Archive of SID

مجله ایمنی زیستی

دوره ۱۴، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۰

ISSN 2716-9804 الکترونیکی، ISSN 2717-0632 چاپی

ارزیابی کارایی دو سویه *Amycolatopsis* sp. strain 1119 و *Pseudomonas* sp. strain P3-57 در گلخانه تجاری خیار و بررسی نحوه استقرار آن‌ها و تاثیر آن‌ها بر جمعیت میکروبی خاک

20.1001.1.27170632.1400.14.2.3.2

سحر علی‌پور کافی[۱]، علی محمدی*[۲] و ابراهیم کریمی

۱- دانش آموخته کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران

۲- استادیار میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران

۳- کارشناس ارشد بیماری شناسی گیاهی، بخش بیوتکنولوژی میکروبی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

a.mohammadi@alzahra.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۳۰، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۳۱

صفحه ۴۴-۳۱

چکیده

خیار سبز با نام علمی *Cucumis sativus*، از گیاهان مهم جالیزی است. در حال حاضر بیشترین سطح کشت را در گلخانه‌های کشور دارد. گلخانه‌داران برای افزایش عملکرد از کودهای شیمیایی در مراحل مختلف رشد و نمو گیاه استفاده می‌کنند که موجب برهم خوردن تعادل محیط زیست و میکروبیوم خاک می‌شود. استفاده از باکتری‌های محرک رشد علاوه‌بر حفظ تعادل میکروارگانیسم‌های خاک می‌تواند موجب بهبود کیفیت محصول شود. در این پژوهش اثرات دو سویه باکتریایی *Amycolatopsis* sp. strain 1119 و *Pseudomonas* sp. strain P3-57 بر جمعیت میکروبی خاک، میزان تولید و کیفیت محصول در گلخانه تجاری خیار مورد بررسی قرار گرفت. استفاده از سویه‌های P3-57 و ۱۱۱۹ باعث افزایش عملکرد به‌ترتیب تا ۴ و ۲۳ درصد شد. ارزیابی کیفی محصول مشخص کرد، هر دو باکتری اثر مطلوبی بر روی پذیرش کلی محصول داشتند. بررسی نحوه استقرار باکتری محرک رشد نشان داد که سویه ۱۱۱۹ در ریشه به‌صورت اندوفایت و P3-57 بر روی ریشه کلنیزه می‌شود. سویه ۱۱۱۹ میزان قارچ‌های قابل کشت موجود در ریزوسفر را افزایش و تعداد باکتری‌ها را کاهش داد. تیمار با باکتری P3-57 موجب افزایش جمعیت هر دو گروه میکروارگانیسم شد. استفاده از این باکتری‌ها در صنعت می‌تواند کمک شایانی به محافظت از محیط زیست و دستیابی به کشاورزی پایدار در سال‌های آتی کند.

واژه‌های کلیدی: *آمیکولاتوپسیس*، باکتری اندوفایت، باکتری‌های محرک رشد، کلنیزاسیون، گلخانه تجاری خیار.

www.SID.ir

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2022-04-30]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.2.3.2]

Archive of SID

مقدمه

میوه و سبزی بخش مهمی از رژیم غذایی انسان را تشکیل می‌دهند و در این میان خیار سبز با نام علمی *Cucumis sativus*، از گیاهان مهم جالیزی است که نقش مهمی را در جیره غذایی بشر ایفا می‌کند (Murad et al. 2016).

در سال‌های گذشته، کشت خیار گلخانه‌ای توسعه زیادی پیدا کرده است و در حال حاضر بیشترین محصول گلخانه‌ای کشور را شامل می‌شود. بر اساس گزارشات سالانه وزارت جهاد کشاورزی ایران (آمارهای سالانه کشاورزی. وزارت جهادکشاورزی ایران؛ ۱۳۹۸)، سطح کشت خیار گلخانه‌ای در ایران در حال افزایش است به‌طوری‌که سطح گلخانه‌های زیر کشت از ۶۳۰۰ هکتار در سال ۱۳۹۶ به ۷۴۰۰ هکتار در سال ۱۳۹۷ افزایش یافته است (Alipour Kafi et al. 2021a).

سالانه بیش از ۲ میلیون تن خیار در ایران برداشت می‌شود و هر ساله گلخانه‌داران برای بهبود حاصلخیزی خاک، افزایش و بهبود کیفیت محصول به طور مستمر از کودهای شیمیایی در مراحل مختلف رشد گیاه به ویژه در مرحله باردهی استفاده می‌کنند. استفاده از این نهاده‌های پرهزینه و آلوده‌کننده محیط زیست، برهم زننده تعادل محیط زیست بوده و حتی مغایر با اهداف و چشم‌اندازهای توسعه پایدار است (Kaur et al. 2008).

جمعیت میکروبی خاک مهمترین بخش زنده خاک است که نقش بسیار مهمی در چرخه عناصر غذایی، حاصلخیزی دراز مدت و جریان انرژی در خاک دارد. ارزیابی جمعیت میکروارگانیسم‌های خاک به‌عنوان زیست‌توده میکروبی می‌تواند به‌عنوان ابزاری برای بررسی کیفیت خاک به کار رود (Hofman et al. 2003). استفاده از کود زیستی حاوی باکتری‌های محرک رشد (PGPR، plant growth-promoting rhizobacteria) موجب بهبود ساختار خاک و افزایش محصول شده و آلودگی‌های ناشی از مصرف کود شیمیایی و بیماری گیاهان را به حداقل خواهد رساند (Gopalakrishnan et al. 2015).

یک مطالعه انجام‌شده در سال ۲۰۲۱ نشان داد که با تلقیح سویه‌های *Streptomyces* تعداد کلنی‌های قابل کشت قارچ موجود در ریزوسفر گیاه فلفل دلمه‌ای افزایش یافته است و همچنین سویه IT20 باعث افزایش تنوع باکتری‌های موجود در خاک ریزوسفر شد در صورتی‌که تعداد کلنی‌های باکتری قابل کشت تفاوت معنا داری با کنترل نداشت (Abbasi et al. 2021b).

www.SID.ir

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2022-04-30]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.2.3.2]

Archive of SID

باکتری‌های محرک رشد در ناحیه ریزوسفری خاک زندگی کرده و با ساز و کارهای متفاوتی رشد گیاهان را بهبود می‌دهند. این میکروارگانیسم‌ها توانایی تثبیت نیتروژن، توانایی حل فسفات معدنی نامحلول، آزادسازی یون‌های آهن، پتاسیم و غیره از ترکیبات نامحلول، توانایی تولید سیدروفور و فیتوهورمون‌ها را داشته و می‌توانند با تسهیل جذب مواد غذایی زمینه رشد بهتر گیاه را فراهم و سمیت فلزات سنگین در گیاهان را کاهش دهند (Burd et al. 2000a).

اعضای جنس *Amycolatopsis* به خانواده Pseudonocardiaceae تعلق دارند که باکتری‌های گرم مثبت هوازی هستند. تاکنون ۶۸ گونه و ۴ زیرگونه از این جنس شناسایی شده است که از محیط‌های متفاوتی مانند غارهای طبیعی، رسوب اقیانوس، خاک و ریشه گیاهان جداسازی شده است. اهمیت این جنس در کشاورزی هنوز به خوبی شناخته نشده است. برای اولین بار در سال ۲۰۱۶، *Amycolatopsis* sp. BCA-696 از خاک ریزوسفری نخود جدا شد و توانایی محرک رشدی آن بر روی نخود و سورگوم بررسی شد (Gopalakrishnan et al. 2015).

در سال ۲۰۲۱ علی‌پور کافی و همکاران نیز *Amycolatopsis* strain 1119 را از مزرعه ذرت جداسازی کرده و عملکرد آن را در گلخانه تجاری خیار بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که این سویه عملکرد محصول را تا ۲۰٪ افزایش داده و به دلیل توانایی در بهبود عملکرد میوه در یک گلخانه تجاری و و بهبود طعم و پذیرش کلی میوه خیار، دارای پتانسیل بالایی برای استفاده به‌عنوان یک کود زیستی است (Alipour Kafi et al. 2021b).

Pseudomonas جنس مهمی از باکتری‌های گرم منفی متعلق به شاخه پروتئوباکتریا، رده گاماپروتئوباکترها هستند که تاکنون ۱۴۴ گونه و ۱۰ زیرگونه از این جنس شناسایی شده است. در بین باکتری‌های گرم منفی *Pseudomonas* بیشترین تعداد گونه شناسایی‌شده را دارد (Burd et al. 2000). باکتری *Pseudomonas* sp. strain P3-57 توسط زارع و همکاران در سال ۲۰۱۸ جداسازی و ویژگی‌های محرک رشدی آن بررسی شد (Zare et al. 2019). این باکتری در سال ۲۰۲۱ توسط علی‌پور کافی و همکاران در گلخانه تجاری خیار مورد ارزیابی قرار گرفت (Alipour Kafi et al. 2021a).

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که استفاده از این سویه به همراه کود شیمیایی ۱۰۰٪ بالاترین نمره پذیرش کلی میوه خیار در ارزیابی حسی را

www.SID.ir

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2022-04-30]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.2.3.2]

Archive of SID

داشت که با افزایش عطر، طعم و آب میوه همراه بود. تیمار گیاهان با این سویه در گلخانه تجاری خیار تاثیر معناداری بر عملکرد محصول نداشت.

اگرچه شناسایی باکتری‌های محرک رشد و بررسی تاثیر آن‌ها بر عملکرد گیاهان مختلف در سال‌های گذشته به خوبی مطالعه قرار گرفته و سویه‌هایی مطلوب با کارایی بالا نیز معرفی شده است اما تحقیقات بسیار کمی برای درک روابط پیچیده جوامع میکروبی بومی در ریزوسفر گیاهان سالم انجام شده است.

هدف از انجام این مطالعه ارزیابی و مقایسه اثر دو سویه محرک رشد P3-57 و ۱۱۱۹ بر جمعیت میکروبی خاک برای درک بهتر روابط آن‌ها با گیاه خیار در شرایط گلخانه تجاری بوده است. علاوه‌بر این میزان تولید و کیفیت خیار تولید شده توسط گیاهان تحت تیمار با این سویه‌ها در مقایسه با یکدیگر نیز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه مایه تلقیح

در این پژوهش تاثیر دو سویه باکتریایی که توسط و زارع و همکاران (Zare et al. 2019) و علی‌پور کافی و همکاران (Alipour Kafi et al. 2021b) جداسازی شده بود، بر عملکرد و کیفیت خیار در گلخانه تجاری بررسی شد. این دو سویه در مجموعهٔ میکروبی پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRIICC) نگهداری می‌شوند.

برای کشت باکتری *Amycolatopsis*. strain 1119 از محیط کشت GYM (Glucose-Yeast extract-Malt extract-Agar) (Kämpfer et al. 1991) و برای کشت باکتری *Pseudomonas* sp. strain P3-57 از محیط کشت NB (nutrient broth) استفاده شد.

برای تهیه مایه تلقیح، یک میلی‌لیتر از کشت تازه به ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت استریل اضافه شد و به مدت سه روز در شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس و با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه (rpm) تکان داده شد.

فرمولاسیون سویه P3-57 به‌صورت مایع به این صورت انجام شد که سلول‌های باکتری با استفاده از سانتریفیوژ (۶۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه) جدا و با ۲۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی (NaCl ٪۰/۹) استریل مخلوط شد سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر OD نمونه با سرم فیزیولوژی تا ۰/۲ رقیق شد.

برای فرمولاسیون سویه ۱۱۱۹، سلول‌های باکتری با استفاده از سانتریفیوژ (۶۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه) جدا و در ۵۰ میلی‌لیتر سرم

www.SID.ir

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2022-04-30]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.2.3.2]

Archive of SID

فیزیولوژی استریل سوسپانسیون و به ۳۷۵ گرم ماسه استریل اضافه و به خوبی مخلوط شد. غلظت باکتری در حدود 10^6 واحد تشکیل کلنی (CFU) در هر گرم ماسه تنظیم شد.

کشت گلخانه

کشت خیار رقم سلطان در یک گلخانه به مساحت ۱۲۵۰ متر واقع در محمدآباد عرب، روستایی از توابع بخش جوادآباد شهرستان ورامین در استان تهران، ایران در طی سه فصل کشت (پائیز ۹۷ و بهار وپاییز ۹۸) انجام شد.

بستر کشت گلخانه‌ها مطابق با روال معمول منطقه و با استفاده از کود حیوانی پوسیده گاوی آماده شد. آبیاری و استفاده از کودهای شیمیایی مطابق روال معمول (استفاده از NPK) و طبق نظر کارشناس گلخانه انجام شد. استفاده از سموم آفت‌کش مطابق نیاز و بر اساس نظر کارشناس گیاهپزشک مجموعه انجام شد. طراحی آزمایش به‌صورت طرح بلوک‌های کاملا تصادفی انجام گرفت. هر تیمار در ۴ ردیف (تکرار) و هر ردیف شامل ۱۰۰ بوته انجام شد.

تیمار نشاهای بیست روزه با باکتری‌های مختلف به این صورت انجام گرفت که از نمونه آماده‌شده سویه P3-57 مقدار ۵ میلی‌لیتر در پای هر بوته خیار قبل از آبیاری دوره‌ای ریخته شد. برای سویه ۱۱۱۹، پنج گرم مخلوط ماسه و باکتری قبل از آبیاری دوره‌ای در پای هر بوته ریخته شد. برای کنترل منفی ۴ ردیف (تکرار) بدون تیمار با باکتری در نظر گرفته شد.

ارزیابی عملکرد (میوه)

در میانه دوره برداشت خیار، در طول یک ماه، پانزده بار با فاصله زمانی ۲ روز محصول هر ردیف به‌صورت مجزا با ترازوی دیجیتال فروشگاهی توزین و ثبت و میزان عمکرد یک ماهه نمونه‌ها محاسبه شد.

ارزیابی حسی

از هر تیمار ۸ میوه (از هر تکرار ۲ عدد) به‌صورت ورقه‌های نسبتا باریک بریده و در بشقاب‌های یکبار مصرف تمیز قرار داده شد. تیمارها با کدهای غیرقابل تشخیص، مشخص و بر روی میز چیده شدند. از ۲۰ نفر خانم و ۲۰ نفر آقا از دانشجویان و پرسنل بخش‌های مختلف پژوهشگاه در سنین مختلف برای تست کیفی و پرکردن پرسشنامه کیفیت زیر (جدول ۱) دعوت شد (Motamedi et al. 2018).

www.SID.ir

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2022-04-30]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.2.3.2]

Archive of SID

جدول ۱- پرسشنامه ارائه‌شده به شرکت‌کنندگان برای ارزیابی حسی

لطفا به هر یک از معیارهای زیر از ۱ تا ۵ به‌ترتیب افزایشی امتیاز دهید، به‌طوری‌که ۱ کمترین امتیاز و ۵ بیشترین امتیاز را داشته باشد							
نام نمونه	بو	طعم	آبداری	تردی	تلخی خیار	ظاهر	پذیرش کلی
۱							
۲							

بررسی نحوه ی استقرار باکتری محرک رشد

برای بررسی کلنیزاسیون و یا اندوفایت شدن باکتری در ریشه، لوله‌های شیشه‌ای استریل ۲۰ سانتی‌متری با ۲۵ سی‌سی محیط آب-آگار (pH=۶) پر شد. بذر خیار پس از دو مرتبه ضد عفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم ٪۲، با آب مقطر استریل سه مرتبه آبکشی شد، سپس به مدت ۲۰ دقیقه در سوسپانسیون باکتری و سرم فیزیولوژی با CFU برابر با 10^6 در هر میلی‌لیتر قرار داده شد. برای بذور شاهد از سرم فیزیولوژی استریل بدون باکتری استفاده شد. در هر لوله استریل، یک بذر گذاشته شد. تیوب‌ها در دمای محیط به مدت یک هفته قرار گرفتند.

برای بررسی اندوفایت شدن باکتری‌ها، ریشه‌ها پس از دو مرتبه شستشوی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۲٪ با اتانول ۷۰٪ ضدعفونی شدند. سپس سه مرتبه با آب مقطر استریل آبکشی شدند. ریشه‌ها پس از یک مرتبه شستشوی نهایی با سرم فیزیولوژی استریل، به قطعات ۲ سانتی‌متری تقسیم شدند. این قطعات به مدت ۳ دقیقه در سرم استریل ورتکس شد. از سرم سریال غلظت تهیه و بر روی محیط کشت اختصاصی *Actinomycetes* (GYM) و *Pseudomonas* (NA) پخش شد. برای بررسی کلنیزه‌شدن باکتری‌ها ریشه‌ها به‌صورت سالم بر روی محیط کشت‌های اختصاصی برده شد (Bonaldi et al. 2015; Himaman et al. 2016).

مطالعه جمعیت باکتریایی و قارچی قابل کشت در خاک ریزوسفری

از هر تکرار ۵ بوته به صورت تصادفی انتخاب شد. خاک پای بوته‌ها با استفاده از یک قاشق غذاخوری تمیز به آرامی کنار زده شد. پس از نمایان شدن ریشه‌ها، سه قاشق پر از خاک اطراف ریشه داخل یک کیسه پلاستیکی تمیز ریخته شد. خاک ریزوسفری هر ۵ بوته داخل یک کیسه نگهداری و به‌عنوان یک تکرار در نظر گرفته شد. خاک‌ها بر روی یخ و در ظرف در دار به آزمایشگاه منتقل شدند. مقدار ۱ گرم خاک از هر

www.SID.ir

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2022-04-30]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.2.3.2]

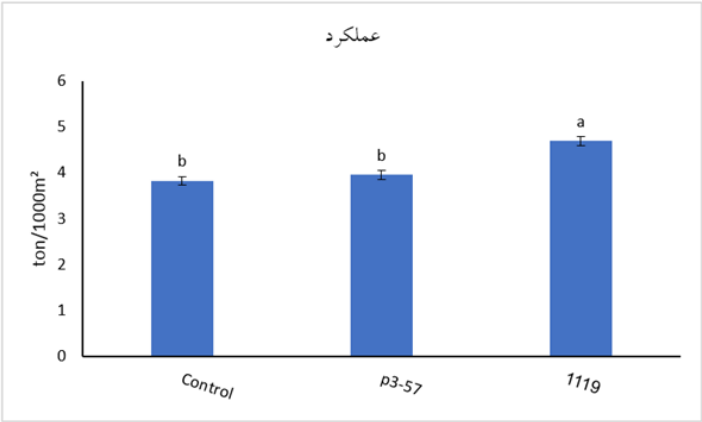
Archive of SID

نمونه به فالکون استریل ۱۵ میلی‌لیتری منتقل و سپس ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل به آن اضافه شد. فالکون حاوی سوسپانسیون خاک ۱۰ دقیقه در شیکر انکوباتور قرار داده شد. سری رقت تا رقت ۴– ۱۰ تهیه شد. برای شمارش باکتری‌ها از محیط TSA و برای شمارش قارچ‌ها از محیط PDA استفاده شد. برای هر غلظت ۳ تکرار، هر تکرار شامل یک پلیت در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

میزان عملکرد

میانگین مجموع وزن ۱۲ برداشت از هر تیمار به‌صورت عملکرد یک ماهه در شکل ۱ نشان داده شده است. عملکرد یک ماه بوته‌های تیمارشده با سویه‌ها ۱۱۱۹ در مقایسه با کنترل تفاوت معنی داری داشت و موجب افزایش میزان عملکرد شد. استفاده از سویه P3-57 و ۱۱۱۹ باعث افزایش عملکرد به‌ترتیب تا ۴ و ۲۳ درصد شد. اما افزایش عملکرد سویه P3-57 در مقایسه با کنترل معنادار نبود. نتایج حاصل از تیمار سویه P3-57 مطابق نتایج بوتارد–هانت و همکاران بود که در سال ۲۰۰۹ گزارش کرد که استفاده از محصول PGPR BioYield® شرکت Bayer CropScience طی دو سال متوالی هیچ تأثیر معنی‌داری بر عملکرد فلفل در شرایط مزرعه نداشت (Boutard-Hunt Caroline, 2009). تیمار با سویه ۱۱۱۹ پیش‌تر توسط علی‌پور کافی و همکاران در گلخانه تجاری خیار مورد ارزیابی قرار گرفته بود. افزایش معنادار عملکرد مشاهده شده در این مطالعه با نتایج مطالعه قبل مطابقت داشت (Alipour Kafi et al. 2021b).



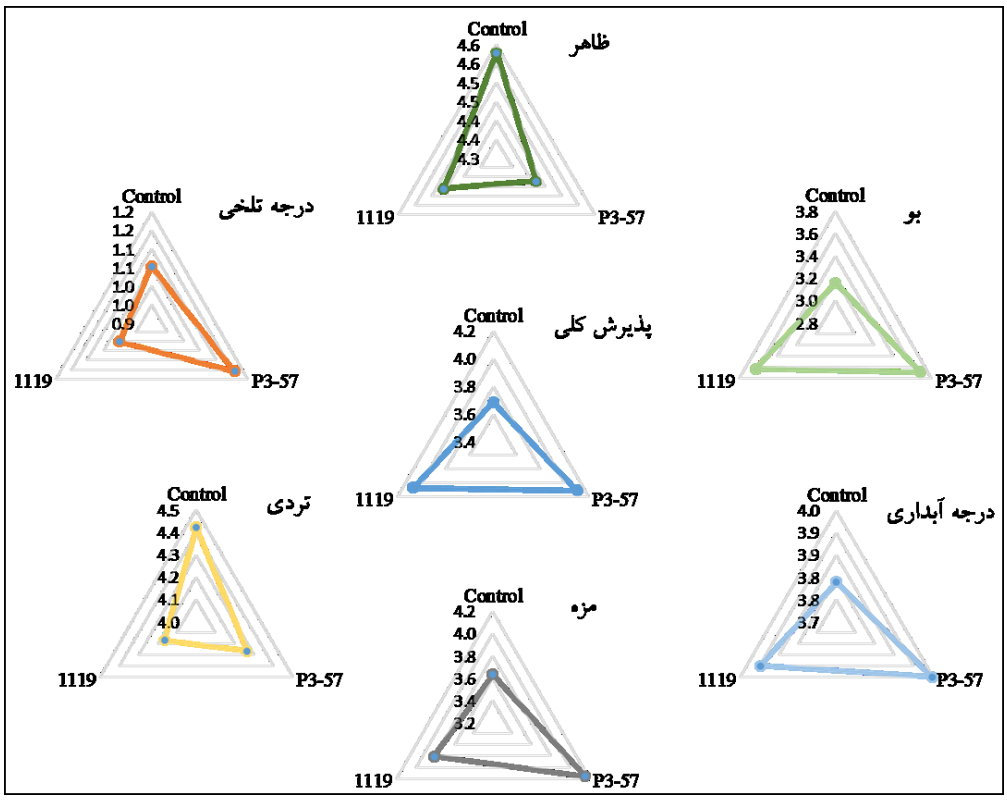
شکل ۱- نمودار اثر باکتری‌های PGPR بر عملکرد یک ماهه خیار. ستون‌هایی که با یک حرف مشخص شده‌اند با یکدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند ($P \leq 0.05$).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2022-04-30]
[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.2.3.2]
www.SID.ir

Archive of SID

ارزیابی حسی

میانگین نمرات ثبت‌شده توسط ۴۰ نفر شرکت‌کننده در این آزمون در شکل ۲ نمایش شده است. همانطوری‌که مشاهده می‌شود امتیاز P3-57 در بیشتر گزینه‌های مورد سنجش، نسبت به کنترل بیشتر است. بو، طعم، آبداری، ظاهر و تُردی میوه در پذیرش کلی بیشترین تاثیر را داشت. درجه تلخی خیار در نمونه‌های تیمار شده با این سویه نیز بیشتر از کنترل و ۱۱۱۹ بود. در مطالعه‌ای که سال ۲۰۱۸ انجام شده بود نشان داده شد که ترکیبات فرّار خیار مانند Beta-cyclocitral و Z-3-Hexenal (ترکیباتی که نقش اصلی در ایجاد بو و مزه دارند) زمانی‌که گیاه با سویه محرک رشد *Trichoderma atroviride* تیمار شده بود، در مقایسه با کنترل افزایش یافته است (Nawrocka et al. 2018). رشه و همکاران دریافتند که میوه‌های عناب (تحت تیمار با سویه‌های PGPR از دو جنس *Pseudomonas* و *Bacillus*) غلظت بالاتری از ترکیبات فرار دارند و کیفیت و طعم بیشتری نسبت به میوه‌هایی که تحت سیستم‌های تولید معمولی رشد می‌کنند، دارند (Reche et al. 2019).



شکل ۲- نمودار ارزیابی حسی تاثیر سویه‌های P3-37 و ۱۱۱۹ بر شاخص‌های کیفیت میوه خیار

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2022-04-30]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.2.3.2]

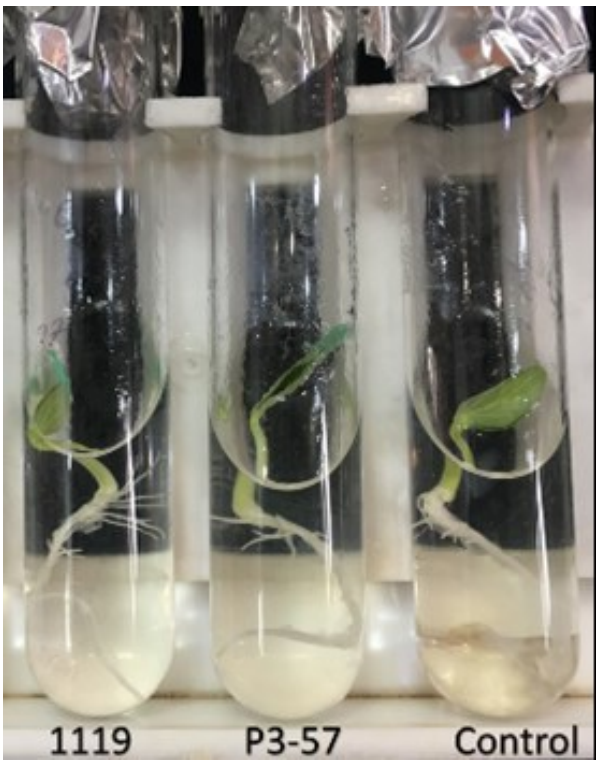
www.SID.ir

Archive of SID

بررسی وضعیت استقرار باکتری

پس از گذشت یک هفته از قرار گرفتن بذرها در محیط استریل، بذرها جوانه زده و مشاهده شد که رشد طولی ریشه بذرهای تلقیح‌شده با باکتری‌های PGPR بیشتر از کنترل است اما رشد قطری آن‌ها تغییری پیدا نکرده است (شکل ۳).

همچنین در اطراف ریشه بذر تلقیح شده با سویه P3-57 (شکل ۴ ب) رشد کلنی دیده شد. پس از مشاهده کلنی اطراف ریشه، برای بررسی کلنیزاسیون و یا اندوفایت شدن باکتری، آزمایش کشت بر روی پلیت انجام شد. نتایج به دست آمده نشان داد که سویه ۱۱۱۹ که از جنس *Amycolatopsis* است توانایی اندوفایت شدن درون ریشه را دارد و پس از استریل کامل سطح ریشه، سرم فیزیولوژی توانست آنرا از درون ریشه بیرون بکشد، به نحوی که روی پلیت تشکیل کلنی مشاهده شد (شکل ۴ الف). درحالی‌که در مورد ریشه بذرهای تلقیح شده با باکتری P3-57 تشکیل کلنی مشاهده نشد.



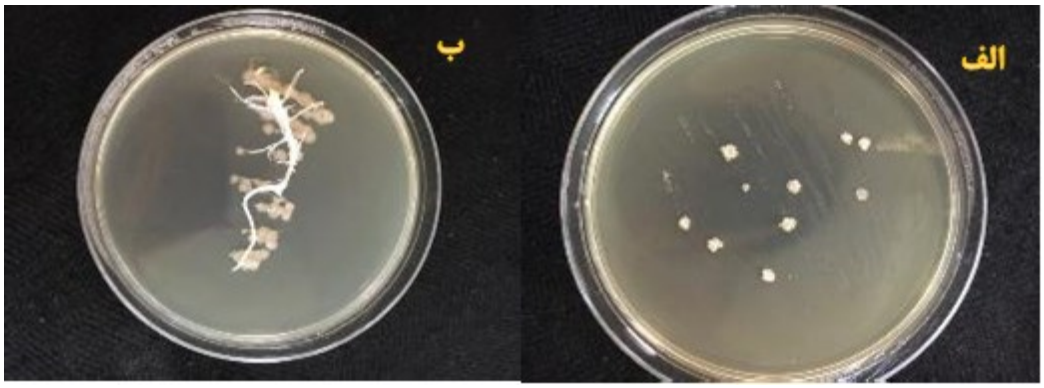
شکل ۳- رشد بذور تلقیح شده با سویه‌های P3-37 و ۱۱۱۹

www.SID.ir

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2022-04-30]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.2.3.2]

Archive of SID



شکل ۴- بررسی نحوه استقرار باکتری در ریشه
الف) کشت محتویات داخلی ریشه تلقیح شده با سویه ۱۱۱۹ (پس از استریل سطحی) بر روی محیط کشت ب) رشد کلنی‌های *Pseudomonas* در اطراف ریشه خیار تلقیح‌شده با سویه P3-57

محصولی با نام تجاری ®Proradix یک ضدقارچ حاوی *Pseudomonas* sp. DSMZ 13134 است. طبق اطلاعات تولیدکننده محصول (Sourcon-Padena GmbH ،Tübingen, Germany & ,Co. KG) این سویه در سطح ریشه گیاه کلنیزه می‌شود و احتمالاً با تحریک مکانیسم‌های دفاعی سیستمی گیاه و اثرات محرک رشدی، باعث رشد بیشتر ریشه می‌شود. همچنین این محصول موجب کاهش جمعیت عوامل بیماری‌زای خاک توسط رقابت بر سر مواد مغذی و زیستگاه می‌شود. کلنیزاسیون ریشه توسط *Pseudomonas* در پژوهش‌های زیادی مورد مطالعه قرار گرفته است (Lugtenberg et al. 2001).

در یک پژوهش انجام‌شده در سال ۱۹۹۷ کلنیزاسیون متراکم و قوی ریشه توسط سویه *Pseudomonas fluorescens* WCS365 گزارش شد (Chin-A-Woeng et al. 1997). در مطالعه انجام‌شده در سال ۲۰۱۰ نیز سلول‌های *Pseudomonas* sp. DSMZ 13134 در سطح و تمام قسمت‌های ریشه از پایه ریشه تا نوک آن مشاهده شدند (Buddrus-Schiemann et al. 2010).

با توجه به شکل ۴ ب، سویه *Pseudomonas* sp. P3-57 توانایی کلنیزاسیون در سطح سلول را داشت. به‌طور کلی، اعضای اکتینوباکتر در طبیعت توزیع گسترده‌ای دارند و هم به‌صورت اندوفایت و هم کلنیزه‌شده در ریزوسفر یافت می‌شوند. به‌عنوان میکروارگانیسم‌های اندوفایت، آن‌ها در قسمت داخلی گیاهان، به طور عمده در ریشه و بافت‌های زایلم ساقه استقرار دارند و باعث ایجاد تغییر ظاهری در مورفولوژی و فیزیولوژی میزبان خود نمی‌شوند (Vurukonda et al. 2018).

www.SID.ir

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2022-04-30]

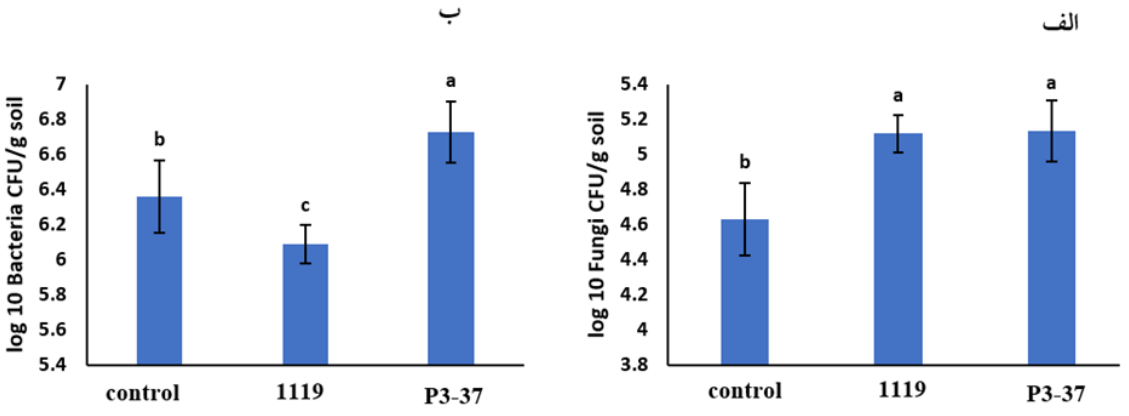
[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.2.3.2]

Archive of SID

مطالعات اخیر توانایی رقابت باکتری‌های اندوفایت با بیمارگرهای اندوفایت را نشان می‌دهد. برخی از این مطالعات نقش این باکتری‌ها را در تحریک بیان ژن‌های مقاومت/ تحمل تنش زنده و غیر زنده نشان می‌دهد که نشانگر این است که باید اکتینوباکترهای اندوفیت مانند باکتری ۱۱۱۹ به‌عنوان عوامل بسیار امیدوارکننده برای کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی در نظر گرفته شوند.

بررسی تغییرات در جمعیت خاک

چهار روز پس از انکوباسیون پلیت‌ها، تعداد میکروارگانیسم‌های رشد کرده بر روی محیط PDA و TSA شمارش شد. بر اساس تجزیه واریانس داده‌ها (شکل ۵) سویه ۱۱۱۹ بر روی میزان جمعیت بومی میکروارگانیسم‌های قابل کشت موجود در خاک ریزوسفری تاثیر گذاشت به‌طوری‌که اختلاف آن با کنترل در سطح ۵٪ معنادار بود. به صورتی‌که این باکتری جمعیت قارچ‌های قابل کشت موجود در خاک را افزایش و تعداد باکتری‌ها قابل کشت را کاهش داد. تیمار با باکتری P3-57 نیز موجب افزایش جمعیت کلنی‌های رشد کرده بر روی محیط PDA و TSA شد.



شکل ۵- تاثیر سویه‌های P3-37 و ۱۱۱۹ بر جمعیت الف) قارچ‌ها و ب) باکتری‌های قابل کشت موجود در خاک ریزوسفری خیار. مقادیر مشخص شده با حروف متفاوت در سطح $P<0.05$ با کنترل متفاوت است.

به‌تازگی گزارش شده است که استفاده از *Streptomyces* کنترل‌کنندهٔ زیستی بیماری موجب افزایش رشد گیاه گندم و تعدیل میکروبیوم ریشه با کاهش جمعیت جنس *Paenibacillus* و افزایش سایر باکتری‌هایی مفید می‌شود (Araujo et al. 2019). نکته جالب توجه این است که

www.SID.ir

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2022-04-30]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.2.3.2]

Archive of SID

پژوهشگران در سال ۲۰۱۹ کنسرسیومی از سه سویه محرک رشد گیاهی (*Bacillus cereus*، *B. subtilis* و *Serratia* sp) را برای سرکوب بیماری پوسیدگی فیتوفتورایی (phytophthora blight) استفاده کردند که منجر به ارتباط منفی بین شیوع بیماری و فراوانی نسبی برخی از باکتری‌های موجود در خاک شد (Zhang et al. 2019). مطالعات قبلی با استفاده از عوامل کنترل زیستی نشان داد که پویایی جمعیت باکتری‌های خاک نقش مهمی در سرکوب بیماری‌های ناشی از قارچ‌های خاک دارد (Wang et al. 2017; Yuan et al. 2017).

دلیل بررسی تاثیر دو سویه ۱۱۱۹ و P3-57 بر جمعیت میکروارگانیسم‌های قابل کشت خاک نگرانی در مورد تغییر فلور میکروبی خاک (کاهش جمعیت میکروبی خاک) و ممانعت از ایجاد خسارت احتمالی به واسطه ورود میکروارگانیسم‌های محرک رشد به خاک بود. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه به نظر می‌رسد مطالعات عمیق‌تر در مورد این موضوع به‌خصوص با استفاده از ابزارها و تکنیک‌های مولکولی مانند متاژنومیکس ضرورت دارد (Abbasi et al. 2021a).

اینگونه مطالعات باید به‌صورت پویا و در طی مدت زمان طولانی بررسی و در طی آن خصوصیات خاک از نظر مواد آلی و حاصلخیزی مورد توجه قرار گیرد. اگرچه بعید است که استفاده از باکتری‌های محرک رشد موجب افزایش عوامل بیمارگر شوند اما این نیز موضوعی است که باید به آن توجه شود.

به‌طور خلاصه، بر اساس نتایج به دست آمده از این پژوهش، باکتری‌های محرک رشد مورد مطالعه موجب افزایش تولید و یا کیفیت محصول در گلخانه تجاری خیار شدند و عطر و طعم میوه را بهبود بخشیدند. استفاده از این باکتری‌ها در صنعت تولید کودهای زیستی و باکتری‌های محرک رشد گیاهی با استفاده از زیست‌فناوری (فرآیند تخمیر صنعتی یا فرمانتاسیون) می‌تواند کمک شایانی به محافظت از محیط زیست و دستیابی به کشاورزی پایدار در سال‌های آتی کند.

www.SID.ir

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2022-04-30]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.2.3.2]

Archive of SID

References فهرست منابع

Abbasi S, Safaie N, Sadeghi A. 2021a. Next generation sequencing and its application in the study of microbiome in plant diseases suppressive soils. Journal of Biosafety. 14(1): 1-12. (In Farsi with English abstract).

Abbasi S, Spor A, Sadeghi A, Safaie N. 2021b. *Streptomyces* strains modulate dynamics of soil bacterial communities and their efficacy in disease suppression caused by *Phytophthora capsici*. Scientific Reports. 11(1): 1-14. (In Farsi with English abstract).

Alipour Kafi S, Arabhosseini S, Karimi E, Koobaz P, Mohammadi A, Sadeghi A. 2021a. *Pseudomonas putida* P3-57 induces cucumber (*Cucumis sativus* L.) defense responses and improves fruit quality characteristics under commercial greenhouse conditions. Scientia Horticulturae. 280: 109942.

Alipour Kafi S, Karimi E, Akhlaghi M, Amini Z, Mohammadi A, Sadeghi A. 2021b. Isolation and identification of *Amycolatopsis* sp. strain 1119 with potential to improve cucumber fruit yield and induce plant defense responses in commercial greenhouse. Plant and Soil (in press).

Araujo R, Dunlap C, Barnett S, Franco CMM. 2019. Decoding wheat endosphere–rhizosphere microbiomes in *Rhizoctonia solani*–infested soils challenged by *Streptomyces* biocontrol agents. Frontiers in Plant Science, 10(1038).

Bonaldi M, Chen X, Kunova A, Pizzatti C, Saracchi M, Cortesi P. 2015. Colonization of lettuce rhizosphere and roots by tagged *Streptomyces*. Front Microbiol. 6: 25.

Boutard-Hunt C, Smart CD, Thaler J, Nault BA. 2009. Impact of plant growth-promoting rhizobacteria and natural enemies on *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) infestations in pepper. Journal of Economic Entomology. 102(6): 2183-2191.

Buddrus-Schiemann K, Schmid M, Schreiner K, Welzl G, Hartmann AJ. 2010. Root colonization by *Pseudomonas* sp. DSMZ 13134 and impact on the indigenous rhizosphere bacterial community of barley. Microb Ecol. 60(2): 381-393.

Burd GI, Dixon DG, Glick BR. 2000. Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. Canadian Journal of Microbiology. 46(3): 237-245.

Chin-A-Woeng TFC, de Priester W, van der Bij AJ, Lugtenberg BJJ. 1997. Description of the colonization of a gnotobiotic tomato rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain WCS365, using scanning electron microscopy. APS Journal. 10(1): 79-86.

Gopalakrishnan S, Sathya A, Vijayabharathi R, Varshney RK, Gowda CL, Krishnamurthy L. 2015. Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. 3 Biotech. 5(4): 355-377.

Himaman W, Thamchaipenet A, Pathom-aree W, Duangmal K. 2016. *Actinomycetes* from Eucalyptus and their biological activities for controlling Eucalyptus leaf and shoot blight. Microbiological Research. 188: 42-52.

Hofman J, Bezchlebová J, Dušek L, Doležal Lk, Holoubek I, Anděl P, Ansorgová A, Malý S. 2003. Novel approach to monitoring of the soil biological quality. Environment International. 28(8): 771-778.

Kämpfer P, Kroppenstedt RM, Dott W. 1991. A numerical classification of the genera *Streptomyces* and *Streptoverticillium* using miniaturized physiological tests. Microbiology. 137(8): 1831-1891.

Kaur K, Goyal S, Kapoor KK. 2008. Impact of organic fertilizers with and without chemical fertilizers on soil chemical properties and the establishment of nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere. Microbes and Environments. 23(4): 313-316.

Lugtenberg BJ, Dekkers L, Bloemberg GV. 2001. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. Annu Rev Phytopathol. 39(1): 461-490.

Motamedi E, Nasiri J, Malidarreh TR, Kalantari S, Naghavi MR, Safari M. 2018. Performance of carnauba wax-nanoclay emulsion coatings on postharvest quality of 'Valencia'orange fruit. Scientia Horticulturae. 240: 170-178.

Murad H, Nyc M. 2016. Evaluating the potential benefits of cucumbers for improved health and skin care. Journal of Aging Research and Clinical Practice: 5(3). 139-141.

Nawrocka J, Małolepsza U, Szymczak K, Szczech MJP. 2018. Involvement of metabolic components, volatile compounds, PR proteins, and mechanical strengthening in multilayer protection of cucumber plants against *Rhizoctonia solani* activated by *Trichoderma atroviride* TRS25. Protoplasma. 255(1): 359-373.

www.SID.ir

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2022-04-30]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.2.3.2]

Archive of SID

Reche J, Hernández F, Almansa M, Carbonell-Barrachina Á, Legua P, Amorós A. 2019. Effects of organic and conventional farming on the physicochemical and functional properties of jujube fruit. LWT. 99: 438-444.

Vurukonda SSKP, Giovanardi D, Stefani E. 2018. Plant growth promoting and biocontrol activity of *Streptomyces* spp. as endophytes. Int J Mol Sci. 19(4): 952.

Wang R, Zhang H, Sun L, Qi G, Chen S, Zhao X. 2017. Microbial community composition is related to soil biological and chemical properties and bacterial wilt outbreak. Scientific Reports. 7(1): 1-10.

Yuan J, Sha Zm, Hassani D, Zhao Z, Cao Lk. 2017. Assessing environmental impacts of organic and inorganic fertilizer on daily and seasonal greenhouse gases effluxes in rice field. Atmospheric Environment. 155: 119-128.

Zare R, Dezfulian M, Amini Z, Karimi E, Sadeghi A, Rahmati R. 2019. Isolation and molecular identification of isolates of plant growth promoting *Pseudomonas* and *Bacillus*. Crop Biotechnology. 8(24): 95-109.

Zhang LN, Wang DC, Hu Q, Dai XQ, Xie YS, Li Q, Liu HM, Guo JH. 2019. Consortium of plant growth-promoting *rhizobacteria* strains suppresses sweet pepper disease by altering the rhizosphere microbiota. Frontiers in Microbiology. 10: 1668.

Evaluation of *Amycolatopsis* sp. strain 1119 and *Pseudomonas* sp. strain P3-57 in the Commercial Greenhouse of Cucumber, and the Study of Their Establishment and Their Effect on Soil Microbial Population

Sahar Alipour Kafi [1], Ali Mohammadi [1*], Ebrahim Karimi [2]

1- Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran.
2- Department of Microbial Biotechnology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

a.mohammadi@alzahra.ac.ir

Abstract

Green cucumber named *Cucumis sativus* is one of the most important vegetables. Currently, it has the highest level of cultivation in greenhouses in the country. To increase yields, greenhouse managers use chemical fertilizers at different stages of plant development, which upset the balance of the environment and the soil microbiome. Using growth-promoting bacteria, in addition to maintaining the balance of soil microorganisms, can improve crop quality. In this study, the effects of two bacterial strains of *Amycolatopsis* sp. strain 1119 and *Pseudomonas* sp. strain P3-57 on soil microbial population, production rate, and crop quality in commercial cucumber greenhouse were investigated. The use of P3-57 and 1119 strains increased the yield by 4% and 23%, respectively. Qualitative evaluation of the product revealed that both bacteria had a favorable effect on the overall acceptance of the product. Examination of the growth-promoting colonization bacteria showed that strain 1119 is an endophytic bacteria and strain P3-57 colonized on the root. The 1119 strain increased the number of cultivable fungi in the rhizosphere and decreased the number of bacteria. Treatment with strain P3-57 increased the population of both groups of microorganisms. Using these bacteria in the industry can significantly help protect the environment in the future.

Keywords: *Amycolatopsis*, Endophytic Bacteria, Plant-Growth-Promoting Bacteria, Colonization, Commercial Greenhouse.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2022-04-30]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.2.3.2]

www.SID.ir