فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال سوم، شماره ۱۱، پاییز ۱۳۹۳، صفحه ۳۷- ۴۶
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۳/۰۵ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۹/۱۹

بررسی فعالیت ACC دآمیناز در ریزوباکتری‌های جدا شده از خاک‌های مناطق شمال کشور

زینب سادات متشرعی*: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، هیات علمی جهاد دانشگاهی سازمان، تهران، ایران، zmotesharrei@yahoo.com
هاجر محمودی: کارشناس میکروبیولوژی، دانشگاه تهران، ایران، mahmoodihajar@yahoo.com
پرویز اولیاء: استاد میکروبیولوژی، دانشگاه شاهد، ایران، owlia@yahoo.com
حسن سلیمی: دکترای تخصصی ژنتیک، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران، hasan_salimi@yahoo.com

چکیده

مقدمه: باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه که حاوی آنزیم (۱- آمینو سیکلوپروپان -۱- کربوکسیلیک اسید) دآمیناز هستند، می‌توانند برای بهبود رشد گیاهان به‌ویژه تحت شرایط تنش محیطی کاربرد داشته باشند. این تحقیق با هدف بررسی توان سویه‌های بومی در تولید آنزیم ACCدآمیناز انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: از ۸ نمونه خاک ریزوسفری و غیرریزوسفری، کشت به روش تهیه رقت‌های متوالی در محیط‌های اختصاصی تهیه شد. به منظور آزمون نیمه کمی توان تولید ACCدآمیناز در جدایه‌های به‌دست آمده، قطر کلونی‌ها در پلیت به روش لکه‌گذاری پس از مایه‌کوبی و گرماگذاری در روزهای ۱، ۲ و ۵ ارزیابی شد. توانایی تولید آنزیم ACCدآمیناز در سویه‌های منتخب، با استفاده از تراکم نوری رشد در طول موج ۵۰۴ نانومتر در محیط‌های مناسب ارزیابی شد. میزان فعالیت آنزیمACC دآمیناز با تعیین غلظت آلفا کتوبوتیرات آزاد شده برای سویه‌های منتخب انجام گرفت. آزمون‌های بیوشیمیایی و میکروبیولوژیک برای شناسایی تمامی سویه‌های منتخب انجام شد. در نهایت، شناسایی سویه منتخب که دارای بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم بود، با تکثیر و تعیین توالی ژن *16S rRNA* انجام گرفت.

نتایج: تعداد ۴۴۵ جدایه، خالص شد و با آزمون نیمه کمی توان تولید ACCدآمیناز، تعداد ۱۷سویه انتخاب شد. بر اساس توانایی جدایه‌ها در تولید آنزیم، ۹ سویه انتخاب شد و نتایج شناسایی مقدماتی نشان داد که سویه‌های منتخب به جنس‌های *Pseudomonas*، *Bacillus* و گروه *Actinomycetes* متعلق هستند. بررسی میزان فعالیت آنزیم نشان داد که سویه Kot_{12} با بیش‌ترین مقدار فعالیت آنزیم به میزان ۸۲۶/۴۳۶۹ نانومول آلفا کتوبوتیرات/میلی‌گرم پروتئین/ ساعت، در گروه *سودوموناس* های فلورسنت و به گونه *Pseudomonas brassicacearum* متعلق هستند.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به فعالیت در خور توجه آنزیم ACCدآمیناز در این سویه بومی به‌دست آمده (۸۲۶/۴۳۶۹ نانومول آلفا کتوبوتیرات/میلی‌گرم پروتئین/ ساعت) در مقایسه با سویه‌های مشابه، می‌توان با بهینه‌سازی شرایط تولید آنزیم و تهیه فرمولاسیون مایه تلقیح بر پایه باکتری محرک رشد گیاه به منظور استفاده در مزرعه بهره گرفت.

واژه‌های کلیدی: ۱- آمینو سیکلوپروپان -۱- کربوکسیلیک اسید دآمیناز، ۱- آمینو سیکلوپروپان -۱- کربوکسیلیک اسید، سویه‌های منتخب

* نویسنده مسؤول مکاتبات

مقدمه

ریزوباکترهـای محـرک رشـد گیـاه بخـش اصـلی میکروارگانیسـم‌هـای ریزوسـفر را تشـکیل مـی‌دهنـد. از مهم‌ترین مکانیسم‌هایی که باعث افزایش رشد و نمو گیـاه می‌شوند، تولید و ترشح تنظیم کننـده‌هـای رشـد گیـاهی[1] است (۱). امروزه پژوهشگران تنظیم باکتریایی تولید اتـیلن در گیاهچه‌های جوان را بهترین مکانیسم ریزوباکتری‌هـای محرک رشد گیاه در افزایش رشد گیاهان دانسـته‌انـد (۲). در کشاورزی کنترل سطح اتیلن در گیاه از اهمیت زیـادی برخوردار است. کنترل سطح اتـیلن در گیاهـان زراعـی بـه ویژه در مواقعی که گیاه در معـرض تـنش قـرار مـی‌گیـرد می‌تواند از خسارت اقتصادی ناشی از افزایش غلظت اتیلن که باعث کاهش رشد و عملکرد گیاه می‌شود، جلوگیری کنـد. سـازوکارهای متـداول در کنتـرل سـطح اتـیلن در گیاهان شامل این مـوارد اسـت: اسـتفاده از بازدارنـده‌هـای شیمیایی بیوسنتز و فعالیت اتیلن، تهیه ارقام موتانت گیـاهی که به سطح بالای اتـیلن حساسـیت کمتـری داشـته باشـند، تهیه گیاهان تراریخته‌ای که در شرایط تنش، اتیلن کمتری تولیـد کننـد و بـه‌تـازگی اسـتفاده از برخـی بـاکتری‌هـای محرک رشد گیاه کـه قادرنـد سـطح اتـیلن درون گیـاه را کاهش دهند. با وجود این، استفاده از باکتری‌های محرک رشد گیاه، روشی است که بیشتر مـورد پسـند قـرار گرفتـه اسـت (۳). در گیاهـان عـالی، پـیش مـاده اتـیلن، ترکیـب ACC[2] است. آنزیم ACCدآمیناز توسط تعـداد زیـادی از بـاکتری‌هـای محـرک رشـد گیـاه و برخـی از مخمرهـا و قارچ‌ها تولید می‌شود (۴). آنزیم (۱- آمینـو سـیکلوپروپان -۱- کربوکسیلیک اسید) دآمیناز مانع تبـدیل مـاده ACC به اتیلن شده و از اثرات بازدارنده رشد اتیلن تنشـی کـه در پاسخ بـه تـنش‌هـای محیطـی در گیـاه تولیـد مـی‌شـود، جلـوگیری مـی‌نمایـد. آنـزیم ACC دآمینـاز بـه ایـن میکروارگانیسم‌ها امکان مـی‌دهـد کـه از ACC بـه عنـوان تنها منبع نیتروژن استفاده کند (۴).

مواد و روش‌ها

از نواحی ریزوسفری و غیرریزوسفری گیاهان مناطق کومله، اطاقور، پرشکوه و لیلی‌کوه در شمال کشور (با عرض و طول جغرافیایی به ترتیب N " ۱۰/۸۸ '۱۰°۳۷ و E "۵۴/۶۲ '۱۰°۵۰ - N " ۳۴/۰۰ '۶°۳۷ و E "۵۱/۰۰ '۶°۵۰ - N " ۳۹/۲۱'۸°۳۷ و E "۹/۹۰ '۱۰°۵۰ - N " ۲۰/۳۰ '۱۱°۳۷ و E "۴۷/۱۰ '۸°۵۰)، تعداد ۸ نمونه خاک از عمق ۲۰ تا ۴۰ سانتی‌متری جمع‌آوری شد. نمونه‌برداری از ریزوسفر گیاهان شاداب و سالم و از درختانی که رشد و نمو بهتری داشتند انجام شد. کشت از نمونه‌های خاک به روش تهیه رقت‌های متوالی و پخش بر ۳ نوع محیط کشت جامد DF (۵)، YM(۶) وKing B (۷) به‌وسیله میله سرکجِ استریل انجام شد. ترکیب اجزای محیط‌های کشت در جدول ۱ آمده است. به سطح محیط‌های کشت بلافاصله قبل از تلقیح باکتری، ۱۵۰ میکرولیتر از محلول آمونیوم سولفات ۰/۳ مولار اضافه شد. تمامی پلیت‌ها به مدت یک هفته در دمای۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و روزانه رشد کلونی بر روی محیط‌های کشت بررسی و در نهایت کشت خالص به‌دست آمد.

آزمون نیمه کمی توان تولید آنزیم ACCدآمیناز

به منظور آزمون نیمه کمی توان تولید ACCدآمینـاز در سویه‌های به‌دسـت آمـده، آزمـون لکـه‌گـذاری در ۳ حالت کنترل منفـی (فاقـد منبـع نیتـروژن)، کنتـرل مثبـت (دارای منبـع نیتـروژن کلریـد آمونیـوم) و نمونـه مـورد بررسـی (دارای منبـع نیتـروژن ACC) مشـابه بـا روش خسـروی و همکـاران[3] (۸) انجـام گرفـت. بـدین‌منظـور، کشت تازه از سویه‌های مـورد نظـر بـر روی محیـط‌هـای جامد DF، YM و King B تهیه شد و محیط‌های کشـت مزبور به گونه‌ای که منابع نیتروژن در آن‌ها حـذف شـده بود، نیز در ۳ سری آماده شـد؛ در سـری اول بـه سـطوح

محیط کشت بلافاصله قبل از تلقیح باکتری، ۱۵۰ میکرولیتر از محلول ۰/۱۵ مولار ACC اضافه شد (محلول ACC کمی قبل از شروع از فریزر خارج و پس از ذوب شدن با یک میله شیشه‌ای سرکج استریل روی سطح پلیت پخش و در مدت کوتاهی خشک شد). در سری دوم به سطح محیط کشت ۱۵۰ میکرولیتر کلریدآمونیوم ۰/۱۵ مولار اضافه شد (به عنوان شاهد مثبت) و در سری سوم هیچ منبع نیتروژنی به سطح محیط کشت اضافه نشد (به عنوان شاهد منفی). برای حذف منبع نیتروژن احتمالی موجود در آگار به‌کار رفته در محیط‌های کشت، آگار مرک[۴] طبق روش ریان[۵] (۹) شستشو شد. از کشت تازه جدایه‌ها سوسپانسیونی معادل یک مک فارلند در سرم فیزیولوژی برای تلقیح تهیه شد. از هر سوسپانسیون میزان ۲ میکرولیتر در خانه‌های مربوطه لکه‌گذاری شد. مایع‌تلقیح هر ۳ سری پلیت با جدایه‌ها در یک زمان واحد انجام شد و پلیت‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد برای یک هفته گرماگذاری شدند.

جدول ۱- الف) ترکیب محیط کشت DF ب) محیط کشت YM ج) محیط کشت King B د) محیط کشت M9 در ۱ لیتر آب مقطر

الف	KH_2PO_4	۴ گرم
	Na_2HPO_4	۶ گرم
	$MgSO_4$ _ $7H_2O$	۰/۲ گرم
	Glucose	۲ گرم
	$FeSO_4$ _ $7H_2O$	۱ میلی گرم
	H_3BO_3	۱۰ ماکروگرم
	$MnSO_4$ _H_2O	۱۱/۱۹ ماکروگرم
	$ZnSO_4$ _ $7H_2O$	۱۲۴/۶ ماکروگرم
	gluconic acid	۲ گرم
	citric acid	۲ گرم
	$CuSO_4$ _ $5H_2O$	۷۸/۲۲ ماکروگرم
	MoO_3	۱۰ ماکروگرم

ب	$KHPO_4$_$3H_2O$	۰/۶۵ گرم
	NaCl	۰/۱ گرم
	$MgSO_4$ _ $7H_2O$	۰/۲ گرم
	Yeast Extract	۰/۵ گرم
	Mannitol	۱۰ گرم
	Congo Red 1%	۲/۵ میلی‌لیتر

ج	Proteose Peptone	۲۰ گرم
	$MgSO_4$ _ $7H_2O$	۱/۵ گرم
	K_2HPO_4	۱/۵ گرم
	Glycerol	۱۰ میلی‌لیتر

د	KH_2PO_4	۶ گرم
	Na_2HPO_4	۳ گرم
	NaCl	۱/۵ گرم

عناصر زیر نیز به طور جداگانه استریل و به ترکیبات یاد شده محیط کشت M_9 در حجم نهایی یک لیتر افزوده شدند.

$MgSO_4 \times 7H_2O$	۴۹۳میلی گرم
$CaCl_2 \times 2H_2O$	۱/۴۷میلی گرم
Glucose	۲ گرم
Thamine HCl	۳۳۷ میلی گرم

تعیین توانایی سویه‌ها در استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن

توانایی تولید آنزیم ACCدآمیناز با استفاده از روش تغییر یافته پنروز و گلیک[۶] ارزیابی شد (۱۰). برای این منظور یک لوپ از هر جدایه به ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت براث در لوله‌های ۵۰ میلی‌لیتری تلقیح شد و پس از ۲۴ ساعت از رشد باکتری در۲۸ درجه سانتی‌گراد، میزان ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر جدایه به ۳۰ میلی‌لیتر محیط نوترینت براث تازه اضافه شد و ۲۴ ساعت در ۲۸ درجه سانتی‌گراد تکان داده شد. سپس، ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر سویه به هر یک

از لوله‌های ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰ میلی لیتر از محیط حداقل M_9، محیط حداقل M_9 حاوی ۰/۱۵ مولار ACC و محیط حداقل M_9 حاوی ۲ گرم در لیتر آمونیوم کلرید تلقیح و به مدت ۴۸ ساعت روی شیکر با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و دور ۸۰ rpm تکان داده شد. دانسیته نوری این محیط‌ها در طول موج ۵۰۴ نانومتر به‌وسیله اسپکتروفتومتر به عنوان معیاری از رشد باکتری در آن محیط در روزهای اول، دوم و پنجم اندازه‌گیری شد.

سنجش آنزیم (۱- آمینو سیکلوپروپان -۱- کربوکسیلیک اسید) دآمیناز[7] در سویه‌های منتخب

میزان فعالیت آنزیم ACCدآمیناز با تعیین غلظت آلفا کتوبوتیرات آزاد شده و بر طبق روش تغییر یافته پنروز (۱۰) انجام گرفت. در این روش، از محیط کشت مایع BHI به عنوان محیط پیش کشت استفاده شد. برای این منظور، ابتدا از باکتری‌ها، کشت تازه در محیط جامد BHI تهیه شد. سوسپانسیون سلولی از کشت جامد سویه‌ها با غلظت معادل ۱ مک فارلند آماده و به میزان ۱۰۰ ماکرولیتر به ۱۰ میلی لیتر محیط کشت مایع BHI تلقیح و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. با بررسی میزان جذب نوری محیط کشت سویه‌ها، زمان مناسب برای رسیدن سویه‌ها به فاز سکون رشد ارزیابی شد. در این مقطع زمانی سلول‌ها طی ۱ مرحله سانتریفوژ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۶۰۰۰ rpm جمع‌آوری و محلول رویی دور ریخته شد. برای القای آنزیم، سلول‌های باقیمانده پس از شستشو با محیط کشت حداقل M_9، در ۷/۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع M_9 حاوی ۴۰ میکرولیتر از محلول ۰/۵ مولار معلق و برای ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۲۰ rpm قرار گرفت. ۵۰ ماکرولیتر از سوپ رویی سلول‌های لیز شده با تولوئن ۵ درصد (حجمی/ حجمی) برداشته شد و پس از افزودن ۵ ماکرولیتر ACC ۰/۵ مولار، ورتکس و برای ۳۰ دقیقه در ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. از نمونه حاوی ۵۰ ماکرولیتر سوپ باکتریایی به همراه ۵ ماکرولیتر آب مقطر و نیز نمونه حاوی ۵۰ ماکرولیتر بافر تریس-کلریدریک اسید[8] ۰/۱ مولار (اسیدیته ۸/۵) و ۵ ماکرولیتر محلول ACC ۰/۵ مولار به ترتیب به عنوان کنترل منفی و بلانک استفاده شد. سپس، ۵۰۰ ماکرولیتر کلریدریک اسید ۰/۵۶ نرمال به هر لوله اضافه شد. پس از آن محلول نهایی درون هر لوله با استفاده از ورتکس مخلوط و برای حذف بقایای سلولی، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۸۰۰۰ rpm در دمای اطاق سانتریفوژ شد. سپس، ۵۰۰ ماکرولیتر از محلول رویی هر لوله میکروسانتریفوژ برداشته و با ۴۰۰ ماکرولیتر کلریدریک اسید ۰/۵۶ نرمال درون یک لوله آزمایش کوچک ورتکس شد. ۱۵۰ ماکرولیتر از محلول ۲-۴ دی نیتروفنیل هیدرازین[9] (محلول ۰/۲ درصد در کلریدریک اسید ۲ نرمال: ۰/۰۲ گرم ۲-۴ دی نیتروفنیل هیدرازین در ۹/۶۱ میلی‌لیتر استون حل و ۳۳۰ ماکرولیتر کلریدریک اسید ۲ نرمال به آن اضافه شد) به هر لوله افزوده و ورتکس شد. محتویات ۳۰ دقیقه در ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس، به محلول فوق ۱ میلی‌لیتر سدیم هیدروکسید ۲ نرمال اضافه و مخلوط شد تا یکنواخت شود. مقدار جذب نور در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت شد. مقادیر جذب کنترل منفی و بلانک برای هر سویه از جذب نمونه، کسر شد و مقدار به‌دست آمده برای سنجش فعالیت آنزیم، به کار رفت.

شناسایی سویه‌های منتخب

شناسایی سیستماتیک سویه‌ها طی ۲ سری از آزمایش‌ها انجام شد. در سری نخست، آزمون‌های بیوشیمیایی و میکروبیولوژیک برای شناسایی تمامی سویه‌های منتخب طبق روش پیشنهادی *برگی*[10] (۶)، انجام شد. در نهایت، شناسایی سویه منتخب که دارای بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم ACCدآمیناز بود، با تکثیر و تعیین توالی ژن *16S rRNA* انجام گرفت. برای این منظور، استخراج DNA باکتری به کمک مواد لیز کننده سلولی انجام گرفت و در ادامه با روش فنل/ کلروفرم/ ایزوآمیل الکل خالص شد. در این تحقیق، برای تکثیر ژن *16S rRNA* سویه منتخب از آغازگر رفت:

P1 (F27) ۵´AGAGTTTGATCCTGGCTTAG۳´

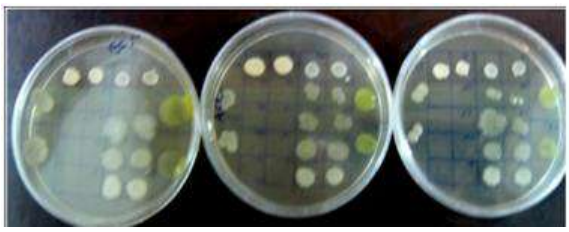
و آغازگر برگشت:

P2 (R1492) ۵´TAAGGAGGTGATCCAGC۳´

استفاده شد و ژن *16S rRNA* تکثیر یافته به کمک واکنش زنجیره ای پلیمراز[11] که برای تعیین توالی مناسب بود (تراکم مناسب، بدون اسمیر و باند اضافه) به شرکت ماکروژن[12] برای تعیین توالی با استفاده از دستگاه (ABI 3730 XL DNA sequencer) ارسال شد.

نتایج

در مجموع، تعداد ۴۴۵ جدایه از نمونه‌های خاک به‌دست آمد که این فراوانی بالا را می‌توان با اکوسیستم غنی و پیچیده خاک مرتبط دانست. از این تعداد ۲۴۲ جدایه، در محیط کشت YM، ۱۷۰ جدایه در محیط **در** جدایه در محیط کشت YM، ۱۷۰ جدایه در محیط کشت King B و ۳۳ جدایه در محیط کشت DF رشد یافتند. مشاهدات حاصل از بررسی لام میکروسکوپی تمامی سویه‌ها نشان داد که باکتری‌ها با ریخت‌شناسی میله‌ای کوتاه فراوان‌ترین گروه را در میان اشکالِ میله‌ای بلند، میله‌ای کوتاه، کوکوباسیل و کوکوس شامل می‌شوند.



شکل ۱- آزمون نیمه کمی توان تولید آنزیم ACC دآمیناز به روش لکه‌گذاری

بر اساس شکل میکروسکوپی و ظاهر کلونی باکتریایی، تعداد ۱۵۹ جدایه از ۳ محیط کشت (۳۳ جدایه از محیط DF، ۷۳ جدایه از محیط YM و ۵۳ جدایه از محیط King B) برای آزمون نیمه کمی توان تولید آنزیم ACCدآمیناز انتخاب شدند (شکل ۱).

نتایج بررسی نیمه کمی توان تولید آنزیم در سویه‌های مورد آزمایش نشان داد، تعداد ۵۵ سویه رشد ناچیزی (کمتر از ۲میلی‌متر) در محیط کشت دارای منبع نیتروژن ACC و نیز کنترل منفی داشته و به عنوان سویه‌های ناتوان در تولید آنزیم در نظر گرفته شدند.

با توجه به میزان رشد باکتری و قطر کلونی حاصل در مقایسه با شاهد منفی، تعداد ۱۷ سویه توانمند در تولید آنزیم ACCدآمیناز انتخاب شد.

در بررسی توان تولید آنزیم ACCدآمیناز، میزان رشد سویه‌های مورد نظر در ۳ نوع محیط کشت M_9 بدون هیچ منبع نیتروژن به عنوان کنترل منفی، M_9 حاوی ۰/۱۵ مولار منبع نیتروژن ACC و M_9 حاوی ۲ گرم در لیتر منبع نیتروژن کلرید آمونیوم در روزهای اول، دوم و پنجم به شکل $OD_{۵۰۴}$ نانومتر در جدول ۲ آمده است.

جدول ۲- بررسی توان تولید آنزیم ACC دآمیناز به شکل میزان رشد سویه‌های مورد نظر در ۳ نوع محیط کشت در طول موج نانومتر۵۰۴

روز / سویه	منبع نیتروژن								
	NH_4			Control Negative			ACC		
	اول	دوم	پنجم	اول	دوم	پنجم	اول	دوم	پنجم
Kot_{12}	۰/۴	۰/۷۶	۱/۱۹	۰/۲۱	۰/۴۲	۰/۶۳	۰/۶۷	۱/۲۸	۱/۷۳
Ko_{7}	۰/۴	۰/۵۳	۰/۶	۰/۱۶	۰/۲۳	۰/۲۵	۰/۱۷	۰/۲۸	۰/۳۶
DF_{25}	۰/۲۱	۰/۷۲	۰/۹۶	۰/۴۱	۰/۱۶	۰/۱۸	۰/۳۸	۰/۹۸	۱/۴۵
Kot_{7}	۰/۱۳	۰/۵۵	۰/۸۸	۰/۱۲	۰/۲۷	۰/۴۵	۰/۴۱	۰/۹۹	۱/۳۰
Yo_{10}	۰/۲	۰/۳۹	۰/۶	۰/۰۸	۰/۲۶	۰/۴۰	۰/۰۴	۰/۲۰	۰/۲۸
Kp_{28}	۰/۱۹	۰/۴۱	۰/۵۳	۰/۰۱	۰/۱۴	۰/۲۳	۰/۱۴	۰/۲۴	۰/۳۰
DF_{528}	۰/۰۳۸	۰/۱۲	۰/۱۷	۰/۰۷	۰/۱۰	۰/۱۲	۰/۱۱	۰/۱۷	۰/۲۰
DF_{2}	۰/۰۰۱	۰/۰۱۱	۰/۸۱	۰/۰۱	۰/۰۳۷	۰/۲۲	۰/۰۰۱	۰/۰۱۴	۰/۲۳
Kot_{39}	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۴	۰/۸	۰/۶	۰/۹	۰/۰۸	۰/۰۷	۰/۱۰
Kp_{22}	۰/۰۰۱	۰/۰۱۴	۰/۰۲۳	۰/۰۰۱	۰/۰۴۶	۰/۰۶	۰/۰۲	۰/۰۴	۰/۰۸
Yot_{18}	۰/۰۰۱	۰/۰۰۶	۰/۲۳	۰/۰۱۸	۰/۰۱۵	۰/۱۱	۰/۰۱۱	۰/۰۱۳	۰/۰۸
Kot_{10}	۰/۲۳۵	۰/۵۱۶	۰/۶۸۴	۰/۱۶۹	۰/۲۶۱	۰/۲۵۲	۰/۵۲۳	۱/۲۳۷	۱/۳۲۴
Kot_{42}	۰/۳۱	۰/۴۵	۰/۷۹	۰/۱۲	۰/۱۹	۰/۳۵	۰/۶۳	۱/۳۱	۱/۴۴
Yl_{4}	۰/۰۳	۰/۰۸۴	۰/۰۲۲	۰/۰۰۵	۰/۰۳۱	۰/۰۴	۰/۰۳۴	۰/۰۲۹	۰/۰۶۹
Yp_{23}	۰/۰۳	۰/۰۸	۰/۳	۰/۰۹	۰/۱۲	۰/۴	۰/۰۱	۰/۰۲	۰/۰۹
Ypn_{17}	۰/۱	۰/۰۹	۰/۲	۰/۰۰۵	۰/۰۲	۰/۰۹	۰/۰۰۴	۰/۰۰۷	۰/۱۷
Yp_{7}	۰/۲	۰/۱۹	۰/۲۲	۰/۰۷	۰/۰۳	۰/۱	۰/۰۳	۰/۰۳	۰/۱

داده‌های جدول ۲ که حاصل میانگین سه مرتبه تکرار آزمایش است، نشان داد: سویه‌های KOT_{7}، KOT_{42}، KOT_{10}، KOT_{12} و DF_{25} در محیط کشت حاوی ۰/۱۵ مولار ACC، بیشتر از محیط کشت کنترل و نیز محیط حاوی ۲ گرم در لیتر آمونیوم کلرید رشد داشتند. به این معنی که، این سویه‌ها به‌واسطه آنزیم ACCD از منبع نیتروژن ACC استفاده و بهتر از حالات دیگر رشد کردند. همچنین، نتایج این بررسی نشان می‌دهد در سویه‌های DF_{528}، KP_{22} و YL_{4} با وجود رشد کم در حالات مختلف، میزان رشد در محیط حاوی ۰/۱۵ مولار ACC بیشتر است. بنابراین، سویه‌های KOT_{7}، KOT_{10}، KOT_{12}، KOT_{42}، DF_{25}، DF_{528}، KP_{22} و YL_{4} به عنوان سویه‌های منتخب، شناسایی فراتر بیوشیمیایی شدند. سویه‌های اکتینومیستی YPN_{17} و YP_{7} به دلیل دیر رشد بودن در مقایسه با دیگر سویه‌های باکتریایی، نتایج مشخصی نداشتند. بنابراین، سویه اکتینومیستی YPN_{17} به عنوان شاخص از میان ۲ سویه منتخب اکتینومیستی بر مبنای رشد بهتر در پلیت حاوی ACC و توانمند در تولید آنزیم ACCدآمیناز انتخاب شد تا برای سنجش فعالیت آنزیم در مراحل بعدی استفاده شود.

سنجش کمی آنزیم ACCدآمیناز در ۹ سویه منتخب به روش تغییر یافته پنروز با تعیین غلظت آلفا کتوبوتیرات آزاد شده و در مقایسه با منحنی استاندارد غلظت‌های ۰/۱ -۰/۲ تا ۱ میکرو مول آلفاکتوبوتیرات انجام گرفت. یک واحد فعالیت آنزیم به شکل مقدار

نانومول آلفاکتوبوتیرات آزاد شده به ازای ۱ میلی‌گرم پروتئین (آنزیم) در ۶۰ دقیقه تعریف شد. برای ارزیابی مقدار پروتئین سلولی از جذب نوری غلظت‌های مختلف (۰/۱-۱/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) آلبومین سرمی گاو در ۵۹۵ نانومتر به عنوان استاندارد استفاده شد. نتایج این بررسی نشان داد که در میان سویه‌های مورد آزمایش، سویه KOT_{12} دارای بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم (۸۲۶/۴۳۶۹ نانومول آلفا کتو بوتیرات/میلی‌گرم پروتئین/ ساعت) و سویه KOT_{42} دارای کم‌ترین میزان فعالیت (۸/۵۱۹۶۶۸ نانومول آلفا کتو بوتیرات/میلی‌گرم پروتئین/ ساعت) است (جدول ۳).

جدول ۳- میزان فعالیت آنزیم ACCD در سویه‌های منتخب

نام سویه	مقدارجذب آلفاکتوبوتیرات (OD ۵۴۰ نانومتر)	مقدار جذب پروتئین (OD ۵۹۵ نانومتر)	فعالیت آنزیم (نانومول آلفا کتو بوتیرات/میلی‌گرم پروتئین/ ساعت)
Kot_{10}	۰/۰۲۸	۰/۸۳۵	۳۲۰/۹۰۳۷
Kot_{12}	۰/۰۳۹	۰/۷۹۳	۸۲۶/۴۳۶۹
Df_{528}	۰/۰۳۱	۰/۸۵	۳۷۸/۲۴۳۹
Yl_4	۰/۰۲۵	۰/۸۲	۲۵۳/۶۲۰۲
Kot_7	۰/۰۱۸	۰/۸۲۵	۳۰/۸۱۲
Kot_{42}	۰/۰۱۷۸	۱/۱۶۲	۸/۵۱۹۶۶۸
Kp_{22}	۰/۰۱۷۵	۰/۸۳	۱۴/۹۸۵۰۷
Df_{25}	۰/۰۱۹۵	۰/۷۹	۹۵/۸۸۳۵
Ypn_{17}	۰/۰۱۷۴	۰/۸۴	۱۱/۳۶۶۹۱

از آنجا که پنروز و گلیک (۱۰) فعالیت آنزیمی کمتر از ۲۰ نانومول را به عنوان فعالیت کم آنزیم ACCدآمیناز یاد کرده اند، بر اساس نتایج، سویه‌های مورد بررسی از نظر میزان فعالیت آنزیم در ۳ گروه با فعالیت زیاد، متوسط و کم به طور نسبی طبقه‌بندی شدند (جدول ۴).

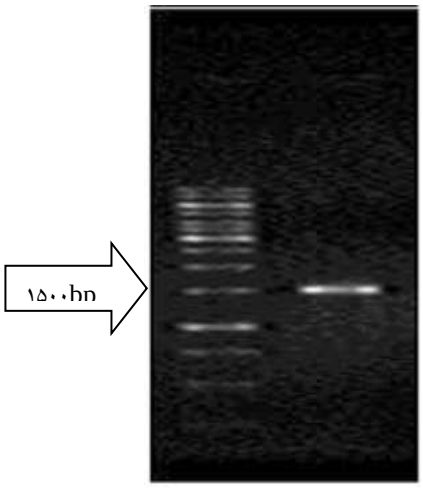
جدول ۳- طبقه بندی نسبی سویه‌های منتخب بر اساس میزان فعالیت آنزیم ACCD

گروه	میزان فعالیت (نانومول آلفا کتو بوتیرات/میلی‌گرم پروتئین/ ساعت)	درجه نسبی فعالیت آنزیمی	سویه
۱	>۱۰۰	زیاد	Y_{14}/ Df_{528}/ Kot_{10}/ Kot_{12}
۲	۲۰-۱۰۰	متوسط	Df_{25}/ Kot_7
۳	<۲۰	کم	Ypn_{17}/ Kp_{22}/ Kot_{42}

آزمایش‌های اولیه شناسایی سویه‌های منتخب نشان داد که باکتری‌های به‌دست آمده به جنس‌های *سودوموناس* (KOT_7، KOT_{10}، KOT_{12}، KOT_{42}، DF_{25})، *باسیلوس* (DF_{528}، KP_{22}، YL_4) و گروه *Actinomycetes* (YPN_{17}) متعلق اند.

از میان سویه‌های منتخب، سویه KOT_{12} که بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم را در مقایسه با دیگر سویه‌های مورد آزمایش نشان داد، شناسایی مولکولی شد. شکل ۲ تصویر ژل تکثیر ژن *16S rRNA* (طول حدود ۱۵۰۰ جفت باز) در سویه *Pseudomonas* KOT_{12} را نشان می‌دهد. نتایج به دست آمده از تعیین توالی سویه منتخب با استفاده از نرم افزار Chromas، DNA baser و Bioedit ویراش شد.

با مقایسه ژن *16S rRNA* به‌دست آمده از سویه منتخب با توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI و بر اساس میزان شباهت ۹۹ درصد، این سویه به جنس *Pseudomonas* متعلق بوده و به گونه *Pseudomonas brassicacearum* نزدیک است.



شکل ۲- سمت چپ مارکر وزن مولکولی 1kb ladder DNA و سمت راست محصول تکثیر ژن *16S rRNA* در سویه منتخب

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به عدم تهیه آسان ACC و همچنین، هزینه زیاد برای خریداری این ماده، آزمون نیمه کمی توان تولید آنزیم ACCدآمیناز با روش یاد شده (محاسبه قطر کلونی) دارای توجیه اقتصادی است. با وجود این‌که روش محاسبه قطر کلونی دقت کم‌تری در تفکیک سویه‌ها از نظر فعالیت آنزیم ACCدآمیناز دارد، در مواقعی که تعداد سویه‌های باکتری زیاد است (همانند پژوهش حاضر) این روش می‌تواند برای غربال‌گری اولیه استفاده شود. در تایید این موضوع پنروز و گلیک (۱۰) محیط کشت حاوی ACC را روش مناسبی برای غربالگری تعداد زیادی از سویه‌های باکتری گزارش دادند. در این پژوهش، پلیت فاقد هر گونه منبع نیتروژنی نیز به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد که اختلاف آن با محیط حاوی ACC دقت کار را بیشتر کرد. شایان ذکر است، در روش پنروز و گلیک به استفاده از کنترل منفی اشاره‌ای نشده است. همچنین، پنروز و گلیک (۲) اشاره داشته‌اند که تقریبا غیرممکن است که بر روی پلیت‌های کشت شده، باکتری فاقد رشدی را پیدا کرد و معمولا هر سویه حداقل رشد بسیار ضعیفی را نشان خواهد داد. این نکته‌ای است که در پژوهش حاضر نیز مشاهده شد. در رابطه با این موضوع که چرا سویه‌ها در محیط کشت می‌توانند رشد حداقلی داشته باشند ولی فاقد توان سنتز ACC باشند، اشاره شده است که این مسأله می‌تواند هنگام تلقیح سویه‌ها همراه سوسپانسیون باکتری، مقدار ناچیزی محیط کشت قبلی به محیط جدید منتقل شود. از دیگر دلایل احتمالی این موضوع می‌توان به کاتابولیسم برخی از متابولیت‌های سلولی توسط سویه‌ها اشاره کرد و شاید بتوان اصطلاح جاروبگرهای نیتروژن[۱۳] را برای این باکتری‌ها به کار برد. این باکتری‌ها از برخی مواد و ترکیبات دارای نیتروژن که سایر باکتری‌ها قادر به رشد در آن‌ها نیستند به عنوان منبع نیتروژن استفاده می‌کنند. در مواردی اشاره شده که برخی از باکتری‌ها قادرند حتی از آمونیاک موجود در اتمسفر نیز استفاده کنند.

گلیک و همکارانش[۱۴] با تقسیم‌بندی میکروارگانیسم‌های خاکزی دارای فعالیت آنزیمیACC دآمینازی به باکتری‌های با سطح فعالیت بالا و پایئن، بیان داشتند که معمولا میکروارگانیسم‌هایی که فعالیت آنزیمی بالایی دارند به‌طور غیر اختصاصی به سطوح بسیاری از گیاهان متصل شده که بیشتر میکروارگانیسم‌های ریزوسفری به شمار می‌آیند (۱۱). از سوی دیگر بنیزری و همکارانش[۱۵] دریافتند که سویه‌های *Pseudomonas fluorescens* بخش مهمی از باکتری‌های ریزوسفری را تشکیل داده و پتانسیل بالایی در کلنیزه کردن ریشه گیاهان دارند (۱۲). بنابراین، مطابق با این یافته‌ها، سویه برتر در این مطالعه، که دارای فعالیت آنزیمی بالایی است، در گروه fluorescent *Pseudomonas* قرار گرفته است.

در خصوص توانایی سویه‌های *Pseudomonas fluorescens* در استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن و به عبارت دیگر تولید آنزیم ACCدآمیناز و تحریک رشد گیاه، گزارش‌های متعددی ارائه شده است که از آن میان می‌توان به مطالعه خاوازی و همکارانش[۱۶] در سال ۲۰۰۹ اشاره کرد که نشان دادند میزان جوانه‌زنی بذرهای آغشته شده به مایه تلقیح گونه‌های فلورسنت *Pseudomonas* دارای فعالیت ACCD در گیاه کلزا، تحت شرایط تنش شوری بسیار افزایش یافته است (۱۳).

همچنین، نوید و همکارانش[۱۷] در سال ۲۰۰۸ نشان دادند میزان رشد و محصول ذرت در حضور کودهای آلی دارای گونه‌های فلورسنت *Pseudomonas*، به میزان در خور توجهی افزایش یافت (۱۴). در مطالعه‌ای دیگر، ساراواناکومار و همکارانش[۱۸] در سال ۲۰۰۶ دریافتند که تیمار گیاه بادام زمینی با باکتری *Pseudomonas fluorescens* سویه TDK1 با میزان فعالیت آنزیم ACCD 342 نانومول آلفاکتوبوتیرات آزاد شده در واحد میلی‌گرم پروتئین در ساعت، در مقایسه با گیاهی که فاقد این تیمار بود، سبب افزایش مقاومت گیاه به شوری و در نهایت تولید محصول شد (۱۵).

در نهایت، با توجه به میزان فعالیت بالای آنزیم ACCدآمیناز در سویه *Pseudomonas* منتخب و نقش مثبتی که این سویه می‌تواند در افزایش رشد گیاه داشته باشد، ادامه تحقیقات در این زمینه با توجه به لزوم استفاده از راهکارهای زیستی به منظور جلوگیری از کاربرد بی‌رویه کودهای شیمیایی ضروری به نظر می‌رسد.

References

(1) Glick BR. The enhancement of plant growth by free by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 1995; 41 (2):109-17.

(2) Glick BR, Penrose DM, Li J. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *Journal of Theoretical Biology*. 1998; 190 (1): 63–8.

(3) Barnawal D, Bharti N, Maji D, Chanotiya CS, Kalra A. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase-containing rhizobacteria protect *Ocimum sanctum* plants during waterlogging stress via reduced ethylene generation. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2012; 58: 227-35.

(4) Shahzad SH, Arif MS, Riaz M, Iqbal Z, Ashraf M. PGPR with varied ACC-deaminase activity induced different growth and yield response in maize (Zea mays L.) under fertilized conditions. *Journal of Soil Biology*. 2013; 57: 27-34.

(5) Dworkin M, Foster J. Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. *Journal of Bacteriology*. 1958; 75: 592-601.

(6) Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. New York: Springer; 1989.

(7) King EO, Ward MK, Raney DE. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 1954; 44 (2): 301–07.

(8) Khosravi H, Yakhchali B, Alikhani HA. Potential evaluation of some native rhizobia as plant growth promoting bacteria and their role in decreasing of stress ethylene. *Iranian Journal of Biology* 2009; 22 (4): 661-70.

(9) Ryan FJ. Selected methods of *Neurospora* genetics. *Methods in Medical Research*. 1950; 3: 51-75.

(10) Penrose DM, Glick BR. Quantifying the Impact of ACC Deaminase Containing Bacteria on Plants. : In: Varma A, Abbott L, Werner D, Hampp R, editor. *Plant Surface Microbiology*; 2nd ed. Berlin Heidelberg: Springer; 2004.

(11) Glick BR. Modulation of plant ethylene levels by the bacteria enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiology Letters*. 2005; 251: 1-7.

(12) Benizri E, Courtade A, Picard C,. Guchert A. Role of maize root exudates in the production of auxins by *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biology & Biochemistry*. 1998; 30: 1481-84.

(13) Khavazi K, Jalili F, Pazira E. Isolation and characterization of ACC deaminase-producing fluorescent *pseudomonad*s, to alleviate salinity stress on canola (Brassica napus L.) growth. *Journal of Plant Physiology*. 2009; 166 (6): 667-74.

(14) Naveed M, Khalid M. Relative Efficacy of *Pseudomonas* spp., Containing Acc-Deaminase For Improving Growth and Yield of Maize (Zea Mays L.) in The Presence of Organic Fertilizer. *Pakistan Journal of Botany*. 2008; 40 (3): 1243-51.

(15) Saravanakumar D, Samiyappan R. ACC deaminase from *Pseudomonas fluorescens* mediated saline resistance in groundnut (*Arachis hypogea*) plants. *Journal of Applied Microbiology*. 2007; 102 (5): 1283–92.

[1]- Plant Growth Regulators (PGPRs)
[2]- ۱-آمینو سیکلوپروپان-۱- کربوکسیلیک اسید
[3]- Khosravi H. et al.
[4]- Merck
[5]- Ryan
[6]- Penrose DM, Glick BR
[7]- ACC Deaminase
[8]- Tris-HCl
[9]- DPH
[10]- Bergey
[11]- PCR
[12]- Macrogen
[13]- Nitrogen Scavenger
[14]- Glick et al
[15]- Benizri et al
[16]- Khavazi et al
[17]- Naveed et al
[18]- Saravanakumar et al

Study of ACC deaminase activity of Rhizobacteria isolated from soils of northern Iran

Zeinab Sadat Motesharrei *
M.Sc of Microbiology, Academic member of ACECR (Tehran Organization), Iran, zmotesharrei@yahoo.com
Hajar Mahmoodi
BSc of Microbiology, Tehran University, Iran,.mahmoodihajar@yahoo.com
Parviz Owlia
Professor of Microbiology, Shahed University, Tehran, Iran, owlia@yahoo.com
Hassan Salimi
Ph.D. of Genetics, NIGEB, Tehran, Iran, hasan_salimi@yahoo.com

Abstract

IntroductionPlant growth promoting rhizobacteria with ACC deaminase activity can be used for stimulating plant growth under tension situations. This study held to surveyed native bacteria having ACC deaminase activity.

Materials and methods: 8 (none) rhizospherial soils were cultured by preparing serial dilution in selective media. The isolates screened by semi quantity assay of determining ACC deaminase in which diagonal colony after inoculation and incubation was measured in first, second and fifth day. The ability of these strains in accdeaminase production was investigated by optical density of bacterial growth in 504nm. ACC deaminase activity was assayed by measuring the production of α-KB. The selected strains recognized by biochemical and microbiological tests and the best strain in production of ACCD was identified by PCR amplification and sequencing of *16s rRNA*..

Results: 445 stains were isolated. Then, 17 stains were selected by semi quantity assay. Then, 9 strains belong to *Bacillus* and *Pseudomonas* genera and *Actinomycete* group, were selected based on their abilities in the enzymes production. The study of Acc deaminase activity showed *Pseudomonas brassicacearum* strain KOT_{12} belonged to the fluorescent *pseudomonad* group had highest activity (826/4369 nmol kb/mg pr/h).

Discussion and conclusion: Based on high production of ACCD in the selected isolate in comparison with other strains, this strain can be used for PGPR inoculums in the field by optimizing enzyme production and formulation.

Key words: Accdeaminase, ACC, Selected strains

* Corresponding author
Received: May 26, 2013 / **Accepted:** December 10, 2013