Archive of SID

خودبوم‌شناسی و هم‌بوم‌شناسی *سودوموناس فلورسنس* **CHAO- Rif** بکاررفته در کشت گیاهان آفتابگردان و شاهدانه

علی اکبر صفری سنجانی[1] و لیلا رمضانی

استاد گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا؛ **aa-safari@basu.ac.ir**

دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه بوعلی سینا؛ **laila.ramezany@gmail.com**

دریافت: **98/4/2** و پذیرش: **99/2/15**

چکیده

گیاهان برای زندگی در زیستگاه‌های سخت مانند خاک‌های آلوده به فلزهای سنگین با دشواری‌های گوناگونی روبرو هستند که برای کاهش این دشواری بهره‌گیری از باکتری‌های افزاینده رشد گیاه می‌تواند سودمند باشد.این پژوهش برای بررسی اوتکولوژی و سین‌اکولوژی باکتری *سودوموناس فلوروسنس* در یک خاک آلوده به فلزهای سنگین انجام شد. این پژوهش به گونه آزمایشی فاکتوریل با طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار به گونه گلخانه‌ای انجام شد. فاکتور نخست دو گیاه آفتاب‌گردان و شاهدانه و فاکتور دوم خاک به دو گونه سترون و ناسترون بود که دانه آنها با باکتری *سودوموناس فلوروسنس* سویه CHAO- Rif که از موسسه بیمارهای گیاهی و بیولوژی سوئیس خریداری شده، مایه‌زنی شد. پس از رسیدن به گام گلدهی، کار برداشت گیاه انجام شد. فراوانی سودوموناس بکاررفته در خاک و گیاه در کشت آفتابگردان و خاک سترون بیش از 1/5 برابر و به اندازه چشم‌گیری بیشتر از آن در کشت شاهدانه و خاک ناسترون بود. در خاک سترون باکتری سودوموناس مایه‌زنی شده در بافت‌های درونی ریشه آفتاب‌گردان و به گونه درونزی یا اندوفیت دیده شد و لگاریتم فراوانی آن 0/06±4/02 بود؛ ولی در درون ریشه شاهدانه یافت نشد. این باکتری بر رویه ریشه به گونه پلانوسفری و در خاک‌های ریزوسفری و ناریزوسفری هر دو گیاه بازیابی شد ولی در درون اندام‌های هوایی هیچ یک از گیاهان به گونه درونزی دیده نشد. در برابر آن در خاک ناسترون باکتری یاد شده تنها در ریزوسفر و رویه ریشه (پلانوسفر) گیاهان دیده شد، ولی در درون ساقه و ریشه گیاهان به گونه درونزی و در خاک ناریزوسفری آنها دیده نشد. اگر چه ریزجانداران بومی خاک مایه کاهش فراوانی سودموناس بکاررفته در خاک ناسترون شد، ولی کاربرد این باکتری بر فراوانی دیگر ریزجانداران بومی پیامد بد و چشم‌گیری نداشت.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های ریزوسفری افزاینده رشد گیاه، درون‌زی، کود زیستی

[1]. نویسنده مسئول، آدرس: همدان، دانشگاه بوعلی سینا، دانشکده کشاورزی، گروه خاکشناسی

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

بررسی بی‌زیانی زیستی ریزجانداران می‌تواند به کمک آزمایش های خودبوم‌شناسی (اوتواکولوژی[1]) و هم-بوم‌شناسی (سین‌اکولوژی[2]) ریزجاندار انجام شود (ناتسچ و همکاران، 1998). در بررسی‌های خودبوم‌شناسی زنده‌مانی ریزجاندار، توانایی آشیان‌گیری در بوم‌سازه و گنجایش پخش آن در زیستگاه آزمون می‌شود. در بررسی-های هم‌بوم‌شناسی برهمکنش میان ریزجاندار بکاررفته و دیگر ریزجانداران آزمون می‌شود. بررسی خودبوم‌شناسی یک جاندار چگونگی رفتار و زندگی آن را در یک زیستگاه نشان می‌دهد که اگر بیش از اندازه فراوان شود، می‌تواند بر زندگی ریزجانداران دیگر فشار آورد و پیامد بد داشته باشد که در بررسی هم‌بوم‌شناسی آن این پیامدها بررسی و آزمون می‌شود که مبادا زیان بار باشد و مایه کاهش گوناگونی زیستی در ان زیستگاه شود.

آگاهی‌های بدست آمده از بوم‌شناسی باکتری‌های کودهای زیستی بکاررفته در کشاورزی و بررسی رفتار آنها پس از رسیدن به زیستگاه‌های خشک و آبکی بسیار اندک است. امروزه با افزایش آگاهی‌ها و شناخت از توانایی‌های گوناگون ریزجانداران، از آنها برای مهار بیماری‌های گیاهی، کودهای زیستی، زیست‌بهسازی زیستگاه‌ها بهره‌گیری می‌شود. برخی از جانداران بومی بدون هیچ پیامد زیانباری، در زیستگاه‌های بومی خود بهره‌گیری شده‌اند. ولی برخی از گیاهان و ریزجانداران بویژه آنهایی که بیگانه‌اند یا دستکاری ژنتیک شده‌اند، می‌توانند پس از کاربرد مایه پیامدهای بد و کاهش گوناگونی زیستی در بومسازه‌ها شوند (پیرسی و همکاران، 1997؛ هوبس و مانی، 1998؛ سنچکین، 2013). بنابراین پیش از کاربرد ریزجانداران سودمند در پهنه بزرگی از زیستگاه‌ها نیاز است که از چگونگی زندگی آنها در خاک، آب و گیاه و همچنین بی‌زیان بودن رهاسازی آنها آگاهی یافت. برای شناخت آن که ریزجاندار بکاررفته در درون گیاه و به گونه درون‌زی (اندوفیت) ریشه و اندام های هوایی درآمده است یا تنها در خاک ریزوسفری یا ناریزوسفری زندگی می‌کند، نیاز است هر یک از این زیستگاه‌ها جداگانه نمونه‌برداری و بررسی شوند (صفری سنجانی، 2013)

از سوی دیگر برای ارزیابی زیان‌های رهاسازی ریزجانداران در زیستگاه‌ها، می توان از شیوه‌هایی همانند آن روش‌هایی که برای ارزیابی پیامد بد زهرها در بومسازه‌ها (اکوتوکسیکولوژی[3]) بکارمی‌رود، بهره‌گیری نمود. بررسی اکوتوکسیکولوژی زهرها و آفت‌کش‌ها دو رویکرد دارد (باسی،1994؛ فیوناباشی، 2016): رویکرد یکم بررسی پیامدهای زیانبار آنها روی جانداران آلوده شده، و رویکرد دوم بررسی پایداری آنها در زیستگاه و چگونگی رسیدن آنها به جانداران دیگر است. کاربرد ریزجانداران بویژه بیگانه در زیستگاه‌ها همانندی‌هایی با کاربرد زهرها دارد (لوین،1991). بنابراین درکاربرد ریزجانداران نوین در زیستگاه‌ها نیاز به آگاهی و شناخت: 1- چه زمان و چه ریختی از ریزجاندار در جایگاه رهاسازی زنده می‌ماند؟، 2- تا چه اندازه‌ای از جایگاه رهاسازی می تواند جدا شود و به جایگاه‌های دیگر برسد؟ و 3- چه پیامدی بر جایگاه بکاررفته و جایگاه‌های دیگر دارد؟ به هر گونه میان ریزجانداران و زهرهای زیست‌بیگانه (زنوبیوتیک[4]) یکسری ناهمانندی‌هایی است،که باید هنگام ارزیابی زیان رهاسازی جانداران در زیستگاه بررسی شوند (دازو و یانی، 2017؛ نانداکافله و همکاران، 2018). زهرها با گذشت زمان در زیستگاه کم می شوند، ولی ریزجانداران این توانایی را دارند که افزایش پیدا کنند، بنابر این زمان ماندگاری خود را بیشتر کنند (کرمسکای، 1995). فروزینگی (تجزیه) زهرها می‌تواند به یکسری مواد پایدارتر و زهری‌تر بیانجامد، ولی شمار آنها اندک است ولی زاد و ژنوتیپ ریزجانداران می‌تواند با جهش یا ترابری ژن‌ها دگرگون شود و مایه پیدایش یک فنوتیپ نوین شود (زیانگ و همکاران، 2010). افزون بر آن، جانداران از یک زیستگاه ویژه می‌توانند کوچ کنند یا به جایی دیگر بروند، اگرچه این جابجایی ریزجانداران در بسیاری از زیستگاه‌ها اندک است (فولچان و همکاران، 2013؛ ویل و همکاران، 2017؛ السوپ و لانکیو، 2019).

برای برآورد زیان رهاکردن ریزجانداران در یک پهنه بزرگ یافته‌های پژوهش‌های خودبوم‌شناسی و هم بوم‌شناسی باید با هم بررسی و ارزیابی شوند. از آنجایی که یافته‌های بدست آمده از بومسازه‌های کوچک (آزمایشگاه) و میانه (گلخانه) برای پیش‌بینی کشتزارها بسنده نیست، این بررسی‌ها می‌تواند در زیستگاهی باز مانند لایسیمتر[5] بررسی شود (ناتسچ و همکاران، 1998؛ جمالدین و البانا، 2011). به هر گونه در چنین آزمایش-هایی بهره‌گیری از روش‌های گام به گام پیشنهاد شده است که در آن بررسی‌های خودبوم‌شناسی و هم‌بوم-

1. Autecology
2. Synecology
3. Ecotoxicology
4. Xenobiotic
5. Lysimeter

www.SID.ir

Archive of SID

شناسی در بومسازه‌های کوچک (آزمایشگاهی)، میانه (گلخانه‌ای) و بزرگ (کشتزاری) انجام می‌شود (البدری و همکاران، 1999).

این پژوهش در راستای شناخت خودبوم‌شناسی یک باکتری سودمند (*سودوموناس فلورسنس*) در کشت گلدانی گیاهان شاهدانه و آفتابگردان در یک خاک آلوده به فلزهای سنگین انجام شد. آماج این پژوهش بررسی و آزمون توان پرگنه‌سازی[1] و فراوان شدن آن باکتری افزاینده رشد گیاه (PGPR) در زیستگاه‌های گوناگون بود. یافته‌های این پژوهش برای برنامه‌ریزی چگونگی کاربرد و ارزیابی بی‌زیانی کودهای زیستی در خاک بسیار سودمند است. برای اینکار از یک باکتری نشاندار شده (دارای ژن پایدار به پادزیست ریفامپیسین) بهره‌گیری شد تا بتوان آن را در زیستگاه-های ریزوسفری[2]، پلانوسفر[3]، هیستوسفر[4] و درون اندام‌های هوایی گیاهان[5] کشت شده در خاک آلوده پیگیری و شمارش نمود. افزون بر آن هم‌بوم‌شناسی باکتری بکاررفته در کشت گیاهان یاد شده با بررسی باکتری‌ها و قارچ‌های بومی خاک نیز بررسی گردید تا زیان یا بی‌زیانی آن بر ریزجانداران بومی خاک آشکار گردد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از خاک و شناخت ویژگی‌های آن

برای کشت گیاه، از لایه 0-30 سانتی متری خاکه زباله‌های معدن سرب وروی آهنگران در جاده اراک – ملایر در 26 کیلومتری شهرستان ملایر از استان همدان با درازی جغرافیایی ''44 '59 °48 و عرض جغرافیایی ''20 '10 °34 نمونه‌برداری شد. پس از برداشت نمونه خاکه از معدن در کیسه‌های پلاستیکی، آلودگی خاک به فلزهای سنگین بررسی شد. در پیش آزمایش خاک دیده شد که فلزهای سنگین سرب، روی و کادمیوم در این نمونه‌ها به اندازه‌ای بالا است که با نگاه به مرز آستانه فلزها، گیاهان نمی‌توانند در آن رشد کنند. از آنجایی که زنده‌سازی خاک‌های آلوده و مرده به زیست‌بهسازی آنها کمک می-کند این پژوهش در خاک آلوده انجام شد. بنابراین از لایه 0 تا 30 سانتی‌متری خاک زمین‌های بالای گلخانه دانشگاه بوعلی سینا برای آمیختن با آن و کاهش غلظت آلاینده‌ها بهره‌گیری شد. برای این کار یک بخش خاک آلوده (زباله معدن) با چهار بخش خاک ناآلوده (خاک کشاورزی) با هم بخوبی آمیخته شد تا اندازه آلودگی زباله معدن نزدیک پنج برابر کمتر شود. بخشی از نمونه‌های بدست آمده، پیش از هوا خشک شدن و پس گذراندن از الک دو میلی‌متری، برای بررسی‌های ویژگی‌های زیستی خاک دردمای چهار درجه سلسیوس در یخچال نگه‌داری شد. بخشی دیگر از خاک یاد شده هوا خشک و از الک دو میلی‌متر برای آزمایش‌های فیزیکی و شیمیایی گذرانده شد. مانده خاک برای کشت گلدانی از الک چهار میلی‌متری گذرانده شد.

بافت خاک برپایه قانون استوکس و به روش هیدرومتر (کلوت، 1986)، اسیدیته کارا با بهره‌گیری از دستگاه پی اچ متر در عصاره1:5 خاک به آب (توماس، 1996)، رسانندگی الکتریکی در عصاره1:5 خاک به آب با بهره‌گیری از دستگاه رسانایی سنج الکتریکی (رودس،1996)، کربنات کلسیم معادل به روش تیتراسیون برگشتی اسید با NaOH، ماده آلی خاک به روش اکسیداسیون تر (والکلی –بلاک، 1934)، فسفر فراهم به روش السن عصاره‌گیری و به روش رنگ سنجی و با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (السن وسومر،1990). پتاسیم فراهم به روش استات آمونیوم یک نرمال عصاره‌گیری و به کمک دستگاه فلیم فتومتر اندازه-گیری شد. برای اندازه‌گیری غلظت کل فلزهای سنگین در خاک روش هضم و گوارش اسیدی به کار رفت (اسپوزیتو، 1982).

از ویژگی‌های زیستی خاک فراوانی قارچ‌ها در کشتگاه سیب‌زمینی دکستروز آگار (P.D.A[6])، باکتری‌ها در در کشتگاه آگار مغذی (N.A)[7]، اکتینومیست‌ها در کشتگاه کشتگاه رز بنگال نشاسته کازیین نیترات آگار (RBSCN-Agar[8])، سودوموناس‌ها در کشتگاه کینگ ب (Kings-B) آگار به روش شمارش پرگنه (کلنی کانت) پیش از کشت گیاه شمارش گردید. تنفس پایه و تنفس برانگیخته با سوبسترا به روش گرفتن دی‌اکسیدکربن در محلول هیدروکسید سدیم و تیتراسیون مانده باز با اسید کلریدریک اندازه گیری شد (صفری سنجانی و همکاران، 2010).

کشت و فراوان‌سازی باکتری *سودوموناس فلوروسنس* سویه CHAO- Rif

برای فراوان سازی و آماده کردن زادمایه باکتری *سودوموناس فلوروسنس* سویه CHAO- Rif که از

1. Colonization
2. Rhizosphere
3. Planosphere
4. Histosphere
5. Aerial plant parts

6. Potato dextrose agar
7. Nutrient agar
8. Rose Bengal Starch Casein agar

www.SID.ir

Archive of SID

موسسه بیمارهای گیاهی و بیولوژی سوئیس خریداری شده بود، در آغاز در کشتگاه Kings-B که دارای 0/1 گرم در لیتر پادزیست ریفامپیسین بود، کشت خطی داده شد و برای 48 ساعت در دمای 27 درجه سلسیوس رشد داده شد. سپس در ارلن که دارای 50 میلی لیتر کشتگاه مایع بدون پادزیست ریفامپیسین بود، مایه زنی انجام شد. پس از 48 ساعت نگهداری در دمای 27 در جه سلسیوس و فراوانی باکتری‌ها در هر میلی لیتر از کشتگاه بکار رفته، 10^8 شد. تیمار یک آب مقطر (شاهد)، تیمار دو کشتگاه دارای باکتری زنده بود.

آماده‌سازی خاک و گیاه و مایه‌زنی آنها

این پژوهش در گلخانه پژوهشی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا بر دو خاک سترون و ناسترون انجام شد. برای سترون‌سازی خاک، نیمی از آن در اتوکلاو با دمای 121 درجه سلسیوس برای نیم ساعت سترون شد. از هر خاک سترون و ناسترون به اندازه‌ی 5 کیلوگرم در گلدان های پلاستیکی (که در تیمار سترون با الکل گندزدایی شده بودند)، جداگانه ریخته شد.

دو گیاه آفتاب گردان (رقم فرخ) و شاهدانه (رقم اصفهان) برای کشت گلدانی در گلخانه برگزیده شد. پژوهش‌های پیشین توانایی این گیاهان روغنی برای رشد در خاک‌های آلوده به فلزها را نشان داده است. در تیمارهای سترون رویه برزهای[1] هر گیاه به کمک هیپوکلریت سدیم گندزدایی شد (صفری سنجانی و همکاران، 2010؛ وینسنت، 1982). سپس برای مایه‌زنی دانه‌های گیاهان یک سری در آب مقطر سترون (شاهد) و سری دوم در سوسپانسیون باکتری (با 10^8 باکتری در هر میلی‌لیتر) برای چهار ساعت گذاشته شد. افزون بر آن هنگام کشت به رویه هر کدام از برزها در خاک یک میلی لیتر از هر زادمایه افزوده شد (بشارتی و همکاران، 1395). در این پژوهش 18 گلدان برای خاک سترون و 18 گلدان برای خاک ناسترون، روی هم 36 گلدان 5 کیلوگرمی آماده شد. برای انجام این پژوهش از آزمایش فاکتوریل با طرح کاملاً تصادفی بهره‌گیری شد که در آن دو فاکتور سترون سازی خاک در دو سطح (سترون و ناسترون) و کشت گیاه در دو سطح (آفتابگردان و شاهدانه) در سه تکرار بکار رفت. در هر گلدان در آغاز 10 دانه از هر گیاه کاشته شد و یک هفته پس از کشت، در هر گلدان 4 گیاه نگه داشته شد. دامنه دمای گلخانه در دوره رشد میان 21-32 درجه سلسیوس بود و آبیاری روزانه با اندازه‌گیری کاهش وزن گلدان در اندازه گنجایش رطوبتی خاک انجام شد و پس از 65 روز برداشت گیاهان انجام گردید.

برای نمونه‌برداری از خاک ریزوسفری و ناریزوسفری به روش لایه نازک، از یک شبکه فلزی از جنس گالوانیزه سوراخ دار به قطر 0/25 میکرون بهره‌گیری شد و آن در زیر دانه و ریشه های کارای گیاه گذاشته شد (صفری سنجانی و رشیدی، 2011). قطر سوراخ‌های این شبکه‌ای فلزی چیزی نزدیک 0/25 میکرون است که ریشه‌های گیاه توانایی گذشتن از شبکه فلزی را ندارند و تنها هیف‌های ریز و ریزجانداران و مواد رها شده از ریشه از آن می-توانند بگذرند. خاک زیر شبکه فلزی نزدیک یک سانتی متر همانند خاک ریزوسفری و 3 سانتیمتری آن همانند خاک ناریزوسفری گردآوری و آزمایش شد.

پس از برداشت خاک ریزوسفری و ناریزوسفری و گیاه فراوانی *سودوموناس فلورسنس* سویه CHAO- Rif در کشتگاهKings-B آگار که دارای 0/1 گرم در لیتر پادزیست ریفامپیسین بود، به روش شمارش پرگنه (کلنی کانت) در بافت درونی اندام هوایی (ساقه و برگ)، هیستوسفر (بافت درونی ریشه)، خاک ناریزوسفری،خاک ریزوسفری و ریزوپلان (رویه ریشه) در همه تیمارها شمارش شد.

برای شمارش باکتری بکارفته در رویه و درون اندام هوایی، یک گرم از ساقه و برگ بدون سترون سازی رویه آن در هاون استریل به خوبی کوبیده شد سپس در کالگون[2] یک دهم درسد[3] تکان داده و به روش شمارش کلنی انجام شد. برای شمارش باکتری درون ریشه یک گرم ریشه به خوبی با آب مقطر سترون شسته شد. سپس رویه آن 30 ثانیه با هیپوکلریت سدیم 10 درسد گندزدایی گردید و در هاون چینی سترون کوبیده و له شد و در کالگون یک دهم درسد تکان داده تا سری رقت از آن ساخته شود. برای شمارش باکتری رویه ریشه یک گرم ریشه زیر جریان آهسته آب سترون شسته شد تا خاک چسبیده به ریشه از آن جدا شود. ریشه‌ها در کالگون یکدهم درسد تکان داده شد. پس از ساخت سری رقت از آن فراوانی باکتری به روش شمارش پرگنه بررسی شد (ایورز و همکاران، 2015؛ صفری سنجانی و همکاران، 2010).

یادآور شود که تنها در کشت گیاهان در خاک ناسترون پس از برداشت گیاه فراوانی همه باکتری های کشت پذیر در محیط کشت N.A، فراوانی سودوموناس‌ها

1. Seeds (بذور)

2. Calgon

3. Percent (درصد)

www.SID.ir

Archive of SID

در کشتگاه Kings-B آگار و فراوانی قارچ‌ها درکشتگاه P.D.A به روش شمارش پرگنه در خاک ریزوسفری و ریزوپلان شمارش شد (آلف و نانیپیری، 1995).

پردازش داده‌ها و رسم نمودارها به کمک نرم افزار Excel و آنالیز آماری آن‌ها به کمک نرم افزار SAS نسخه 9/1 انجام شد.آزمون میانگین هر یک از ویژگی‌های یاد شده در تیمارهای بکار رفته نیز به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در پایه آماری پنج درسد انجام شد.

بحث و نتایج

ویژگی‌های خاک بکاررفته در پژوهش

میانگین برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک بکاررفته در جدول 1 آمده است. این خاک دارای بافت لوم شنی می‌باشد و کمبود ماده آلی دارد. رسانندگی الکتریکی و شوری آن پایین بوده و در گروه خاک های ناشور است و پی اچ آن 7/8 درب گروه خاک های خنثی تاکمی قلیایی می‌باشد. غلظت فلزهای سرب، روی وکادمیم در خاک به ترتیب 6725 و 2296 و 24/9 میکروگرم بر گرم که بسیار بالاتر از مرز آستانه آلودگی این فلزها در خاک می‌باشد (شیلا، 1996).

جدول 1- برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک بررسی شده

ویژگی	یکان	اندازه
بافت	-	لوم شنی
شن	%	61/2
سیلت	%	28/6
رس	%	10/2
ماده آلی	%	0/5±0/03
کربنات کلسیم معادل	%	10/7±0/15
پی اچ	-	7/8±0/1
رسانندگی الکتریکی	dSm^{-1}	0/9±0/19
فسفر فراهم	$\mu g\ g^{-1}$	15/3±2/31
پتاسیم فراهم	$\mu g\ g^{-1}$	67/75±2/31
سرب	$\mu g\ g^{-1}$	6725±136
روی	$\mu g\ g^{-1}$	2296±37/5
کادمیم	$\mu g\ g^{-1}$	24/9±0/11

ویژگی‌های زیستی خاک آزمایش شده در جدول 2 آمده است. هر چند فراوانی همه باکتری‌ها، باکتری‌های سودوموناس، قارچ‌ها و اکتینومیست‌ها در یک گرم از این خاک چندان بالا نیست، ولی خاک بکاررفته زنده است. این خاک با همه آلودگی و دشواری‌هایی که دارد، در هر گرم از وزن خشک آن بیش از یک میلیون باکتری و بیش از ده هزار قارچ، اکتینومیست و سودوموناس است.

جدول 2- برخی از ویژگی‌های زیستی خاک بکار رفته در این پژوهش

ویژگی	یکان	اندازه
فراوانی قارچ	$\log cfu\ g^{-1}$	4/68±0/06
فراوانی باکتری	$\log cfu\ g^{-1}$	6/35±0/02
فراوانی باکتری‌های سودوموناس	$\log cfu\ g^{-1}$	4/55±0/05
فراوانی اکتینومیست	$\log cfu\ g^{-1}$	4/44±0/06
تنفس برانگیخته	$mgco_2 g^{-1}soil day^{-1}$	1/02±0/07
تنفس پایه	$mgco_2 g^{-1}soil day^{-1}$	0/13±0/04

www.SID.ir

Archive of SID

تنفس پایه و برانگیخته در این خاک به ترتیب 0/13 و 1/02 میلی‌گرم دی‌اکسید کربن در یک گرم خاک در روز بود. این یافته‌ها نشان می دهد که خاک بکار رفته در پژوهش هر چند بسیار آلوده است، ولی ریزجانداران در آن فراوان و زندگی کارآمدی می‌توانند داشته باشند.

اوتواکولوژی *سودوموناس فلوروسنس* سویه CHAO- Rif

تجزیه واریانس شمار *سودوموناس فلوروسنس* سویه CHAO- Rif نشان داد که پیامد گونه گیاه و سترون کردن خاک بر فراوانی باکتری یاد شده در هر دو جایگاه ریزوسفر و رویه ریشه در پایه آماری 0/001 چشم‌گیر است و برهم‌کنش گونه گیاه و سترون کردن خاک بر فراوانی باکتری بکارفته در جایگاه ریزوسفر و رویه ریشه به ترتیب در پایه آماری 0/001 و 0/05 چشم‌گیر است (جدول3)

جدول 3- تجزیه واریانس پیامد گونه گیاه وسترون کردن خاک بر فراوانی باکتری بکار رفته

خاستگاه	ریزوسفر		رویه ریشه	
دگرگونی	درجه آزادی	میانگین مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات
گونه گیاهی	1	۰/۳۱***	1	۰/۸۶***
سترون کردن	1	۱۳/۹۵***	1	۷/۸۸***
گونه گیاه*سترون کردن	1	۰/۱۵***	1	۰/۰۰۹*
خطا	8	0/002	8	0/002
ضریب دگرگونی (درسد)		0/78		0/67

***و* به ترتیب نشانگر پیامد چشم گیر در پایه آماری 0/1 و 5 درسد است.

آزمون میانگین شمار *سودوموناس فلوروسنس* سویه CHAO- Rif بکاررفته در کشت گیاهان بررسی شده در دو خاک سترون و ناسترون در جدول 4 آمده است. روند فراوانی باکتری یاد شده در تیمارها در هر دو جایگاه نمونه‌برداری به این گونه بود که آفتاب‌گردان سترون > شاهدانه سترون > آفتاب‌گردان ناسترون > شاهدانه ناسترون است. بنابراین فراوانی باکتری بکاررفته هنگام برداشت گیاهان در خاک‌های سترون بیشتر از آنها در خاک‌های ناسترون بود و از سوی دیگر در خاک ریزوسفری و در رویه ریشه آفتاب گردان بیشتر از آنها در شاهدانه بود. شاید بیشتر بودن باکتری در ریزوسفر و رویه ریشه کشت شده در خاک سترون وابسته به کمتر بودن برهم‌کنش‌های زیانباری چون هماوردی، شکار و ناهمسفرگی در آن در برابر خاک ناسترون باشد. بودن ریزجانداران بومی خاک بؤیژه آنهایی که با سودموناس فلورسنس برهم کنش زیانبار دارند می‌توانند مایه جلوگیری از فراوان شدن آن در خاک ریزوسفری و رویه ریشه گیاهان شوند. از سوی دیگر فراوانی سودموناس بکاررفته در هر دو خاک سترون و ناسترون در ریزوسفر و رویه ریشه آفتاب گردان بیشتر از آن در شاهدانه بود که این نشان از سازگاری بهتر باکتری برای زندگی در کنار آفتاب‌گردان دارد و این شاید وابسته به تراوش‌های بهتر و فراوان‌تر آفتاب‌گردان در برابر شاهدانه باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول 4- میانگین لگاریتم فراوانی سودوموناس فلورو سنس سویه CHAO- Rif (± انحراف استاندارد) در خاک ریزوسفری و رویه ریشه گیاهان کشت شده در دو خاک سترون و ناسترون

جایگاه نمونه برداری	خاک	آفتاب گردان	شاهدا نه
ریزوسفر	سترون	7/49±0/03 a	7/26±0/005b
	ناسترون	5/56±0/07c	4/88±0/06d
رویه ریشه	سترون	6/33±0/02a	5/74±0/01b
	ناسترون	4/65±0/02c	4/17±0/06d

در هر جایگاه نمونه‌برداری میانگین‌های دارای دست کم یک واژه یکسان در پایه آماری 5 درسد ناهمانندی چشم‌گیر ندارند.

از سوی دیگر آزمون میانگین فراوانی باکتری بکاررفته درجایگاه های ریزوسفر و رویه ریشه نشان داد که در هر دو گیاه و در هر دو خاک سترون و ناسترون، فراوانی باکتری بکارفته در خاک ریزوسفری به اندازه چشم‌گیری بالاتر از رویه ریشه بود. در کشت هر دو گیاه آفتاب‌گردان و شاهدانه، رویه ریشه گیاه در خاک ناسترون کمترین لگاریتم فراوانی باکتری (به ترتیب 4/65 و 4/17) را داشت.

شمارش فراوانی باکتری *سودوموناس فلورسنس* CHAO- Rif در ریشه گیاهان و کشت بافت‌های ریشه نشان داد که در خاک ناسترون باکتری یاد شده نتوانسته است خود را به درون ریشه هیچ یک از گیاهان برساند و یا به اندازه شمارش شدنی فراوان نشده است. باکتری *سودوموناس فلوروسنس* بکار رفته تنها در بافت‌های درون ریشه‌ای (هیستوسفر) گیاه آفتاب‌گردان کشت شده در خاک سترون به اندازه کشت شدنی رسیده و بازیابی شد. لگاریتم فراوانی آن در درون ریشه آفتاب‌گردان کشت شده در خاک سترون به اندازه 4/02±0/06 رسید. در برابر آن باکتری بکاررفته در ریشه شاهدانه کشت شده در هر دو خاک سترون و ناسترون دیده نشد. بنابراین در خاک سترون باکتری یاد شده توانسته است به درون بافت‌های ریشه آفتاب‌گردان برود و فراوان شود ولی در شاهدانه نتوانسته است.

باکتری بکاررفته در خاک ناسترون در درون ریشه هیچ یک از گیاهان آفتاب‌گردان و شاهدانه یافت نشد که شاید وابسته به پیامد ریزجانداران بومی خاک بر گیاه و یا این باکتری باشد. گونه هایی از ریزجانداران که ریزوسفر و یا بافت‌های درونی گیاه را آلوده می‌نمایند، می‌توانند مایه دگرگونی‌های ریخت‌شناسی و فیزیولوژی در گیاه شوند (اک-راموس و همکاران، 2019). ون پر و شیپر (1989). بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی گونه‌های *Pseudomonas* spp که در درون یا بیرون از بافت گیاه آن را آلوده می‌نمایند، نشان داده است که فرورفتن باکتری‌ها به درون گیاه بختانه نیست و از سوی گیاه گزینشی برای فرورفتن هر باکتری رخ می‌دهد. بنابراین پاسخ گیاهان گذشته از گونه گیاهی و ویژگی آن، به پیشینه آلودگی یا انگیزش آن با باکتری‌ها و ریزجانداران دیگر نیز وابسته است. ناهمانندی بیوشیمیایی برخی از مواد تازه‌ساز در گونه‌های گیاهی در زیستگاه‌های گوناگون می‌تواند پاسخی به جایگیری باکتری‌ها و ریزجانداران آلودکننده و یا همزیست در گیاه باشد (استروبل، 2003). بنابراین باکتری بکار رفته نه تنها در دو گیاه رفتاری ناهمانند داشته بلکه در کشت گیاهان در خاک سترون و ناسترون ناهمانند است به گونه‌ای که باکتری بکاررفته در خاک ناسترون نتوانسته است در درون ریشه گیاهان کشت شده بروند و آلودگی پدید آورند.

همانگونه که یاد شد در خاک ناسترون در درون ریشه هیچ یک از گیاهان باکتری یاد شده دیده نشد. روهمرفته فراوانی باکتری یاد شده در خاک سترون بالاتر از ناسترون است. این می‌تواند به برهم‌کنش‌های زیانبار آن با ریزجانداران بومی خاک وابسته باشد که فراوانی این باکتری در خاک ناسترون کمتر بوده، به گونه‌ای نتوانسته است، بافت‌های درونی ریشه را کلنیزه کند. دفاگو و همکاران (1999) پیامد ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی (بویژه شمار باکتری‌های هوازی بومی) آب بیرون آمده از لایسیمتر را بر فراوانی باکتری CHAO- Rif را بررسی کرده و گزارش کردند که در آب بیرون آمده از لایسیمتر با خاک سترون شده، یاخته‌های باکتری CHAO- Rif درزمان 175 روز پایدار ماندند، ولی در آب بیرون آمده از خاک ناسترون، شمار یاخته‌های CHAO- Rif با گذشت زمان کاهش یافت. شماری از سویه های باکتری جنس آزواسپریلیوم می‌توانند بافت های درونی ریشه را کلنیزه کنند و همیاری با گیاه داشته باشند واین همیاری زمانی می‌تواند بهتر باشد که باکتری بتواند در خاک زنده مانده و به فراوانی چشم‌گیری روی سیستم ریشه گیاه برسد (جیمز، 2000). بررسی‌های پیشین ما نشان داد

www.SID.ir

Archive of SID

که زمان زنده‌مانی باکتری سودوموناس فلورسنس سویه CHAO- Rif در خاک‌های ناسترون به اندازه چشم‌گیری کمتر از خاک‌های سترون است (فرهنگی و همکاران، 2014).

شمارش فراوانی باکتری *سودوموناس فلورسنس* CHAO- Rif در اندام‌های هوایی گیاهان و کشت سوسپانسیون آماده شده از اندام‌های هوایی گیاهان تیمار شده با باکتری سودوموناس نشان داد که این باکتری نتوانسته خود را به بخش‌های هوایی گیاهان آفتاب گردان و شاهدانه در هر دو خاک سترون و ناسترون برساند و هیچ‌گونه نشانی از این باکتری در اندام‌های هوایی گیاهان دیده نشد. این یافته با گزارش‌های دیگران همخوانی دارد. مارهوفر و همکاران (1994) گزارش کردند که *سودوموناس فلورسنس* سویه CHAO مایه آلودگی ساقه و برگ گیاه نشده است. ون پیر و همکاران (1991) نیز نتوانستند باکتری‌های ریزوسفری افزاینده رشد گیاه را در درون ساقه و بر گ گیاه ببینند. باکتری *سودوموناس فلورسنس* از گروه باکتری‌های ریزوسفری افزاینده رشد گیاه است. این باکتری‌ها را در بسیاری از نوشتارها این گونه شناسانده‌اند: باکتری‌های آزادزی که بیشتر در نزدیک ریشه‌ها ویا در رویه و یا درون آنها با گیاهان دارای برهم کنش سودمند می‌باشند (فلوری و همکاران، 2019).

در این پژوهش، در خاک سترون، باکتری بکاررفته در خاک ناریزوسفر یافت شد ولی در خاک ناسترون یافت نشد. از آنجایی که روش آبیاری و کشت و کار در هر دو خاک سترون و ناسترون یکسان بود، این یافته نشان می‌دهد که در هر دو خاک رسیدن باکتری به خاک ناریزوسفری شدنی است ولی شاید در خاک ناسترون توان زنده‌مانی کم بوده و فراوانی آن به اندازه‌ای نبوده که در آن به اندازه شمارش شدنی برسد. در این پژوهش برای ردیابی باکتری تنها از روش کشت و شمارش کلنی بهره گیری شد، شاید اگر از دیگر روش‌ها که بر پایه کشت نیستند، نیز بهره‌گیری می‌شد، در خاک ناسترون نیز در بخش ناریزوسفر یافت می‌شد. اگرچه این باکتری در خاک سترون در بخش ناریزوسفر نیز یافت شد، ولی شمار آنها در برابر دیگرگزارش‌ها کم است. روهمرفته در این بررسی ترابری باکتری در خاک کم است زیرا آبیاری از پایین به بالا انجام شده ولی در دیگر پژوهش‌ها ابیاری از بالا انجام شده است که این به جابجایی و ترابری باکتری در نیمرخ خاک کمک می‌کند.

هم‌بومشناسی *سودوموناس فلوروسنس* سویه CHAO- Rif

باکتری یاد شده در خاک ناسترون تنها در ریزوسفر و رویه ریشه گیاهان دیده شد، بنابراین تنها به بررسی پیامد کاربرد باکتری یاد شده بر ریزجانداران بومی این دو جایگاه نمونه‌برداری پرداخته می‌شود.

تجزیه واریانس فراوانی همه باکتری‌های بومی شمارش شده در کشتگاه نوترینت آگار و سودوموناس-های بومی شمارش شده در کشتگاه کینگ بی نشان داد که تنها پیامد گونه گیاه بر فراوانی همه باکتری‌ها و سودوموناس‌های خاک در هر دو جایگاه نمونه برداری در پایه آماری 0/1 درسد چشم‌گیر است. پیامد کاربرد باکتری و برهم‌کنش آن با گونه گیاه بر آنها چشم‌گیر نبود (جدول3-12).

آزمون میانگین فراوانی همه باکتری‌ها و سودوموناس‌ها بومی در ریزوسفر و رویه ریشه گیاهان بررسی شده در کشت ناسترون در جدول 5 آمده است. فراوانی همه باکتری‌ها در هر دو جایگاه نمونه‌برداری شده، در کشت آفتاب گردان به گونه چشم‌گیری بالاتر از آن در کشت شاهدانه است ولی فراوانی همه سودوموناس‌ها در هر دو جایگاه نمونه‌برداری در کشت شاهدانه به گونه چشمگیری بالاتر از آفتاب گردان است. این ناهمانندی‌ها به ویژگی‌های ژنتیک دو گیاه، تروش‌ها و زیستگاه پدید آمده در پیرامون ریشه‌های گیاهان بر می‌گردد که هر گونه گیاهی برای گروهی از ریزجانداران زیستگاه بهتری فراهم می‌کند. از سوی دیگر بهینه شدن زیستگاهی بر گروهی از باکتری‌ها می‌تواند مایه کاهش فراوانی گروه‌هایی شود که با ریزجاندار فراوان شده برهمکنش زیانبار دارند.

جدول 5- میانگین (±انحراف استاندارد) فراوانی همه باکتری‌ها و سودوموناس‌های بومی خاک ($\log cfu\ g^{-1}$) در ریزوسفر و رویه ریشه گیاهان بررسی شده

گیاه	باکتری‌های ریزوسفری	باکتری‌های رویه ریشه	سودوموناس‌های ریزوسفری	سودوموناس‌های رویه ریشه
آفتاب گردان	7/48±0/1 a	1/7±0/07 a	8/1±0/04 b	8/22±0/05 b
شاهدانه	6/97±0/03 b	6/89±0/01 b	8/16±0/03 a	8/44±0/02 a

- در هر ستون میانگین‌های دارای دست کم یک واژه یکسان در پایه آماری 5 درسد ناهمانندی چشم‌گیر ندارند.

www.SID.ir

Archive of SID

توان باکتری *سودوموناس فلوروسنس* سویه CHAO در مهار بیماری‌های خاکزاد بویژه بیماری‌های قارچی بخوبی شناخته شده است زیرا دارای متابولیت‌های دی استیل فلوروگلوسینول[1] (PHI)، فنازین کربوکسیلیک اسید[2] (PCA) و پیولوترین[3] (plt) است و اینها پادباکتری و پادقارچ هستند و از رشد و فراوانی قارچ‌ها و باکتری‌ها جلوگیری می‌کنند (کیل و همکاران، 1992). بنابراین پیش‌بینی می‌شد که پیامد کاربرد *سودوموناس فلورسنس* CHAO- Rif بر همه باکتری‌ها و سودوموناس‌های بومی خاک چشم‌گیر باشد ولی چنین نشد. به هر گونه یافته‌های این پژوهش با یافته‌های بسیاری از پژوهش‌های دیگر همخوانی دارد (استروبل، 2003).

تجزیه واریانس فراوانی همه قارچ‌های شمارش شده در کشتگاه پی دی ای نشان دادکه تنها پیامد گونه گیاه بر فراوانی همه قارچ‌های ریزوسفری در پایه آماری 0/1 درسد چشمگیر است. پیامد کاربرد باکتری و برهمکنش باکتری و گونه گیاه بر فراوانی قارچ‌ها همانند آنچه که در بررسی باکتری‌ها در خاک ریزوسفری دیده شد، چشم‌گیر نبود. در گزارش‌های گوناگونی آمده است که سودموناس‌ها می‌توانند از بیماری های گیاهی و بویژه از زیان قارچ‌های بیماریزا جلوگیری کنند. ولی در این پژوهش که شمارش قارچ‌های ریزوسفری انجام شده است، پیامد چشم‌گیری از کاربرد باکتری سودوموناس بر شمار قارچ‌های کشت شدنی دیده نشد.

سودوموناس فلوروسنس سویه CHAO بیشتر از باکتری‌های بیماریزا بر قارچ‌های بیماریزا پیامد بد دارد. افزون بر قارچ‌های بیماری‌زا در مهار زیستی، قارچ‌های نابیماریزا که برای زنده بودن بومسازه خاک سودمند هستند، نیز مهار می‌شوند (توماشو و ولر، 1996). به هر گونه در این پژوهش مایه زنی باکتری روی شمار قارچ‌ها در خاک ریزوسفری پیامدی نداشت. برای شناخت پیامد مایه زنی باکتری و متابولیت‌های آن شاید بهتر باشد که گوناگونی قارچ‌ها و گونه‌های پاسخ‌دهنده قارچ‌ها نیز بررسی شود. یافته‌های بدست آمده از شمارش همه قارچ‌های کشت شدنی در این پژوهش با یافته‌های گیرلاند و همکاران (2001) همخوانی دارد. در پژوهش آنها نیز مایه زنی باکتری *سودوموناس فلوروسنس* سویه CHAO- Rif پیامد چشم‌گیری بر فراوانی گونه‌ها نداشت ولی شناسه گوناگونی زیستی قارچ‌ها کاهش یافت.

شناخت پیامد مایه‌زنی این باکتری‌ها بر قارچ‌های بومی خاک دشوار است. زیرا پیامد بد آنها و مهار زیستی قارچ ها با سویه CHAO بی‌درنگ و پس از مایه‌زنی آغاز می‌شود. بویژه هنگامی که پس از مایه‌زنی، هنوز فراوانی باکتری‌های مایه‌زنی شده در خاک کاهش نیافته است. ولی شناخت اینکه در چه زمانی برهمکنش سویه مایه‌زنی شده با قارچ‌ها آغاز می‌شود، کار دشواری است (گیرلاند و همکاران، 2001). گزارش شده است که نشانه‌های سویه‌های مایه‌زنی شده سودوموناس بر بیماری گیاهی گاهی وابسته به ساخت و رهاسازی پادزیست‌ها[4] نیست. برهم‌کنش سودمند میان سودوموناس‌های مایه زنی شده و قارچ‌های زیانبار برای قارچ‌های بیماریزا (مانند قارچ پوساننده تربچه) می‌تواند مایه مهار بیماری شود (لی‌مان و همکاران، 1996). آزمون میانگین لگاریتم فراوانی همه قارچ‌ها در ریزوسفر گیاهان بررسی شده نشان داد که فراوانی همه قارچ‌ها در یک گرم از خاک ریزوسفری گیاه آفتاب‌گردان (5/17) به گونه چشم‌گیری بالاتر از آن در شاهدانه (5/03) است.

نتیجه‌گیری پایانی

بررسی خودبوم‌شناسی یا اوتکولوژی *سودوموناس فلورسنس* CHAO- Rif بکاررفته در کشت آفتاب‌گردان و شاهدانه نشان داد که باکتری بکاررفته در خاک سترون بهتر از خاک ناسترون در زیستگاه‌های بررسی شده فراوان می‌شود. از سوی دیگر این باکتری برای زندگی در ریزوسفر، پلانوسفر، هیستوسفر (درون ریشه) گیاه آفتاب‌گردان بهتر از شاهدانه سازگاری داشته و فراوان‌تر است. اگر چه در خاک سترون این باکتری توان فرورفتن در ریشه و آلودگی گیاه را داشت ولی در هیچ یک از تیمارها نتوانسته است خود را به اندام‌های هوایی گیاهان برساند. بنابراین *سودوموناس فلورسنس* بکاررفته، یک باکتری درون‌زی و اندوفیت نیست. این باکتری بیشتر ریزوسفری است، زیرا هر چه از ریزوسفر به ریشه و سپس به اندام‌های هوایی نزدیک شود، فراوانی آن در زیستگاه بررسی شده کمتر شد. بر این پایه شاید کاربرد این باکتری به گونه برگ پاشی پاسخ چشم‌گیری از گیاه نداشته باشد.

بررسی هم‌بومشناسی *سودوموناس فلورسنس* CHAO- Rif بکاررفته نشان داد که بودن ریزجانداران بومی خاک از فراوانی آن در زیستگاه‌های گوناگون می کاهد و توان آلودگی آن را کاهش می‌دهد. این شاید به برهم‌کنش‌های زیانبار میان باکتری و ریزجانداران دیگر

1. 2,4-diacetylphloroglucinol
2. Phenazine-1-carboxylic acid (PCA)
3. Pyoluterin (Plt)
4. Antibiotics

www.SID.ir

Archive of SID

خاک وابسته باشد. از سوی دیگر نباید از پیامد ریزجانداران بومی خاک در برانگیختن گیاه برای جلوگیری از آلودگی با باکتری بکاررفته نیز چشم پوشید. به هر گونه کاربرد این باکتری پیامد چشم‌گیری بر فراوانی باکتری‌های ریزوسفری و پلانوسفری شمارش شده در کشتگاه‌های نوترینت آگار (همه باکتری‌ها) و کینگ بی (سودوموناس‌ها) نداشت. همچنین در برابر آنچه که پیش‌بینی می‌شد، باکتری بکاررفته بر فراوانی قارچ‌های ریزوسفری نیز پیامد چشم‌گیری نداشت.

این پژوهش نشان داد که اگرچه فراوانی سودوموناس‌های بومی خاک در ریزوسفر و پلانوسفر شاهدانه بیشتر از آنها در آفتاب‌گردان بود ولی روهمرفته گیاه آفتاب‌گردان از ریزجانداران رویه ریشه و خاک ریزوسفری بهتر از شاهدانه پشتیبانی می‌کند و فراوانی ریزجانداران در کشت این گیاه بیشتر است. این می‌تواند وابسته به رها سازی مواد آلی بیشتر برای ریزجانداران خاک باشد. بر این پایه، شاید کاربرد کود زیستی از این باکتری‌ها در کشت آفتاب-گردان پاسخ بهتری به دنبال داشته باشد.

فهرست منابع:

1. Alef, K., and P. Nannipieri. 1995. Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. London: Academic Press Harcourt Brace & Company Publishers.
2. Allsup C., and R. Lankau. 2019. Migration of soil microbes may promote tree seedling tolerance to drying conditions. Ecology. https://doi.org/10.1002/ecy.2729
3. Bacci, E.1994 Ecotoxicology of organic contaminants.CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.
4. Bell, C.R., G.A., Dickie, W.L.G. Harvey, and J.W.Y.F. Chan, 1995 Endophytic bacteria in grapevine. Can. J. microbiol. 41: 46-53.
5. Besharati, B., Sh. Pashapour, and M. Rezazadeh, 2017. The evaluation of plant growth promoting rhizobacteria effect for improving soybean growth indices. Iranian Journal of Field Crop Science, 47:671-687.
6. Bolton, H.,Jr., J.K. Frederickson, J.M. Thomas, S.M.W. Li, D.J. Workman, S.A. Bentjen and J.L. Smith, 1991 Field calibration of soil-core microcosms:Ecosystem structural and functional comparisions. Microb..Ecol. 21:175-189.
7. Carroll, H., Y. Moenne-Loccoz, D,N. Dowling and F.O Gara, 1995 Mutational disruption of the biosynthesis genes coding for the antifungal metabolite 2.4 – diaacetylphloroglucinol does not influence the ecological fitness of *Pseudomonas fluorescens* F113 in the rhizosphere of sugarbeets. APPI. Environ. Microbiol, 61:3002-3007.
8. Dazzo F.B., and Y.G. Yanni. 2017. Spatial ecology of microbial colonization intensity and behavior in rice rhizoplane bioflms analyzed By CMEIAS bioimage informatics software. J Soil Sci Plant Health 1:1-6.
9. De Leij, F.A.A.M. E.J. Sutton, J.M. Whipps, and J.M. Lynch, 1994 Effect of a genetically modified pseudomonas aur eofaciens on indigenous microbial population of wheat .FEMS Microbiol .Ecol.13:249-258.
10. De Leij, F.A.A.M. E.J. Sutton, J.M. Whipps, J.S. Fenlon, and J.M. Lynch, 1995 Impact of field release of genetically modified Pseudomonas fluorescns on indigenonus microbial population of wheat. APPI. Environ. Microbiol. 61:3446-3453.
11. Défago, G., Y. Moënne-Loccoz, D. Haas, 1999 Ecology of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* CHAO in non-target environments: Biosafety implication. Ph.D Dissertation No. 13419, ETH Zürich, Switzerland.
12. Eevers, N., M. Gielen, A. Sánchez-López, S. Jaspers, J.C. White, J. Vangronsveld and N. Weyens. 2015. Optimization of isolation and cultivation of bacterial endophytes through addition of plant extract to nutrient media .Microb Biotechnol. 8(4): 707–715.
13. Ek-Ramos M.J., R. Gomez-Flores, A.A. Orozco-Flores, C. Rodríguez-Padilla, G. González-Ochoa, and P. Tamez-Guerra. 2019. Bioactive Products From Plant-Endophytic Gram-Positive Bacteria Frontiers in Microbiology. 10: doi:10.3389/fmicb.2019.00463

www.SID.ir

Archive of SID

14. Elbadry M., H. Gamal-Eldin, and Kh. Elbanna. 1999. Effects of Rhodobacter capsulatus inoculation in combination with graded levels of nitrogen fertilizer on growth and yield of rice in pots and lysimeter experiments. World J. Microbiol. Biotech. 15:393-395.
15. Elliot E. T., Hunt H. W. ,Walter D. E. and J. C. Moore. 1986 Microcosms, mesocosms and ecosystems linking the laboratory to the field. p. 481-488. In F. Megusar and M. Gantar ed.. Perspectives in Microbial Ecology .Slovena Soc. Microbiol., Ljubljana,.
16. Farhangi, M.B., A.A. Safari Sinegani, M.R. Mosaddeghi, A. Unc, and G. Khodakaramian, 2014. Survival of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in soil; Impact of calcium carbonate and temperature. Arid Land Res. Manag. 28:36-48.
17. Flury P., P. Vesga, A. Dominguez-Ferreras, C. Tinguely, C.I. Ullrich, R.G. Kleespies, C. Keel, and M. Maurhofer. 2019. Persistence of root-colonizing Pseudomonas protegens in herbivorous insects throughout different developmental stages and dispersal to new host plants. *The ISME Journal*. 13:860-872.
18. Gamal-Eldin H.1., and K. Elbanna. 2011. Field evidence for the potential of Rhodobacter capsulatus as Biofertilizer for flooded rice. Curr Microbiol. 62(2):391-5. doi: 10.1007/s00284-010-9719-x
19. Girland, M., S. Perotto, Y. Moenne-Loccoz, R. Bergero, A. Lazzari, G. Defago, P. Bonfante, A. M. Luppi, 2001. Impact of biocontrol *Pseudomonas fluorescens*CHA0 and a genetically modified derivative on the diversity of culturable fungi in the ucumber rhizosphere. Appl. Environ. Microbiol. 67:1851-1864.
20. Hallmann, J., A. Quadt- Hallmann, W.F. Mahaffee, and J.W. Kloepper, 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. Can. J. Microbiol. 43: 895- 914.
21. Heijnen, C E., and J.A. van Veen, 1991. A determination of protective microhabitats for bacteria introduced in to soil. FEMS Mirobiol. Ecol. 85:73-80.
22. Hobbs R.J., and H.A. Mooney, 1998. Broadening the extinction debate: Population deletions and additions in California and Western Australia. Conserv. Biol. 12:271-283.
23. James ,EK. (2000) " Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis". Field Crops Res. 65: 197-209.
24. Keel, C., U. Schnider, M. Maurhofer, C. Voisard, J. Laville, U. Burger, P.Wirthner, D. Haas,and G. Defago, 1992. Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens*CHA0: Importance of the bacterial secondary me-tabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. Mol. Plant-Microbe Interact..5:4–13.
25. Klute, A., 1986. Methods of Soil Analysis. Part 1: Physical and Mineralogical Methods. Madison Wiscosin USA.: Soil Science Society of America.
26. Krimsky S. , lR.G. Wrube, I.G. Naess, S .B. Levy, R.E. Wettzler and B. Marshall, 1995. Standardized microcosms in microbial risk assessment. BioScience. 45:590-599.
27. Leeman, M., F.M. Den Ouden, J.A. Van Pelt, C. Cornelissen, A. MatamalaGarros, P.A.H. M. Bakker, and B. Schippers, 1996. Suppression of fusariumwilt of radish by coinoculation of fluorescent Pseudomonass pp and root-colonizing fungi. Eur. J. Plant Pathol. 102:21–31.
28. Levin S. A.,1991. An ecological perspective. p.45-59. In B. D. Daviesed (edt), The genetic revolution. The John Hopkins University Press, Baltimore MD, U.S.
29. Loeppert, R.H., and G.L. Suarez, 1996. Carbonates and gypsum. In DL. Spark (edt). Methods of Soil Analysis Part 3: Chemical Methods, Madison Wisconsin USA: Soil Science Society of America
30. Maurhofer, M., C. Hase, P. Meuwly, J.-P. Metraux, and G. Defago, 1994. Induction of systemic resistantce of tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO: Influemce of the gac A gene and of pyoverdine production. Phytopathol. 84:139-146.

www.SID.ir

Archive of SID

31. Miller R.V., and S.B. Levy, 1989. Horizontal gene transfer in relation to environmental release of genetically engineered microorganisms. p.405-420. In S.B. Levy and R.V., Miller (eds)., Gene transfer in the environment. McGraw-Hill, New York.
32. NandaKafle G., A.A. Christie Vilain and V.S. Brözel. 2018. Growth and extended survival of Escherichia coli O157:H7 in soil organic matter. Front. Microbiol. 9:762. doi: 10.3389/fmicb.2018.00762
33. Natsch A., C. Keel, N. Hebecker, E. Laasik, G. Défago, 1998. Impact of Pseudomonas fluorescensstrain CHA0 and a derivative with improved biocontrol activity on the culturable resident bacterial community on cucumber roots. FEMS Microbiol. Ecol. 27:365-380.
34. Olsen, S.R., and L.E. Summers, 1990. Phosphorous. In A.L. Page (edt). Method of Soil Analysis, Part 2, Chemical Methods, Madison Wisconsin USA: Soil Science Society of America.
35. Pearce K.P., D. Clarke, C. Walker, and P. Atkin, 1997. A conservation program for the partulid tree snails of the pacific region. Mem. Mus. Vic. 56:431-433.
36. Pholchan M.K., J.C. Baptista, R.J. Davenport, W.T. Sloan, and T.P. Curtis. 2013. Microbial community assembly, theory and rare functions. Front. Microbiol., 4(68). 1-9.
37. Quadt- Hallmann, A., N. Benhamou, and J.W. Kloepper, 1997. Bacterial endophtes in cotton: mechanisms of entering the plant. Can. J. Microbiol. 43: 577- 582.
38. Roades, J.D., 1990. Salinity electrical conductivity and total dissolved solids. In D.L Sparks (edt). Methods of Soil Analysis Part 3: Chemical Methods, Madison Wisconsin USA.: Soil Science Society of America.
39. Safari Sinegani, A.A., 2013. Soil biology and biochemistry. 4th edition. Bu-Ali Sina University publication Centre. Hamadan, Iran.
40. Safari Sinegani, A.A., and T. Rashidi, 2011. Changes in phosphorus fractions in the rhizosphere of some crop species under glasshouse conditions. J. Plant Nutr. Soil Sci. 174:899-907.
41. Safari Sinegani, A.A., Z. Sharifi, and M. Safari Sinegani. 2010. Applied methods in microbiology. Bu-Ali Sina University publication Centre. Hamadan, Iran.
42. Senechkin I.V. 2013. Oligotrophic Bacteria and Root Disease Suppression in Organically Managed Soils. PhD thesis, at Wageningen University. 141 pages. ISBN 978-94-6173-803-5.
43. Shila, M.T., 1996. Toxic metal in soil-plant system. John Wiley and Sons. New York, p.469.
44. Siciliano, S.D., C.M. Theoret, J.R. Defreitas, P.J. Hucl, and J.J. Germida, 1998. Differences in the microbial communities associated with the roots of different cultivars of canola and wheat. Can . J. Microbiol. 44: 844- 851.
45. Sparks, D.L., 1996. Methods of soil analysis. P. 3. Vol. 5, Chemical Methods. SSSA Book Series, Madison, WI, USA: American Society of Agronomy and Soil Science Society of America.
46. Sposito, G., L. Lund, and A. Chang, 1982. Trace metal chemistry in arid-zone field soils amended with sewage sludge: I. Fractionation of Ni, Cu, Zn, Cd, and Pb in solid phases. Soil Sci. Soc.Am. J. 46:260–264.
47. Strobel G.A. 2003. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes Infect.* 5 535–544. 10.1016/S1286-4579(03)00073-X
48. Thomas, G.W., 1996. Soil pH and soil activity. In D.L. Sparks (edt). Methods of Soil Analysis Part 3: Chemical Methods, Madision Wislonsin USA: American Society of Agronomy and Soil Science Society of America.

www.SID.ir

Archive of SID

49. Thomashow, L.S., and D.M. Weller, 1996. Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifun-gal metabolites. p. 187–235. In G. Stacey and N.T. Keen (edts)., Plant-microbeinteractions, vol. 1. Chapman and Hall, New York, N.Y.
50. Troxler J., M. Zala, A. Natsch, Y. Moënne-Loccoz, and G. Défago, 1997. Autecology of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHAO in the rhizosphere and inside roots at later stages of plant development. FEMS Microbiol. Ecol. 23:119-130.
51. Van Elsas J.D., 1995. Preparation of protocols and decision trees for field trials with genetically engineered microorganisms. Key factors for decision trees. p. 123-127. In Unanswered safety questions when employing GMOs, CCRO Meeting on Risk Assessment, Noordwijkerhout, Netherlands.
52. Van Elsas J.D., and J.T. Trevors, 1991. Environmental risks and fate of genetically engineered microorganisms in soil. J. Environ. Sci. Health. 26:981-1001.
53. Vanpeer, R., and B. shippers, 1989. Plant growth responses to bacterization with selected Pseudomonas spp. Strains and rhizosphere microbial development in hydroponic cultures. Can. J. Microbiol. 35: 456- 463.
54. Vanpeer, R., G.J. Niemann, and B. shippers, 1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation by pseudomonas sp. Strain WCS417r. phytopathol. 81:728-734.
55. Vincent, J.M. 1982. Nitrogen fixation in legumes. Academic Press, Sydney, Australia.
56. Walkley, A., and I.A. Black, 1934. An examination of the Degtareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. Soil Sci. 37:29–38.
57. Weil T, C. De Filippo, D. Albanese, C. Donati, M. Pindo, L. Pavarini, F. Carotenuto, M. Pasqui, L. Poto, J. Gabrieli, C. Barbante, B. Sattler, D. Cavalieri, and F. Miglietta. 2017. Legal immigrants: Invasion of alien microbial communities during winter occurring desert dust storms. Microbiome. 5: 32.
58. Xiong J., L. Wu, Sh. Tu, J.D. Van Nostrand, Zh. He, J. Zhou, and G. Wang. 2010. Microbial Communities and Functional Genes Associated with Soil Arsenic Contamination and the Rhizosphere of the Arsenic-Hyperaccumulating Plant Pteris vittata L. Appl Environ Microbiol. 76(21): 7277–7284. DOI: 10.1128/AEM.00500-10.

www.SID.ir

Archive of SID

Autecology and synecology of *Pseudomonas fluorescens* CHAO-Rif used in the cultivation of sunflower and cannabis

A. A. Safari Sinegani[1] and L. Ramezani
Professor, Soil Science Department, Bu Ali Sina University; E-mail: aa-safari@basu.ac.ir
M. Sc. Graduated, Bu Ali Sina University; E-mail: laila.ramezany@gmail.com
Received: June, 2019 & Accepted: May, 2020

Abstract

Plants have difficulty living in hard habitats such as heavy metal contaminated soils that the application of plant growth-promoting bacteria can be beneficial to reduce this difficulty. This study was designed to investigate the autecology and synecology of *Pseudomonas fluorescens* CHAO-Rif in a heavy metal contaminated soil. This research was a factorial experiment with a completely randomized design with three replications in greenhouse condition. The first factor was plant species (sunflower and hemp plants) and the second factor was soil sterilization, in which the treated soils were inoculated with *Pseudomonas fluorescens* CHAO-Rif bacterium purchased from the Plant Pathology Group of the Institute for Integrative Biology (IBZ) in Zurich, Switzerland. The plants were harvested at the beginning of the flowering stage. The population of the applied *Pseudomonas* was significantly higher (more than 1.5 times) in sterile soil planted with sunflower compared to that in unsterile soil planted with cannabis. In sterile soil, the inoculated *Pseudomonas* could colonize in the inner tissues of the sunflower root. Here the natural log of the number of the bacterium was 4.02±0.06, but it was not found in the cannabis root. The bacterium was found in the rhizosphere and non-rhizosphere soils and on the root surface (rhizoplane) of both plants. However, it was not found in aerial parts of the plants. In unsterile soil, the inoculated bacteria were found only in the rhizosphere and on the root surface of the plants, but not seen in the shoots and roots of the plants. Although soil native microorganisms reduced the abundance of applied *Pseudomonas* in unsterile soil, the application of this bacterium did not have a significant negative effect on the studied soil native microorganisms.

Keywords: Biofertilizer, Endophyte, Plant growth-promoting rhizobacteria, Rhizosphere.

[1] Corresponding author: Soil Science Department, Faculty of Agricultural, Bu-Ali Sina University.

www.SID.ir