تعیین فلورغالب قارچی و باکتریایی ریزوسفر و شناسایی ریز ساز واره‌های مولد آنزیم فسفولیپاز و کیتیناز در خاک‌های حاصلخیز ایرانشهر

Scrutiny Flora and identify the dominant fungal and bacterial rhizosphere microorganisms in the soil fertile productive chitinase and phospholipase enzymes in Iranshahr

هادی حسینی[1*]، ایمان هرمزی[2]، نجمه شکیب [2]

۱- باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی، زاهدان، زاهدان- ایران

۲- کارشناس آزمایشگاه تشخیص طبی

***نویسنده مسوول مکاتبات:** dr.hosseini1368@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۶/۲/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۶/۸/۲۰

چکیده

این پژوهش با هدف شناسایی و جداسازی باکتری‌ها و قارچ‌های مولد آنزیم‌های فسفولیپاز و کیتیناز در خاک منطق حاصلخیز ایرانشهر جهت شناسایی و تولید کود بیولوژیک برای استفاده ی کشاورزان استان با استفاده از ریزسازواره‌های سازگار با شرایط جغرافیایی منطقه (هدف ثانویه) انجام پذیرفت. نمونه‌گیری از خاک مزارع کشاورزی مناطق حاصلخیز شهر ایرانشهر بوده و خاک مناطق نمونه‌برداری به میزان 10^{+5} رقیق‌سازی شدند. در ادامه جهت خالص‌سازی به محیط‌های عمومی Pda و Nutrient agar منتقل گردیدند. برای سوبسترای کیتین، کیتین میگو از کمپانی سیگما آلدریچ آمریکا و برای سوبسترای فسفولیپاز از زرده‌ی استریل تخم‌مرغ استفاده شد. پس از ادغام سوبستراهای اختصاصی با محیط‌های عمومی، ریزسازواره‌های آنزیم مثبت از طریق تولید هاله شناسایی و جداسازی شدند که در بین قارچ‌ها، قارچ موکور و در بین باکتری‌ها سودوموناس در صدر قرار- داشتند. آنزیم‌ها با تست اسپکتوفتومتری و سنجش میزان جذب نوری در طول موج‌های ۴۱۰ و ۲۸۰ نانومتر شناسایی و تایید شدند. در این تست محیط‌ها به‌صورت مایع تهیه و به‌عنوان بلانک استفاده شد و محیط‌های حاوی آنزیم جهت خالص‌سازی از فیلترهای میکروبی عبور داده شدند. نمونه‌ها جهت شناسایی مولکولی به شرکت میکروژن کره‌جنوبی ارسال گردیدند که پاسخ تست‌های شناسایی مولکولی نیز تایید کننده‌ی تست‌های بیوشیمیایی و مورفولوژیک بود. باکتری و قارچ غالب تولید کننده‌ی آنزیم فسفولیپاز به‌ترتیب *Bacillussubtilis* و *Mucorhiemalis* بودند، همچنین بیش‌ترین میزان تولید آنزیم کیتیناز نیز در ریزسازواره‌های *Pseudomonasputida* و *Mucorhiemalis* مشاهده شد. تغییرات pH نشان داد افزایش pH به سمت قلیایی باعث کاهش شدید ترشح آنزیم میشود. بیش‌ترین میزان تولید هر دو آنزیم در قارچ *Mucorhiemalis* دیده شد.

واژگان کلیدی: قارچ، باکتری، فسفولیپاز، کیتیناز و آنزیم.

مقدمه:

تولید آنزیم امروزه اهمیت ویژه‌ای دارد و میکروب‌ها یکی از عوامل مهم در این زمینه هستند، میکروب‌ها می‌توانند به‌راحتی کشت داده شوند و آنزیم حاصل از آنها طیف وسیعی از واکنش‌های هیدرولیتیکی و سنتزی را کاتالیز کنند، همچنین با توجه به‌میزان زیاد تولید در زمان اندک از لحاظ اقتصادی دارای اهمیت می‌باشند (زارع و همکاران، ۱۳۹۲). باکتری‌های خاک زی با کارکردهای مهم و متنوع، بسترساز واکنش‌های اساسی خاک بوده و نقش مهمی در تنوع زیستی بی‌مهرگان خاک‌زی دارند (خداشناس و همکاران ۱۳۸۹) در طول کشت گیاهان زراعی کاهش محصول ناشی از حمله قارچ‌های بیماری‌زا به گیاهان همواره به‌عنوان مهم‌ترین عامل زیان‌های اقتصادی محسوب می‌شود. قارچ تریکودرما، به‌دلیل ترشح بعضی از انواع آنزیم‌های کیتینازی، به‌عنوان عاملی قوی در کنترل بیولوژیک بیمارهای قارچی مورد استفاده قرار می‌گیرد (سید اصلی و همکاران ۱۳۸۳). کیتیناز اهمیت اقتصادی چشمگیری در خصوص تجزیه مواد کیتینی و پاک‌سازی محیط زیست و تهیه مواد پیش‌ماده دارد و با رشد جمعیت و محدودیت منابع طبیعی، تکنولوژی آنزیم می‌تواند برای بسیاری از صنایع جهت غلبه بر مشکلات اقتصادی در آینده نزدیک مفید باشد (باباشپور و همکاران، ۱۳۹۰). باکتری‌های نمک دوست نسبی منابع بسیار خوبی برای تولید آنزیم‌هایی هستند که نه تنها در برابر غلظت‌های مختلف نمک پایدارند، بلکه دارای فعالیت بهینه در محدوده وسیعی از pH و دما هستند (قربانی و قانع، ۱۳۹۶). فسفر در تمام موجودات زنده وجود دارند و یک جزء از غشاهای زیستی همراه با glycolipids و کلسترول محسوب می‌شود. ایرانشهر منطقه ای است در استان سیستان و بلوچستان که دارای اقلیم خوب و با توجه به گرم و خشک بودن اکثر مناطق این استان ایرانشهر دارای خاکی حاصلخیز و از نظر رویش گیاهان و کشاورزی در خور توجه می‌باشد. با بررسی فلور قارچی ریشه‌ی این گیاهان می‌توان پس از بررسی فلور غالب، این قارچ‌ها را در شرایط آزمایشگاهی بر روی گیاهان سایر مناطق آزمود. تولید این آنزیم‌ها توسط ریزسازواره‌های کیاز فاکتورهای بیماری‌زایی محسوب می‌شود و می‌تواند بین قارچ‌های منطقه روابط هم‌افزایی و ضدیت را بررسی کند و در صورت میزان بالای ترشح می‌توان بررسی‌های مقایسه‌ای با سویه‌ی صنعتی انجام داد. با توجه به عدم شناسایی قارچ‌های منطقه و عدم فعالیت‌های بیولوژیکی از نقطه نظر میکروبیولوژی در این منطقه می‌توان به کشاورزی، بیولوژی استان و شناسایی سویه‌های بومی منطقه کمک کرد. شناسایی قارچ‌های مناطق مورد نظر و متعاقب آن بررسی اثرات مابین قارچ‌ها و بررسی فعالیت آنها در خاک سایر مناطق استان از نقطه نظر اکولوژیکی، اقتصادی، علمی و ...کاملا ناشناخته است.

مواد و روش‌ها

این تحقیق با هدف بررسی فلورغالب قارچی و باکتریایی ریزوسفر و شناسایی ریز ساز واره‌های مولد آنزیم فسفولیپاز و کیتیناز در خاک‌های حاصلخیز ایرانشهر در سال ۱۳۹۵صورت پذیرفت.

الف) نمونه برداری: نمونه‌گیری از خاک شهر ایرانشهر در فاصله‌ی ۳۲۶ کیلومتری شهر زاهدان مرکز استان سیستان و بلوچستان در تاریخ۹۵/۸/۱۵ در هوایی آفتابی ساعت ۱۴ الی۱۷ از خاک مناطق قابل کشت زراعی و پای درختان انجام شد. تعداد ۱۸ نمونه خاک (تا عمق ۱۰ سانتی‌متر) جمع‌آوری و از هر محیط نمونه‌برداری حدود یک کیلوگرم خاک جدا گردید. نمونه‌گیری از پای درختان و گیاهان گوناگون با فواصل نزدیک و دور صورت پذیرفت، در مجموع ۱۸ نمونه خاک از نقاط برداشته و توسط دستگاه GPS محل جغرافیایی نمونه برداری به‌صورت دقیق و با دقت سانتی‌متر (UTM) ثبت شد. در طول نمونه‌برداری هر نمونه خاک به‌صورت جداگانه در ظرف-های درب‌دار یک کیلوگرمی پلاستیکی بسته‌بندی و در شرایط محیط نگهداری شد، جهت جلوگیری از آلودگی‌ها انتقال در شرایط تقریبا عاری از تماس با محیط پیرامون، ظرف‌ها به آزمایشگاه دانشگاه آزاد واحد زاهدان منتقل گردید و پس از انتقال در یخچال نگهداری شدند.

ب)جداسازی قارچ‌ها و باکتری‌ها از خاک: عمل رقت‌سازی بر روی نمونه ها به‌صورت ده‌دهی انجام شد. هر نمونه خاک به رقت ۱۰ به توان ۵ + رقیق گردید. ($۱۰^{+۵}$) سپس از هر نمونه حجم مساوی ۰/۵ میلی‌لیتر به محیط-های کشت افتراقی YJC و منتقل گردید و برای جداسازی باکتری‌ها نیز از محیط نوترینت آگار استفاده شد (Hoster *et al*., 2005). این محیط کشت‌ها از کمپانی میرمدیا خریداری و طبق روش مندرج بر روی آنها ساخته شد بود.

با توجه به یکسان بودن محیط تلقیح، محیط‌ها نیز در شرایط یکسان از نظر دما، رطوبت، میزان نور و سایر شرایط نگهداری شدند. شرایط نگهداری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد (دمای اتاق) (طاهری و همکاران، ۱۳۹۵) و پس از سه روز قارچ‌ها روی محیط‌ها رشد کردند که این مدت برای باکتری‌ها ۱۸ ساعت بود. نمونه‌های محیط کشت دارای قارچ‌های متفاوت و بسیاری بودند، اما در برخی محیط‌ها نیز فقط یک نوع قارچ دیده می‌شد که عمل خالص‌سازی را آسان می‌کرد. در این مرحله ۳۷ کلنی قارچی جداسازی و ۲۷ کلنی باکتریایی براساس تفاوت‌های مورفولوژیک جداسازی شدند. برای خالص‌سازی مقداری از میسیلیوم قارچ‌ها و کلنی باکتری‌ها به وسیله‌ی لوپ جدا و جهت کشت مجدد به محیط جدید منتقل می‌شد. از قارچ‌های جداشده در هر محیطی که رشد بهتری داشتند، برای خالص‌سازی مجدد، استفاده شد. صبح روز بعد برای جداسازی اولیه بر روی دو محیط کشت PDA و YGC برای خالص‌سازی استفاده شدند و به‌مدت ۷۲ ساعت انکوبه گردیدند و بالاترین سرعت رشد مربوط به جنس‌های *موکور و ریزوپوس* بود.

کلنی‌های قارچی فاقد آلودگی با مخمر؛ قارچی و باکتری صورت خالص درآمدند. برای حذف آلودگی‌ها محیط کشت جدید تهیه و زیر هود با دقت بیش‌تری میسلیوم و یا اسپور قارچی جدا شده و به‌وسیله آنس و لوپ به محیط جدید منتقل گردید. نمونه‌های خالص از کلنی‌های قارچی سپس روی اسلنت‌های حاوی محیط کشت های PDA و YGC برده شدند. بعد از پنج روز کلنی‌ها رشد کرده روی اسلنت این نمونه‌ها برای نگهداری و استفاده در مراحل بعدی به یخچال انتقال داده شدند.

پ)شناسایی اولیه براساس مرفولوژی و کلیدهای شناسایی: ویژگی‌های فنوتیپی و مشاهدات میکروسکوپی جدایه‌های قارچی به‌منظور بررسی ویژگی‌های فنوتیپی و مورفولوژیکی در کشت‌های پنج روزه جدایه‌های قارچی روی محیط کشت‌های PDA و YGC و براساس کلیدهای شناسایی قارچی انجام شد. برای شناسایی باکتری ها در این مرحله از مرفولوژی کلنی، رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی متداول IMVIC استفاده گردید.

ت)آماده سازی کیتین:

میزان یک گرم کیتین (Sigma) را در ۱۲میلی‌لیتر از اسیدکلریدریک غلیظ در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد هم زده و حل گردید. ۴۰۰میلی‌لیتر اتانول سرد خالص اضافه و در دمای اتاق همزده و در روز بعد کیتین را با سرعت ۶۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ نموده و سه بار با آب خنثی شستشو داده شد (کشاورز و همکاران، ۱۳۹۰).

ث)جداسازی ریزساز واره‌های مولد آنزیم کیتیناز: جهت بررسی تولید کیتیناز توسط سویه‌های خالص سوبسترای کیتین از کمپانی سیگما تهیه و با محیط کش‌ها با نسبت حجمی ۳٪ افزوده گردید. ریزسازواره‌ها به‌صورت خالص به این محیط‌ها با استفاده از آنس (استفاده از لوپ می‌تواند تعداد متغیری از باکتری‌ها را منتقل کرده و در نتیجه ی شعاع هاله موثر باشد) به مرکز پلیت مورد نظر منتقل شدند. قارچ‌هایی که توانایی تولید کیتیناز داشتند بعد از ۷۲ ساعت در صورت ایجاد هاله اطراف کلنی مثبت در نظر گرفته شدند.

ج)جداسازی ریزسازواره‌های مولد آنزیم فسفولیپاز: همزمان برای انجام تست فسفولیپاز ریزسازواره‌ها نیز لیسیتین حاصل از تخم‌مرغ جداسازی و با نسبت حجمی ۱۰٪ با محیط‌های فوق‌الذکر اضافه گردید (حسینی و همکاران، ۱۳۹۴). این محیط نیز مثبت‌بودن ترشح آنزیم فسفولیپاز را با ایجاد هاله نشان می‌دهد، با این تفاوت که زرده‌ی تخم مرغ به میزان ۱۰ ٪ حجم وزنی به‌عنوان سوبسترا به محیط کشت افزوده می‌شود. ریزسازواره‌ها به محیط کشت منتقل و براساس هاله جداسازی و سپس بر پایه ی شعاع هاله مرتب گردیدند. قارچ‌ها پس از شناسایی در یخچال نگهداری و هر سه هفته پاساژ داده می‌شدند.

قارچ‌ها و باکتری‌ها به‌صورت خالص مجدداً به این محیط‌ها منتقل شدند و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد (دمای اپتیمم رشد) انکوبه گردیدند، بعد از ۷۲ ساعت هاله‌های ترشح آنزیم در پلیت‌ها دیده شد.چون افزودن سوبسترا به محیط باعث ایجاد کدورت می‌گردد و ریزسازواره در چند روز اول او منابع انرژی موجود در محیط استفاده می‌کند، پس از اتمام آن در صورت توانایی در تولید آنزیم مورد نظر جهت تجزیه‌ی سوبسترا قادر به استفاده از سوبسترای محیط می‌باشد، این قابلیت باعث حذف سوبسترا و مصرف آن توسط ریزسازواره شده که در نتیجه محیط به حالت

پایه‌ی خود بر می‌گردد که با بررسی هـاله در اطراف کلنی در نور قابل بررسی است .

چ)شناسایی ملکولی ریزساز واره‌های مولد آنزیم کیتیناز و فسفولیپاز: تعداد چهار جدایه برای شناسایی مولکولی انتخاب شدند. ملاک انتخاب قدرت در تولید آنزیم و در نظر گرفتن نوع ریزسازواره‌ها (قارچ و باکتری) بود.

جدول۱: پرایمرهای استفاده شده در PCR به روش 18 EC

Table ۱: Primers Used in PCR by 18 EC Method

Primer	Primer sequences 5'_3'
EC18-F	Its1: TCCGTAGGTGAACCTGCGG
EC18-R	Its4: TCCTCCGCTTATTGATATGC

جدول ۲: پرایمرهای استفاده شده درواکنش زنجیره‌ای پلی‌مرازی (PCR) به روش 16EC

Table 2: Primers Used in Polymerase Chain Reaction (PCR) by 16EC

Primer	'Primer sequences 5'_3
F	16F27 (5-CCAGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3)
R	16R1488 (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')

ح)الکتروفورز روی ژل آگارز: الکتروفورز موجب حرکت مولکول‌های باردار در میدان الکتریکی می‌شود. در این فرآیند خصوصیات فیزیکوشیمیایی مولکول‌ها نقش موثر دارند. دامنه غلظت آگارز در روش‌های مختلف از ٪۰/۴ تا ٪۴ اسـت و قطر منافذ از ۱۰۰ nm تا ۳۰۰nm متغییر است. در این تحقیق برای الکتروفورز DNA از ژل آگارز ٪۱ استفاده شد.

خ) بررسی آنزیم به روش اسپکتوفتومتری: برای این منظور محیط کشت‌های براث طبق فرمولاسیون فوق تهیه شد و با همان نسبت نیز سوبسترا به حجم محیط کشت افزوده گردید. ریزسازواره‌ها به محیط کشـت‌ها تلقیح و به‌مدت ۹۶ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. مقداری از محیط کشت‌های اولیه که باقی مانده بود به‌عنوان بلانک نگهدای شد با توجه به اینکه تنها تفاوت بلانک با نمونه‌ی تحت آزمایش در روش اسپکتوفتومتری تنها باید خود ماده‌ی تحت آزمایش باشد بنابراین برای حذف ریزسـازواره‌ها از محیط ثانویه از فیلترهای میکروبی سرنگی استفاده شد.

نمونه‌ها با دستگاه اسپکتوفتومتر با توجه به طول موج‌های مشخص اندازه‌گیری شد. طول موج اسـتاندارد برای اندازه‌گیری کیتیناز با استفاده از روش اسپکتوفتومتری ۵۱۰ نانومتر و برای فسفولیپاز نیز طول موج استاندارد ۲۸۰ نانومتر (حسینی و همکاران، ۱۳۹۴) در نظر گرفته شد.

د) بهینه سازی شرایط تولید آنزیم: بررسی شرایط بهینه‌ی تولید آنزیم با توجه به‌میزان سوبسترا، دما و اسیدیته‌ی محیط بررسی گردید.

نتایج و بحث:

فراوانی ریزسازواره‌ها

جدول زیر مربوط به جدایه‌های خاک و میزان فراوانی آنهاست:

جدول ۳: فراوانی قارچها

Table 3: Frequency of fungi

ردیف Number	قارچ Mucor	تعداد قارچها پس از تعیین گونه Number of fungi after determination of species
1	Mucur موکور	9
2	Rhizopus رایزوپوس	7
3	Aspergillusniger آسپرژیلوس نایجر	5
4	Aspergillusfumigatus آسپرزیلوس فومیگاتوس	4

5	Penicillium پنی سیلیوم	3
6	Cladosporium کلادوسپوریم	3
7	Epidermophyton اپیدرموفایتون	2
8	Chlamydospore کلامیدوسپور	2
9	Alternaria آلترناریا	2

جدول :۴ فراوانی باکتری‌ها

Table 4: Frequency of bacteria

ردیف Number	باکتری Bacteria	تعداد کلنی‌ها در کلنی کانت Number of colonies in colony count
1	Pseudomonas پسودوموناس	7
2	Azotobacter ازتوباکتر	6
3	Azomonas آزوموناس	5
4	Azorhizobium آزوریزبیوم	3
5	E. coli ای کلای	3
6	Streptococcus استرپتوکوکوس‌ها	3

شناسایی مولکولی ریزسازواره‌های غالب مولد آنزیم: برای انجام تست واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی بعد از استخراج DNA برای مشاهده‌ی وزن نمونه های RNA قبل از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی آزمایش الکتروفورز انجام شد که نتایج حاصل به صورت زیر است. سنجش وزن نمونه‌ها به‌وسیله‌ی الکتروفورز قبل از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی کمک نمود تا بتوان وزن مولکولی نمونه ی اصلی در قبل و بعد از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی تطبیق داد.

نتایج حاصل از بررسی جذب نوری: با روش بررسی جذب نوری و با توجه به داشتن طول موج مشخص برای هر پروتئین یا آنزیم می‌توان از طریق بررسی میزان جذب آن ماده در آن طول موج و هماهنگی بین جواب‌ها، به ماهیت آنزیم تحت بررسی پی برد. طول موج استاندارد برای اندازه‌گیری لیپاز قارچی با استفاده از روش اسپکتوفتومتری نانومتر۴۱۰ و برای فسفولیپاز نیز طول موج استاندارد ۲۸۰ نانومتر (حسینی و همکاران، ۱۳۹۴) در نظر گرفته شد.

جدول ۵: قارچ‌های غالب دارای آنزیم کیتیناز و میزان تولید براساس دانسیته‌ی نوری

Table 5: Dominant fungi contain chitinase enzyme and production based on optical density

شماره Number	دانسیته ی نوری Optical density	جنس قارچ‌های دارای کیتیناز Chitinase secreted fungi
FL-7	0.063	Mucorhiemalis
FL -20	0.054	Aspergillusfumigatus

جدول ۶: میزان جذب آنزیم فسفولیپاز

Table 6: Phospholipase Enzyme Absorption Rate

شماره Number	دانسیته ی نوری Optical density	جنس قارچ‌های دارای فسفولیپاز Phospholipase secreted fungi
FP – 7	0.183	Mucorhiemalis
FP -9	0.12	Aspergillusfumigatus

جدول ۷: باکتری‌های دارای کیتیناز
Table 7: Chitinase secreted bacteria

ردیف Number	دانسیته‌ی نوری Optical density	جنس و گونه Gender and species
Lp-6	0.026	سودوموناس پوتیدا
Lp-11	0.0159	سودوموناس آئروژینوزا

جدول ۸: باکتری‌های دارای فسفولیپاز
Table 8:phospholipase secreting bacteria

ردیف Number	دانسیته‌ی نوری Optical density	جنس وگونه Gender and species
Lp-11	0.0159	سودوموناس آئروژینوزا
Lp-7	0.023	باسیلوس سوبتیلیس

میزان پراکنش قارچها و باکتری‌های موجود در محیط گرچه با فرضیه‌های تحقیق تطابق داشت، اما با برخی از اهداف مغایرت داشت. در مبحث قارچها با توجه به حضور فعال آسپرژیلوس*(Aspergillus)* در کلیه‌ی شرایط هـوازی اعم از هوا و سطح خاک (گاراژیان و همکاران، ۱۳۹۵) پیش‌بینی غالب بودن این قارچ در منطقه یک فرضیه‌ی قوی بود که در پژوهش، قارچ موکور به‌عنوان قارچ غالب تعیین گردید. غالب بودن باکتری *سودوموناس* با توجه به قدرت آنزیم فوق‌العاده بالای این باکتری به علت پلاسمیدهای زیاد (خسروی و همکاران، ۱۳۹۵)، توانست کد کننده‌ی آنزیم باشند، که دور از فرضیه تحقیق نبود. با توجه به این که سوبسترای آنزیم‌های فوق قـــبل از نمونه‌برداری به خاک افزوده نشده بود تا تله‌گذاری برای جذب ریزسازواره‌ها شود و از جایی که خاک به خودی خود عاری از سوبسترایی مانند کیتیناز و فسفولیپاز است، می‌توان حضور این ریزسازواره‌ها را در خاک چنین بیان نمود:

این ریزسازواره‌ها در خاک حضور دارند و زندگی همزیست خود با گیاهان را ادامه می‌دهند و در این همزیستی متابولیت‌های دیگری تولید می‌کنند (شهریاری و همکاران، ۱۳۹۵)، در حالت اول باید گفت ایـــــــن ریزسازواره‌ها، از ویژگی ترشح این آنزیم خود در حالت عادی استفاده نمی‌کنند و بستگی به سوبسترای محیط دارد مانند باکتری *سودوموناس* که قدرت آنزیمی بالایی دارد اما در حالت عادی تمام آنزیم‌ها را هم زمان ترشح نمی‌کند؛ به‌عنوان مثال با توجه به دخالت‌های انسانی، گیاهان خشک شده، برگ‌های افتاده و .. .مقداری سوبسترا وارد خاک می‌شود که این ریزسازواره‌ها در صورت نـاکافی بودن املاح و مواد معدنی با ترشح آنزیم شروع به جذب این مواد به‌عنوان منبع انرژی ثانویه از محیط می‌کنند اما نباید از این نکته غافل شد که بر خلاف فسفولیپید مقداری کیتین گیاهان در خاک برای ریزسازواره‌ها در دسترس است. فسفولیپاز از طریق رفت و آمد انسان‌ها و آلودگی‌هایی که از طریق مواد غذایی خود ایجاد می‌کنند و همچنین مرگ و میر جانوران منطقه و تجزیه ی اجساد آنان وارد خاک می‌شود. کیتین در دیواره سلولی گیاهان قرار دارد، یکی از منابع کتین درختان است ولی منابع دیگر کتین بسیار است و وجود آن در خاک دور از انتظار نیست. پس از ریزش و تجزیـــــــه‌ی سلولی گیاهی، ریزسازواره‌های دارنده‌ی آنزیم کیتیناز به آن تهاجم و از این سوبسترا به‌عنوان ماده ی غذایی بهره می برند.

ریزسازواره‌ها غالب، تولید کننده‌ی آنزیم موکور بود که علاوه بر بالاترین میزان توانایی تولید آنزیم، بیش‌ترین پراکندگی در منطقه را نیز داراست، این مطلب با پژوهشی مشابه در استان گلستان همخوانی دارد(حسینی و همکاران، ۱۳۹۴) که می‌تواند نوعی تایید کننده‌ی پوشش یکسان مناطق سرسبز و دارای خاک حاصلخیز باشد. که می‌توان به دو گونه نتیجه گرفت: ۱- از کود بیولوژیک سایر مناطق هم می‌توان برای ایرانشهر بهره برد. ۲- باید جنس و گونه‌ی ریزسازواره‌های غالب به‌طور دقیق شناسایی شوند و با سایر مناطق حاصلخیز مقایسه گردند.

در مورد فعالیت هیدورولیزی باکتری *سودوموناس* در استفاده از سوبستراها به‌وسیله‌ی تولیـد آنزیم به‌علت داشـتن انواع زیادی از پلاسمیدها قابل پیش‌بینی بود.

یکی از مهم‌ترین ریزسازواره‌های ناقـــص است که در موادغـذایی حـائز اهمـیت *آسپرژیلوس* می‌باشد و از نظر پراکندگی در طبیعت در درجه اول اهمیت قرار دارد. اسپورهای *آسپرژیلوس* از مناطق قطبی تا حاره‌ای پراکنده اند. هر ماده آلی که به اندازه‌ی کافی رطوبت داشته باشد، می‌تواند مورد استفاده آن‌ها قرار گیرد .

تجزیه ترکیبات معدنی و آلی فسفردار که بخش عمده آن به‌صورت املاح غیرمحلول آهن، کلسیم و آلومینیوم است در خاک به‌وسیله باکتری‌ها انجام می‌گیرد. ریزسازواره‌های خاک به‌عنوان منبعی از فسفر در چرخه بیو ژئوشیمی یاد می‌شوند. ممکن است ترشح آنزیم فسفولیپاز نیز نوعی رابطه‌ی مثبت مابین ریزسازواره‌ها یا ریزسازواره ها و گیـاهان باشد که باعث شکـسته شدن فسفولیپید به فسفر و لیپید می‌شود. فسفر یک عنصر محرک رشد برای گیاه و لیـپید یک ماده‌ی غذایی برای ریزسازواره ها است .طبق نتایج به دست آمده، آنزیم کیتیناز در روزهای سوم و چهارم کشت ترشح می‌شود که ریزسازواره‌ها از نظر منحنی رشد وارد فاز سکون می‌شود با نتایج تحقیقات طاهری در سال ۱۳۸۰ مطابقت دارد (طاهری و همکاران، ۱۳۹۵)، می‌توان علت این اتفاق را در بودن دو نوع ماده‌ی غذایی در محیط دانست، زیرا ریزسازواره‌ها پس از اتمام ماده غذایی ساده‌تر محیط به سمت ماده‌ی غذایی دوم می‌روند (سوبسترای موجود در محیط) و ریزسازواره‌ها پس از رشد اولیه به آن مرحله می‌رسد. از مجـــــموع ۶۴ ریزسازواره‌ها جدا شده در این تحقیق، ۲۰ ریزسازواره‌ها، توانایی تولید آنزیم کیتیناز و ۱۰ ریزسازواره‌ها توانایی تولید فسفولیپاز را داشتند، در خصوص قارچ مولد آنزیم کیتینار در تحقیقات افضلی و همکاران نیز در سال ۱۳۸۷ پنیسیلیوم به‌عنوان ریزسازواره‌ها غالب در تولید کیتیناز در نظر گرفته شد که با نتایج این تحقیق همخوانی دارد.

نتایج حاصل از اسپکتوفتومتری نشان داد که این آنزیم‌ها با آنزیم‌های استاندارد بررسی شده قبلی نزدیک هستند و تنها کیتینازی که رایزوپوس اوریزا تولید می‌کند، جذبی بالاتر از سایر گونه‌ها دارد به‌علت بالاتر بودن میزان جذب OD این ریزسازواره ها می‌توان بیان کرد که غلظت آنزیم بالاتری دارد.

تغییرات pH نشان داد افزایش و کاهش pH به سمت قلیایی یا اسیدی شدن، باعث کاهش شدید ترشح آنزیم می‌شود. دمای محیط تحقیق هرچه به ۳۷ درجه سانتی گراد نزدیک‌تر شد، میزان ترشح آنزیم افزایش داشت. می توان چنین نتیجه گرفت کیتیناز را فقط در حد فرضیه برای این تحقیق نوعی فاکتور بیماری‌زایی برشمرد، که در بحث صنعتی‌سازی و بررسی عوامل بیماری‌زا در خاک جهت مبارزه یا درمان بیماری‌های احتمالی در کشاورزان اهمیت بسیاری دارد (Adnan, 2015).

نتیجه گیری کلی

خاک کشاورزی منطقه ایرانشهر در استان سیستان و بلوچستان از دیدگاه میکروبی به‌علت داشتن تنوع بالای قارچی و باکتریایی مفید که توان تولید آنزیم‌هایی مانند فسفولیپاز و کیتیناز و به احتمال زیاد سایر آنزیم‌ها را دارا می‌باشد و همچنین ایجاد روابط هم‌افزایی (سینرژیسم) فی مابین باعث ایجاد شرایطی بهینه برای کشاورزی گردیده است. این ریزسازواره‌ها در صورت انجام مطالعات کمّی و تکمیلی می‌توانند گزینه ی مناسبی برای تولید آنزیم‌های صنعتی به شمار روند. همچنین می‌توان با مطالعه‌ی تعداد و انواع این ریز ساز واره‌ها، خالص‌سازی و تولید کود میکروبی مناسب و تلقیح به خاک سایر نقاط استان با شرایط اکولوژیکی مشابه ایرانشهر، امید به اصلاح خاک آن مناطق داشت.

منابع مورد استفاده **References**

افضلی، س. ۱۳۸۷. جداسازی سویه‌های مولد آنزیم لیپاز خارج سلولی از محیط و بهینه‌سازی تولید آنزیم. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، گروه میکروب شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل ۱۳۸۷.

باباشپور، س.، امین‌زاده، س، خسروشاهلی، م. و کشاورز، م. ۱۳۹۰. جداسازی و همسانه سازی ژن آنزیم کیتیناز از باکتری Serratia marcescens B4A جدا شده از استخرهای پرورش میگو، نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی ۷ (۱).

حسینی، ه.، ارزانش، م. ح. و آجودانی فر، ه. ۱۳۹۴. بررسی شناسایی و جداسازی قارچ تولیدکننده‌ی آنزیم فسفولیپاز در خاک جنگلی نهارخوران گرگان، کنفرانس ملی زیست شناسی و علوم زیست محیطی، گرگان، مرکز علمی و کاربردی خانه کارگر گرگان.

خداشناس، ع.،کوچکی، ع.، رضوانی مقدم، پ.، لکزیان، ا. و نصیری محلاتی، م. ۱۳۸۹. ارزیابی اثر فعالیت‌های کشاورزی بر تنوع و فراوانی باکتری‌های خاک‌زی.علوم آب و خاک (علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی): ابستان ۱۳۸۹، دوره ۱۴، شماره ۵۲، ۹۹ - ۱۱۳.

خسروی، ن.، درویشی، ش. و داوری، ک.۱۳۹۴. بررسی اثر ضدپلاسمیدی عصاره‌های آبی و الکلی (با حلال‌های اتانولی و دی متیل سولفو اکساید) برهم ومکردستان بر باکتری سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به آنتی‌بیوتیک، سومین کنفرانس بین المللی رویکردهای نوین در علوم، مهندسی و تکنولوژی، دبی، شرکت پنداران دیش رهپو.

زارع، و.، طباطبایی یزدی، ف. و سیدعلی مرتضوی، س،ع. ۱۳۹۲. کاربردهای نوین لیپاز در صنعت غذا، بیست و یکمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی، شیراز، دانشگاه شیراز.

سیداصلی، ن.، حریقی، م.ج.، مطلبی، م. و زمانی، م. ۱۳۸۳. مطالعه تولید آنزیم کیتیناز در قارچ تریکودرما، زیست شناسی ایران: پاییز ۱۳۸۳، دوره ۱۷، شماره ۳، ۲۲۷ - ۲۴۶.

شهریاری، ف.، عقیقی، س. و شهیدی بنجار، غ.ح. ۱۳۹۵. جداسازی اکتینو باکتری‌های ریزوسفرگیاه زیره سبز (*Cuminum cyminum* L) با هدف به‌کارگیری در بازدارندگی بیماری پژمردگی فوزاریومی، همایش علمی پژوهشی کشاورزی، مهندسی ژنتیک و گیاهپزشکی ایران، به صورت الکترونیکی، شرکت علم محوران آسمان.

طاهری، م.، میثاقی، ع.؛ آخوندزاده بستی، ا. و مدرسی، م. ح. ۱۳۹۵. اثر اسانس سیر بر رشد باکتری اشرشیاکلی :O_{157} H_7 و تولید شیگاتوکسین ۲، فصلنامه تحقیقات دامپزشکی. ۷۱ (۱).

قربانی، ن. و قانع، م. ۱۳۹۶. جداسازی و شناسایی باکتری‌های نمک دوست نسبی تولید کننده پروتئاز از خاک‌های شور. دنیای میکروب‌ها: زمستان ۱۳۹۶، دوره ۱۰، شماره ۴ (پیاپی ۳۳) #a، ۳۳۲ - ۳۲۲.

کاراژیان، ر.، حبیبی نجفی، م.ب.، یاورمنش، م. و عدالتی اندوم، م.ر. ۱۳۹۵ .اندازه گیری کپک *آسپرژیلوس نایجر* در رب گوجه فرنگی به روشReal Time، فصلنامه علمی پژوهشی میکروبیولوژی کاربردی در صنایع غذایی ۲ (۱).

کشاورز، م.، احمدی زیدآبادی م.، احمدیان غ. ر. ۱۳۹۰. کلونی نگو بیان ژن آنزیم ضد قارچ نوترکیب کیتیناز باسیلوس پومیلوس در باسیلوس سوبتیلیس ۱۶۸کومش. ۱۵۸-۱۵۱ (۲)۱۳.

Adnan, A. 2015.Pakistan Research RepositoryIncorporation of terminal phosphorothioates into oligonucleotides Nucleic Acids Research, 26 (21). pp. 4983-4988. ISSN 1362-4962.

Hoster, F., Schmitz, J.E., Daniel, R. 2005. Enrichment of chitinolytic microorganisms: Isolation and characterization of a chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel Streptomyces strain. Microbiol Biotechnol 2005; 66 (4): 434- 42

Whitman,W.B., Coleman D.C., Wiebe,W.J. 1998.Prokaryotes: the unseen majority .Proc Natl Acad Sci U S A .1998 Jun 9;95(12): 6578-6583.