فصلنامه

دانش میکروب شناسی

سال اول، شماره ۲، بهار۱۳۸۸

بررسی توان تولید آنتوسیانین در ریزوبیوم در حالت زندگی همزیست و آزاد

آنیتا خنافری[1*]، معصومه منسوبی[1]، صدیقه اربابیان[2]

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال ۲- گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

چکیده

آنتوسیانین ها گروهی از رنگدانه های فلاونوئیدی هستند که به طور گسترده در طبیعت حضور دارند. این رنگدانه ها به علت داشتن فعالیت های آنتی اکسیدانتی، ضد سرطانی، ضد التهابی و ضد رگزایی قابل ملاحظه اند. با توجه به اهمیت رنگدانه های زیستی تحقیق حاضر با هدف بررسی توان تولید این رنگدانه در باکتری ریزوبیوم مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور نمونه برداری از ریشه گیاهان یونجه و لوبیا از مناطق اطراف کرج، خمین و مشهد انجام شد. بعد از مشاهدات ماکروسکوپی و میکروسکوپی گرهک ها، وجود آنتوسیانین در حالت همزیست و در محیط کشتYMA بررسی شد. استخراج رنگدانه ها با استفاده از حلال متانول اسیدی در حالت همزیست و استون- متانول در محیط کشت انجام گرفت. سپس با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک و کروماتوگرافی گازی - طیف سنجی جرمی، رنگدانه های استخراج شده بررسی شدند. به منظور بهینه سازی تولید رنگدانه در محیط کشت پایه YMA، تاثیر چهار نوع منبع کربن (گلوکز، ساکارز، لاکتوز و مانیتول)، سه منبع نیتروژن آلی و معدنی (نیترات پتاسیم، کلرید آمونیوم و عصاره مخمر)، سه دمای ۲۵ ، ۳۰ و ۳۵ درجه سانتی گراد و شش pH مختلف (۵، ۶ ، ۶,۵ ، ۷ و ۸) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد، رنگدانه استخراج شده در حالت همزیست آنتوسیانین و مشتقات آن و رنگدانه استخراج شده در محیط کشت رنگدانه های کارتنوئیدی از دسته آستاگزانتین می باشد. قند مانیتول بین منابع کربن و عصاره مخمر در بین منابع نیتروژن تاثیر افزایشی بر جمعیت باکتری نشان دادند. همچنین مناسب ترین pH معادل ۷ و دما، ۳۰ درجه تعیین شد. در روش گاز کروماتوگرافی علاوه بر رنگدانه آنتوسیانین وجود ترکیبات فرار بوتانوئیک اسید دی متیل استر، پالمیتک اسید، لینولئیک اسید متیل استر، متیل سیس اکتادکانوآت، استئاریک اسید متیل استر و سیکلوپروپانوئیک اسید متیل استر در نمونه گرهک عصاره گیری شده با حلال متانول اسیدی گزارش شد.

واژگان کلیدی: آنتوسیانین، گرهک، ریزوبیوم، رنگدانه های کارتنوئیدی.

مقدمه

ریزوبیومها، باکتریهایی گرم منفی، میله‌ای شکل با ابعاد ۳-۱/۲×۰/۹-۰/۵ µm و بدون اسپور بوده که اغلب تحت شرایط نامساعد رشد، به اشکال مختلف (Pleomorphic) دیده می‌شوند. این باکتریها در حالت همزیست با سلولهای گیاهی، به اشکال X, Y و فرم های گرزی وشاخه ای تغییر شکل داده و بزرگ می‌شوند. این شکل از باکتری قدرت تثبیت نیتروژن مولکولی را داشته و در این حالت آنها را باکتروئید نامگذاری می کنند (۱). همزیستی با ریزوبیومها تاکنون در ۱۶ تا ۱۹ هزار گونه از خانواده بزرگ تیره نخود گزارش شده است و انتظار می‌رود با بررسی فراتر، بر فهرست گیاهان همزیست با ریزوبیوم ها افزوده شود (۲). تشکیل گرهکهای تثبیت کننده نیتروژن،

Archive of SID

www.SID.ir

نیازمند یک فرآیند متوالی علامت دهی و شناسایی سلولی دو طرفه (Two – way Signalling and cellular recognition) بین یک پروکاریوت و گیاه میزبان است. چنین فرآیندی نیازمند فعال و یا سرکوب شدن متوالی یک سری ژنهای کد کننده باکتری و گیاه میزبان و به دنبال آن فعالیت یک سری ملکولهای شیمیایی مناسب و قابل انتقال بین دو همزیست است (۳).

کلروفیل ها، کاروتنوئید ها، آنتوسیانین ها و دیگر فلاونوئید ها، سه خانواده بزرگ از رنگیزه های مهم می باشند. بیش از ده هزار پلی فنول طبیعی تاکنون شناسایی شده است که نیمی از آنها را فلاونوئید ها تشکیل می دهند. فلاونوئیدهای رنگی در بافتهای اپیدرمی گلهاو میوه ها بهتر دیده میشوند. تقریبا" تمام پلی فنول ها، به شدت نور را در ناحیه فرابنفش جذب می کنند و تنها عده کمی از این خانواده بزرگ در ناحیه نور مرئی جذب دارند. در واقع آنتوسیانین ها زیرگروه بزرگی از پلی فنول های قابل دیدن توسط چشم انسان هستند (۴).

آنتوسیانین ها مسئول رنگ های قرمز تا بنفش و آبی در میوه ها و گل ها می باشند. عصاره هایی از منابع غنی از این رنگدانه های طبیعی به عنوان رنگ های غذایی و ترکیبات دارویی استفاده می شود (۵).

آنتوسیانین ها، آنتی اکسیدان های بالقوه در محیط in vitro هستند و به عنوان دارو در بسیاری از کشورها پذیرفته شده اند. مطالعات متعددی پیشنهاد می کند که آنتوسیانین های طبیعی موجود در میوه ها و سبزی ها در برابر بسیاری از بیماری های تخریب عروقی موءثراند. از دیگر اثرات فارماکولوژیکی آنتوسیانین ها می توان به کاهش ایندکس رگ زایی و کاهش سطح تری گلیسیرید و اسیدهای چرب آزاد اشاره داشت. تحقیقات نشان می دهد که آنتوسیانین ها بیشتر از سایر فلاونوئید ها، جهت مهار رشد سلول های توموری موءثر اند. این مواد می توانند ارزش غذایی، غذاها را با جلوگیری از اکسیداسیون لیپیدها و پروتئین ها در تولیدات غذایی افزایش دهند. همچنین در صنایع پلاستیک سازی (تهیه ی پلاستیک های رنگین قابل تجزیه)، صنایع الکترونیک (تهیه فتوسل)، پزشکی، شیمیوتاکسونومی و اکولوژی نیز کاربرد گسترده ای دارند (۶).

آنتوسیانین ها بسیار ناپایدار بوده و به راحتی مستعد تخریب می باشند. پایداری آنتوسیانین ها تحت تاثیر pH ، دمای نگهداری، نور، اکسیژن، آسکوربیک اسید، قند ها، یونهای فلزی، کوپیگمانت ها، ساختمان و غلظت آنتوسیانین هاو حضورسایر ترکیبات نظیرسایر فلاونوئید ها و مواد معدنی قرار دارد.

با توجه به اهمیت رنگدانه های زیستی، جایگزینی رنگهای مصنوعی با اثرات سمی برای بشر، مطالعه رنگهای طبیعی تبدیل به یک زمینه تحقیقاتی گسترده و فعال شده است. لذا تحقیق حاضر با هدف بررسی توانایی تولید رنگدانه آنتوسیانین در باکتری ریزوبیوم در حالت همزیست و محیط کشت و تعیین شرایط بهینه تولید رنگدانه توسط باکتری انجام شد.

مواد و روشها

جمع آوری نمونه، آماده سازی و شرایط کشت

بمنظور جداسازی گرهک از ریشه گیاهان یونجه و لوبیا از مناطق اطراف کرج (محمد شهر)، خمین (ایستگاه تحقیقات لوبیا) و مشهد (مزرعه دانشگاه فردوسی) نمونه برداری انجام گرفت. ابتدا خاک اطراف گیاه به شعاع تقریبی ۱۵ و عمق ۲۰ سانتی متر حفر گردید و به آهستگی ریشه و توده خاک اطراف آن بیرون آورده شد، تا به ریشه های فرعی واجد گرهک آسیبی نرسد. سپس آنها را در ظروف یک بار مصرف تیره قرار داده و به آزمایشگاه منتقل شدند.

ریشه های جدا شده از خاک، چندین مرتبه به آرامی با آب مقطر شستشو داده شدند. گرهک های نسبتا" درشت تر و صورتی رنگ انتخاب شده و به فاصله چند میلیمتر از اطراف گرهک با قیچی جدا گردید. گرهک ها به دو گروه جهت جداسازی ریزوبیوم و بررسی وجود آنتوسیانین تقسیم شدند.

بررسی ماکروسکوپی گرهک ها به وسیله استریو میکروسکوپ (SM) و بررسی میکروسکوپی، پس از برش و تهیه لام و رنگ آمیزی گرم توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت.

جهت سترون نمودن سطح گرهک های یونجه، از اتانل ۹۶ درجه به مدت ۵ تا ۱۰ ثانیه و محلول ۳۰ درصد هیپوکلریت سدیم تجاری (وایتکس) به مدت ۳ تا ۵ دقیقه

Archive of SID

www.SID.ir

استفاده شد. سپس نمونه ها ۸ تا ۱۰ بار با آب مقطر سترون شستشو داده شدند.

گرهک ها درون لوله محتوی ۰/۵ میلی لیتر آب مقطر سترون قرار داده شدند و با استفاده از میله شیشه ای سترون له گردیدند. برای جداسازی باکتریها از عصاره فوق به روش کشت خطی بر روی محیط CRYMA (مانیتول ۱۰ گرم، فسفات دی پتاسیم ۰/۵ گرم، عصاره مخمر ۰/۵ گرم، سولفات منیزیم با ۷ مولکول آب ۰/۱ گرم، کلرید سدیم ۰/۱ گرم، قرمز کنگو ۰/۰۰۲۵ گرم، آگار ۱۵ گرم، آب مقطر ۱۰۰۰ میلی لیتر و pH بین ۷-۶/۸) کشت تهیه شد و نمونه ها به مدت ۳ الی ۵ روز در ۲۸ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند و مشخصات مورفولوژیکی کلنی های رشد یافته مورد بررسی قرار گرفت (۷).

جهت نگهداری نمونه های رشد یافته مشکوک به ریزوبیوم از محیط کشت شیبدار YMA حاوی کربنات کلسیم $CaCO_3$ (۳ گرم به ازاء یک لیتر) استفاده شد. پس از کشت و شرایط گرمخانه گذاری ذکر شده، نمونه ها در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

تأیید ایزوله ها با استفاده از روش Plant infection

جهت بررسی توانایی ایزوله ها در تولید گرهک در ریشه گیاه میزبان، تمامی ایزوله های بدست آمده از مناطق مختلف، تحت شرایط گلخانه ای به گیاه تلقیح وفعال بودن آنها ازنظر تشکیل گرهک مورد بررسی قرار گرفت.

ابتدا محیط کشت شیبدار Hoagland در لوله تهیه شد. به ازای هرلیتر از محلول هوگلند دو میلی لیتر از محلول شماره یک، یک میلی لیتر از هریک از محلول های دو، پنج و شش و پنج میلی لیتر از محلول های سه و چهار در ۹۸۵ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شد (محلول شماره ۱:[سولفات منیزیم با ۷ مولکول آب ۲۴ گرم، آب مقطر ۱۰۰ میلی لیتر]، محلول شماره ۲: [منوپتاسیم فسفات۳/۶ گرم، آب مقطر ۱۰۰ میلی لیتر]، محلول شماره ۳: [کلرید پتاسیم ۷/۴ گرم، آب مقطر ۱۰۰ میلی لیتر]، محلول شماره ۴: [کلرید کلسیم با ۴ مولکول آب ۱۴/۷ گرم، آب مقطر ۱۰۰ میلی لیتر]، محلول شماره ۵: محلول غذایی میکرونوترینت دریک لیتر [اسید بوریک۲/۸ گرم، کلرید منگنز با ۴ مولکول آب۱/۸۱ گرم، سولفات روی با ۷ مولکول آب۰/۲۲ گرم، سولفات مس با۵ مولکول آب۰،۰۸ گرم، مولیبدات سدیم با ۲ مولکول آب۰/۰۲۵ گرم] و محلول ۶: [اتیلن دی آمین ترا استیک اسید آهن دار ۴گرم، آب مقطر یک لیتر]) برای جامد نمودن محیط کشت ۱۵ گرم آگار در یک لیتر محیط کشت افزوده شد و همچنین برای تحریک گرهک سازی پنج میلی لیتر از محلول یک مولار نیترات پتاسیم نیز به محلول فوق اضافه گردید. pH این محیط بین ۷-۶/۸ تنظیم و در اتوکلاو سترون گردید (۸).

در مرحله بعد تعدادی بذر یونجه (رقم همدانی) و بذر لوبیا جدا کرده و به روشی که برای گرهک ذکرشد، سطح آنها سترون گردید. سپس با پنس سترون روی محیط کشت Water-Agar حاوی ۲ درصد آگار قرار داده و در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد به مدت یک روز گرمخانه گذاری شدند.

سپس از ایزوله های موجود در محیط کشت YMA پس از گرمخانه گذاری به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور شیکردار در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و دور ۱۵۰rpm کشت تلقیح تهیه گردید.

در مرحله بعد، بذر های جوانه زده یونجه در منافذی که بطور عمودی در راستای لوله توسط لوپ سرسوزنی سترون در محیط کشت ایجاد شده بود قرار داده شدند. پس از سبز شدن و رویش گیاهچه در مدت ۳ تا ۴ روز یک میلی لیتر از مایه تلقیحی نمونه با در نظر گرفتن دو تکرار برای هر نمونه به لوله افزوده شد. همچنین دو لوله شاهد بدون اضافه کردن مایه تلقیحی جهت کنترل در نظر گرفته شد. پس از بستن لوله ها و پوشاندن قسمتی از لوله که محل رویش ریشه است، در اتاقک رشد با دما و رطوبت و نور کافی قرار داده شد. چگونگی رشد و تشکیل گرهک بعد از مدت زمان ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز مورد بررسی قرار گرفت (۹).

بررسی تغییر pH محیط کشت

تغییر pH محیط کشت توسط ایزوله ها که تاییدی بر میزان سرعت رشد آنهاست، با افزودن معرف برموتیمول بلو به مقدار ۲۵ میلی گرم به ازای یک لیتر به محیط کشت YMA بررسی شد.

Archive of SID

www.SID.ir

بررسی سرعت رشد ایزوله ها با تغییر نوع محیط کشت

ایزوله ها برروی محیط های TY(Tryptone) Yeast extract [تریپتون ۵ گرم، عصاره مخمر ۳ گرم، کلرید کلسیم با دومولکول آب ۰/۹ گرم، آگار ۱۵ گرم، آب مقطر یک لیتر]، YMA (Yeast Manitol Agar) و CRYMA کشت داده شدند وخصو صیات مورفولوژیکی آنها مورد بررسی قرار گرفت.

قابلیت جذب رنگ

محیط کشت CRYMA تهیه شد و پس از کشت ایزوله ها و رشد آنها رنگ کلنی ها مورد بررسی قرار گرفت.

آزمون حرکت

برای انجام این آزمایش از محیط کشت نیمه جامد Motility Agar [گلوکز ۱۰ گرم، کازئین آب دار۲ گرم، دی پتاسیم فسفات ۰/۲ گرم، برم تیمول بلو۳ میلی لیتر از محلول یک درصد آن در الکل، کلرید سدیم۵ گرم، آگار ۴ گرم، آب مقطر یک لیتر] در لوله استفاده گردید. لوله های تلقیح شده در حرارت ۲۸ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شده و میزان حرکت باکتری که با زرد شدن رنگ محیط به طرف پایین لوله تناسب داشت هر دو روز یک بار یادداشت گردید.

رسم منحنی رشد

نمودار رشد باکتری در محیط YMB بررسی شد. کشت تلقیح ۴۸ ساعته ایزوله مورد نظر پس از دوره گرمخانه گذاری ۴۸ ساعته در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد و دور rpm ۱۶۰ و بررسی کدورت آن با شاهد ۰/۵ مک فارلند، به نسبت ۳٪ به محیط کشتYMB افزوده شد. میزان رشد نمونه ها به مدت ۷ روز گرمخانه گذاری با شرایط فوق، در فواصل زمانی ۲ ساعته با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در OD_{600nm} خوانده شد.

بهینه سازی رشد باکتری

بررسی تاثیر نوع منبع کربن بر رشد ایزوله

تاثیر چهار نوع منبع کربن بر میزان جمعیت بهترین ایزوله در محیط استاندارد YMB بررسی شد. برای این منظور میزان یک درصد از منابع قندی گلوکز، مانیتول، ساکارز و لاکتوز بطور جداگانه به محیط کشت فوق افزوده شد و پس از افزودن کشت تلقیح باکتری و گرمخانه گذاری به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد و دور rpm ۱۶۰، میزان رشد نمونه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در OD_{600nm} خوانده شد.

بررسی تاثیر نوع منبع نیتروژن بر رشد ایزوله

تاثیر منابع آلی (عصاره مخمر) و معدنی نیتروژن [نیترات پتاسیم (KNO_3) و کلرور آمونیوم(NH_4Cl)] بر میزان جمعیت بهترین ایزوله در محیط استاندارد YMB مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور به میزان ۰/۵ درصد از منابع ذکر شده به محیط کشت فوق بطور جداگانه افزوده شد و پس از افزودن کشت تلقیح باکتری و گرمخانه گذاری به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد و دور rpm ۱۶۰، میزان رشد نمونه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در OD_{600nm} خوانده شد.

بررسی تاثیر pH بر رشد ایزوله

برای این منظور در محیط استاندارد YMB تاثیر چهار pH ۶ ،۶,۵ ،۷ و ۷,۵ بر میزان جمعیت بهترین ایزوله مورد بررسی قرار گرفت. محیط کشت فوق در پنج pH ذکر شده به کمک کلریدریک اسید یک نرمال وهیدروکسید سدیم یک نرمال تنظیم تهیه شد. پس از افزودن کشت تلقیح باکتری و گرمخانه گذاری به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد و دور rpm ۱۶۰، میزان رشد نمونه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در OD_{600nm} خوانده شد.

بررسی تاثیر دما بر رشد ایزوله

برای این منظور در محیط استاندارد YMA تاثیر سه دما ۲۵ ، ۳۰ و ۳۵ درجه سانتیگراد بر میزان جمعیت بهترین ایزوله مورد بررسی قرار گرفت. پس از افزودن کشت تلقیح باکتری و گرمخانه گذاری به مدت ۴۸ ساعت در سه دمای ذکر شده و دور rpm ۱۶۰، میزان رشد نمونه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در OD_{600nm} خوانده شد.

استخراج رنگدانه کاروتنوئید از باکتری

برای استخراج رنگدانه باکتریایی، ابتدا ۵ میلی لیتر از کشت باکتری در دور ۴۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ

Archive of SID

www.SID.ir

شد. سپس مایع رویی به آهستگی برداشته و به رسوب باکتری ۲ میلی لیتر محلول استون: متانول (۷:۲) افزوده شد. نمونه به مدت دو ساعت در بن ماری ۵۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد و محلول رویی واجد رنگدانه مورد بررسی قرار گرفت.

استخراج آنتو سیانین ازگرهک

ابتدا گرهک ها به مدت ۱۲ ساعت در فریزر ۴- درجه سانتیگراد قرار داده شدند. سپس با میله شیشه ای له و مقدار ۳ میلی لیتر متانول حاوی یک درصد HCl به آن افزوده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد در تاریکی قرار داده شدند. سپس ۱ میلی لیتر آب مقطر و ۲ میلی لیتر کلرفورم به نمونه ها افزوده شد و در دور۴۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. در پایان محلول رویی حاوی رنگدانه به آرامی جدا گردید.

روشهای تایید رنگدانه های استخراج شده

تعیین λ ماکزیمم

برای تعیین λ ماکزیمم نمونه ها با دستگاه اسپکتروفتومتر ماوراء بنفش UviKon 922 در طول موج ۹۰۰- ۱۹۰ نانومتر بررسی شدند.

کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)

برای این منظور از کاغذهای Silicagel 60F (MERCK) و پنج نوع حلال بالا رونده متانول:بوتانول، اتانول: بوتانول، هگزان : متانول، هگزان :بو تانول و اتیل استات استفاده شد. پس از مدت زمان لازم ورقه های TLC را از حلال خارج کرده و در محیط خشک نموده و سپس در زیر دستگاه UV cabinet با طول موج nm ۲۵۴ و nm ۳۶۶ مشاهده گردید. باند ها و لکه های مشاهده شده علامت گذاری و شماره گذاری شده و R_f هر یک تعیین گردید.

گاز کروماتوگرافی جرمی

مقدار 1/0-5µL از نمونه رنگدانه جدا شده به وسیله سرنگ مخصوص به دستگاه تزریق گردید. سپس با استفاده از کتابخانه و اطلاعات موجود در رایانه دستگاه که اطلاعات و طیف های جرمی ترکیبات مختلف در آن وجود دارد، اقدام به شناسایی اجزاء جداسازی شد (۱۰).

بررسی آماری

بررسی های آماری با استفاده از برنامه اکسل و آنالیز رگرسیون و معنا دار بودن یا نبودن پارامترها بر مبنای $P>0.05$ و یا $P<0.05$ سنجیده شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از این تحقیق، جداسازی ۸۰ سویه باکتری ریزوبیوم از گرهک گیاهان لگوم را نشان داد. به نظر می رسد حضور Congo Red در محیط کشت سبب تسهیل در شناسایی جنس ریزوبیوم به علت کاهش رشد ساپروفیت ها از یک سو و تشخیص افتراقی کلنی موکوئیدی ریزوبیوم ها به علت عدم جذب معرف از سوی دیگر می گردد.

بررسی مورفولوژی نمونه های جدا شده، نشان داد که از نظر اندازه، رنگ و تعداد گرهکها تفاوت قابل ملاحظه ای وجود دارد. در ریشه نمونه های یونجه با سن کمتر از یکسال، گرهک ها صورتی نسبتا"درشت مشاهده گردید در حالیکه در نمونه های چند ساله تعداد گرهک اندک و یا اصلا" وجود نداشت. شکل ۱ تشکیل گرهک را در گیاه لوبیا و یونجه نشان می دهد.

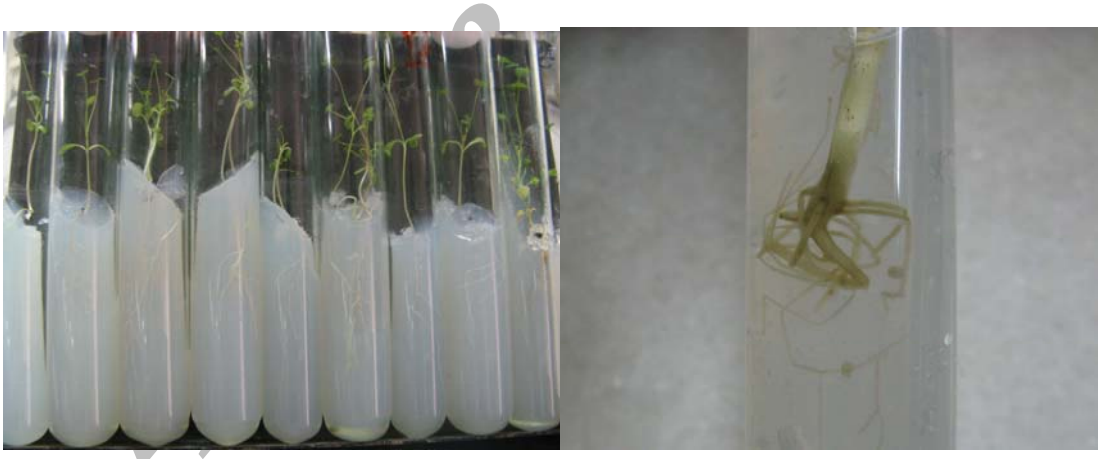
شکل ۱. گرهک در ریشه گیاه لوبیا (تصویر چپ) و یونجه (تصویر راست

Archive of SID

www.SID.ir

ضدعفونی گرهک ها با اتانل ۹۶ درجه و محلول هیپوکلریت سدیم برای کشت و جداسازی ریزوبیوم ها تاثیر زیادی در کاهش جمعیت ساپروفیت ها داشته و جداسازی را تسهیل نمود. مقایسه کشت سوسپانسیون باکتریایی حاصل از له کردن گرهک ها برروی دو محیط CRYMA و TY نشان داد که محیط CRYMA برای جدا سازی مستقیم ریزوبیوم از گرهک ها مناسب تر است و تعداد محدودتر میکروارگانسیمهای ساپروفیت در این محیط، امکان شناسایی کلنی های ریزوبیوم را تسهیل می کند. در این محیط کشت کلنی های ریزوبیوم بعد از ۴۸ تا ۷۲ ساعت ظاهر شدند. کلنی ها به رنگ سفید، مدور، محدب و لعاب دار قابل تشخیص بودند (شکل ۲).

شکل ۲. کلنی های ریزوبیوم در محیط CRYM



شکل ۳. Plant- infection . تشکیل گرهک در گیاه لوبیا (تصویر راست) و عدم تشکیل آن در گیاه یونجه (تصویر چپ)

در بررسی میکروسکوپی، این باکتریها گرم منفی، میله‌ای و بدون اسپورتشخیص داده شدند. پس از انجام روش Plant – infection test جهت بررسی قدرت گرهک سازی ایزوله‌ها بر روی گیاه میزبان، تمامی ایزوله‌ها بر روی گیاه لوبیا در مدت ۱۵ الی ۲۰ روز گرهک ایجاد کردند. هیچکدام از ایزوله ها توانایی تشکیل گرهک بر روی گیاه یونجه را نشان ندادند (شکل ۳). بررسی ریشه‌های گیاهان تیمار شده توسط باکتریها نشان داد که سرعت گرهک سازی در تعدادی از ایزوله ها بیشتر بوده است. همچنین گرهک‌های ایجاد شده در ابتدا ریز و سفید بودند و با گذشت زمان درشت و صورتی شدند. همچنین بررسی خصوصیات ظاهری گیاهان تیمار شده توسط باکتریها با گیاهان شاهد بدون مایع تلقیحی نشان داد که گیاهان تیمار شده از رشد بهتری برخوردار بودند.

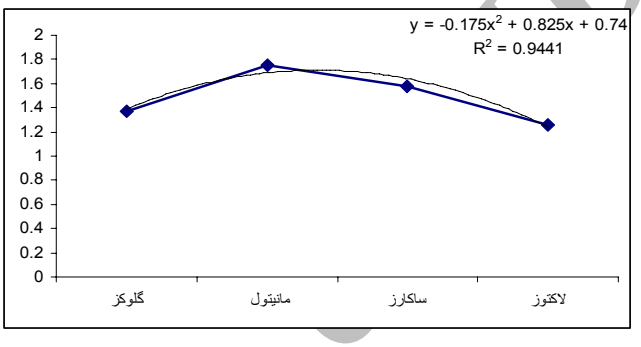
www.SID.ir

سرعت رشد کلنی ها در محیط های استفاده شده تقریبا" برابر بود. در محیط YMA کلنی ها موکوئیدی تر بودند. قابلییت جذب رنگ در ایزوله ها دیده نشد ولی در کشت های کهنه کمی صورتی رنگ می شدند.

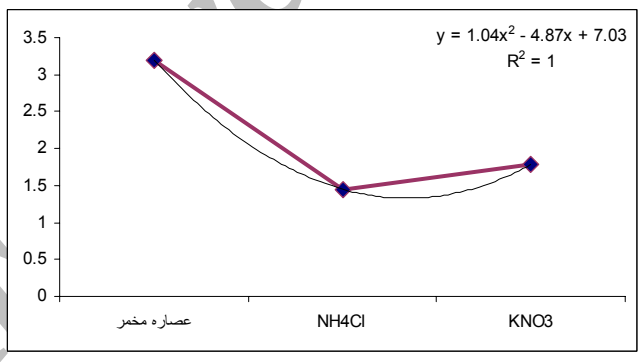
در محیط کشتMotility Agar تحرک باکتری به طرف پائین لوله که با تغییر رنگ محیط کشت از سبز به زرد در اثر هضم گلوکز همراه بود، به عنوان شاخص میزان حرکت هر ایزوله ارزیابی گردید. لذا باکتریهایی که سریعتر حرکت می‌نمودند طول منطقه تغییر رنگ یافته بیشتری را در یک زمان معین بخود اختصاص می‌دادند که این با سرعت حرکت باکتری مطابقت دارد. نتایج آزمایشات نشان داد که میزان حرکت در بین ایزوله‌های مختلف تقریبا" یکسان و در حدود ۳ الی ۴ سانتیمتر در طی ده روز بود.

از میان ۸۰ سویه ریزوبیوم جداسازی شده، تنها یک سویه (Y21) دارای رنگدانه نارنجی بود که جهت آزمونهای تکمیلی تولید نوع رنگدانه و بهینه سازی شرایط مورد بررسی قرار گرفت.

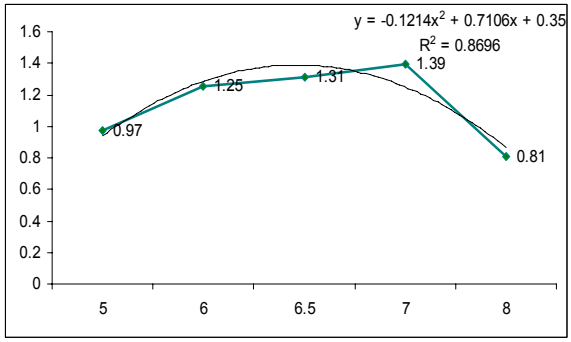
همانطور که در نمودار ۴-۱ نشان داده شده است، بیشترین تاثیر بر میزان رشد و تولید رنگدانه در ایزوله Y21 حضور قند مانیتول بعنوان منبع کربن، عصاره مخمر بعنوان منبع ازت، pH معادل ۷ و دمای ۳۰ درجه سانتیگراد می باشد.



نمودار ۱. تاثیر منابع مختلف کربن بر میزان رشد ایزوله Y21

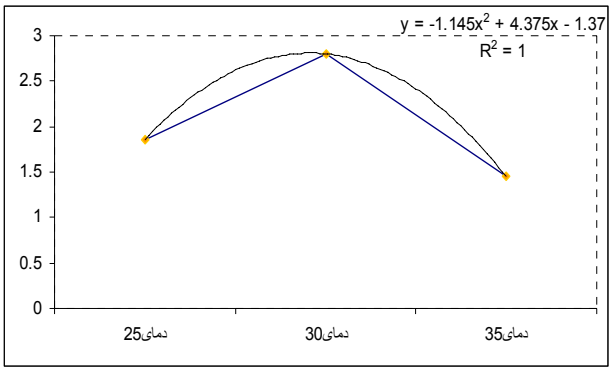


نمودار ۲. تاثیر منابع مختلف نیتروژن بر رشد و میزان تولید رنگدانه توسط ایزوله Y21



نمودار ۳. تاثیرpH بر رشد و تولید رنگدانه در ایزوله Y21

www.SID.ir



نمودار ۴. تاثیر سه دمای متفاوت در رشد و تولید رنگدانه در ایزوله Y21

عصاره مخمر سوبسترای مناسبی برای اکثر میکروارگانیسم ها می باشد. همچنین متداول ترین فاکتور رشد برای ریزوبیوم ها است، که ممکن است به عنوان منبع کربن و نیتروژن مورد استفاده قرار بگیرد (۱۱).

ریزوبیوم ها از نیترات ونمکهای آمونیوم به عنوان منبع نیتروژنی استفاده می کنند. تحقیقات نشان داده است که کلرور آمونیوم برای بعضی از سویه ها دارای اثر کمتری از عصاره مخمر است. همچنین به جهت جذب یون آمونیوم و پایین آمدن pH و از طرفی تولید اسید توسط باکتری کلرورآمونیوم تا زمانی که pH محیط مناسب باشد مصرف می شود و مازاد آن باقی می ماند (۱۲). طبق نتایج Baoling و همکاران در سال ۲۰۰۷ و همچنین Kucuk و همکاران در سال ۲۰۰۶ pH معادل ۷ و دمای ۳۰ درجه سانتیگراد بهینه برای رشد باکتری در محیط YMA می باشد (۱۳ و ۱۴).

در این تحقیق برای استخراج آنتوسیانین طی یک فرآیند چند مرحله ای از متانول اسیدی استفاده شد. در سال ۲۰۰۶ Kapasakalidis و همکاران ازمتانول اسیدی برای استخراج آنتوسیانین های انگور استفاده کردند. در بیشتر موارد محققان جهت استخراج رنگدانه آنتوسیانین از میوه ها و سبزیجات مختلف از متانول و یا اتانل اسیدی استفاده نموده اند، اما متانول موثرتر شناخته شده است. همچنین مورد قابل توجه دیگر کمتر بودن میزان سمیت اتانل نسبت به متانول است (۱۵).

جهت تعیین نوع رنگدانه ها از روشهای TLC و گاز کروماتوگرافی - طیف سنجی جرمی استفاده شد. امروزه از روش های مختلفی نظیر اسپکتروسکوپی مادون قرمز(IR)، اسپکتروسکوپی جرمی(MS)، رزونانس مغناطیسی(NMR)، کروماتوگرافی‌باکارایی بالا (HPLC) و گاز کروماتوگرافی - طیف سنجی جرمی جهت مطالعه انواع رنگدانه ها استفاده می شود. Muller & Simon در سال ۱۹۷۹ برای اولین بار از روش GC-Mass برای شناسایی مقادیر اندک آنتوسیانین ها در کشمش استفاده کردند (۱۶).

نتایج کروماتوگرافی لایه نازک از نمونه گرهک گیاه لوبیا و یونجه تشکیل دو تا سه باند با R_F های ۰/۸۵، ۰/۴۸ و ۰/۵۶ نشان داد. لاندای ماکزیمم در طول موجهایی در ناحیه ۲۸۰ تا ۳۶۰ جذب مشخصی را از خود نشان دادند و همچنین دارای جذب در ناحیه ۵۲۰ نانومتر نیز بودند.

مجموعه نتایج فوق همراه با نتایج گاز کروماتوگرافی طیف سنجی جرمی (نمودار۵) حضور رنگدانه آنتوسیانینی را تایید نمود. در نمونه فوق علاوه بر این رنگدانه حضور ترکیبات فرار بوتانوئیک اسید دی متیل استر، پالمیتک اسید، لینولئیک اسید متیل استر، متیل سیس اکتاد کانوآت، استئاریک اسید متیل استر و سیکلو پروپا نوئیک اسید متیل استر مورد تایید قرار گرفت.

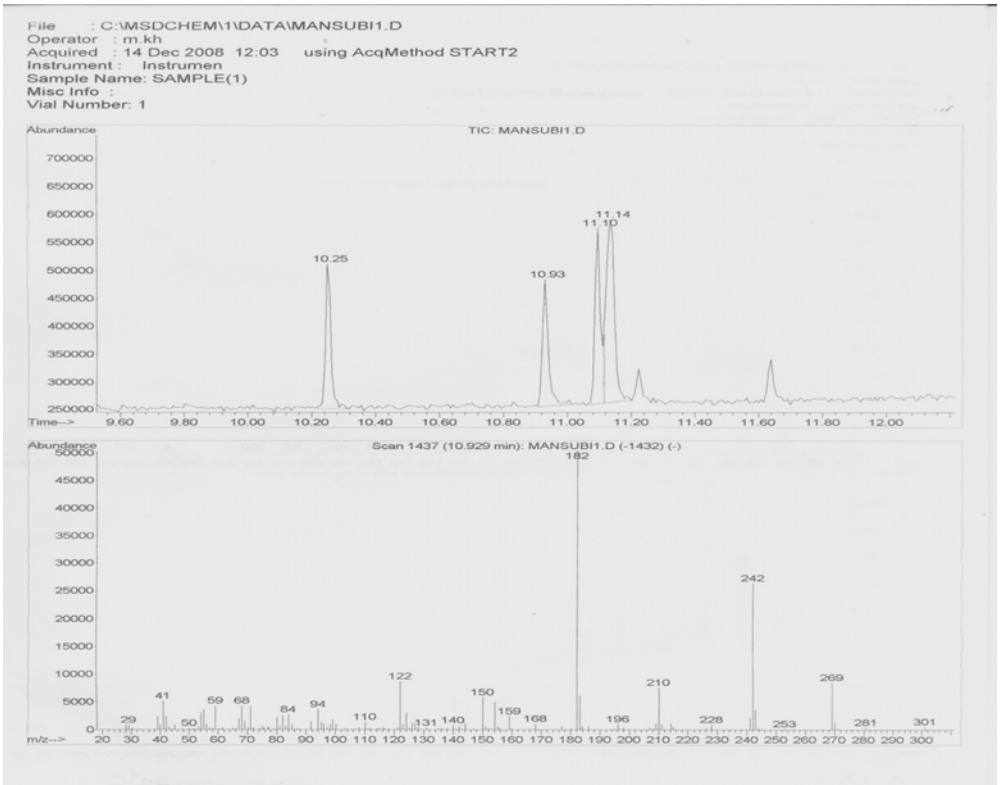
نتایج کروماتوگرافی لایه نازک از رنگدانه نارنجی تشکیل تک باند باR_F= ۰/۷۶ و لاندای ماکزیمم، بیشترین میزان جذب را در محدوده ۴۷۶ nm نانومتر نشان داد. نتایج حاصل احتمال وجود رنگدانه کارتنوئیدی کانتاگزانتین را در محیط کشت نشان می دهد. Lorquin همکاران‌در سال۱۹۹۷سویه‌های از *Bradyrhizobium* را شناسایی کردند که توانایی تولید رنگدانه کانتاگزانتین را داشتند. در نتایج گاز کروماتوگرافی علاوه بر حضور رنگدانه آنتوسیانین و ترکیبات فرار طیف جذبی لگ هموگلوبین

Archive of SID

www.SID.ir

نیز مشاهده گردید (۱۷).

با توجه به نتایج فوق می توان انتظار حضور رنگدانه های آنتوسیانینی را در حالت زندگی همزیستی ریزوبیوم با گیاه لگوم و رنگدانه های کارتنوئیدی را در حالت زندگی آزاد در محیط کشت داشت و با تغییر شرایط محیطی و بهینه سازی آن به نوع رنگدانه مورد نظر دستیابی یافت.



نمودار ۵. گراف گاز کروماتوگرافی - طیف سنجی جرمی از نمونه رنگدانه آنتوسیانینی استخراج شده از گرهک گیاه لوبیا

منابع

1- Jordan D. C, (1984). Family III. Rhizobiaceae. Pages 234-256 in R. K. Krieg and J. G. Holt, editors. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore.

2- Bahar M; Majnil J; Wexler M; Fry Poole S. P; Murphy J.P, (1998). A model for the catabolism of rhizopine in Rhizobium Leguminosarum involves aferrdoxin oxygennase complex and the inositol degradative pathway", The American Phytopathological. Society, 1057-1068

3- Laguerre G; S. M; Nour V; Macheret J; Sanjuan P; Drouin; Amarger N, (2001). Classification of rhizobia based on nodC and nifH gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among Phaseolus vulgaris symbionts. Microbiology **147**:981-993.

4- Andersen Ø. M.; Jordheim M., (2006). The Anthocyanins. In Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications, Andersen, Ø. M., Markham, K. R., Eds., CRC Press: Boca Raton; 471–553.

5- Pazmiő-Durn A. E; Giusti M. M; Wrolstad R. E; Glŕia B. A, (2001). Anthocyanins from oxalis triangularis as potential food colorants. Food Chemistry, **75**(2): 211–216.

Archive

www.SID.ir

6- Close D. C; Beadle C. L. (2003). The ecophysiology of foliar anthocyanin. Bot. Rev. **69**:149–161.

7- Keatinge J. D. H., Materon L. A., Beck D. P., Yurtsever N., Karuc K. and Altuntas S. (1995). The Role of Rhizobial Biodiversity in Legume Crop Productivity in the West Asian Highlands. Experimental Agriculture, **31**: 473-483 Cambridge University Press

8- Hom, S.S.M., Uratsu, S.L. and Hoang, F. (1984). Transposon Tn5-induced mutagenesis of *Rhizobium japonicum* yielding a wide variety of mutants, Bio/Technology **3**: 143- 149

9- Gamborg OL; Wetter LR, (1975). Plant Tissue Culture Methods. Saskatoon: Natl. Res. Council of Canada.

10- Skoog D. A; West Holt D. M, (1994). Principle of Instrumental Analysis, Saunders College Publishing, Sixth edition.

۱۱- ملـــک‌زاده فریـــدون، میکروبیولـــوژی عمـــومی، انتشارات عقیق، چاپ چهارم، ۱۳۷۶.

12- Alschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W and Lipman D.J., Jordan D.C. (2002). Transfer of *Rhizobium japonicum* to Bradyrhizobium gen. nov., ... the Mediterranean shrub Spanish broom (Spartium junceum), J. App. Microbiol. **92**, 155-168.

13- BaoLing Huang, ChengQun Lü, B o Wu and LiQin Fan, (2007). A rhizobia strain isolated from root nodule of gymnosperm Podocarpus macrophyllus, Science in China Press, **50**: 2, 228-233.

14- Kucuk C, Kivanc M, Kinaci E, (2006), Characterization of RhizobiumSp. Isolated from Bean, Turk J Biol, **30**: 127-132

15- Kapasakalidis, P.G., Rastall, R.A. and Gordon, M.H. (2006). Extraction of polyphenols from processed black, Outlook on Agriculture, **35**(4), 291-298.

16- Affolter M, Percival-Smith A, Müller M, Billeter M, Qian YQ, Otting G, Wüthrich K, Gehring WJ. (1977). Mutational analysis of the Rhizobium meliloti nifA promoter. Proc Natl Acad Sci U S A. **74**(12): 5463–5467.

17- Lorquin, F. Molouba and B. Dreyfus, (1997). Identification of carotenoid pigment, Systematic and Applied Microbiology, **63**: 1151–1154.

Archive of SID

www.SID.ir