مقایسه میزان تولید پلی‌ساکارید خارج سلولی توسط باکتریهای سینوریزوبیوم ملیلوتی مقاوم و حساس به شوری

محبوبه ابوالحسنی زراعتکار[۱]، امیر لکزیان[۲]، احمد تاج آبادی پور[۳] و حمید محمدی[۴]

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد دانشگاه فردوسی مشهد.
mahboobeh_abolhasani@yahoo.com
۲و۳- عضو هیأت علمی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، دانشگاه ولیعصر (عج).
۴- دانشگاه آزاد اسلامی واحد رفسنجان.

مقدمه

تنشهای محیطی مختلف از جمله تنش شوری، خشکی و عناصر غذایی بر روی ترکیبهای سطح یاخته‌ای باکتریها به خصوص پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی تاثیر گذار هستند[۱]. به طوری که جدایه‌های ریزوبیومی در شرایط نامساعد محیطی، برای مقاومت در برابر این شرایط میزان پلی‌ساکارید برون یاخته‌ای بیشتری تولید می‌کنند[۱]. بین جدایه‌های مختلف سینوریزوبیوم ملیلوتی از نظر میزان تولید پلی‌ساکارید برون یاخته‌ای تفاوت وجود دارد[۱]. جدایه‌های ریزوبیومی مقاوم به تنش شوری میزان پلی‌ساکارید بیشتری تولید می‌کنند و با افزایش پلی‌ساکاریدهای برون یاخته‌ای شرایط نامساعد را تحمل نموده و به رشد خود ادامه می‌دهند[۱]. از طرفی ماندگاری جدایه‌های ریزوبیوم در خاک بستگی به توانایی این جدایه‌ها در اتصال به گیاه میزبان و ایجاد یک رابطه همزیستی سودمند دارد و در این میان پلی‌ساکاریدهای برون یاخته‌ای اهمیت ویژه‌ای در تخصصی شدن ریزوبیومها در شناسایی این جدایه‌ها توسط گیاه میزبان دارند [۵]. بنابراین جدایه‌های مقاوم نه تنها شرایط تنش شوری و خشکی را بهتر می‌توانند تحمل کنند بلکه در ایجاد رابطه همزیستی مفید با گیاه میزبان نیز موفقتر از سایر جدایه‌ها عمل می‌کنند[۳].

مواد و روشها

از سطح استان کرمان تعدادی جدایه جداسازی و خالص‌سازی شدند. پس از آزمون گرم‌زایی و کشت در محیط کشت جامد TY حاوی غلظتهای متفاوت نمک کلرید سدیم ۸ جدایه سینوریزوبیوم تایید و برای مطالعه انتخاب شدند.

قبل از هر مرحله از آزمایش ابتدا عمل یکسان سازی تعداد سلول جدایه‌ها انجام شد. به منظور تعیین تحمل به شوری جدایه‌ها از محیط کشت مایع TY با غلظتهای متفاوت شوری ۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم استفاده شد. و جدایه‌های حساس و مقاوم به شوری انتخاب شدند [۴]. جهت آزمون بررسی تاثیر میزان پلی‌ساکارید برون یاخته‌ای باکتریهای سینوریزوبیوم بر مقاومت باکتری در برابر شرایط شور از روش Luch و Miller در سال ۲۰۰۱ استفاده شد [۲]. نتایج حاصل از هر مرحله با نرم‌افزار MINTAB به صورت فاکتوریل و بر مبنای طرح کاملا تصادفی مورد آنالیز قرار گرفت. میانگینها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ مقایسه شدند.

نتایج و بحث

نتایج بدست آمده از آزمون بررسی مقاومت به شوری جدایه‌های سینوریزوبیوم نشان داد که شوری اثر منفی بر رشد جدایه‌های سینوریزوبیوم دارند و مقاومت جدایه‌های مختلف سینوریزوبیوم در برابر تنش شوری متفاوت است (جدول۲). مطالعه میزان تولید پلی‌ساکاریدهای برون یاخته‌ای جدایه‌های سینوریزوبیوم در شرایط شور نشان داد که بین جدایه‌های سینوریزوبیوم از نظر میزان تولید پلی‌ساکاریدها تفاوت معنی‌داری وجود دارد. نتایج بدست آمده از مقایسه میانگین مشاهده می‌شود که چهار جدایه سینوریزوریزوبیوم مقاوم به شوری (S36K، S27K، S50K و S64K) به ترتیب بیشترین پلی‌ساکارید را تولید کردند (جدول ۳). همان گونه که مشاهده می‌شود جدایه‌های مقاوم تقریبا ۱۰ برابر پلی‌ساکارید بیشتری نسبت به جدایه‌های حساس تولید کردند (جدول ۳). از طرفی با توجه به جدول ۱ مشاهده شد که اگر چه رشد جدایه‌ها با افزایش غلظت نمک (کاهش پتانسیل آب) یک روند کاهشی داشته است اما

در غلظت ۴۰۰ میلی‌مولار نمک کلرید سدیم رشد جدایه‌ها بطور ناگهانی افزایش پیدا کرده است. از این رو بنظر می‌رسد که در غلظتهای فوق مکانیسمهای دفاعی سلول در برابر تنش قدری فعال شده و سلول برای ادامه حیات تمام مکانیزمهای حفاظتی خود را بکار می‌گیرد. از جمله این مکانیزمها تولید پلی‌ساکارید بیشتر است که منجر به افزایش تحمل جدایه‌ها در برابر تنش می‌شود که نتایج حاصل از تولید میزان تولید پلی‌ساکارید در غلظتهای متفاوت نیز بیانگر این مطلب است (جدول ۳). لیکن از آنجا که این جدایه‌ها با غلظتهای بسیار زیاد نمک روبرو می‌شوند که علاوه بر ایجاد یک پتانسیل اسمزی بسیار منفی سبب ایجاد سمیت در سلول شده و در نهایت سلولها از بین می‌روند.

جدول ۱- مقایسه میانگین چگالی نوری (میزان رشد) جدایه‌های سینوریزوبیوم در غلظتهای متفاوت NaCl

غلظت نمک	0 mM	200 mM	400 mM	650 mM
میانگین	0.62 a	0.10 c	0.15 b	0.02 d

جدول۲- مقایسه میانگین چگالی نوری(میزان رشد) جدایه‌های مختلف سینوریزوبیوم در میانگین چهارغلظت نمک کلریدسدیم

جدایه	S36K	S27K	S50K	S64K	S13K	S21K	S53K	S56K
میانگین	0.43 a	0.29 b	0.27 bc	0.26 c	0.13 d	0.13 d	0.12 de	0.10 e

جدول۳- مقایسه میانگین میزان پلی‌ساکاریدهای برون یاخته‌ای در جدایه‌های مختلف سینوریزوبیوم و غلظتهای مختلف نمک-کلرید سدیم

غلظت / جدایه	0 mM	200 mM	400 mM	650 mM	میانگین
S36K	7.05 a	3.84 e	3.88 e	1.00 k	3.94 a
S27K	6.02 b	2.45 g	3.11 f	0.38 p	2.99 b
S50K	5.20 c	1.35 j	1.98 h	0.65 m	2.95 c
S64K	5.01 d	1.88 i	1.88 i	0.31 q	2.27 c
S13K	0.84 n	0.55 q	0.55 n	0.01t	0.42 d
S21K	0.90 l	0.64 r	0.46 o	0.02t	0.40 d
S53K	0.47 o	0.15 r	0.15 s	0.02 t	0.21 e
S56K	0.37 p	0.06 t	0.14 s	0.02 t	0.15 f
میانگین	3.23 a	1.29 c	1.52 b	0.30 d	

منابع

[1] Delavechia, C., Hampp, E., Fabra, A., and Castro, S. 2003. Influence of pH and calcium on the growth, polysaccharide production and symbiotic association of *Sinorhizobium melliloti* SEMIA 116 with alfalfa roots. *Biology and Fertility of Soils*. 38: 110-114.

[2] Louch, H.A. and Miller, K.J. 2001. Synthesis of a low-molecular-weight from of exopolysacharide by *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. *Applied and Environmental Microbiology*. pp: 1011-1014.

[3] Shamseldin, A., and Werner, D. 2005. High salt and high pH tolerance of new isolated *Rhizobium etli* strains from Egyptian soils. *Current Microbiology*.50: 11-6.

[4] Somasegaran, P., and H.j. Hoben, H.J. 1994. Handbook for rhizobia: Methods in legume-rhizobium technology. *Springer-Verlay. New York*. p: 450.

[5] Sylria, D.M., Fuhrmann, J.J., Hartel, P.G., and Zuberer, D.A. 1999. Principles and applications of soil microbiology.