محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی باکتری‌های بومی همزیست عدس

الهام شمشیری‌پور[۱]، کاظم خاوازی[۲*]، شکوفه رضایی[۳]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

[۲] استاد پژوهش موسسه تحقیقات خاک و آب، تهران، ایران

[۳] استادیار گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

چکیده

در سال‌های اخیر دستیابی به کودهای بیولوژیک حاوی باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن به عنوان جایگزین کودهای شیمیایی نیتروژن مورد توجه قرار دارد. بدین منظور تحقیقی بر روی گیاه عدس در ۹ استان کشور بر پایه طرح کاملا تصادفی انجام شد. ابتدا از ۸۴ نقطه نمونه‌های تصادفی خاک تهیه، سه رقم بذر بیله‌سوار، گچساران و کیمیا در دو تکرار در هریک از نمونه‌های خاک کشت و با محلول غذایی فاقد منبع نیتروژن آبیاری شد. پس از برداشت در مرحله گلدهی(۲ ماه پس از کاشت) باکتری‌های ریزوبیوم از گرهک‌های ریشه جداسازی و آزمایش‌های افتراقی بیوشیمیایی انجام شد. جهت تفکیک *اگروباکتریوم* از *ریزوبیوم*، هریک از جدایه‌های باکتری به صورت همزمان روی ۴ محیط کشت YMA(تفکیک بر اساس سرعت رشد)، Hofer(تفکیک از نظر تحمل به pH بالای۱۱)، Glucose pepton agar (تفکیک بر اساس استفاده از منبع پپتون) و محیط YMA حاوی ۲ درصد NaCl (تفکیک بر اساس تحمل به نمک) کشت داده شد. پلیت‌ها پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت بررسی شد. بر این اساس تعداد ۱۶۰جدایه به عنوان باکتری‌های همزیست گیاه عدس شناسایی شد. بطور کلی نتایج حاصل از آزمایشات بیوشیمیایی بر روی باکتری‌های جداسازی شده از گره‌های ریشه عدس نشان داد که از این آزمایشات حتی می‌توان به عنوان جایگزینی برای آزمایشات گره‌زایی نیز استفاده کرد.

کلمات کلیدی: عدس، تثبیت ازت، ریزوبیوم لگومینوزاروم، همزیستی

مقدمه

از آنجایی که استفاده از کودهای نیتروژنی باعث آلودگی غیرمنتظره آب‌ها و پیری زودرس رودخانه‌ها و دریاچه‌ها می شود، تثبیت زیستی نیتروژن اهمیت زیادی پیدا کرده است(Megharaj و همکاران، ۲۰۱۱). عدس (Lens culinaris Medik) یکی از مهمترین لگوم‌ها است (FAOSTAT، ۲۰۱۷). این گیاه قادر به ایجاد همزیستی با باکتری Rhizobium leguminosarum b viciae است(Weir و همکاران، ۲۰۱۱). ریزوبیوم‌ها گروه رایجی از باکتری‌های کوچک میله‌ای شکل و گرم منفی هستند که بطور کلی توانایی تولید گره در ریشه گیاهان لگوم را دارند. باکتری ریزوبیوم به‌طور موثری ریشه گیاه را آلوده کرده و رشد گیاه را افزایش می‌دهد. در مناطقی که عدس در تناوب زراعی با گیاهان دیگر قرار می‌گیرد قادر است بیش از ۵۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار به خاک اضافه نماید که می‌تواند در تأمین مقداری از نیاز نیتروژنی محصول بعدی بسیار مفید باشد (Martinez Romero، ۲۰۰۹). به منظور دستیابی به حداکثر تولید عدس، غربالگری جدایه‌های بومی ریزوبیوم برای تأمین نیتروژن کافی برای آنها حیاتی است(Anglade و همکاران، ۲۰۱۵). باکتری‌های ریزوبیوم لگومینوزاروم از لحاظ فنوتیپی بسیار شبیه باکتری‌های اگروباکتریوم که عامل بیماری گال در ریشه گیاهان است می‌باشند. از آزمون‌های بیوشیمیایی خاصی می‌توان جهت شناسایی باکتری‌های ریزوبیوم از اگروباکتریوم استفاده نمود. باکتری‌های ریزوبیوم لگومینوزاروم در محیط‌های گلوکز پپتون آگار، محیط هوفر و YMA حاوی ۲ درصد کلرید سدیم قابلیت رشد نداشته و یا رشد بسیار محدودی دارند (Bhatt و همکاران، ۲۰۱۳). جدایه‌های بومی ریزوبیوم پایدارتر بوده و میزان بقاء آنها بیشتر است و این می‌تواند شانس گره‌زایی موفق و تثبیت نیتروژن در گیاه میزبان را افزایش دهد (Stajković و همکاران، ۲۰۱۱). این مساله اهمیت جداسازی باکتری‌های بومی همزیست با گیاه عدس، جهت دستیابی به مایه تلقیح مناسب برای این گیاه را دو چندان می‌کند. بر این اساس پژوهش حاضر با هدف جداسازی باکتری ریزوبیوم از خاک‌های تحت کشت عدس در ۹ استان کشور انجام شد.

*ایمیل نویسنده مسئول: khavazik@yahoo.com

مواد و روش‌ها

ابتدا از مزارع عدس واقع در مناطق مختلف ۶ استان کشور نمونه‌های ۳ کیلوگرمی خاک ازعمق ۳۰-۰ سانتی‌متری تهیه شد. همچنین از مزارع عدس سه استان زنجان، آذربایجان شرقی و سمنان نیز پس از برداشت عدس نمونه‌های گرهک از ریشه جداسازی شد(جدول ۱). جهت دستیابی به حداکثر فراوانی سویه‌های باکتری همزیست با عدس، ۳ رقم بذر عدس (بیله‌سوار، کیمیا و گچساران) که بیشترین سطح زیر کشت عدس را در کشور دارا می‌باشند از موسسه تحقیقات دیم کشور دریافت شد. بذرهای هر سه رقم عدس در شرایط استریل (زیر هود لامینار)، ابتدا به مدت ۳۰ ثانیه داخل الکل ۹۶ درصد غوطه ور شده، سپس پس از شستشو با آب مقطر استریل، به مدت دو دقیقه داخل ۰/۱HgCl2 درصد قرار گرفته و سپس چندین مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند (۱۲-۱۰مرتبه). سپس به منظور تسریع در جوانه‌زنی به مدت یک ساعت زیر هود لامینار داخل آب مقطر استریل نگهداری شدند. بذور استریل شده در داخل پلیت‌های حاوی واتراگار (۱۰۰۰میلی‌لیتر آب مقطر استریل و ۱۳/۵ گرم در لیتر آگار) به دستگاه ژرمیناتور منتقل شدند. بذرها پس از ۴۸ ساعت در دمای ۲۲°Cجوانه‌دار شدند. بذور جوانه‌دار شده در گلخانه در شرایط مناسب رشد گیاه عدس (دمای ۲۶ºC، رطوبت ۸۰ درصد و شدت نور ۱۲۰۰۰لوکس) در ۲ تکرار داخل گلدان‌های نیم کیلویی حاوی خاک‌های نمونه برداری شده از ۶ استان کشور کاشته شدند. گلدان‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی در گلخانه چیده شدند. جهت آبیاری گلدان‌ها از محلول غذایی فاقد منبع نیتروژن با pH حدود ۷ استفاده شد. در مرحله گلدهی (ابتدای تشکیل غلاف) که گیاهان در بهترین شرایط از نظر تشکیل گره بودند گلدان‌ها در سطل آب غوطه‌ور شده و خاک اطراف ریشه به دقت حذف شد. از هر گلدان ریشه‌های دارای گرهک فعال (درشت، سالم با مرکز صورتی و قرمز) انتخاب و در داخل ظروف حاوی سیلیکاژل به سردخانه منتقل شدند. گرهک‌های خشک شده برای مدت یک ساعت در آب مقطر غوطه‌ور شدند. گرهک‌هایی که بدین صورت جداسازی شدند و همچنین گرهک‌های جداسازی شده از مزارع عدس، در شرایط استریل (زیر هود لامینار) ابتدا به مدت ۳۰ ثانیه داخل الکل ۹۶ درصد قرارداده شده و پس از ۲ دقیقه غوطه‌وری در هیپوکلریت سدیم ۳۰ درصد، ۱۰ مرتبه توسط آب مقطر استریل شستشو داده شدند. گرهک‌ها در داخل پلیت‌های استریل یک‌بار مصرف توسط میله شیشه ای له شده و عصاره آنها بدست آمد. ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون مربوطه توسط پیپت استریل روی حداقل سه پتری‌دیش حاوی محیط کشت YMA(Yeast Extract Mannitol Agar) حاوی کنگورد ریخته شده و پس از گلس کردن کشت گردیدند. پلیت ها در انکوباتور در دمای ۲۸ºC قرار داده شده و هر روز از نظر ظهور کلنی باکتری مورد بررسی قرار گرفتند. پس از چند مرحله خالص‌سازی، باکتری‌های لعابی‌شکل که رنگ کونگورد را جذب نکرده بودند روی لوله‌های مورب حاوی YMA و سه گرم در لیتر CaCO3 کشت و پس از رشد در سردخانه نگهداری شدند.

از آنجایی که باکتری‌های Rhizobium leguminosarum از لحاظ مورفولوژیکی بسیار به باکتری‌های Agrobacterium tumefaciens (باکتری مولد بیماری گال) شباهت دارند، جهت شناسایی و جداسازی باکتری‌های ریزوبیوم از اگروباکتریوم از چهار آزمایش بیوشیمیایی زیر استفاده شد (Bhatt و همکاران، ۲۰۱۳).

الف- کشت بر روی محیط Congored Yeast Extract monitol agar (YMA): کلونی‌های ریزوبیوم در کنگورد سفید، نیمه‌شفاف، درخشان و در مقایسه با کلونی‌های اگروباکتریوم کوچک‌تر هستند. تفاوت دیگر کلنی‌های ریزوبیوم لگومینوزاروم با اگروباکتریوم‌ها در سرعت رشد آن‌هاست. کلنی‌های ریزوبیوم پس از ۴۸ ساعت ظاهر می‌شوند ولی اگروباکتریوم‌ها تندرشدتر بوده و پس از ۲۴ ساعت کلنی‌های آن‌ها در محیط کشت YMA قابل رویت است. با بررسی کشت‌ها پس از ۲۴ ساعت می‌توان این دو را از هم تفکیک نمود.

ب- کشت بر روی محیط Hofer alkaline medium: اگروباکتریوم‌ها قابلیت رشد در pH بالاتر از ۱۱ را دارند که این خاصیت می‌تواند در جداسازی ریزوبیوم و اگروباکتریوم کارساز باشد.

ج- کشت بر روی محیط Glucose pepton agar: ریزوبیوم‌ها برخلاف اگروباکتریوم‌ها که خیلی سریع در این محیط رشد می‌کنند نمی‌توانند از پپتون به عنوان منبع انرژی استفاده کنند(Bergey ، ۲۰۱۰).

د- YMA حاوی دو درصد NaCl: ریزوبیوم‌ها برخلاف اگروباکتریوم‌ها در غلظت نمک ۲ درصد قادر به رشد نمی‌باشند(Bergey ، ۲۰۱۰).

ابتدا این آزمایشات بر روی باکتری‌های شاهد مثبت *Rhizobium etli* سویه‌های166-RB، 175-RB و 180-RB و باکتری‌های شاهد منفی *Rhizobium Radiobacter* سویه‌های 176-RB، 182-RB و 194-RB موجود در کلکسیون میکروبی موسسه تحقیقات خاک و آب انجام شده و سپس بر روی کلیه جدایه‌ها صورت گرفت. پس از بررسی نتایج به دست آمده، اگروباکتریوم‌ها از ریزوبیوم‌ها تفکیک شدند.

نتایج و بحث

تعداد ۴۲۵ جدایه که از لحاظ فنوتیپی مشخصات ریزوبیوم را دارا بودند از گرهک‌های ریشه جداسازی شدند.

جدول ۱. تعداد باکتری های جداسازی شده از گرهک‌های ریشه گیاه عدس در استان‌های مختلف

ردیف	استان	نوع نمونه	تعداد باکتری جداسازی شده
۱	خراسان جنوبی	خاک	۸۷
۲	فارس	خاک	۲۶
۳	اردبیل	خاک	۹۳
۴	کهکیلویه	خاک	۶۹
۵	لرستان	خاک	۵۴
۶	قزوین	خاک	۵۰
۷	زنجان	گره	۱۸
۸	آذربایجان شرقی	گره	۲۴
۹	سمنان	گره	۴

نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی

تمامی سویه‌هایی که بعد از گذشت ۲۴ ساعت از کشت در محیط YMA رشد کرده بودند همانند باکتری‌های شاهد اگروباکتریوم در هر سه محیط Hofer alkaline medium، Glucose pepton agar medium و YMA حاوی دو درصد NaCl رشد کردند(جدول ۲). این باکتری‌ها به عنوان اگروباکتریوم شناسایی و حذف شدند. بقیه باکتری‌ها که نتایج آزمایش بیوشیمیایی مشابه باکتری‌های ریزوبیوم را داشتند به عنوان ریزوبیوم انتخاب شدند. همه جدایه‌های خالص شده به عنوان ریزوبیوم مورد تأیید قرار نگرفتند. ازدلایل این مسئله ممکن است وجود باکتری‌هایی غیر از ریزوبیوم در داخل گره یا سایر آلودگی‌ها در سطح گره باشد. گزارش شده است که ازگرهک‌های استریل جداسازی شده از ریشه یونجه، باکتری‌های اندوفیت غیرریزوبیومی نیز جداسازی شده اند(Stajkovic و همکاران، ۲۰۰۹). افزایش غلظت نمک منجر به کاهش رشد ریزوبیوم‌ها بسته به سویه باکتری می‌شود. در تمام سویه‌های مورد آزمایش، سرعت رشد با افزایش غلظت نمک از ۰/۵ تا ۶ درصد کاهش یافت. همچنین گزارش شده که pH بین ۶/۵ تا ۷ بهترین pH برای رشد باکتری‌های ریشه است. با این وجود، اثر بازدارنده pH بالا (بالاتر از ۷/۰) به وضوح در پاسخ رشد ریزوبیوم‌های مورد آزمایش مشاهده شد(Ahmed و همکاران، ۲۰۱۵). بر اساس آزمایش‌های بیوشیمیایی گچندی و خانزول (۲۰۱۱) باکتری‌های ریزوبیوم در محیط کشت هوفر رشد نمی‌کنند و یا رشد کمی دارند که نتایج به دست آمده با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت داشت. در تحقیقی دیگر روند کاهشی رشد باکتری‌های ریزوبیوم با افزایش شوری گزارش شده است (Thrall و همکاران، ۲۰۰۸). بر این اساس در تحقیق حاضر باکتری‌هایی که در NaCl ٪۲ رشد نکردند به عنوان ریزوبیوم انتخاب شدند.

جدول۲. قابلیت رشد باکتری‌های شاهد درمحیط‌های کشت ویژه آزمون‌های بیوشیمیایی

ردیف	شاهد	کد باکتری	رشد در محیط NaCl٪۲حاوی	رشد در محیطHofer	رشد در محیط Glucose Peptone Agar	رشد در محیط YMA پس از ۲۴ ساعت
۱	شاهدمثبت	RB-166	□	□	□	□
۲	*Rhizobium Etli*	RB-180	□	□	□	□
۳		RB-175	□	□	□	□
۴	شاهدمنفی	RB-176	□	□	□	□
۵		RB-182	□	□	□	□
۶	*Rhizobium Radiobacter*	RB-194	□	□	□	□

کشت باکتری‌های جداسازی شده از گرهک‌های واقع در ریشه عدس و نخود در محیط گلوکز پپتون آگار و YMA نتایج مشابهی با تحقیق حاضر نشان داد(Upadhayay و همکاران، ۲۰۱۷). این نتایج همچنین مشابه نتایج آزمایشات بیوشیمیایی روی باکتری‌های جداسازی شده از سویا بود(Gachande و Khansole، ۲۰۱۱)

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که از آزمایشات بیوشیمیایی می‌توان جهت شناسایی ریزوبیوم و اگروباکتریوم استفاده نمود. جهت دستیابی به کود بیولوژیک حاوی باکتری‌های همزیست عدس نیاز به جداسازی سویه‌های بومی همزیست عدس از خاک‌های کشور می‌باشد. در نهایت تعداد صد و شصت جدایه ریزوبیوم همزیست با گیاه عدس از خاک‌های مورد مطالعه کشور با بیشترین سطح زیر کشت عدس جداسازی شد.

منابع

Ahmed, T. H. M. and Abdelmageed, M. S. 2015. Diversity of Rhizobium leguminosarum bv. Viceae strains isolated from different schemes in Shendi area, Extensive Journal of Applied Sciences, 3(1), 1-10

Anglade, J., Billen, G. and Garnier, J. 2015. Relationships for estimating N2 fixation in legumes: incidence for N balance of legume-based cropping systems in Europe. Ecosphere, 6(3), pp.1-24.

Bergey's, M. O. 2010. The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes.

Bhatt, S., Vyas, R. V., Shelat, H. N. and Mistry, S. J. 2013. Isolation and identification of root nodule bacteria of *mungbean* (*Vigna radiata* L.) for biofertilizer production. International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology, 3(4), 127-133.

FAOSTAT Database, http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC,Accessed date: 10 January 2017.

Gachande, B. D. and Khansole, G. S. 2011. Morphological, cultural and biochemical characteristics of *Rhizobium japonicum* syn and *Bradyrhizobium japonicum* of soybean. Bioscience Discovery Journal, 2(1), 1-4.

Laguerre, G., Louvrier, P., Allard, M. R., and Amarger, N. 2003. Compatibility of rhizobial genotypes within natural populations of Rhizobium leguminosarum biovar viciae for nodulation of host legumes. Applied and Environmental Microbiology, 69(4), 2276-2283.

Martínez-Romero, E. 2009. Coevolution in Rhizobium-legume symbiosis? DNA and Cell Biology, 28(8), 361-370.

Megharaj, M., Ramakrishnan, B., Venkateswarlu, K., Sethunathan, N., and Naidu, R. 2011. Bioremediation approaches for organic pollutants: a critical perspective. Environment International, 37(8), 1362-1375.

Stajković, O., De Meyer, S., Miličić, B. and Willems, A. 2009. Isolation and characterization of endophytic non-rhizobial bacteria from root nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). Botanica serbica, 33(1), 107-114.

Stajkovic, O., Delic, D., Josic, D., Kuzmanovic, D., Rasulic, N. and Knezevic-Vukcevic, J. 2011. Improvement of common bean growth by co-inoculation with Rhizobium and plant growth-promoting bacteria. Rom Biotechnol Lett, 16(1), 5919-5926.

Thrall, P. H., Bever, J. D. and Slattery, J. F. 2008. Rhizobial mediation of Acacia adaptation to soil ecology, 96(4), 746-755.

Upadhayay, S. P., Pareek, N., and Mishra, G. 2015. Isolation and biochemical characterization of *Rhizobium* strains from nodules of lentil and pea in Tarai agro-ecosystem, Pantnagar India. Nusantara Bioscience, 7(2), 73-76.

Weir, B. S. 2011. The current taxonomy of Rhizobia. New Zealand Rhizobia website. http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

Isolation and biochemical characterization of indigenous *bacteria* in symbiosis with Lentil

Shamshiripour[1], E., Khavazi[2*], K., Rezaei[3], S

[1] M. Sc. Student, Soil Science Department, Faculty of Agriculture Islamic Azad University, Karaj branch, Karaj, Iran
[2] Professors, Soil and Water Research Institute, Tehran, Iran
[3] Assistant Prof., Soil Science Department, Faculty of Agriculture Islamic Azad University, Karaj branch, Karaj, Iran

Abstract

Nowadays biofertilizers containing nitrogen-fixing bacteria are considered as an alternative to nitrogen fertilizers. For this purpose, a study was conducted on lentil plant in 9 provinces of Iran based on a completely randomized design. First, from 84 points of random soil samples, three cultivars of Bilehsuar, Gachsaran and Kimia were irrigated in each soil sample in two replications and irrigated with nitrogen source nutrient solution. After harvesting, in the flowering stage (2 months after planting), Rhizobium bacteria were isolated from the root nodules and biochemical differential tests. For isolation of Agrobacterium from rhizobium, each bacterial isolate simultaneously was applied to 4 medium, YMA (growth rate differentiation), Hofer (breakdown for tolerance to pH 11), Glucose pepton agar (breakdown based on the use of the peptone source), and YMA medium containing 2% NaCl (salt-tolerance) culture was cultured. Plates were examined after 24 and 48 hours. Accordingly, 160 isolates were identified as symbiotic nitrogen-fixing bacteria bacteria. In general, the results of biochemical experiments on isolated bacteria from lentil root nodes showed that these experiments could even be used as a substitute for nodule experiments.

Keywords: Lentil, Nitrogen fixation, *Rhizobium leguminosarum*, Symbiosis

[*] Corresponding author, Email: khavazik@yahoo.com