شانزدهمین کنگره علوم خاک ایران

دانشگاه زنجان، ۵ تا ۷ شهریور ۱۳۹۸

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

ارزیابی آزمایشگاهی تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های محرک رشد و کلنیزاسیون ریشه گندم توسط آنها

اسماعیل کریمی*[۱]، ناصر علی اصغرزاد[۲]، محمد رضا نیشابوری[۲]، سید بهمن موسوی[۱] ، عزت اله اسفندیاری[۳] و میکا تاراکا[۴]

[۱*]اعضای هیات علمی گروه علوم و مهندسی خاک، دانشگاه مراغه

[۲]اعضای هیات علمی گروه علوم و مهندسی خاک، دانشگاه تبریز

[۳]عضو هیات علمی گروه مهندسی تولید و به نژادی، دانشگاه مراغه

[۴]عضو هیات علمی موسسه تحقیقات هلمهولتز آلمان، بخش تحقیقات اکولوژیک

چکیده

تشکیل بیوفیلم توانایی باکتریهای محرک رشد را در برابر شرایط نامساعد محیطی افزایش داده و توانایی آنها را در کلنیزاسیون ریشه گیاه افزایش می‌دهد. از آنجایی که بررسی باکتریهای محرک رشد با هدف تولید کودهای بیولوژیک صورت می‌گیرد و موفقیت مایه تلقیح حاصل از آنها علاوه بر غلبه بر شرایط نامساعد محیطی در خاک به برتری رقابتی در خاک و توانایی کلنیزاسیون ریشه گیاه بستگی دارد، لذا از این جنبه توانایی تشکیل بیوفیلم بسیار مهم تلقی می‌شود. به این منظور تعدادی جدایه از ریزوسفر گیاهان گرامینه جمع‌آوری گردیده و پس از ارزیابی توانایی تشکیل بیوفیلم، توانایی کلنیزاسیون ریشه گندم توسط باکتری‌های منتخب با میکروسکوپ کونفوکال مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصله نشان داد جدایه‌هایی که در شرایط آزمایشگاهی توانایی تشکیل بیوفیلم داشتند، توانایی مطلوب‌تری نیز در کلنیزاسیون ریشه گیاه از خود نشان دادند، از این‌رو به نظر می‌رسد بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم به عنوان یک معیار گزینشی در انتخاب سویه‌های باکتریهای محرک رشد با توانایی کلنیزاسیون بالا سودمند باشد. همچنین میکروسکوپ کونفوکال می‌تواند روند کلنیزاسیون باکتریایی روی ریشه گیاه را به خوبی نشان دهد.

کلمات کلیدی: باسیلوس، محلول هوگلند، کریستال ویوله، ریشه‌ی گندم

مقدمه

اگر چه به کارگیری کودهای زیستی، با قابلیت بهبود رشد گیاه از طریق عرضه مواد مغذی گیاهی به شیوه¬ای سازگار با محیط زیست در پاسخ به نگرانی‌های عمومی در مورد مخاطرات ناشی از مصرف نهاده‌های شیمیایی برای بهبود عملکرد محصولات کشاورزی، در کانون توجه متخصصان کشاورزی قرار گرفته است (O'Connell, 1992) ولی عدم سازگاری و موفقیت در کاربردهای مزرعه‌ای استفاده‌ی گسترده از آن را محدود کرده است. ناتوانی و عدم موفقیت مایه تلقیح در رقابت با میکروفلور بومی و استقرار در ریزوسفر گیاه میزبان از عوامل مهم و احتمالی این ناکامی محسوب می‌گردند (Bent and Chanway, 1998). تلاش‌هایی در این زمینه در حال انجام است تا بتوان مایه تلقیح‌هایی روانه بازار کرد که از پتانسیل کلنیزاسیونی خوبی برخوردار باشند، در این راستا باکتریهای محرک رشد که توانایی تشکیل بیوفیلم را داشته باشند مورد استقبال قرار گرفته‌اند. بیوفیلم یک ویژگی ژنتیکی بوده و زمانی تشکیل می‌شود که عده زیادی از باکتریها در مواد پلیمری خارج سلولی که خودشان ترشح می‌کنند، گیر می‌افتند و زندگی اجتماعی آنها شکل می‌گیرد. این توانایی در باکتریهای محرک رشد گیاه صفتی مطلوب به شمار می‌رود، چرا که باکتری را در برابر آسیبها توانمند نموده، پتانسیل کلنیزاسیون ریشه گیاه را افزایش داده و باعث تشدید اثرات محرک رشدی آنها در قیاس با همنوعان فاقد توانایی تشکیل بیوفیلم می‌گردد. با معرفی مایه تلقیح‌های باکتریایی در شکل بیوفیلمی و در نتیجه حفاظت در برابر شرایط نامطلوب زیست محیطی مانند شوری بالا، غلظت تانن، pH پایین، وجود فلزات سنگین، شکار توسط کرم‌های خاکی، رقابت با جمعیت بومی خاک و مقاومت در برابر چرای پروتوزوا می‌توان به موفقیت کاربرد مایه تلقیح‌های میکروبی امیدوار بود(Seneviratne و همکاران ۲۰۰۸). با این نگرش مزیت استفاده از PGPR بیوفیلمی نسبت به PGPR انفرادی بخوبی قابل توصیف است چرا که تشکیل بیوفیلم، یک مزیت اضافی برای PGPR در کلنیزاسیون موثر در سطح یا داخل ریشه گیاه بوده و آنها می‌توانند به خوبی با فلور بومی رقابت کنند. Timmusk و همکاران (۲۰۰۵) گزارش دادند که پنی‌باسیلوس پلی‌میکسا در اطراف نوک ریشه گیاه بیوفیلم تشکیل داده و به‌عنوان باکتری مهاجم ریشه در فعالیت‌های کنترل زیستی و افزایش تحمل به خشکسالی میزبان عمل می‌نماید. این یافته‌ها تایید می‌کنند که تولید آزمایشگاهی مایه تلقیح PGPRهای بیوفیلمی می‌تواند برای برآورده ساختن تقاضاهای بخش کشاورزی در آینده با کمک به افزایش تثبیت N_2، افزایش جذب مواد غذایی، تولید عوامل رشد گیاه و کنترل زیستی بیماری‌ها از طریق طیف وسیعی از مکانیسم‌ها، به‌کار گرفته شوند. بر مبنای بررسی‌های فوق،

- ایمیل نویسنده مسئول: sm_ka80@yahoo.com

انجام مطالعات در خصوص بهره‌گیری از پتانسیل میکروبی باکتریهای تشکیل‌دهنده بیوفیلم در جهت مقابله با انواع تنش‌های محیطی، نوید بخش این امر خواهد بود که بدون بهره‌گیری از موجودات دستکاری ژنتیکی شده، بتوان عملکرد محصولات کشاورزی را در مقابل تنشها بالا برد. این مطالعه به بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم توسط باکتریهای محرک رشد و سپس آزمون توانایی کلنیزاسیون ریشه گیاه گندم توسط آنها در شرایط آزمایشگاهی خواهد پرداخت.

مواد و روش‌ها

تهیه باکتری: تعداد ۹۰ عدد سویه منسوب به باکتری از مجموعه باکتریهای محرک رشد موجود در آزمایشگاه‌های بیولوژی خاک دانشگاه مراغه و دانشگاه تبریز که قبلا از ریزوسفر گونه‌های مختلف گیاهان گرامینه غیر زراعی جداسازی شده بودند، جهت این مطالعه انتخاب گردیدند. آزمون تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌ها: توانایی تشکیل بیوفیلم جدایه‌ها بر مبنای روش تغییر یافته Stepanovic و همکاران (۲۰۰۰) و با تلقیح ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون شبانه و تازه باکتری‌ها به ۰/۵ میلی‌لیتر محیط کشت استریل TSB 0.5 X حاوی یک درصد گلوگز درون تیوپ‌های پلاستیکی محتوای داخل میکروتیوب‌ها تخلیه و سه بار با سرم فیزیولوژیکی استریل به آرامی شستشو داده شدند تا سلول‌های غیرمتصل به دیواره میکروتیوب‌ها خارج شوند. سپس تثبیت سلول‌ها با گذاشتن این میکروتیوب‌ها در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد در آون به‌مدت یک ساعت انجام شد. در ادامه کار میکروتیوب‌ها با ۰/۵ میلی‌لیتر کریستال ویوله ۰/۲ درصد و با ۰/۵ میلی‌لیتر اسید استیک ۱۱ درصد به‌عنوان حلال، پر شدند. بعد از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۲۰۰ میکرولیتر از محتویات میکروتیوب‌ها به آرامی به میکروپلیت منتقل شده و مقدار جذب نوری در چاهک‌ها در طول موج ۵۵۰ نانومتر، توسط دستگاه ELISA Reader خوانده شد.

آزمون تشکیل بیوفیلم باکتری‌ها روی سطح ریشه گندم: سطح بذور گندم با هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد و اتانول ۷۰ درصد استریل و پس از شستشوی مکرر با آب مقطر استریل با سه باکتری *Bacillus atrophaeus* سویه‌های ۱-۱۶ و ۱-۵۴ و ۱-۲۵ به‌صورت جداگانه، درون گلدان‌های حاوی پرلیت سترون کشت گردیده و با محلول غذایی هوگلنداستریل آبیاری گریده و در اتاق کشت رشد داده شدند. چهار هفته پس از تلقیح، ریشه‌ها از پرلیت خارج گردیدند و زیر جریان ملایم آب شسته شدند. سپس به قطعه‌های تقریبا یک سانتی‌متری بریده شده و پس از رنگ آمیزی با رنگ سایبرگرین با استفاده از میکروسکوپ کونفوکال در موسسه هلمهولتز آلمان بخش مطالعات اکولوژیکی خاک مورد مطالعه قرار گرفته و عکس‌های بیوفیلم باکتریایی روی ریشه تهیه گردیدند (Aline و همکاران ۲۰۱۵).

نتایج و بحث

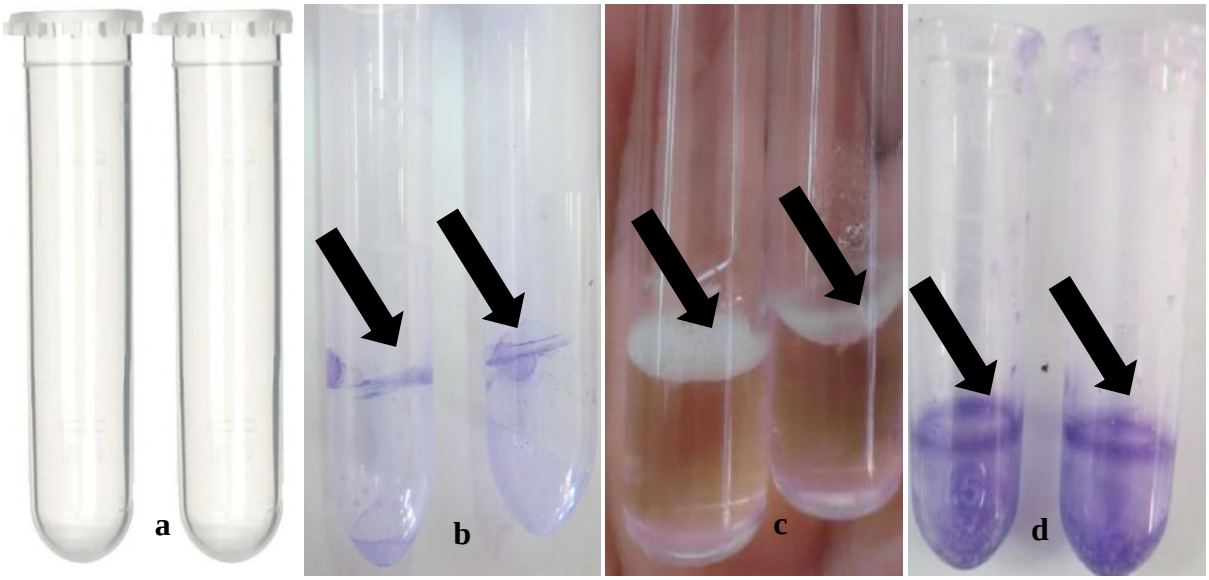
ارزیابی توانایی تشکیل بیوفیلم

نتایج بدست آمده همانگونه که در جدول ۱ گزارش گردیده، نشان دادند که باکتری‌های مورد بررسی در حالت کلی دو نوع بیوفیلم تشکیل می‌شود و بر این اساس باکتری‌ها می‌توانند به دو گروه تقسیم شوند: الف- بیوفیلم رو شناور که در این حالت بیوفیلم در سطح محیط کشت مایع با چشم به راحتی قابل مشاهده می‌باشد (شکل ۱). ب- بیوفیلم تشکیل شده در دیواره لوله و یا به شکل حلقه‌ای در اطراف لوله در سطح اتصال محیط کشت به دیواره لوله (شکل ۱). باکتری‌های گروه ب بر مبنای توانایی تشکیل بیوفیلم بر اساس توانایی اتصال به سطح دیواره ظرف در ۴ گروه دسته‌بندی شدند (Stepanovic و همکاران ۲۰۰۰). غیرچسبنده (OD < ODc)، چسبندگی ضعیف (ODc < OD < 2xODc)، چسبندگی متوسط (2 < xODc < OD 4xODc) و چسبندگی قوی (OD > 4xODc). از میان اینها سه سویه باکتریایی از گونه *Bacillus atrophaeus* انتخاب گردیدند، سویه‌های ۱-۱۶ و ۱-۵۴ این باکتری دارای قدرت تشکیل بیوفیلم و سویه ۱-۲۵ با قدرت تشکیل بیوفیلم ضعیف جهت آزمون پتانسیل کلنیزاسیونی ریشه گندم انتخاب گردیدند.

جدول ۱: گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس توانایی تشکیل بیوفیلم

قدرت تشکیل بیوفیلم		غیر چسبنده OD<ODc	چسبندگی ضعیف (ODc< OD< 2xODc)	چسبندگی متوسط (2xODc<OD< 4xODc)	چسبندگی قوی (OD > 4xODc)	روشناور (pellicle)
جمعیت	تعداد	7	14	35	28	44
جدایه‌ها	درصد	4.5	10.9	27.3	22.3	34.4

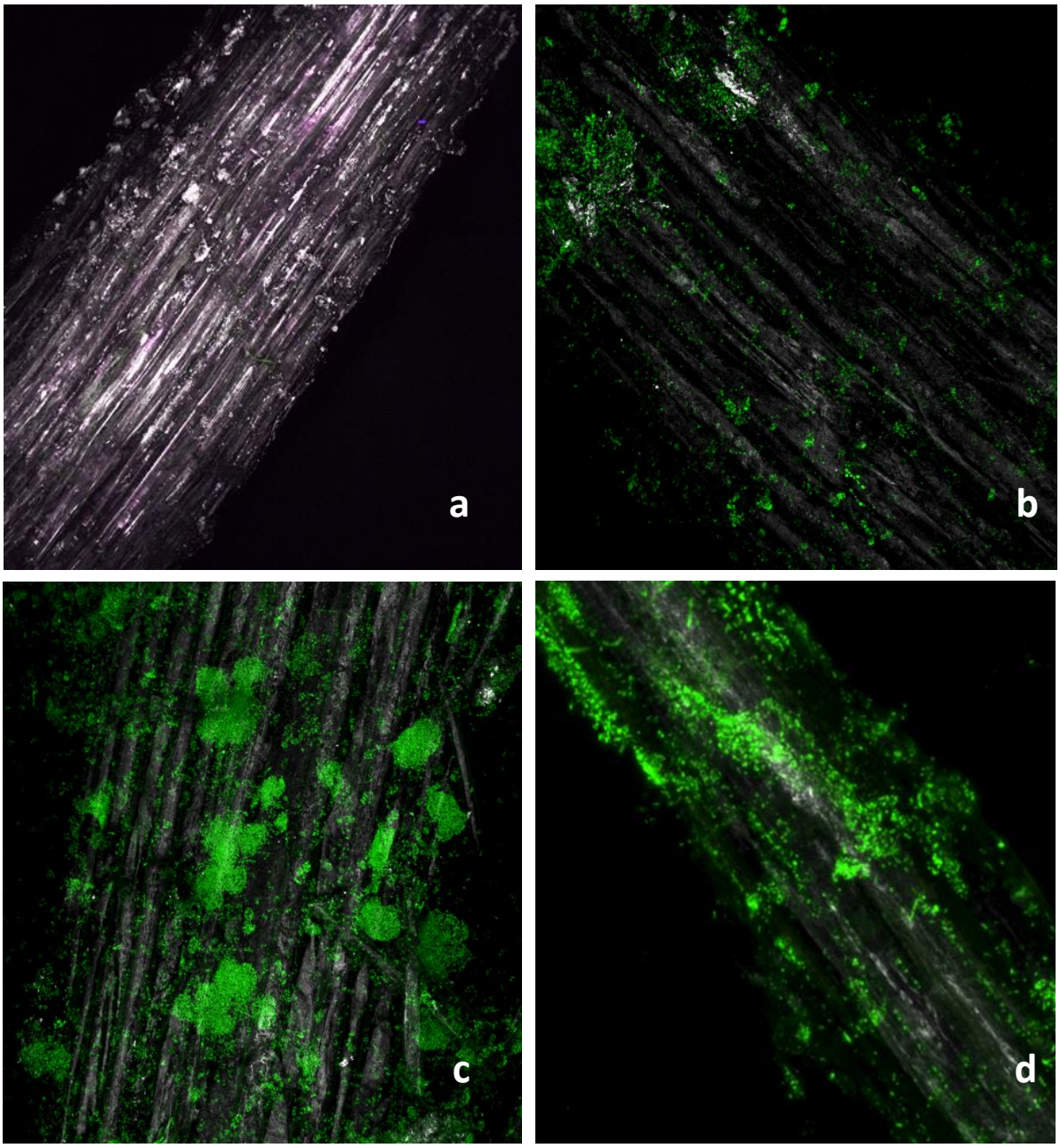
OD: میزان جذب طول موج ۵۷۵ نانومتر برای هر نمونه و OD_C: میزان جذب طول موج ۵۷۵ نانومتر برای شاهد بدون باکتری



شکل ۱ : انواع بیوفیلم ایجاد شده توسط سویه‌های جداسازی شده به ترتیب از چپ به راست: (a) بدون باکتری (شاهد)، (b) بیوفیلم چسبناک ضعیف توسط سویه ۱-۲۵، (c) بیوفیلم روشناور ۱-۱۶ و (d) بیوفیلم چسبناک قوی ۱-۵۴. فلش‌های مشکی بیوفیلم‌ها را در تصویر نشان می‌دهند. نمونه‌ها به غیر از بیوفیلم روشناور با کریستال ویوله رنگ‌آمیزی شده‌اند و میزان رنگ بنفش نشان دهنده تشکیل بیوفیلم و شدت تشکیل آنها می‌باشند.

مطالعه کلنیزاسیون باکتریایی ریشه با میکروسکوپ کونفوکال

نتایج این بخش از مطالعه نشان داد که *Bacillus atrophaeus* سویه‌های ۱-۱۶ و ۱-۵۴ دارای پتانسیل مطلوبی جهت کلنیزاسیون ریشه گندم هستند و همانگونه که در شکل ۲ مشاهده می¬گردد، در مدت ۱۸ روز این باکتری‌ها توانسته‌اند سطح ریشه گندم را اشغال نمایند. سویه ۱-۲۵ که در نتایج آزمایشگاهی اولیه توان تشکیل بیوفیلم را به صورت ضعیف دارا بود در قیاس با باکتریهای تشکیل‌دهنده بیوفیلم نتوانست به خوبی ریشه گندم را کلنیزه نماید. نتایج نشان داد که توزیع باکتری‌ها در سطح ریشه به‌صورت یکنواخت نبوده و در اکثر موارد به فرم کلنی که همان شکل بیوفیلمی از زندگی باکتری‌های مورد مطالعه می‌باشد، حضور دارند. همانگونه که در تصاویر یاد شده مشخص می‌باشد الگوی کلنیزاسیون در سطح ریشه برای دو باکتری یکسان نبوده و به نظر می‌رسد بیوفیلم ایجاد شده توسط آنها دارای ساختارهای متفاوتی می‌باشد. بررسی کلنیزاسیون میکروبی توسط باکتری‌های ریزوسفری مایه‌زنی شده به خاک با استفاده از میکروسکوپ کونفوکال و میکروسکوپ الکترونی در دهه اخیر توسط محققان مختلفی بررسی شده و نتایج آن مقبول جوامع علمی قرار گرفته است. Ahmed و همکاران (۲۰۱۰) با استفاده از این نوع میکروسکوپ‌ها توانستند ۵ نوع مرحله متمایز در کلنیزاسیون توسط سیانوباکتر را به‌طور کامل تشریح کنند. Timmusk و همکاران (۲۰۱۴) توان کلنیزاسیون *پنه‌باسیلوس* بر روی ریشه گندم را با استفاده از این نوع میکروسکوپ تشریح کرده‌اند.



شکل۲ : تصاویر میکروسکوپی بیوفیلم میکروبی بر روی سطوح ریشه گندم پس از گذشت ۱۸ روز مایه‌زنی، (a) بدون باکتری (شاهد)، (b) باکتری فاقد توانایی تشکیل بیوفیلم، (c) باکتری *Bacillus atrophaeus* سویه ۱-۵۴ و (d) باکتری *Bacillus atrophaeus* سویه ۱-۱۶. مناطق سبز رنگ محل استقرار باکتری را نشان می‌دهد (۴۰۰۰×).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم می‌تواند معیار مناسبی جهت تخمین کلنیزاسیون ریشه گیاه توسط باکتریهای محرک رشد مطرح باشد. میکروسکوپ کونفوکال به روشنی می‌تواند روند کلنیزه شدن ریشه گیاه توسط باکتریهای مایه‌زنی شده را به نمایش درآورد.

منابع

Ahmed, P., Jaleel, C., Azooz, M. and Gowher, N. 2009. Generation of ROS and non-enzymatic antioxidants during abiotic stress in plants. Botany Research International, 2 (3), 11-20.

Aline, B., Yi, D., Regina, K., Alga, Z. and Parniske, M. 2015. Colonization of root cells and plant growth promotion by Piriformospora indica occurs independently of plant common symbiosis genes. Frontier in Plant Science, 6, 1-11.

Bent, E. and Chanway, C.P. 1998. The growth-promoting effects of a bacterial endophyte on lodgepole pine are partially inhibited by the presence of other rhizobacteria. Canadian journal of Microbiology, 44,980–988

O'Connell P. F. 1992. Sustainable agriculture – a valid alternative. Outlook Agric, 21, 5–12.

Seneviratne, G., Zavahir, J. S., Bandara, W. M. M. S. and Weerasekara, M. L. M. A. W. 2008. Fungal–bacterial biofilms: their development for novel biotechnological applications. World Journal Microbiol Biotechnol, 24, 739–743.

Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B. and Svabić–Vlahovic, M. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. Journal of Microbiological Methods, 40, 175–179.

Timmusk, S., Abd El-DaimI, A., Copolovici, M., Tanilas, T., Kännaste, A., Behers, L., Nevo, E., Seisenbaeva, G., Stenström, E. and Niinemets, Ü. 2014. Drought-Tolerance of Wheat Improved by Rhizosphere Bacteria from Harsh Environments: Enhanced Biomass Production and Reduced Emissions of Stress Volatiles, PLOS One, 9(5), e96086.

Timmusk. S., Grantcharova, N., Gerhart, E. and Wagner H. 2005. Paenibacillus polymyxa invades plant roots and forms biofilms. Applied and Environmental Microbiology, 71, 7292–7300.

16th Iranian Soil Science Congress

University of Zanjan, Iran, August 27-29, 2019

Topic for submission: soil biology and biofertilizers

Laboratory evaluation of biofilm formation by growth promoting bacteria and wheat root colonization by them

Karimi*[1], E., Aliasgharzad[2], N., Neishabouri[2], M.R., Mousavi[1], S.B., Esfandiari[3], E., Mika[4], T.

[1] Assistant Prof., Soil Science Department, Faculty of Agriculture University of Maragheh, Iran

[2] Prof., Soil Science Department, Faculty of Agriculture University of Tabriz, Iran

[3] Prof., Agronomy Department, Faculty of Agriculture University of Maragheh, Iran

[4] Associated Prof., Soil ecology department, Helmholtz institute, Germany

Abstract

The formation of biofilms increases the ability of plant growth promoting bacteria against adverse environmental conditions and increase their plant root colonization ability. Since the study of growth promoter bacteria is aimed toward producing biological fertilizers, in addition to overcoming the adverse environmental conditions in the soil, the success of their inoculum, depends on the competitive advantage in the soil and their potential to plant root colonization. So the ability of biofilm formation is considered very important. To this end, a number of isolates from the rhizosphere of Gramineae were collected. After assessing their ability to biofilm forming, the ability of target bacteria to colonizing wheat root was evaluated by confocal laser microscope. The results indicated that power biofilm forming PGPR had better ability to root plant colonization. Therefore, it seems that the biofilm forming ability could be a good selective criteria in addressing effective root colonizing PGPR strains. Confocal microscopy can depict bacterial colonization process on the plant roots.

Keywords: Bacillus, Hogland solution, Crystal violate, wheat root

* Corresponding author, Email: sm_ka80@yahoo.com