

تعیین توانایی تولید هیدروژن سیانید در برخی سویه‌های ازتوباکتر کروکوکوم بومی خاک‌های تحت

کشت گندم در استان چهارمحال و بختیاری

سعیده رجایی، حسینعلی علیخانی، فائز رئیسی و جواد گیوی

به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد خاکشناسی دانشگاه شهرکرد، استادیار گروه خاکشناسی دانشگاه تهران؛ استادیار و دانشیار گروه خاکشناسی دانشگاه شهرکرد

مقدمه

ازتوباکتر کروکوکوم یکی از باکتری‌های آزاد زی تثبیت کننده نیتروژن ملکولی است. همچنین این باکتری را می‌توان در زمره انواع ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR) نیز قرار داد. ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه گروه وسیعی از باکتری‌های خاکزی هستند که بطور مستقیم و غیر مستقیم موجب تحریک رشد و نهایتاً افزایش عملکرد گیاهان می‌شوند تعدادی از سویه‌های PGPR این کار را از طریق کنترل پاتوژن‌های گیاهی انجام می‌دهند. تحقیقات نشان می‌دهد ازتوباکتر کروکوکوم قادر به کنترل پاتوژن‌های گیاهی نظیر *Fusarium* و *Alternaria*, *Helminthosporium* می‌باشد (۱). مکانیزم‌های زیادی برای کنترل بیولوژیک وجود دارد که

از جمله می‌توان به تولید هیدروژن سیانید (HCN) توسط ازتوباکتر اشاره کرد. هیدروژن سیانید یکی از متابولیت‌های میکروبی می‌باشد که از رشد سایر میکروارگانیسم‌ها جلوگیری می‌کند. در این زمینه در مورد *Pseudomonas*ها مطالعات زیادی صورت گرفته و به عنوان یک باکتری سیانوزنیک شناخته می‌شود (۳) برای تعیین سیانوزنیک بودن ازتوباکتری‌ها از دو روش (invitro) ۱- بر روی محیط کشت جامد وینوگرادسکی حاوی گلايسين و روش ابداعی توسط Alstrom (۱۹۸۹) استفاده می‌شود.

مواد و روش‌ها

نارنجی ایجاد شد. در کاغذ‌ها با غلظت ۸ نانومول کاغذ‌های استاندارد برابری می‌کند. در سویه‌های ۷ \square ۳۶ \square ۴۱ \square ۶۵ \square ۶۶ \square ۶۹ و ۶۱ تغییر رنگ از زرد به کرم ایجاد گردید که با غلظت‌های ۴ نانومول استانداردها مطابقت دارد. در بقیه سویه‌ها تغییر رنگ مشاهده نشد. در روش آلستروم باعث تغییر رنگ کاغذ مشابه روش پیشنهادی بود. تنها ۳۰ درصد سویه‌ها در روش آلستروم قادر به رشد در محیط بودند در حالی که سویه‌های ۷ \square ۳۶ \square ۶۹ و ۴۸ که رشد نکرده بودند در روش پیشنهادی حامل پرلیت رشد کرده و خاصیت سیانوزینیک از خود نشان دادند. به نظر می‌رسد گلاسین یک عامل بازدارنده رشد در محیط جامد معمول برای برخی سویه‌ها محسوب می‌شود روش پیشنهادی آزمون HCN بر پایه ماده حامل دارای کارایی بهتری نسبت به روش آلستروم می‌باشد.

منابع مورد استفاده

- ۱- خسروی، ن، ن. صالح راستین و م. محمدی. ۱۳۷۷. بررسی فراوانی، انتشار و برخی خصوصیات فیزیولوژیک ازوتوباکتر کروکوکوم در خاکهای زراعی استان تهران. مجله علوم خاک و آب. ۱۰: ۸۶-۹۶.
- 2- Alstrom, S. and R.G. Burn. 1989. Cyanide production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition. Biol Fertil. Soil, 7:232-238.
- 3- Gallagher, L.A. and C. Manoil. 2001. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kills *Caenorhabditis elegans* by cyanide poisoning. Journal of Bacteriology. 21:6207-621.

برای ارزیابی توان تولید هیدروژن سیانید از روش آلستروم (۱۹۸۹) و یک روش دیگر پیشنهادی استفاده شد. محیط کشت جامد وینوگرادسکی تهیه شد و ۴/۴ گرم در لیتر گلاسین به این محیط افزوده و پس از استریل شدن محیط در داخل ظروف پتری یکبار مصرف توزیع شد و ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون میکروبی تازه با جمعیت $10^8 \times 1/8$ از هر سویه با ۳ تکرار به هر پلیت افزوده و در سطح پلیت پخش گردید. برای روش پیشنهادی بجای محیط کشت جامد وینوگرادسکی از حاصل پرلیت و محیط مایع NB استفاده شد به این صورت که محلول غذایی NB تهیه و به این محلول ۴/۴ گرم در لیتر گلاسین اضافه می‌شد پس این محلول NB+GLY به نسبت ۲:۱ با پرلیت مخلوط شد. بعد از استریل کردن محیط حاوی پرلیت ۱ گرم از محیط مورد نظر به هر پتری استریل افزوده و ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون تازه میکروبی که از قبل نموده تهیه به حاصل با همان ۳ تکرار اضافه می‌کنیم. بعد از اتمام تلقیح یک عدد کاغذ صافی واتمن در اندازه ۱ در ۱ اشباع با معرف پیکریک اسید و بیکنرینات (۱٪: ۱۰٪) در درب تمام پتری‌ها قرار داده و سپس درب پتری با نوار پارافیلیم به خوبی مسدود شده تا هیچ تبادل گازی با محیط بیرون وجود نداشته باشد. سپس به مدت یک هفته پتری‌ها را در انکوباتور قرار داده و در طول این مدت و بعد از آن تمام پتری‌ها را بررسی می‌کنیم. محلول‌های استاندارد KCN در غلظت‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹ و ۱۰ نانومول برای مقایسه تغییرات رنگ تهیه شد. و به روش فوق مورد استفاده قرار گرفت. در صورت تولید HCN رنگ کاغذ از زرد به کرم نارنجی قهوه‌ای و آجری تغییر رنگ خواهد داد.

نتایج و بحث

نتایج بررسی گویای آن است با استفاده از روش پیشنهادی دو سویه ۴۸ و ۱۱ توانایی خوبی در تولید HCN از خود نشان دادند و رنگ