جداسازی باکتریهای تثبیت‌کننده ازت ازبافت نیشکر ومطالعه بعضی ازخصوصیات بیوشیمیایی آن

محسن علمایی
محقق بخش تحقیقات بیولوژی خاک مؤسسه تحقیقات خاک و آب

مقدمه

نیشکر به عنوان محصولی که از نقطه نظر راندمان تثبیت انرژی در واحد سطح در بین دیگر محصولات زراعی در درجه اول قرار گرفته و شکر به عنوان ارزانترین و پرانرژی ترین ماده غذایی، همواره مورد توجه بوده و بخش عمده‌ای از نیازهای بدن به انرژی را تأمین می‌کند. با افزایش رشد جمعیت کشور و بالا رفتن نیاز داخلی با مصرف سرانه ۲۵ کیلوگرم و وارد کردن قریب به یک میلیون تن شکر خارجی در سال و خروج میلیونها دلار ارز کشور، لزوم توجه بیشتر به این محصول استراتژیک را مشخص می‌نماید. تولید محصول نیشکر در منطقه جنوب کشور (۱۰۰ ton/ha) بوده و نیاز ازتی آن با استفاده از ۳۰۰-۳۵۰kg/ha کود اوره تأمین می‌شود. با توجه به راندمان پایین کودهای ازته بخشی از آن توسط زه‌آب مزرعه به آبهای جاری باز گردیده، پس ما باید میزان مصرف کودهای ازتی را با استفاده از کودهای بیولوژیک کاهش دهیم. دانشمندان کشور برزیل(۱) باکتریهای همیار تثبیت کننده ازت را از ریزوسفر نیشکر جدا کرده و به جهان معرفی کردند، که می‌تواند به میزان ۳۰٪ از نیاز ازتی گیاه را تأمین کند. در کشورهای برزیل و هندوستان با تولید ۲۱/۴، ۱۶/۹ میلیون تن شکر در سال مصرف کود ازته آنها در هکتار به ۵۱ و ۴۶ کیلوگرم در هکتار بوده (۲) و این کاهش مصرف کود در جهت تولید حداکثر و همچنین رعایت بهداشت و ایمنی محیط زیست و انسان بسیار مهم می‌باشد. این باکتریها توسط یادوما و همکاران(۳) به نام *Gluconacetobacter diazotrophicus* نامگذاری‌شد که علاوه بر نیشکر درسورگوم‌شیرین، علف *Penisetum* و سیب‌زمینی شیرین یافت می‌شود. در این تحقیق سویه‌های بومی کشور از بافت نیشکر جداسازی و پس از شناسایی توسط آزمون‌های بیوشیمیایی توانایی آنها نیز از نظر تثبیت ازت مولکولی تعیین گردید.

مواد و روشها

باکتری مورد مطالعه کاملاً درون بافتی بوده و در خاک به مدت چند روز بیشتر زنده نمی‌ماند و در تمامی اجزاء گیاه (ریشه، ساقه و برگ) یافت می‌شود و توانایی تولید اسید از قند در محیط غذایی را داشته و pH محیط را بعد از دو روز به حدود ۳ می‌رساند. برای جداسازی آن ابتدا ساقه ۱۰ سانتیمتری نیشکر در محلول ۱٪ (Chloramin T) به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده تا استریل سطحی گردد و با ۴ بار شستشوی سطحی با آب مقطر استریل در دستگاه آسیاب برقی آنرا خرد کرده و توسط پارچه استریل در زیر لامینار عصاره گیری، محیط نیمه جامد اختصاصی LGIP را به همراه ۱۰۰ppm قارچ کش سیکلو هگزامید ترکیب کرده و به هر لوله مقدار ۱۰ میلی‌لیتر عصاره اضافه شد. LGIP, gL^{-1} (K_2HPO_4 0.2, KH_2PO_4 0.6, $CaCl_2.2H_2O$ 0.02, $MgSO_4.7H_2O$ 0.2 $Na_2Mo\ O_4.2H_2O$ 0.002, $FeCl_3.6H_2O$ 0.01, $(NH_4)_2SO_4$ 0.132, Sucarose 100, Bromothymol blue 5ml, vitamin solu 1.0ml, pH=5.5 with acetic acid و Agar 2) برای تهیه تک کلنی از باکتری آن را برروی محیط کشت اختصاصی جامد LGIP با 10% قند ساکارز برده و سپس از تک کلنیهای آن کشت برروی محیط کشت سیب زمینی با 10% قند ساکارز صورت گرفت و همچنین برروی محیط کشت جامد GYC (Glucose 5% ، yeast extract 1% ، $CaCO_3$3% ، Agar 2.5%) برده شد. کشت در محیط کشت مایع با درصد قند بالای ساکارز (30%, 40%, 50%) انجام گرفت. کشت در محیط کشت الکل دهیدروژناز ۱٪ و ۲/۵٪ اتانول gL^{-1} $(NH_4)_2SO_4$ 1,yeast extract 0.5, Casein 0.5, $MgSO_4$ 0.2 KCl 0.2, bromocrosol green 1.0ml, Agar 15 الکل در هنگام پخش محیط در پلیت به آن اضافه شده اگر اکسیداسیون الکل تا مرحله تولید اسید از اتانول ادامه پیدا کند جنس باکتری *Gluconobacter* بوده ولی اگر تا مرحله تشکیل H_2O و CO_2 از اسید ادامه یابد از جنس *Acetobacter* می‌باشد.

تشکیل رسوب $CaCO_3$ از اکسیداسیون محیط لاکتات کلسیم (LOM) gL^{-1} (yeast extract 1.0, lactat calcium 20, agar 15, pH=5.5 with HCl). تشکیل رسوب $CaCO_3$ دلیل بر جنس *Acetobacter* می‌باشد و از جنس

Gluconobacter جدا می‌شود. تست اکسیداز، کاتالاز، توانایی احیاء نیترات به نیتریت انجام گردید. برای تعیین توانایی تثبیت ازت هوا پس از خالص سازی نهایی از روش احیاء استیلن به اتیلن استفاده شد. که پس از ۳ روز رشد به میزان ۱۰ درصد حجم بالای محیط به آن استیلن تزریق گردید و بعد از ۲۴ ساعت تشکیل اتیلن توسط دستگاه گازکروماتوگراف تعیین گردید.

جدول ۱- ویژگی‌های گوناگون ایزوله‌های *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Characteristic	Ace. diazo	The isolate
Motility	+	+
Grain-reaction	—	—
Water soluble brown Pigment on GYC	+	+
Growth on ethanol 1%, 2.5%	+	+
Growth in the presence of 30% sucarose	+	+
N2 fixation	+	+
Nitrate reductase	—	—
Oxidation of lactate	+	+
Oxidase	—	—
Catalase	+	+

نتیجه گیری

کشت عصاره برروی محیط نیمه جامد LGIP بعد از ۴۸ ساعت حلقه‌ای زرد رنگ برروی سطح تشکیل می‌دهد که اگر یک لوپ از آن را بـرروی محیط جامد اختصاصی LGIP برده باکتری از مصرف معرف بروموتیمول بلو در محیط، تولید رنگ دانه نارنجی تیره می‌کند. روی محیط کشت سیب زمینی بعد از ۱۰ روز تشکیل کلنیهای قهوه‌ای تیره داده. باکتری توانایی تکثیر در محیط بـا درصد قند بالا (۵۰٪) را داشته و رشد می‌کند. برروی محیط GYC تولید کلنیهای قهوه‌ای به همراه پیگمنت محلول در آب را داشته که سطح محیط را قهوه‌ای می‌کند. برروی محیط الکل از تشکیل اسید رنگ محیط زرد شده ولی این زردی در محیط باقـی نمـی‌مـاند و باکـتری توانایی اکسیداسیون اسید را داشته و پس از حدود دو هفته رنگ زرد محیط به سبز برمی گردد که نشـان از اکسیداسـیون اسید می‌باشد. تشکیل رسوب کربنات کلسیم از اکسیداسیون لاکتات کلسیم دلیل بر آزاد سازی CO_2 و باکتری از جنس *Acetobacter* می‌باشد. باکتری مذکور میله‌ای، گرم منفی، متحرک و میکروآیروفیل و به اندازه ۰/۸-۰/۶ *۱۰* ۴-۱/۰ میکرومـتر بـوده و ایزولـه‌هـای جداسـازی شـده بـا نمونـه‌های وارداتی تفاوتی از نظر تستهای بیوشیمیایی نداشته که با اندازه‌گیری میزان فعالیت آنها می‌توان بهترین ایزوله‌های داخلی را برای آزمایشهای گلخانه‌ایی و مزرعه‌ایی جداسازی نمود.

منابع مورد استفاده

1- Dobereiner, J. and Ruschel A. P (1958) Uma nova especie *Beijerinka fluminenisis*. Rerista de Biologia, Rio de Juniro, P. 261-279.
2- Dobereiner. J. (1996). Biological nitrogen fixation in the tropics social and economic contributions. Soils Biol. Biochem., V. 22, No. 5,6, P. 771-774.
3- Yamada. Y. K. Hoshino, and T. Ishikawa. 1997. The phylogony of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 165 ribosomal RNA: The elevation of the subgenus *Gluconacetobacter* [sic] to generic level. Biosci. Biotechnol. Biochem., 61: 1244-1251.