجه سانتیگراد به مدت 10 دقیقه انجام شد (16). فرآورده به دست آمده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در ژل آگارز 1 درصد، بارگذاری و پس از دیدن باند ویژه آن (bp1400)، به کمک راهنما<sup>۲۸</sup>، برای تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی فرستاده شد (17).

**تجزیه‌های آماری:** آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی<sup>۲۹</sup> (CRD) در 4 تکرار با منبع تغییر باکتری (16 جدایه باکتری برای تولید آلفاکتوتیرات) و در مورد تیمارهای خشکی و شوری با 6 اندازه گوناگون تنش انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با بهره‌گیری از نرم‌افزار SAS (v 9.1) انجام شد و نتایج تجزیه واریانس به دست آمد؛ سپس با بهره‌گیری از آزمون چنددامنه‌ای دانکن<sup>۳۰</sup>، میانگین داده‌ها در پایه آماری 5 درصد با یکدیگر سنجیده شدند.

### نتایج

نتایج تجزیه شیمیایی خاک‌های نمونه برداری شده نشان داد که بازه شوری خاک‌ها میان 0/1 تا 26/3 دسی‌زیمنس بر متر و نسبت جذب سدیمی میان 0/1 تا 30/12 (میلی‌اکی‌والان بر لیتر)<sup>0/5</sup> است. همچنین میانگین سدیم، کلسیم و منیزیم محلول خاک به ترتیب 56، 22 و 17 میلی‌اکی‌والان بر لیتر و میانگین pH خاک‌ها، 7/61 بود. تعداد 400 باکتری از خاک ریزوسفری و ناریزوسفری جداسازی گردید. با نگاه به اندازه رشد باکتری و قطر کلنی پدیدآمده در برابر شاهد

ارزیابی شد. اندازه‌های نمک افزوده شده به گونه‌ای به کار رفت که شوری‌های صفر، 5، 10، 20، 30 و 40 دسی‌زیمنس بر متر به دست آید. سپس دگرگونی رشد جدایه‌ها با اندازه‌گیری چگالی نوری محیط رشد آنها در طول موج 600 نانومتر، با دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری و مقایسه شد.

**شناسایی جدایه برتر:** برای شناسایی باکتری برتر به روش ژنتیکی (*16S rRNA*)، استخراج DNA با روش استاندارد انجام شد (14). در آغاز کافت یاخته و دگرگون کردن پروتئین‌ها با بهره‌گیری بافر کافنده (لیزوزیم، EDTA، SDS، پروتئیناز K)، انجام شد و سپس با بهره‌گیری از فنل و کلروفرم همه بخش‌ها غیر از اسیدهای نوکلئیک ته‌نشین داده شد (15). در پایان، با بهره‌گیری از استات سدیم و اتانول مطلق سرد، DNA محلول ته‌نشین شد. در این پژوهش، برای تکثیر ژن *SI6 rRNA* جدایه برگزیده از پرایمرهای FP (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3) و RP (5'AAGGAGGTGATCCAGCCGCA3) بهره‌گیری شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز<sup>۳۳</sup> با بهره‌گیری از دستگاه ترموسایکلر با شرایط تکثیر<sup>۳۴</sup> استاندارد انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با حجم نهایی 25 میکرولیتر شامل 5 میکرولیتر DNA الگو، 0/5 میکرولیتر از هر پرایمر، 0/5 میکرولیتر (200 μM) dNTP Mix، 0/8 میکرولیتر (50 mM) MgCl<sub>2</sub>، 0/2 میکرولیتر آنزیم Taq Polymerase انجام شد. در ادامه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دستگاه ترموسایکلر با شرایط دمایی 3 دقیقه واسرشت<sup>۳۵</sup> در دمای 95 درجه سانتیگراد و در ادامه 35 چرخه شامل واسرشت شدن در دمای 95 درجه

شور، شور-سدیمی و معمولی به ترتیب 9، 9 و 7 درصد بود (شکل 1 ب).

**تغییرات توان ساخت آلفاکتوبوتیرات در جدایه‌های باکتری**  
نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تفاوت میان توان ساخت آلفاکتوبوتیرات در جدایه‌های باکتری در سطح 5 درصد معنی دار بود (جدول 1). میان این 11 باکتری، جدایه‌های RN86، BN243 و RSS33 به ترتیب با توان ساخت 906، 904 و 901 نانومول آلفاکتوبوتیرات/میلی گرم پروتئین/ساعت بیشترین اندازه آلفاکتوبوتیرات را ساختند و در یک گروه آماری قرار گرفتند (جدول 2). هرچند تفاوت‌هایی در توان ساخت آلفاکتوبوتیرات میان جدایه‌های برتر دیده شد، 5 جدایه که از دیدگاه مقایسه قطر کلنی‌ها، دارای توان مصرف ACC کمتری بودند (توان 0/80) هماهنگی بیشتری با توان ساخت آلفاکتوبوتیرات داشته و میان 0/39 تا 0/48 میکرومول در میلی گرم پروتئین در ساعت ساختند.

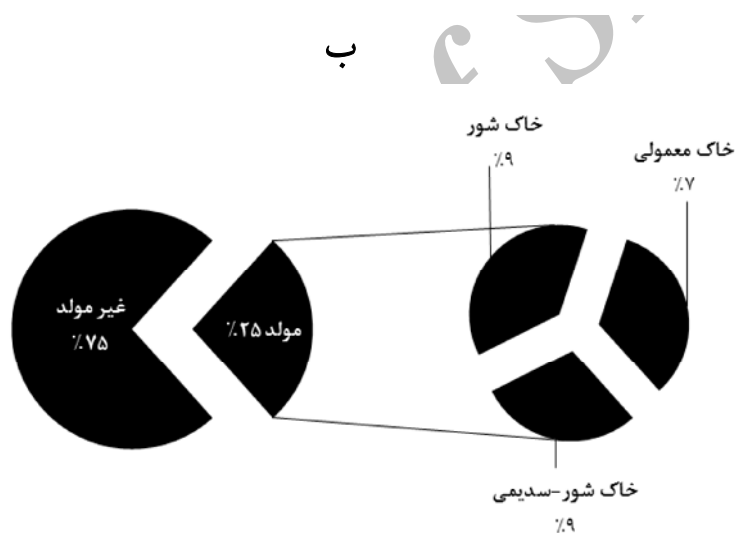
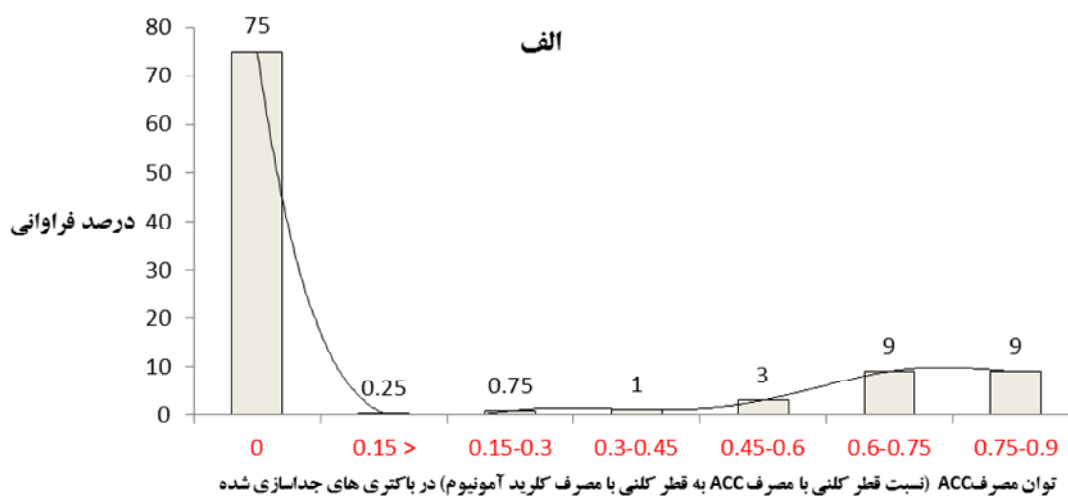
جدول 1 تجزیه واریانس داده‌های توان ساخت آلفاکتوبوتیرات در باکتری‌ها

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	احتمال
تکرار	3	<sup>ns</sup> 1/84	0/349
جدایه باکتری	15	612/4 *	0/017
خطا	45	12/1	-
5/64CV%=			

\* نشان‌دهنده معنی دار بودن در سطح 5 درصد است.

مثبت، سویه‌های توانمند در ساخت آنزیم ACC - دامیناز گزینش شدند. نتایج بررسی کیفی توان ساخت آنزیم در باکتری‌های جدا شده نشان داد که 101 جدایه، رشد شایسته‌ای در محیط کشت دارای ACC داشته و همانند جدایه‌های سازنده آنزیم ACC دامیناز آزمایش شدند.

**فراوانی جدایه‌های باکتری سازنده آنزیم ACC دامیناز:**  
نسبت قطر کلنی‌ها با کاربرد ACC به قطر کلنی با کاربرد کلرید آمونیوم میان صفر و 1 بود. فراوانی باکتری‌ها در کاربرد ACC، در بازه‌های با 0/15 اختلاف در شکل 1-الف نشان داده شده است. همان گونه که دیده می‌شود، تنها 2 درصد از باکتری‌ها در بالاترین بازه توان کاربرد ACC (بیش از 0/85) هستند که در آزمایش‌ها، این باکتری‌های برتر از دیدگاه توانایی ساخت آنها در تنش‌های خشکی و شوری و همچنین توان بردباری خود جدایه‌ها به تنش بررسی شدند؛ همچنین به منظور ازدست‌ندادن جدایه یا جدایه‌های توانای دیگر، شماری از باکتری‌ها که همانندی چشمگیری با گروه نخست از دیدگاه توان ساخت آنزیم ACC دامیناز نداشتند نیز آزمایش شدند (جدول 2). با بررسی فراوانی‌ها، آشکار شد که 75 درصد از باکتری‌ها، بدون توان مصرف یا با توان مصرف ناچیز (کمتر از 0/1) بودند؛ همچنین، آشکار شد که از میان باکتری‌های جداسازی شده که سازنده آنزیم ACC دامیناز بودند (25 درصد)، سهم خاک‌های



شکل 1 مقایسه فراوانی توان مصرف ACC (الف) و نسبت باکتری های سازنده و غیرسازنده (ب) فراوانی نسبی جدایه های باکتری سازنده ACC در میانز در خاک های نمونه برداری شده

جدول 2 توان ساخت آلفا کتوبوتیرات در جدایه های باکتری برتر

شیب منحنی بردباری در برابر تنش		توان ساخت آلفا کتوبوتیرات (نانومول در میلی گرم پروتئین در ساعت)	جدایه های باکتری	ردیف
شوری	خشکی			
0/141±0/013c	0/201±0/018c	550±41c	BSS179	1
0/148±0/014c	0/193±0/016c	511±38c	BSS236	2
0/138±0/014a	0/205±0/019a	684±43c	BSS167	3
0/146±0/012b	0/194±0/018c	507±43c	BS132	4
0/151±0/014d	0/188±0/016c	732±61b	BS58	5
0/143±0/012b	0/221±0/021c	724±74b	RN84	6
0/135±0/011c	0/209±0/019c	906±87a	RN86	7



0/102±0/011b	0/120±0/011d	901±95a	RSS33	8
0/134±0/012c	0/151±0/014c	416±51b	BSS174	9
0/138±0/014c	0/193±0/017c	431±44c	BSS172	10
0/163±0/014a	0/202±0/018a	904±92a	BN243	11
0/131±0/011b	0/144±0/013c	386±42d	BSS235	12
0/132±0/012d	0/158±0/015c	313±38d	BSS194	13
0/143±0/014b	0/201±0/018c	354±43d	BS89	14
0/132±0/014c	0/174±0/016c	313±37d	BS77	15
0/128±0/012b	0/203±0/017d	394±49d	RS3	16

میانگین‌هایی که با حرف یا حروف مشترک مشخص شده‌اند براساس آزمون دانکن در سطح 5 درصد اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

بدون تأثیر شوری و سدیمی = N، شور-سدیمی = SS، شور = S، توده خاک = B، ریزوسفر = R

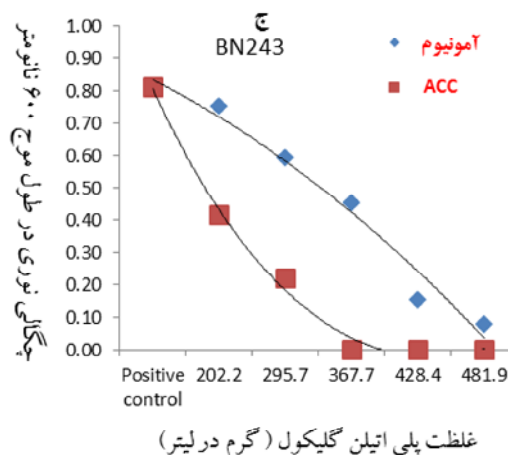
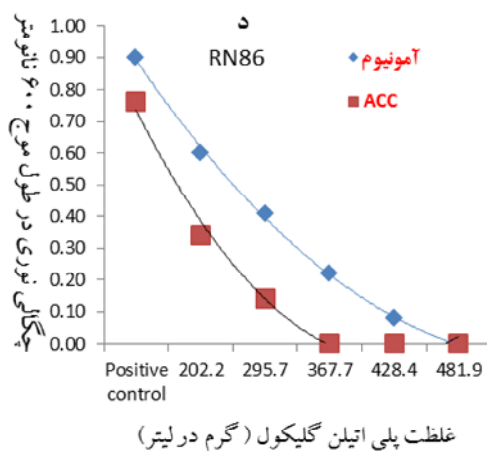
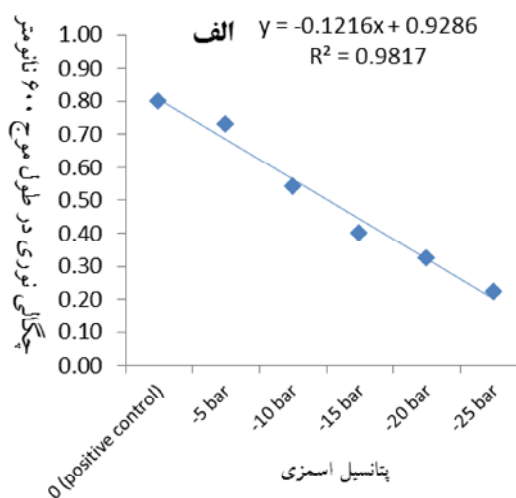
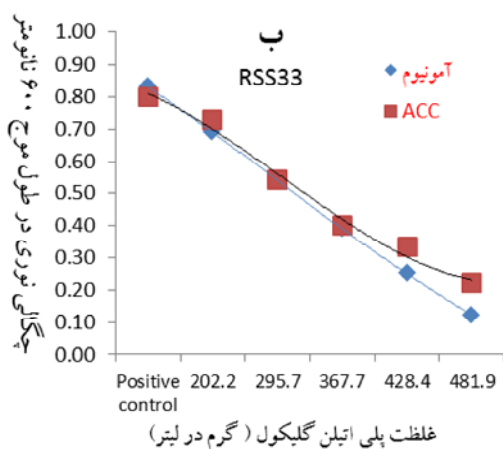
*RN86* و *BS243* با شیب‌های 0/165 و 0/171، توان

بردباری در برابر خشکی پایین‌تری داشتند.

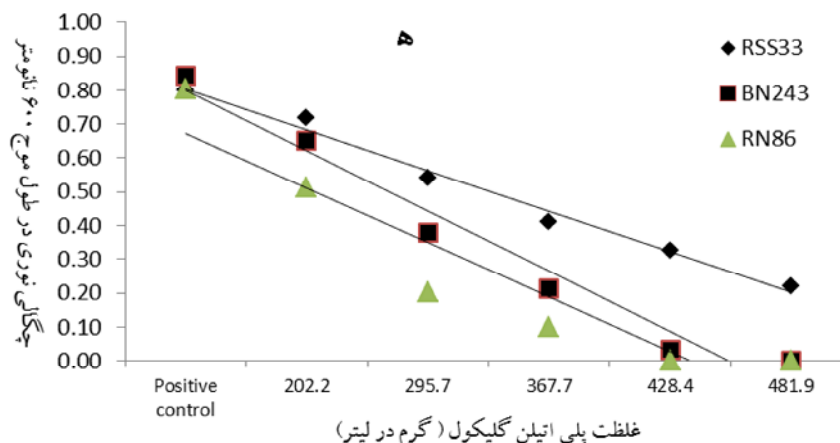
همچنین، ارزیابی توان بردباری در برابر شوری جدایه‌ها با بهره‌گیری از محلول‌های نمکی (ترکیبی از کلریدهای سدیم، کلسیم و منیزیم) نشان داد که در این شرایط نیز، با افزایش قابلیت هدایت الکتریکی، چگالی نوری در طول موج 600 نانومتر تغییر یافت؛ در این حالت نیز، روند کلی شیب منحنی حاصل، شدت پاسخ جدایه‌های باکتری را به تنش شوری نشان داد؛ به طوری که شیب کاهشی کمتر، نشان‌دهنده بردباری نسبی بیشتر است. همان‌طور که در جدول 2 دیده می‌شود جدایه *RSS33* با شیب 0/102 بزرگ‌ترین جدایه و پس از آن جدایه‌های *BSS235* و *BS77* به ترتیب با شیب‌های 0/131 و 0/132 در رتبه‌های بعدی قرار داشتند. منحنی‌های حاصل از آزمون بردباری در برابر تنش شوری در مورد جدایه‌های *BSS243* و *RN86* دارای شیب کاهشی شدیدتری نسبت به جدایه *RSS33* بود (جدول 2).

مقایسه توان بردباری به تنش خشکی و شوری: در مورد

سنجش تنش خشکی، با حل کردن مقادیر مختلف ماده پلی‌اتیلن گلیکول 6000 در محیط کشت باکتری، قابلیت بهره‌گیری مولکول‌های آب کاهش یافت و پتانسیل‌های اسمزی ناهمانندی ایجاد شد. همان‌طور که در شکل 2 در مورد جدایه *RSS33* دیده می‌شود، با افزایش غلظت پلی‌اتیلن گلیکول 6000 در محیط کشت، چگالی نوری ( $OD_{600}$ ) به عنوان معیاری از رشد باکتری، روند کاهشی نشان داد. شیب منحنی حاصل، بیانگر شدت پاسخ جدایه باکتری به تنش ایجاد شده است. به طوری که شیب کاهشی کمتر (شیب ملایم‌تر)، نشان‌دهنده بردباری نسبی بیشتر است که در مورد جدایه *RSS33*، این شیب برابر با 0/121 بود (شکل 2 الف). وضعیت کاهشی چگالی نوری و مقایسه سه جدایه برتر سازنده آنزیم ACC دامیناز در شکل 2 نشان داده شده است. همان‌طور که در جدول 2 نشان داده شده است، جدایه *RSS33* نسبت به جدایه‌های دیگر، دارای توان بردباری در برابر خشکی بیشتری بود و جدایه‌های



شکل 2 (الف) پیامد تنش خشکی بر روند رشد جدایه RSS33، (ب) پیامد مصرف ACC و آمونیوم ( $\text{NH}_3$ ) بر روند رشد جدایه RSS33 در تنش، (ج) پیامد مصرف ACC و آمونیوم بر روند رشد جدایه BN243 در تنش، (د) پیامد مصرف ACC و آمونیوم بر روند رشد جدایه RN86 در تنش و (ه) مقایسه سه جدایه برتر سازنده آنزیم ACC دامیناز متأثر از تنش خشکی



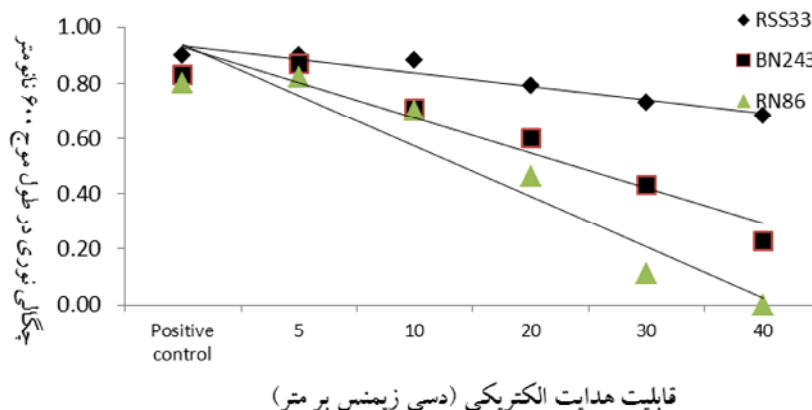
ادامه شکل 2

تنش شوری، از توان مصرف ACC در جدایه‌ها کاسته شده که به صورت کاهش رشد نمایان می‌شود. در مورد جدایه *RSS33* در برابر دو جدایه برتر دیگر، روند کاهش کندتر بود. در جدایه‌های *RN86* و *BSS243*، با مصرف ACC، کاهش شدیدتری در رشد باکتری دیده شد و می‌توان اظهار داشت که با افزایش تنش خشکی، تمایل این باکتری‌ها به جذب ACC و در واقع توانایی ساخت آنزیم ACC دامیناز کمتر شد.

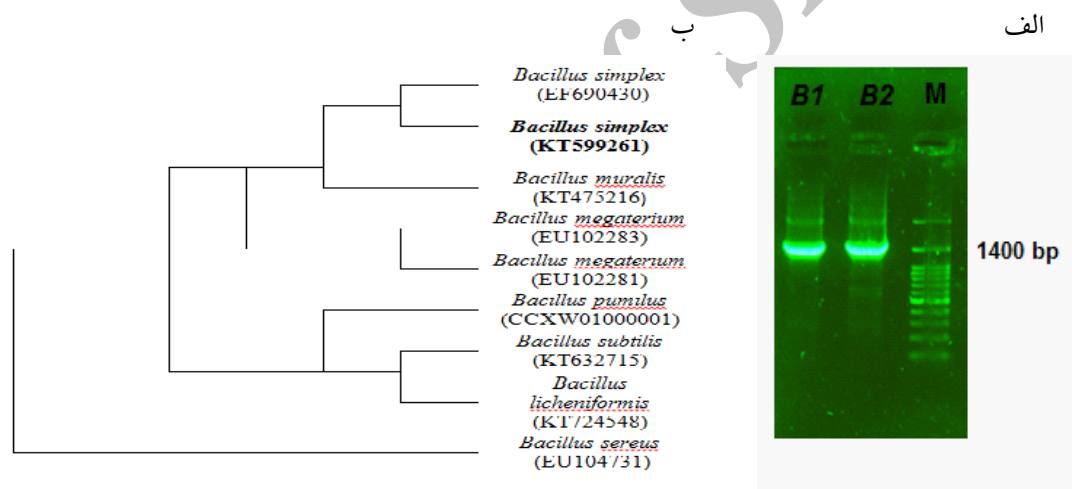
نتیجه شناسایی جدایه باکتری برتر: پس از انجام مراحل شناسایی ژنتیکی، نتایج تعیین توالی‌ها، به وسیله نرم‌فزار بلست<sup>۳۱</sup> بررسی شد و با توجه به میزان قرابت‌ها مشخص شد که به احتمال 99 درصد این جدایه باکتری (*RSS33*)، متعلق به گونه *باسیلوس سیمپلکس*<sup>۳۲</sup> است و در بانک ژن (Accession Number: BankIt KT599261) ثبت شد. بانده الکتروفورز و درخت فیلوژنی در شکل 4 نشان داده شده است.

پیامد تنش خشکی بر توان مصرف ACC در جدایه‌های باکتری: همان‌طور که در شکل 2 نشان داده شده است، با افزایش تنش خشکی، از توان مصرف ACC در جدایه‌ها کاسته شد. در مورد جدایه *RSS33* در برابر دو جدایه برتر دیگر، این روند کندتر بود و همچنین با مقایسه دو منبع نیتروژن (آمونیم و ACC) مشخص شد که در تنش‌های بالاتر، منبع ACC از مزیت نسبی هم برخوردار بود و با مصرف آن در باکتری، کاهش کمتری در رشد جدایه *RSS33* در برابر مصرف آمونیم حاصل شد (شکل 2 الف). در واقع با مصرف آمونیم، حساسیت باکتری به تنش خشکی بیشتر شد. در جدایه‌های *RN86* و *BSS243*، با مصرف ACC در برابر مصرف آمونیم، کاهش شدیدتری در رشد باکتری دیده شد و می‌توان اظهار داشت که با افزایش تنش خشکی، تمایل این باکتری‌ها به جذب ACC و در واقع توانایی ساخت آنزیم ACC دامیناز کمتر شد.

پیامد تنش شوری بر توان مصرف ACC در جدایه‌های باکتری: همان‌طور که در شکل 3 دیده می‌شود، با افزایش



شکل 3 تغییرات رشد باکتری‌ها به‌عنوان معیاری از توان مصرف ACC در اثر تنش شوری



شکل 4 (الف): باند الکتروفورز مربوط به تکثیر ژن *16S rRNA* باکتری *Bacillus simplex* (M: نشانگر 100 جفت بازی، B1: *B. simplex* (تکرار اول)، B2: *B. simplex* (تکرار دوم)) (ب): درخت فیلوژنی براساس توالی ژن *16S rRNA* باکتری *Bacillus simplex* (رسم شده با کمک نرم‌افزار MEGA.6 و بر مبنای الگوریتم نزدیک‌ترین همسایه<sup>33</sup>)

همچنین، مشخص شد که 25 درصد از باکتری‌های جداسازی شده، با درجه‌های مختلفی، سازنده آنزیم ACC دامیناز بودند. 12 درصد از باکتری‌های جداسازی شده از خاک در مطالعات چاودهاری و سیندهو<sup>34</sup> توانا در ساخت آنزیم ACC دامیناز بودند (18). اما دیدن فراوانی جدایه‌ها نشان داد که تعداد باکتری‌های در محدوده بالاترین توانایی، اندک (تنها

### بحث و نتیجه‌گیری

در این پژوهش، با توجه به اینکه نمونه‌برداری اولیه به تعداد زیاد و از خاک‌های ناهمانند از دیدگاه هدایت الکتریکی نسبت جذب سطحی سدیم انجام شد، باکتری‌های جداسازی شده نیز به همان نسبت، متنوع بود و توانایی‌های ناهمانند در ساخت آنزیم ACC دامیناز در تنش‌های خشکی و شوری از خود نشان دادند.

توانایی بهره‌گیری از ACC به‌عنوان یک مزیت در رابطه بین باکتری و گیاه محسوب می‌شود. نبود کاهش شدید در توان مصرف ACC در شرایط تنش‌های حاکم بر خاک‌های متأثر از خشکی، شوری و شور سدیمی، تعیین‌کننده مؤثر بودن مایه‌زنی است و به تدریج با افزایش رشد و توسعه ریشه‌های گیاه، آثار متقابل باکتری و گیاه در جهت گسترش رشد هر دو موجود زنده پیش خواهد رفت. باکتری *باسیلوس سیمپلکس*، در تنش‌های خشکی و شوری، بیشتر از دیگر جدایه‌های برتر، آنزیم ACC دآمیناز ساخت. به طوری که در پتانسیل‌های اسمزی و مقادیر شوری مختلف، توان مصرف ACC بیشتری در برابر دیگر جدایه‌ها داشت. اهمیت این موضوع از آنجا مشخص می‌شود که پژوهشگران مختلف، اظهار داشتند که بخشی از توانایی یک گونه گیاهی برای سازش با شرایط تنش خشکی و شوری بستگی به ریزجانداران توانا به ساخت آنزیم ACC دآمیناز دارد (19 و 20). از آنجایی که بخشی از کاهش رشد گیاه در شرایط خشکی، شوری و شور سدیمی، به افزایش اندازه اتیلن و رسیدن آن به غلظت اتیلن تنشی در بافت گیاهی مربوط می‌شود؛ بنابراین مصرف ACC (پیش‌نیاز ساخت اتیلن) در باکتری‌های بردبار به شوری و خشکی و به دنبال آن عدم ساخت اتیلن اضافی، می‌تواند جبران‌کننده این خلاء در گیاهان باشد (21). همچنین این باکتری، دارای توان بردباری به تنش به خشکی و شوری (اسمو هالوتولرنس<sup>۳۵</sup>) مناسبی در برابر سایر جدایه‌ها بود. پژوهشگران گزارش کردند که در مورد جنس *باسیلوس* تعداد گونه‌های بیشتری در برابر جنس‌های دیگر باکتری، توانایی بردباری به تنش‌های غیرزیستی<sup>۳۶</sup> مانند خشکی و شوری در سطح بالا را دارند (22). این

2درصد از کل باکتری‌ها) بود؛ درحالی‌که بیش از 75درصد از جدایه‌ها، سازنده آنزیم ACC دآمیناز نبودند. فراوانی نسبی باکتری‌های سازنده، در خاک‌های شور و شور سدیمی در برابر خاک‌های معمولی بیشتر بود. این نتایج نشان داد که برای یافتن جدایه‌های باکتری سازنده آنزیم ACC دآمیناز، می‌توان به خاک‌های شور و شور سدیمی مراجعه کرد. در این پژوهش، با بهره‌گیری از چندین گام آزمون و مقایسه جدایه‌ها، یک باکتری متعلق به گونه *باسیلوس سیمپلکس* از ریزوسفر گندم در یک خاک شور سدیمی جداسازی شد که ویژگی‌های یک باکتری برتر را برای شرایط خشکی و شور و شور سدیمی بودن داشت. پژوهشگران مختلف مانند سیدیکی و همکاران، ساخت آنزیم ACC دآمیناز در جنس *باسیلوس* را گزارش کردند (3). نتایج نشان داد که این باکتری به‌ازای مصرف ACC، آهنگ رشدی همانند مصرف آمونیوم از خود نشان داد. نسبت قطر کلنی باکتری *باسیلوس سیمپلکس* با مصرف ACC در برابر قطر آن با مصرف آمونیوم برابر یک بود و همچنین این باکتری توانست 901 نانومول آلفاکتو بوتیرات در میلی‌گرم پروتئین در ساعت به‌عنوان معیاری از فعالیت آنزیم ACC دآمیناز ساخت کند. براساس نتایج پژوهشگران مختلف، گونه‌های باکتری از جنس *باسیلوس* توانایی تولید مقادیر میان صفر تا 1/5 میکرومول آلفاکتو بوتیرات در میلی‌گرم پروتئین در ساعت را داشتند (3 و 19). در تنش‌های خشکی، شوری و شور سدیمی، ترشحات ریشه‌ای به تبعیت از رشد گیاه، کمتر است و منابع آلی کمتری در اختیار باکتری‌ها قرار می‌گیرد؛ از طرفی، جمعیت موجودات خاکزی همانند باکتری‌ها نیز کمتر است و بنابراین

- deaminase. *FEMS Microbiology Ecology* 2015; 91(1): 86-102.
- (5) Soleimani R. Cumulative and residual effects of zinc sulfate on grain yield, zinc, iron, and copper concentration in corn and wheat. *Journal of plant nutrition* 2012; 35(1):85-92.
- (6) Meybodi SM., Khorasani H. Biosorption of chromium by *Pseudomonas* sp. isolated from oil contaminated soils of Khuzestan. *Biological Journal of Microorganism* 2015; 14(3): 101-110.
- (7) Glick BR., Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiology Letters* 2005; 251(1): 1-7.
- (8) Barillot CDC., Sarde CO., Bert V., Tarnaud E., Cochet N. A standardized method for the sampling of rhizosphere and rhizoplan soil bacteria associated to a herbaceous root system. *Annals of Microbiology* 2013; 63(3): 471-476.
- (9) Page AL., Miller RH., Keeney DR. *Methods of Soil Analysis*. 2nd Ed. American Society of Agronomy, Madison, WI., USA; 1982.
- (10) Penrose DM., Glick BR. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiology of Plants* 2003; 118(1): 10-15.
- (11) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72(3): 248- 254.
- (12) Michel BE., Kaufmann MR. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiology* 1973; 51(5): 914-916
- (13) Sandhya V., Ali SKZ., Minakshi G., Reddy G., Venkateswarlu B. Alleviation of drought stress effects in sunflower seedlings by the exopolysaccharides producing *Pseudomonas putida* strain GAP-P45. *Biology and Fertility of Soils* 2009; 46(1):

موضوع به تشکیل اندوسپور در این باکتری‌ها و تجمع ترکیبات محافظت‌کننده از خشکی<sup>۳۷</sup> همانند ترهالوز و گلوتامین برمی‌گردد؛ به طوری که پیگوت و هیلبرت<sup>۳۸</sup> نیز اظهار داشتند که اندوسپورهای باسیلوس قادرند که شرایط نامناسب محیطی را تحمل کنند (23). این ویژگی، مایهٔ این است که بتوان از آنها به شکل فرمولاسیون پودری بهره برد؛ به طوری که جمعیت‌های موردنظر از آنها بتوانند پویایی خود را حفظ کنند. با توجه به نتایج به دست آمده، گونهٔ باکتری باسیلوس سیمپلکس، برای انجام آزمون‌های مزرعه‌ای به عنوان باکتری کاهش‌دهنده تنش‌های خاک‌های شور، شور سدیمی و مناطق خشک و نیمه‌خشک پیشنهاد می‌شود.

## References

- (1) Qadir M., Ster JD., Schubert S., Noble AD., Sahrawat KL. Phytoremediation of sodic and saline-sodic soils. *Advance in Agronomy* 2007; 96(2): 198-247.
- (2) Gamalero E., Glick BR. Ethylene and abiotic stress tolerance in plants. In: Ahmad P., Prasad MNV. editors. *Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change*, Springer-Verlag, Berlin; 2012: 395-412.
- (3) Siddikee MDA., Sundaram S., Chandrasekaran M., Kim, K., Selvakumar G., Tongmin S. Halotolerant bacteria with ACC deaminase activity alleviate salt stress effect in canola seed germination. *Journal of Korean Society Applied Biology and Chemistry* 2015; 58(2): 237-241.
- (4) Li Z., Chang S., Ye S., Chen M., Lin L., Li Y., Li S., An Q. Differentiation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase from its homologs is the key for identifying bacteria containing ACC

- (14) Dauphin L., Moser A., Bowen MD. Evaluation of five commercial nucleic acid extraction kits for their ability to inactivate *Bacillus anthracis* spores and comparison of DNA yields from spores and spiked environmental samples. *Journal of Microbiology Methods* 2009; 76(1): 30-37.
- (15) Maciel BM., Santos ACF., Dias JCT., Vidal RO., Dias RGC., Gross E., Cascardo JCM., Rezende RP. Simple DNA extraction protocol for a 16S rDNA study of bacterial diversity in tropical land farm soil used for bioremediation of oil waste. *Genetic and Molecular Research* 2009; 8(1): 375-388.
- (16) Hebron HR., Yang Y., Hang J. Purification of genomic DNA with minimal contamination of proteins. *Journal of Biomolecular Technology* 2009; 20(3): 278-281.
- (17) Parmeela S., Johri BN. Phylogenetic analysis of bacterial endophytes showing antagonism against *Rhizoctonia solani*. *Current Science* 2004; 87(5): 687-692.
- (18) Chaudhary D., Sindhu SS. Inducing salinity tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.) by inoculation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-containing *Mesorhizobium* strains. *African Journal of Microbiology Research* 2015; 9(2): 117-124.
- (19) Nadeem SM., Zahir ZA., Naveed M., Nawaz S. Mitigation of salinity-induced negative impact on the growth and yield of wheat by plant growth-promoting rhizobacteria in naturally saline conditions. *Annals of Microbiology* 2013; 63(3): 225-232.
- (20) Alikhani HA., Saleh Rasteen N., Bihanta M. The Evaluation of IAA and ACC deaminase production ability by Iranian soils rhizobial strains and the effects of superior strains application on plant growth characteristics. *Iranian Journal of Agricultural Science* 2007; 38(4): 693-703.
- (21) Shaharoon B., Muhammad A., Rashid W., Khalid A. Role of ethylene and plant growth-promoting rhizobacteria in stressed crop plants. In: Venkateswarlu B., Shanker AK., Shanker C., Maheswari M., editors. *Crop stress and its management: Perspectives and Strategies*. Springer Science; 2012: 429-446.
- (22) Wang QF., Li W., Liu YL., Cao H., Li Z., Guo GQ. *Bacillus qingdaonensis* sp. nov., a moderately haloalkaliphilic bacterium isolated from a crude sea-salt sample collected near Qingdao in eastern China. *International journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 2007; 57(2): 1143-1147.
- (23) Piggot PG., Hilbert DW. Sporulation of *Bacillus subtilis*, *Current Opinion in Microbiology* 2004; 7(6): 579-586.

- 
- 1- Secondary salinization
  - 2- Minimal Bioproductivity
  - 3- ESP (Exchangeable sodium percentage)
  - 4- SAR (Sodium adsorption ratio)
  - 5- Gamalero & Glick
  - 6- Siddikee
  - 7- 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate
  - 8- Cleaving & Sequestering
  - 9- (-KB) -ketobutyrate
  - 10- EC (Electrical conductivity)
  - 11- Complexometry
  - 12- Flame photometry
  - 13- Isolation
  - 14- Purification
  - 15- Slant Agar Medium
  - 16- Dworkin foster
  - 17- Penrose & Glick
  - 18- Tryptic soybean broth
  - 19- Vertex
  - 20- PEG (Poly Ethylene Glycole) 6000
  - 21- Michel & Kaufmann
  - 22- OD (Optical density)
  - 23- PCR (Polymerase chain reaction)
  - 24- Amplification
  - 25- Denaturing
  - 26- Annealing
  - 27- Extension
  - 28- Ladder
  - 29- Completely Randomized Design
  - 30- DMRT (Duncan's multiple range test)
  - 31- Blast
  - 32- *Bacillus simplex*
  - 33- Neighbor-joining
  - 34- Chaudhary & Sindhu
  - 35- Osmo-halotolerant
  - 36- Abiotic tensions
  - 37- Xeroprotectant
  - 38- Piggot & Hilbert