



جمهوری اسلامی ایران



وزارت جهاد کشاورزی

سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

موسسه تحقیقات خاک و آب کشور



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

نگارندگان

وحید اله جهان‌دیده مهجن آبادی، عضو هیات علمی موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

کاظم خاوازی، عضو هیات علمی موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

هوشنگ خسروی، عضو هیات علمی موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

مهديه شمشیری‌پور، محقق موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

خدیجه اربابی، کارشناس موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

اکرم اوتادی، کارشناس موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

ندا علیزاده، کارشناس موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

نشریه فنی: 641

1402

مشخصات اثر

عنوان: روش‌های آزمایشگاهی برای اندازه‌گیری ویژگی‌های محرک رشدی گیاه با استفاده از باکتری‌ها
نگارندگان: وحید اله جهان‌دیده مهجن آبادی، کاظم خاوازی، هوشنگ خسروی، مهدیه شمشیری‌پور، خدیجه اربابی، اکرم اوتادی و ندا علیزاده
ناشر: موسسه تحقیقات خاک و آب کشور
کارشناس انتشارات: سمانه پورمنصور
ویراستار ادبی: زهرا محمدی
طراح جلد: راضیه محمدی
سال انتشار: 1402

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

نقل مطالب با ذکر منبع بلامانع است.

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

صندوق پستی: 31785-311

کد پستی: 3177993545

تلفن: 026-36201900

نمبر: 02636210121

پست الکترونیکی: info@swri.ir

وبسایت: http://www.swri.ir

مسئولیت صحت مطالب به عهده نگارندگان است.

فهرست مطالب

صفحه

عنوان

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

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

1- مقدمه

اصطلاح «باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه (PGPR)¹» نخستین بار در سال 1978 توسط Schroth و Kloepper گفته می‌شوند که در شرایط معین و با استفاده از یک یا چند سازوکار خاص موجب افزایش رشد گیاه می‌شوند (Hungria et al., 2010; Adesemoye et al., 2009). توانایی افزایش رشد گیاه توسط باکتری‌ها، تنها به باکتری‌های ریزوسفری و باکتری‌های مستقر در سطح ریشه² منحصر نبوده و باکتری‌های آزادزی خاک و انواع ساکن در فیلوسفر³ (به‌ویژه برگ‌ها) نیز از این ویژگی برخوردار هستند (Jahandideh Mahjen Abadi et al., 2020; 2021). اگرچه بیشتر مطالعات انجام شده در این زمینه مربوط به باکتری‌های ریزوسفری است اما به‌دلیل وجود توانایی باکتری‌های ساکن در سایر زیستگاه‌ها برای افزایش رشد گیاه، پیشنهاد شده است که از عبارت جامع‌تر باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPB)⁴ استفاده شود (Bashan and De-Bashan, 2005).

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

¹- Plant growth promoting rhizobacteria

²- Rhizoplane

³- Phyllosphere

⁴- Plant growth promoting bacteria

باکتری‌های محرک رشد گیاه، شامل کنترل زیستی عوامل بیماری‌زای گیاهی است. باکتری‌های محرک رشد گیاه با تولید متابولیت‌های باکتریایی قادر به کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی هستند. این باکتری‌ها با اختلال در رشد قارچ‌ها، نامتدها و باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی قادر به حفاظت گیاه در مقابل آنها هستند. در اغلب مطالعات، رقابت برای عناصر غذایی (از طریق تولید سیدروفور) و زیستگاه، مقاومت القایی سیستمیک¹ و تولید متابولیت‌های ضد قارچی مانند آنتی‌بیوتیک و سیانید هیدروژن (HCN)² به‌عنوان سازوکارهای غیر مستقیم تحریک رشد گیاه توسط PGPR شناخته شده‌اند (Lugtenberg and Kamilova, 2009; Glick, 2012; Ahemad and Kibret, 2014). هدف از این دستورالعمل ارائه روش‌های آزمایشگاهی برای اندازه‌گیری ویژگی‌های محرک رشدی گیاه با استفاده از باکتری‌ها است. تعدادی از روش‌های ویژگی‌های محرک رشدی گیاه مانند تثبیت زیستی نیتروژن و توانایی انحلال فسفات به‌طور مجزا در دستورالعمل‌های جدا آورده شده‌اند. از این‌رو در این دستورالعمل به آن‌ها اشاره‌ای نشده است.

2- اندازه‌گیری سنتز ایندول-3-استیک اسید³

ایندول-3-استیک اسید، یکی از اکسین‌های فعال فیزیولوژیکی در گیاهان است و نقش اساسی در رشد و توسعه گیاهان دارد. این هورمون از اهمیت ویژه‌ای در الگودهی سلول‌ها و ساختار گیاه، تنظیم رشد ریشه و ساقه، تنظیم فتوتروپیسم، تنظیم شکل سلول‌ها، تنظیم جوانه‌زنی و تنظیم رسیدن میوه و بذر، برخوردار است. هورمون IAA به‌وسیله باکتری‌ها، قارچ‌ها و گیاهان تولید می‌شود. مسیرهای عمده بیوسنتز ایندول-3-استیک اسید شامل مسیر ایندول-3-استامید (IAM)⁴، مسیر ایندول-3-پیرووات (IPA)⁵ و مسیر تریپتامین است. بیوسنتز هورمون ایندول-3-استیک اسید به‌وسیله باکتری‌ها، بیشتر از مسیر IAM و گاهی از مسیر IPA انجام می‌شود. تریپتوفان به‌عنوان پیش ماده تولید ایندول-3-استیک اسید است. آنزیم تریپتوفان مونواکسیژناز⁶ تریپتوفان را به IAM تبدیل می‌کند. سپس

¹ - Induced systemic resistance

² - Hydrogen cyanide

³ - Indol-3-acetic acid

⁴ - Indole-3-acetamide

⁵ - Indole-3-pyruvate

⁶ - Monooxygenase-2-tryptophan

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

2-1- وسایل و تجهیزات

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

- شیکر
- لوپ (فیلدوپلاتین)

2-2- مواد و واکنش‌گرها

- $0/5 \text{ FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ مولار: میزان $15/135$ گرم $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ را پس از توزین در مقداری آب مقطر حل نموده و سپس در بالن ژوژه 1000 میلی‌لیتری با آب مقطر به حجم یک لیتر برسانید.

- معرف سالکوسکی¹: $7/5$ میلی‌لیتر $0/5 \text{ FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ مولار را با پی‌پت برداشته و در یک بالن ژوژه 1000 میلی‌لیتری بریزید. سپس 250 میلی‌لیتر آب مقطر و در آخر 150 میلی‌لیتر اسید سولفوریک 98% را به آرامی به این مخلوط اضافه کنید. معرف حاصل که زرد رنگ و شفاف است را در بطری تیره رنگ نگهداری نمایید.

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

- محیط کشت TSB^2 همراه با 50 میکروگرم در میلی‌لیتر ال - تریپتوفان³. به‌منظور تهیه این محیط کشت، مقدار توصیه شده (مندرج روی بسته‌بندی ماده) از محیط کشت پودری آماده TSB را با توجه به حجم مورد نیاز در میزان مناسب از آب مقطر حل کرده و بسته به تعداد نمونه‌ها، فلاسک‌های ارلن‌مایر 50 میلی‌لیتر دارای 25 میلی‌لیتر از محیط کشت را آماده و اتوکلاو کنید. هر کدام از فلاسک‌های ارلن‌مایر می‌بایست دارای 50 میکروگرم در میلی‌لیتر و یا $0/00005$ گرم در میلی‌لیتر ال - تریپتوفان باشد. پس برای هر فلاسک ارلن‌مایر دارای 25 میلی‌لیتر محیط کشت TSB ، $0/00125$ گرم مورد نیاز است. می‌توانید مقادیر را برای کل

¹ - Salkowski

² - Tryptic soy broth

³ - L-tryptophan

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

- محیط کشت TSB: به منظور تهیه این محیط کشت، مقدار توصیه شده (مندرج روی بسته بندی ماده) از محیط کشت پودری آماده TSB را با توجه به حجم مورد نیاز در میزان مناسب از آب مقطر حل کرده و بسته به تعداد نمونه ها، فلاسک های ارلن مایر 50 میلی لیتر دارای 25 میلی لیتر از محیط کشت را آماده و اتوکلاو کنید.

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

3-2- روش کار

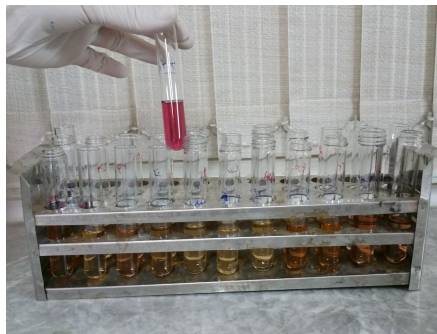
- باکتری مطالعه شده را در محیط TSB در زیر هود لامینار کشت دهید. به این صورت که از کلنی خالص باکتری به ارلن دارای 25 میلی لیتر محیط کشت TSB تلقیح کرده و آن را به مدت 48 ساعت روی یک شیکر انکوباتور با دمای 28 درجه سلسیوس و دور 120rpm قرار دهید.

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

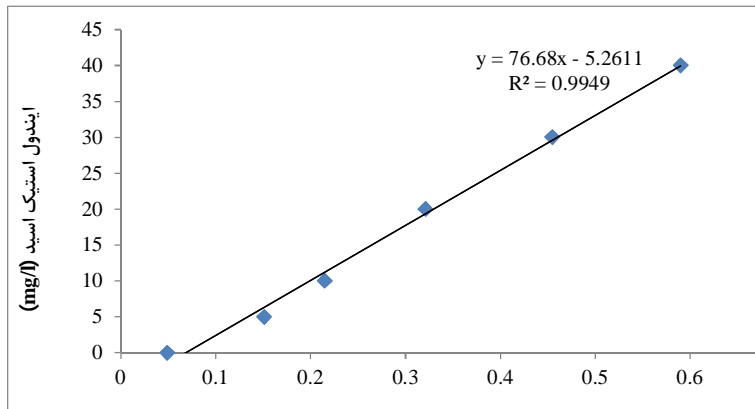
- پس از گذشت این زمان و در دمای آزمایشگاه، $1/5$ میلی لیتر سوسپانسیون باکتری را داخل میکروتیوب ریخته و با دور معادل 15000 دور در دقیقه به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ کنید.
- مقدار یک میلی لیتر از محلول شفاف بالایی را به وسیله سمپلر به داخل لوله آزمایش کوچک (10-12 میلی لیتری) ریخته و چهار میلی لیتر معرف سالکوسکی به آن اضافه و مخلوط حاصل را به مدت 20 دقیقه در دمای آزمایشگاه و در تاریکی نگهداری کنید.
- همچنین از هر کدام از غلظت‌های استانداردهای ساخته شده به مقدار یک میلی لیتر در داخل لوله آزمایش ریخته و سپس چهار میلی لیتر از معرف سالکوسکی به آن اضافه و مخلوط حاصل را به مدت 20 دقیقه در دمای آزمایشگاه و در تاریکی نگهداری کنید.
- دستگاه اسپکتروفتومتر را با محیط کشت TSB بدون تلقیح صفر نمایید و سپس میزان جذب نور مخلوط مورد آزمایش و همچنین استانداردها را در 535 نانومتر قرائت کنید.

2-4- شیوه ارزیابی نتایج آزمون

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



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



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

3- اندازه‌گیری سنتز سیدروفور

سیدروفورها مولکول‌های آلی با وزن مولکولی کم هستند که توسط باکتری‌ها و برخی قارچ‌ها در شرایط کمبود آهن تولید می‌شوند. وظیفه اصلی آن‌ها، جذب آهن از محیط و انتقال آن به داخل سلول است. سیدروفورها دارای تمایل بالا به اتصال به آهن فریک (Fe^{+3}) هستند که می‌توانند با آن کلات پایدار را تشکیل دهند و در نتیجه قابلیت جذب آن را افزایش دهند. باکتری‌هایی که سیدروفور تولید می‌کنند، باکتری‌های تولیدکننده سیدروفور یا تولیدکنندگان سیدروفور نامیده می‌شوند. برخی از معروف‌ترین باکتری‌های تولیدکننده سیدروفور شامل *Pseudomonas aeruginosa* و *Bacillus subtilis* هستند. سیدروفورها نه تنها برای بقای باکتری‌ها مهم هستند، بلکه به دلیل افزایش قابلیت دسترسی آهن، رشد و عملکرد گیاهان را بهبود می‌دهند. سیدروفورها را می‌توان با توجه به قسمت‌هایی که به آهن متصل می‌شوند به سه گروه اصلی کاتکول‌ها¹، هیدروکسامات‌ها² و کربوکسیلات‌ها³ تقسیم کرد. برای اندازه‌گیری توانایی سنتز سیدروفور به وسیله باکتری می‌توان به صورت زیر عمل نمود (Alexander and Zuberer, 1991):

¹ - Catecholates

² - Hydroxamate

³ - Carboxylate

3-1- وسایل و تجهیزات

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

3-2- مواد و واکنش‌گرها

- محلول معرف Fe-CAS: در ابتدا $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ یک میلی‌مولار را تهیه نمایید، بدین صورت که 0/027 گرم $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ را توزین نموده و در 100 میلی‌لیتر آب مقطر حل نمایید. سپس محلول اسیدکلریدریک 10 میلی‌مولار را با حل نمودن 0/1 میلی‌لیتر اسید کلریدریک در 100 میلی‌لیتر آب مقطر تهیه کنید. این دو محلول با هم مخلوط شود (محلول A). 0/06 گرم از ماده CAS^1 را توزین و در 50 میلی‌لیتر آب مقطر حل نمایید (محلول B). سپس 0/072 گرم HDTMA^2 را توزین و در 40 میلی‌لیتر آب مقطر حل کنید

¹ - Chrome Azurol S (CAS)

² - Hexadecyl trimethyl ammonium bromide

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

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

- محلول غذایی: برای تهیه محلول غذایی دو گرم گلوکز، دو گرم مانیتول، 0/493 گرم $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، 0/011 گرم $CaCl_2$ ، 0/00117 گرم $MnSO_4 \cdot H_2O$ ، 0/0014 گرم H_3BO_3 ، 0/04 گرم $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ، 0/0012 گرم $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ و 0/001 گرم $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ را توزین و در 70 میلی‌لیتر آب مقطر حل کنید (بادآوری می‌شود این مواد را یک به یک توزین نموده و در آب حل نمایید). این محلول پس از استریل شدن تا دمای 50 درجه سلسیوس سرد شود.

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

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

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

¹ - 1.4-piperazinethanesulfonic acid

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

3-3- روش کار

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

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

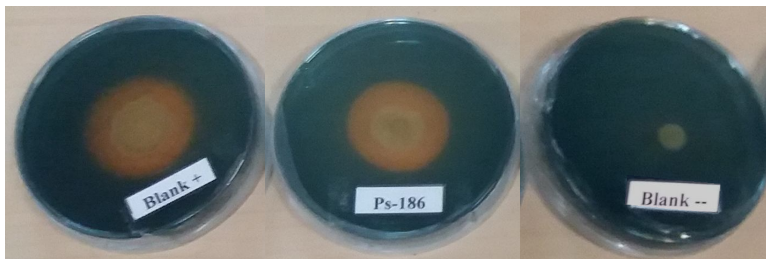
- پلیت‌ها در انکوباتور در دمای 28 درجه به مدت 96 ساعت نگهداری شوند.



شکل 3- روش قطره‌گذاری باکتری.

3-4- شیوه ارزیابی نتایج آزمون

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



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

4- اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ACC-دآمیناز¹

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

¹ - Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase

گیاهان بهبود می‌بخشند (Ghosh *et al.*, 2018). در حال حاضر، گونه‌های باکتریایی که دارای فعالیت ACC-دآمیناز هستند، در طیف گسترده‌ای از جنس‌ها مانند *Acinetobacter*، *Bacillus*، *Azospirillum*، *Alcaligenes*، *Agrobacterium*، *Achromobacter*، *Rhizobium*، *Serratia*، *Ralstonia*، *Pseudomonas*، *Enterobacter*، *Burkholderia* و غیره شناسایی شده‌اند. ACC تولید شده به وسیله ACC-سنتاز در بافت‌های گیاهی از ریشه‌های گیاه خارج شده و توسط باکتری‌های مجاور جذب می‌شود. در نتیجه، باکتری‌ها ACC را به آمونیاک و 2-کسوبوتانوات¹ هیدرولیز می‌کنند. این هیدرولیز ACC باعث کاهش غلظت ACC در باکتری‌ها و انتقال مداوم ACC از ریشه‌های گیاه به باکتری می‌شود. در صورت نبودن ACC-دآمیناز، به دلیل وجود پیش‌ماده ACC، تولید اتیلن افزایش می‌یابد که این امر منجر به ایجاد عکس‌العمل‌های تنش‌ی شامل جلوگیری از رشد گیاه می‌شود (Glick, 2014).

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

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

1-1-4- وسایل و تجهیزات

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

¹ - Oxobutanoate

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

4-1-2- مواد و واکنشگر ها

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

- محیط کشت DF دارای دو گرم در لیتر $(NH_4)_2SO_4$: مقدار دو گرم $(NH_4)_2SO_4$ را به ترکیبات فوق اضافه نموده و سپس pH آن را روی 7/2 تنظیم نمایید. در ادامه فلاسک های ارلن مایر 50 میلی لیتر دارای 20 میلی لیتر از محیط کشت محیط کشت DF دارای دو گرم در لیتر $(NH_4)_2SO_4$ را آماده و اتوکلاو کنید.

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

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

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

4-1-3- روش کار

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

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

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

4-1-4- شیوه ارزیابی نتایج آزمون

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

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

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

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

4-2-1- وسایل و تجهیزات

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

4-2-2- مواد و واکنشگرها

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

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

- معرف 4،2-دی‌نیتروفنیل هیدرازین¹ 0/2 درصد: میزان 0/2 گرم 4،2-دی‌نیتروفنیل هیدرازین را پس از توزین در مقداری آب مقطر حل نموده و سپس در بالن ژوژه 100 میلی‌لیتری با آب مقطر به حجم برسانید.

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

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

- تولوئن

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

¹ - 2,4-Dinitrophenylhydrazine

- محیط کشت TSB: به منظور تهیه این محیط کشت، مقدار توصیه شده (مندرج روی بسته بندی ماده) از محیط کشت پودری آماده TSB را با توجه به حجم مورد نیاز در میزان مناسب از آب مقطر حل کرده و بسته به تعداد نمونه ها، فلاسک های ارلن مایر 50 میلی لیتر دارای 25 میلی لیتر از محیط کشت را آماده و اتوکلاو کنید.

- محلول استاندارد آلفا کتوبوتیرات¹ 100 میلی مولار: مقدار 0/0497 گرم از نمک آلفا کتوبوتیرات را در چهار میلی لیتر Tris HCl 0/1 مولار حل نموده و سپس pH آن را روی 8/5 تنظیم نمایید. از محلول آلفا کتوبوتیرات 100 میلی مولار، محلول 10 میلی مولار در 0/1 Tris HCl میلی مولار بسازید. سپس با محلول های 0/1، 0/2، 0/4، 0/6، 0/8 و 10 میکرومول آلفا کتوبوتیرات در 0/1 Tris HCl مولار را از محلول 10 میلی مولار آلفا کتوبوتیرات در حجم 200 میکرولیتر تهیه نمایید.

4-2-3- روش کار

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

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

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

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

¹ - α -ketobutyrate

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

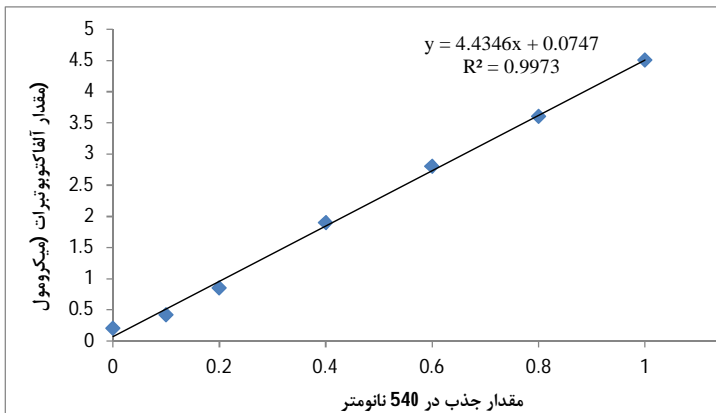
- 300 میکرولیتر از محلول 4,2-دی نیتروفنیل هیدرازین (محلول 0/2 4,2-دی نیتروفنیل هیدرازین در HCl دو مولار) به لوله آزمایش اضافه و ورتکس شود. محتویات هر لوله در دمای 30 درجه سلسیوس به مدت 30 دقیقه انکوبه شوند. سپس دو میلی لیتر NaOH دو مولار به نمونه ها اضافه نموده و مخلوط گردد تا یکنواخت شود.

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

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

4-2-4- شیوه ارزیابی نتایج آزمون

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



شکل 5- نمودار استاندارد آلفا کتوتوبرات.

5- اندازه‌گیری سنتز سیانید هیدروژن (HCN)¹

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

5-1- وسایل و تجهیزات

- قاشقک توزین (اسپاتول)
- سمپلر به حجم 100 میکرولیتر
- سر سمپلر استریل به حجم 100 میکرولیتر
- میله شیشه‌ای خمیده
- کاغذ صافی
- پنس
- لوپ (فیلدوپلاتین)
- پارافیلیم
- پلیت یا پتری‌دیش
- استوانه مدرج (25 و 1000 میلی‌لیتری)
- فلاسک ارلن‌مایر (50 و 500 میلی‌لیتری)
- بالن ژوژه 50 و 2000 میلی‌لیتری
- هود لامینار

¹ - Hydrogen cyanide

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

5-2- مواد و واکنش‌گرها

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

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

- محیط کشت TSA¹ غنی شده با گلیسین؛ به‌منظور تهیه این محیط کشت، مقدار توصیه شده (مندرج روی بسته‌بندی ماده) از محیط کشت پودری آماده TSA را در یک لیتر آب مقطر حل نموده و سپس میزان 4/4 گرم گلیسین به آن اضافه و اتوکلاو کنید. در ادامه پس از کاهش دما در پلیت‌های با قطر 10 سانتی‌متر توزیع نمایید.

5-3- روش کار

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

¹ - Tryptic soy agar

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

- میزان 100 میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با جمعیت یکسان (1×10^8 CFU/ml) را روی سطح پلیت‌های دارای TSA ریخته و با میله شیشه‌ای خمیده استریل پخش کنید.

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

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



شکل 6- کاغذ صافی آغشته به معرف پیکرات‌سدیم.

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

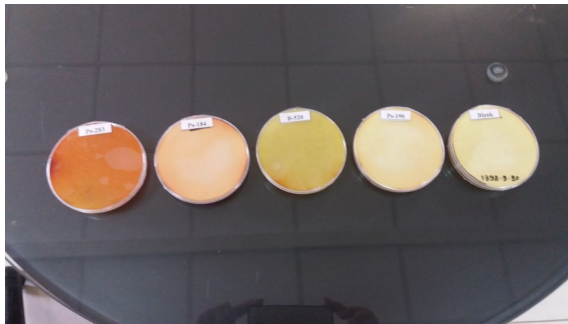
نکته: درب پلیت‌ها به صورت کامل پوشانده شود به‌طوری‌که در صورت مثبت بودن نتیجه آزمون، گاز متصاعد شده خارج نشود.

5-4- شیوه ارزیابی نتایج آزمون

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

جدول 1- تعیین توان تولید سیانید هیدروژن.

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



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

6- اندازه گیری سنتز اگزوپلی ساکارید (EPS)¹

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

¹ - Exopolysaccharide

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

6-1- وسایل و تجهیزات

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

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

6-2- مواد و واکنش‌گرها

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

- محیط کشت MY: برای تهیه یک لیتر محیط کشت MY 10 گرم گلوکز، پنج گرم پپتون، سه گرم عصاره مالت، سه گرم عصاره مخمر، 40/5 گرم NaCl، 4/85 گرم $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، 3/5 گرم $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ، یک گرم KCl، 1/8 $CaCl_2$ ، 0/013 گرم NaBr و 0/303 گرم NaHCO₃ را در یک لیتر آب مقطر حل نمایید. سپس فلاسک‌های ارلن‌مایر 50 میلی لیتر دارای 25 میلی لیتر از محیط کشت را آماده و سپس استریل نمایید.

6-3- روش کار

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

- در زیر هود لامینار 50 میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی با جمعیت 10^8 CFU/ml را به فلاسک ارلن‌مایر دارای 25 میلی‌لیتر محیط کشت MY اضافه کنید و به مدت پنج شبانه‌روز در دمای 28 درجه سلسیوس روی یک شیکر انکوباتور با دور 120 rpm قرار دهید.
- سوسپانسیون به دست آمده را از کاغذ صافی عبور دهید.
- فالکون 50 میلی‌لیتری را توزین نمایید.
- یک حجم از سوسپانسیون را با سه حجم الکل اتانول 96% مخلوط و به مدت 30 دقیقه در دور 5000 rpm سانتریفیوژ نمایید. برای انجام اینکار می‌توانید 10 میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی را با 30 میلی‌لیتر الکل اتانول 96% در فالکون 50 میلی‌لیتری مخلوط کنید.
- مایع رویی خارج و فالکون به همراه رسوب باقی مانده به مدت یک شب در آن با دمای 50 درجه سلسیوس قرار داده شود.
- فالکون به همراه رسوب خشک شده توزین شود.

4-6- شیوه ارزیابی نتایج آزمون

برای بدست آوردن مقدار اگزوپلی ساکارید از فرمول زیر استفاده شود:

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

EPS: اگزوپلی ساکارید (گرم بر لیتر)

W1: وزن فالکون و رسوب (گرم)

W2: وزن فالکون (گرم)

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

فهرست منابع

- Adesemoye, A., Torbert, H. and Kloepper, J. 2009. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microbial Ecology*, 58: 921-929.
- Ahemad, M. and Kibret, M. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King saud University-science*, 26: 1-20.
- Alexander, D. and Zuberer, D. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of soils*, 12 :39-45.
- Bashan, Y. and De-Bashan, L. 2005. Plant growth-promoting. *Encyclopedia of soils in the environment*, 1: 103-115.
- Bhagat, N. Raghav, M. Dubey, S. and Bedi, N. 2021. Bacterial exopolysaccharides: Insight into their role in plant abiotic stress tolerance. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(8): 1045-1059.
- Bhattacharyya, P.N. and Jha, D.K. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28: 1327-1350.
- Dell'Amico, E., Cavalca, L. and Andreoni, V. 2005. Analysis of rhizobacterial communities in perennial Gramineae from polluted water meadow soil, and screening of metal-resistant, potentially plant growth-promoting bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 52: 153-162.
- Donate-Correa, J., León-Barrios, M. and Pérez-Galdona, R. 2005. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste), a forage tree-shrub legume endemic to the Canary Islands. *Plant and Soil*, 266: 261-272.
- Ghosh, P.K., De, T.K. and Maiti, T.K. 2018. Role of ACC deaminase as a stress ameliorating enzyme of plant growth-promoting rhizobacteria useful in stress agriculture: a review. *Role of Rhizospheric Microbes in Soil*: 57-106.
- Glick, B.R. 2012. *Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications*. Scientifica, 2012.
- Glick, B.R. 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological research*, 169: 30-39.

- Gordon, S.A. and Weber, R.P. 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant physiology*, 26: 192.
- Hungria, M., Campo, R.J., Souza, E.M. and Pedrosa, F.O. 2010. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant and soil*, 331: 413-425.
- Jahandideh Mahjen Abadi, V.A., Sepehri, M., Rahmani, H.A., Dolatabad, H.K., Shamshiripour, M. and Khatabi, B. 2021. Diversity and abundance of culturable nitrogen-fixing bacteria in the phyllosphere of maize. *Journal of Applied Microbiology*.
- Jahandideh Mahjen Abadi, V.A., Sepehri, M., Rahmani, H.A., Zarei, M., Ronaghi, A., Taghavi, S.M. and Shamshiripour, M. 2020. Role of Dominant Phyllosphere Bacteria with Plant Growth-Promoting Characteristics on Growth and Nutrition of Maize (*Zea mays* L.). *Journal of soil science and plant nutrition*, 20: 2348-2363.
- Lugtenberg, B. and Kamilova, F. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual review of microbiology*, 63: 541-556.
- Moraine, R. and Rogovin, P. 1966. Kinetics of polysaccharide B-1459 fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 8: 511-524.
- Penrose, D.M. and Glick, B.R. 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia plantarum*, 118: 10-15.