جداسازی و خالص سازی باکتریهای بومی جنس آزوسپیریلوم و بررسی کیفی توان تولید HCN آنها

حسینعلی علیخانی، سید مهدی عرب، غلامعباس اکبری، محمد حسین ارزانش و ایرج اله دادی
به ترتیب استادیار دانشکده کشاورزی کرج- دانشگاه تهران، دانشجوی کارشناسی ارشد مجتمع آموزش عالی ابوریحان- دانشگاه تهران، استادیاران مجتمع آموزش عالی ابوریحان- دانشگاه تهران، عضو هیأت علمی موسسه خاک و آب تهران، استادیاران مجتمع آموزش عالی ابوریحان- دانشگاه تهران

مقدمه

آزوسپیریلوم[1] یکی از معروفترین میکروارگانیزم هایی است که می‌تواند در ریزوسفر غلات و اطراف ریشهٔ آنها کلونی تشکیل دهد. دو برینر و همکاران (۵) برای اولین بار گزارش نمودند که این باکتری به مقدار بسیار زیاد و گسترده ای در ریزوسفر تعدادی از گیاهان علفی مناطق گرمسیری یافت می‌شود. پس از آن آزوسپیریلوم از ریشهٔ تعداد زیادی از گیاهان علفی و وحشی و زراعی از جمله غلات، حبوبات و در خاک‌های مناطق مختلف دنیا با شرایط گرمسیری، نیمه گرمسیری و معتدل جداسازی شد.

سالهاست که باکتری جنس آسپیریدوم به عنوان عامل محرک رشد گیاه (PGPR)[2] شناخته شده است. اثرات مفید این باکتری بر روی محصولات زراعی چه در محیط گلخانه و چه در مزرعه به اثبات رسیده است(۱۵). اکثر باکتریهای خاکزی جنس آزوسپیریلوم موادی را ترشح می‌کنند که رشد گیاه را تحریک کرده و از گسترش عوامل بیماریزا جلوگیری به عمل می آورند (۷).

کنترل و از بین بردن بیماری‌های خاکزی توسط میکروارگانیزم‌ها، که از اثرات غیر مستقیم PGPR ها محسوب می شود ـ ممکن است به یکی از فعالیت های زیر مربوط باشد: ۱ـ تولید آنتی بیوتیکها (۳) ـ ۲ـ تولید انواع سیدروفورها و محروم کردن عوامل بیمارگر گیاهی از آهن قابل استفاده خاک (۱۳) ـ ۳ـ تولید آنزیمهای هیدرولیتیک برون سلولی (۶) ـ ۴ـ بالابردن مقاومت سیستمیک ISR[3] (۱۲) ۵- تولید فیتوتوکسینهای متنوع و ناشناخته (۱۴) و ۶ـ تولید متابولیستهای ثانویه ای مانند HCN[4](۲).

سیانید پتانسیل بازدارندگی آنزیم هایی که مسئول فرآیندهای اصلی متابولیکی گیاه مانند تنفس، تجمع نیترات و CO_2 و متابولیسم کربوهیدرات هستند را دارا می باشد و همچنین ممکن است با اتصال به پروتئین پلاستوسیانین، انتقال الکترون در فتوسنتز را متوقف کند(۸). کرمر و همکاران در سال ۱۹۹۰ گزارش کردند که در حدود ۳۳ - ۲۷٪ از باکتری های سودوموناس از رشد طولی ریشه در علف هرز گاو پنبه جلوگیری به عمل می آورند(۱۰). به علاوه استفاده از باکتریهایی سیانوژن (مولد HCN) در کنترل علف های هرز بسیاری از جمله دم روباهی، پیچک صحرایی و بارنیارد‌گراس به اثبات رسیده است.

ثابت شده است که هیدروژن سیانید تولید شده توسط باکتری ها، سیستم تنفسی قارچ های بیمارگر گیاهی را مختل نموده، از رشد و فعالیت آنها جلوگیری می کند (۲). به طور کلی این گروه از باکتری ها اثرات متفاوتی بر روی رشد گیاهان از خود نشان داده اند(بعضی محققین اثر آنها را سودمند و بعضی دیگر وجود اینگونه باکتریها را مضر دانسته اند). مقدار تولید HCN توسط باکتری ممکن است به وجود پیش ماده هایی از قبیل: گلایسین، متیونین و ترشحات مختلف ریشه ای که حاوی گلوکوزیدهای سیانوژنیک هستند وابسته باشد (۴).

این تحقیق اولاً به منظور شناسایی، خالص سازی و اطلاع از فراوانی باکتری های آزوسپیریلوم بومی خاک های ایران و ثانیاً ارزیابی کیفی توان تولید HCN توسط آنها، مورد آزمون و بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

۱) جداسازی، خالص سازی و شناسایی باکتری های جنس آزوسپیریلوم : باکتریهای جنس آزوسپیریلوم در ریزوسفر بسیاری از گیاهان خانوادهٔ گرامینه (Gramineae) یافت می‌شوند. به همین دلیل، تعداد ۸۰ نمونهٔ گیاهی از این خانواده (گندم، ذرت، جو، علف باغی، مرغ، چمن، چچم و...) از سطح استان‌های تهران و خوزستان جمع‌آوری و ریشه‌ها جداسازی شدند. ریشه‌ها به قطعات ۲-۱ سانتیمتری تقسیم شده و با آب مقطر به خوبی شستشو داده شدند. سپس در محیط کاملاً استریل در انتهای لوله‌های آزمایشی حاوی محیط نیمه جامد Nfb[5] حاوی برموتیمول بلو قرار داده شدند (در دو تکرار). پس ازسه روز محیط سبز رنگ به دو قسمت آبی رنگ (در بالا) و سبز شفاف (در پایین) تبدیل شده و هاله ای سفید رنگ به فاصله ۸-۴ میلی متر از سطح محیط نشان دهنده احتمال وجود باکتری های جنس آزوسپیریلوم در نظر گرفته شد. نمونه هایی که در محیط Nfb (Semi-solid) ایجاد هاله کرده بودند (با آلوده کردن حلقه پلاتین در قسمت تشکیل هاله) به محیط جامد CR[6] کنگورد دار منتقل شده و در انکوباتور در دمای ۳۷-۳۴ درجه سانتیگراد قرارداده شدند. پس از ۱۰-۷ روز کلونی های مشکوک به آزوسپیریلوم (با مشخصات جذب کنگورد، چروکیده، خشک و زخم مانند با حواشی مضرس) شناسایی و به محیط NFb (مایع) منتقل شدند. با تشکیل مجدد هاله در محیط، به احتمال قریب به یقین می‌توان گفت که کلونی مورد نظر Azospirillum است. پس از شناسایی و بازکشت‌های متوالی، کلونی‌ها خالص شده و به Slant برای آزمایشات بعدی منتقل شدند.

1- Azospirillum
2- Plant Growth Promotiong Rhizobacteria
3- Induced Systemic Resistance
4- Hydrogen Cyanide
5- N- Rreesemisolid Malate Broth
6- Congo Red Agar Medium

۲) تشخیص گونه A. lipoferum از دیگر گونه‌ها:

برای این منظور از محیط نیمه جامد Nfb بدون اسید مالیک و حاوی گلوکز به عنوان قند اختصاصی استفاده گردید. به این صورت که مقدار Vcc از محیط Nfb عاری از اسید مالیک به درون لوله های آزمایش ریخته و به میزان 0.7 ml از محلول گلوکز (۱ ml در ۱۰۰ گرم آب مقطر) استریل شده درون هر لوله اضافه شد. لوله‌های حاوی محیط کشت را با باکتری‌های خالص آزوسپیریلوم مایه کوبی نموده و نمونه هایی که در محیط هاله تشکیل دادند شناسایی شدند.

در مجموع تعداد ۶۰ ایزوله باکتری آزوسپیریلوم در این تحقیق استفاده گردیدند که از این تعداد حدود ۳۰ جدایه از کلکسیون موسسه تحقیقات خاک و آب کشور و مابقی از ریشه گیاهان گرامینه موجود در استان‌های خوزستان و تهران جداسازی، خالص سازی و شناسایی شدند. کلیه باکتری‌های جنس آزوسپیریلوم برای بررسی در محیط جامد RC تجدید کشت و جوان شدند.

۱) آزمون کیفی توان تولید HCN:

تعیین توان تولید هیدروژن سیانید در باکتری های جنس آزوسپیریلوم (در حدود ۶۰ ایزوله بدست آمده)، با استفاده از روش پیشنهادی لورک (۱۹۴۸)، اصلاح شده توسط آلستروم (۱۹۸۷) انجام گردید(۱). ابتدا هر جدایه در دو محیط CR و Glycine + CR ، درسه تکرار تلقیح شد و سپس یک کاغذ صافی ($۲cm^2$) آغشته به محلول معرف، شامل پیکریک اسید۱۰٪- کربنات سدیم ($NaCO_3$) ۱٪، در قسمت درب پلیت قرار داده شد. ظروف پتری توسط نوار پارافیلم به دقت درزگیری شدند تا از خروج گاز HCN جلوگیری بعمل آید. سپس این ظروف به صورت واژگون در دمای ۳۰-۲۹ درجه سانتی گراد درون انکوباتور قرار داده شدند.

در صورت تولید HCN توسط باکتری‌های رشد یافته بر روی سطح محیطهای کشت، کاغذ صافی آغشته به محلول معرف که درون هر ظرف پتری تعبیه شده بود می‌بایست از رنگ اولیه زرد به کرم، قهوه ای روشن، قهوه ای تیره و نهایتاً آجری تغییر رنگ می‌یافت. توان تولید HCN با توجه به میزان تغییر رنگ کاغذ معرف درون هر پتری، در دو زمان ۱ و ۲ هفته مورد ارزیابی قرار گرفت. به طور معمول، رنگ کرم کاغذهای صافی نشان دهنده حداقل و رنگ آجری نشان دهنده حداکثر مقدار HCN تولید شده می باشد. بر این اساس توان تولید HCN در چهار سطح مختلف (۱ تا ۴) به شرح ((جدول۱) گروه بندی و سپس تعداد جدایه های آزوسپیریلوم سیانوژن متعلق به هر سطح، شمارش و ثبت گردید.

جدول(۱) سطوح مختلف توان تولید

توان تولید HCN	رنگ کاغذ معرف	سطوح سیانوژن
حداقل	کرم	I
نسبتاً کم	قهوه ای روشن	II
نسبتاً زیاد	قهوه ای تیره	III
حداکثر	آجری	IV

در این آزمایش نمونه‌های شاهد بدین صورت که سطح محیط کشت توسط هیچ باکتری تلقیح نشده ولی برگ آغشته به معرف در درب پتری دیش تعبیه شده بود تهیه و در کنار نمونه‌های بصورت واژگون در انکوباتور قرارداده شدند.

۲) تهیهٔ استاندارد:

به منظور مقایسهٔ نیمه کمی تولید HCN توسط باکتری‌های جنس آزوسپیریلوم استانداردهای ۲۵ nmol KCN، ۲۰، ۱۸،۱۶، ۱۴، ۱۲، ۱۰، ۱۰، ۹، ۸، ۷، ۶، ۵، ۴، ۳، ۲، ۱ و ۰ تهیه گردید. بدین جهت محلول ۱۰ mM KCN درون بالن ژوژه یک لیتری تهیه و به ترتیب به روش سریهای رقت و رقیق کردن، مقادیر ۰.۱ mM، ۰.۲ mM، ۰۰۰ و ۲.۵ mM نیز ساخته شدند. سپس از هر رقت به میزان ۱۰μl بر روی چهار کاغذ صافی ($۲cm^2$) که با معرف پیکریک اسید آغشته شده بودند اضافه شد . در نتیجه این کار طیف رنگی مشاهده شده از کرم، قهوه ای روشن و... قرمز آجری ظاهر شد که امکان مقایسه با تیمار باکتری را به خوبی میسر می نمود.

نتایج و بحث

یکی از اهداف اصلی این تحقیق جداسازی، خالص سازی و شناسایی باکتری های جنس آزوسپیریلوم از ریزوسفر خانواده غلات بوده است که در مجموع سعی شد از طیف وسیعی از گیاهان این تیره نمونه برداری صورت پذیرد. اولین نتیجه گیری در این تحقیق این است که فراوانی این باکتری و احتمال دستیابی به باکتریهای این جنس پایین و در حدود ۱۷٪ است که مستلزم صرف هزینه و زمان بالایی میباشد. نتایج حاصل از این آزمون به شرح زیر است:

احتمال وجود باکتری جنس آزوسپیریلوم در ریزوسفر گیاه ذرت بیشتر از گندم و گندم بیشتر از دیگر غلات سردسیری می باشد. این امر می تواند به دلیل نوع اسید آلی مترشحه از ریشه گیاهان C4 (مانند ذرت، سورگوم، ارزن و ...) و همچنین شرایط مناسب اکولوژیکی برای باکتریهای این جنس در ریزوسفر غلات گرمسیری باشد. در حدود ۶۴٪ از سویه های آزوسپیریلوم از گونه لیپوفروم تشخیص داده شدند که نتایج فوق را تأیید می کند.

نتایج حاصل از آزمون کیفی توان تولید هیدروژن سیانید اندازه گیری شده در ۶۰ سویه آزوسپیریلوم نشان دادند که تعداد و یا درصد بسیار کمی از باکتری های آزوسپیریلوم، توان تولید HCN را داشته (حدود

۷,۳ ٪) و این میزان در بین سویه های آزوسپیریلوم سیانوژن یکسان نیست (جدول ۲). تنها در حدود ۳۰ درصد از سویه ها در محیط گلایسین دار رشد کرده و سویه های سیانوژن تنها در این محیط HCN تولید کرده اند. همچنین بهترین زمان برای قرائت سویه های آزوسپیریلوم پس از دو هفته تشخیص داده شد. با توجه به رنگ ایجاد شده و مقایسه با استانداردها تقریباً می توان گفت که تولید ایزوله ها احتمالاً بین ۱ تا ۴ نانومول HCN بوده است. نکته قابل توجه در این تحقیق این بود که در حدود ۲۰٪ از کلونی هایی که در محیط گلایسین دار رشد کرده بودند به دلایل نامعلومی سیاهرنگ شده بودند.

تاکنون هیچ گزارشی مبنی بر اینکه باکتری های جنس آزوسپیریلوم توان تولید متابولیت‌های ثانویه‌ای همچون HCN را دارند، در مجلات معتبر بین المللی و حداقل در ایران منتشر نشده است. احتمالاً ضعف آزوسپیریلوم نسبت به دیگر باکتری‌ها در تولید این متابولیت‌های ثانویه می تواند یکی از دلائل نپرداختن به این موضوع باشد.

جدول (۲) لیست سویه های آزوسپیریلوم سیانوژن (مولد HCN) در محیط گلایسین

شماره	نام باکتری	سطوح مختلف سیانوژنی
	I II III IV	سطوح مختلف سیانوژنی
۱	کرج۱_ Az 39=I	+
۲	Az 51=۱۰۱	+

منابع مورد استفاده

1-Alstrom, S. and R.G. Burns. 1989. Cyanide production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition.Biol.Fertil.Soils.7: 232-238.

2- Bagnasco, P., L. De La Fuente, G. Gualtieri, F, Noya and A, Anas. 1998. Fluorescent Pseudomonas spp. as biocontrol agents against forage legume root pathogenic fungi. Soil Biol Biochem, 30:1317–1322.

3- Bender, CL, V. Rangaswami and J. Loper. 1999. Polyketide production by plant-associated Pseudomonads. Annu Rev Phytopathol, 37:175–196.

4- Defago, G., C. Berling, U. and Burger, D. Haas, G. Kahr, C., Keel, P. Voisard, B. Wirthner. 1990. Suppression of black root rot of tobacco and other diseases by strains of Pseudomonas Huorescens: potential applications and mechanisms. In: Hornby, D. (Ed.). Biological Control of Soil-borne Plant Pathogens. CAB International, UK, pp. 93-108.

5- Dobereiner, J. I. E. Marriel and M. Nery. 1976. Ecological distribution of spirillum lipoferum Beijerinck. Can. J. Microbiol, 22: 1464 -1473.

6- Fridlender M, J, Inbar, I, Chet .1993. Biological control of soil borne plant pathogens by a b-1,3-glucanase-producing Pseudomonas cepacia. Soil Biol. Biochem, 25:1211–1221.

7- Glick, B. R., D. M., Penrose and J. Li. 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentration by plant growth –promoting bacteria. J. Theor. Biol.190: 63-68.

8- Grossman, K .1996. A role for cyanide, derived from ethylene biosynthesis, in the development of stress symptoms. Plant Physiol 97:772–775.

9- Hebbar, K.P, A.G. Davey, P.J. Dart. 1992. Rhizobacteria of maize antagonistic to Fusarium moniliforme, a soil-borne fungal pathogen: colonization of rhizosphere and roots. Soil Biol `Biochem, 24:989–997.

10- Kremer, R., M., Begonia, L. Stanley and E. Lanham. 1990. Characterizationof rhizobacteria associated with weed seedlings. Applied and EnvironmentalMicrobiology, 56, 1649-1655.

11- Liu L, J.W Kloepper, and S. Tuzun. 1995. Induction of systemic resistance in cucumber against Fusarium wilt by plant growthpromoting rhizobacteria. Phytopathology, 85: 695–698.

12- Loper J.E, J.S, Buyer.1991. Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. Mol Plant-Microbe Interact, 4:5–13.

13- Nehl, D.B, S.J, Allen and J.F. Brown. 1997. Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. Appl Soil Ecol, 5:1–20.

14- Okon, Y., and C. A. Labandera-Gonza´lez. 1994. Agronomic applications of Azospirillum sp. 274–278. In M. H. Ryder, P. M. Stephens, and G. D. Bowen (ed.), Improving plant productivity with rhizosphere bacteria. CSIRO Division of Soils, Adelaide, Australia.