مقایسه روش های کشت درمحیط کرم آزورل S برای ارزیابی پتانسیل تولید سیدروفور سویه های بومی ریزوبیومی

حسینعلی علیخانی ، ناهید صالح راستین و هانی آنتون

به ترتیب: مربی و دانشجوی دورهٔ دکتری و دانشیارگروه‌خاکشناسی‌دانشکده‌کشاورزی دانشگاه تهران و استاد دانشگاه لاوال‌کانادا

مقدمه

میکروارگانیسم‌های خاکزی می‌توانند با ترشح ترکیبهای‌آلی کلات‌کنندهٔ‌آهن با تنش کمبود این عنصر در محیط رشد خود، مقابله نمایند. این ترکیبات‌آلی گرچه دارای ساختمان شیمیایی بسیار متفاوت هستند ولی براساس ویژگی مشترکی که به لحاظ میل‌ترکیبی شدید وکاملاً اختصاصی برای پیوندشدن با آهن فریک، افزایش حلالیت وامکان انتقال آن به درون سلول‌های میکربی دارند ، با واژه عمومی " سیدروفور" ، شناخته می شوند(۷ و۹). توان تولید سیدروفور درانواع گونه های میکربی وحتی در سویه های مختلف درون یک گونه ، بسیار متفاوت است(۱۲) وتنها انواعی که سیدروفورها را به مقداری بیش از نیاز سلول خود تولید می کنند، می توانند برافزایش قابلیت جذب آهن درمحیط رشد خود ، مؤثر واقع شوند(۱و۸). به همین دلیل باکتریهای ریزسفری مانند ریزوبیوم ها که حضور آنها عمدتاً درحوزهٔ فعالیت سیستم ریشه ای گیاه است، درصورت برخورداربودن از پتانسیل بالای تولید سیدروفور ، می توانند از نظر کمک به تغذیه آهن گیاه مؤثرتر از سایرگروههای خاکزی باشند. اولین گام در راه انتخاب سویه های برتر ، یافتن روشی مناسب برای ارزیابی سویه های متعدد ریزوبیومی است که درعین دقت بالا و حساس بودن به مقدار جزئی تولید سیدروفور ، سهولت و سرعت کافی برای امکان غربالگری تعداد زیادی از نمونه ها را دارا باشد. محیط جامد کرم آزورل S (CAS- آگار) از امتیازهای یاد شده برخوردار است (۱۳) ولی مادهٔ دترژان موجود در ترکیب این محیط که بمنظور جلوگیری از رسوب معرف رنگی از آن استفاده می شود ، برای بسیاری از میکروارگانیسم ها حالت سمی دارد ومانع رشد آنها درحالت کشت مستقیم بر روی این محیط می شود (۱و۱۱). هدف این تحقیق یافتن روشی مناسب برای استفاده از محیط CAS- آگار ، به منظور ارزیابی پتانسیل تولید سیدروفور در سویه های ریزوبیومی بومی خاکهای ایران است.

مواد وروشها

در این تحقیق ۴۴۷ سویه (برخی سویه‌های میکربی از موسسه خاک و آب گرفته شده است) متعلق به گونه های مختلف ریزوبیومی که از انواع لگوم های زراعتی کشت شده درخاکهای مناطق مختلف ایران ، جداسازی وپس از انجام آزمون‌های لازم براساس روش های استاندارد (۳) شناسایی شده بودند ، مورد استفاده قرار گرفتند . هنگام استفاده از این سویه‌ها ، کشت تازهٔ هر یک بر روی محیط YMB تهیه وجمعیت آن براساس اندازه گیری دانسیته نوری و استفاده از منحنی استاندارد ، درحدود 5×10^{8} cfu ml^{-1} تنظیم گردید و محیط های مورد استفاده ، به روش قطره گذاری با ۷ میکرولیتر از این سوسپانسیون مایه زنی شدند . محیط CAS- آگار براساس روش پیشنهادی شوئین ونیلند آماده شد(۱۳). استفاده از این محیط با سه روش شامل : کشت مستقیم ، پلیت نیمانیم (۱۰) ومحیط دولایه (معرفی شده توسط نگارندهٔ اول مقاله) ، انجام گرفت. در روش کشت مستقیم ، مقدار ۲۵ میلی لیتر از محیط CAS - آگار به هر ظرف پتری اضافه گردید و سطح آن در چهار نقطه به فواصل مساوی مایه زنی شد. در روش پلیت نیمانیم ، نیمی از ظرف حاوی محیط اختصاصی ریزوبیوم (YMA) و نیمی دیگر دارای محیط CAS- آگار بود ومایه زنی در چهار نقطه (مرکز محیط YMA ، مرکز محیط CAS و دو نقطه روی محیط YMA و درمجاورت نزدیک خط تماس بین دو محیط) انجام گرفت. در روش دو لایه ، یک لایهٔ نازک به قطر حدود ۱ میلی متر از محیط YMA بر روی محیط CAS- آگار اضافه گردیدو سطح این لایه در چهار نقطه مایه زنی شد. پس از خوابانیدن محیط های کشت شده در دمای $28^{0}C$ در فواصل ۷ ، ۱۴ و۲۱ روز ، قطر هالهٔ نارنجی رنگ ظاهر شده در اطراف کلنی باکتری و قطر کلنی اندازه گیری شدند و شاخص های مربوط به حداکثر قطر هاله ، نسبت قطر هاله به قطر کلنی، سرعت توسعه هاله بر حسب میلی متر در روز و نیز درجه بازدارندگی محیط CAS- آگار برای هر سویه تعیین گردیدند.

نتایج و بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که بسیاری ازسویه‌های ریزوبیومی، قادر به رشد مستقیم بر روی محیط CAS_ آگار نیستند. نسبت‌سویه‌های دارای‌توان‌رشد(CAS^+) ، درگونه‌های‌مختلف تفاوت داشت. حداقل‌توان‌رشد درسویه‌های *سینوریزوبیوم ملیلوتی*(S.m) وحداکثر آن درسویه‌های مزوریزوبیوم سیسری (Mc) مشاهده شد. (جدول۱) .حالت بازدارندگی محیط CAS_ آگار برای بسیاری ازباکتریهای غیرریزوبیومی وقارچها وهمینطور برای برخی از گونه‌های ریزوبیومی، توسط محققین مختلف گزارش شده است(۱،۱۰و۱۱). دربین سه روش کشت مورد بررسی، روش پلیت نیمانیم، حداقل بازدارندگی را برای رشد سویه های ریزوبیومی دارا بود ومحیط دو لایه نیز درمقایسه با کشت مستقیم ، حالت بازدارندگی بسیار کمتری را برای رشد این باکتریها نشان داد. توان تولید سیدروفور در اکثر سویه های ریزوبیومی (۸۵/۹٪) مشاهده شد. سویه‌های *برادی ریزوبیوم ژاپنیکوم*(BJ) نسبت به سایر گونه های ریزوبیومی ، کمترین تعداد تولید کنندهٔ سیدروفور را داشتند.

با درنظرگرفتن مجموع فاکتورهای بررسی‌شده، سویه‌های *سینوریزوبیوم ملیلوتی* (Sm)، ازنظرتوان‌تولید سیدروفور بر سایر گونه‌ها برتری داشتند. این برتری درمورد برخی از سویه های این گونه درمقایسه با سویه های برادی ریزوبیوم همزیست با بادام زمینی(۱۴) ویا ریزوبیوم های همزیست با گونه‌های لوتوس (۶) نیز گزارش شده است. باتوجه به نقش مؤثر ریزوبیوم های تولید کنندهٔ سیدروفور درافزایش گره بندی درگیاه میزبان وبهبود کارآیی تثبیت نیتروژن ، استفاده از سویه های کاملاً مؤثر به لحاظ کارآیی همزیستی ودرعین حال توانمند از نظر تولید سیدروفور ، برای تهیه مایه تلقیح های ریزوبیومی ، قابل توصیه است.

منابع مورد استفاده

1- Alexander, D. B. and D.A.Zuberer. 1991.Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria.Biol. Fertil . Soils.12:39-45
2- Arora, N. K., S. C. Kang and D.K.Maheshwari . 2001. Isolation of siderophore producing strains of *Rhizobium meliloti* and their biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* that causes charcoal rot of groundnut. Current Science . 81(6): 673-677.
3- Beck, D. P., L. A. Materon and F. Afandi. 1993. Practical Rhizobium-Legume Technology Manual.Technical Manual No.19,ICARDA ,Syria.
4- Buyer, J. S., L. J. Sikora and R. L. Chaney. 1989. A new growth medium for the study of siderophore mediated interactions. Biol . Fertil . Soils . 8 : 97-101.
5- Carson, K. C., J.-M., Meyer and M.J.Dilworth.2000.Hydroxamate siderophores of root nodule bacteia .Soil Biol. Biochem.32:11-21.
6- Fabiano, E., G.Gualtieri, C.Pritsch, G. Polla and A. Arias. 1994. Extent of high-affinity iron transport systems in field isolates of rhizobia.Plant and Soil.164:177-185.
7- Guerinot, M. L. 1991. Iron uptake and metabolism in the *rhizobia / legume symbioses*. Plant and Soil. 130: 199-209.
8- Johnson,G. V., A. Lopez and N. La Valle Foster. 2002. Reduction and transport of Fe from siderophores . Plant and Soil .241:27-33.
9- Marschner, H. 1995 .Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press .London .
10- Milagres, A. M. F., A. Machuca and D. Napoleao. 1999. Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S(CAS) agar plate assay. J. Microbiol .Methods. 37:1-6.
11- Payne, S. M. 1994. Detection, isolation and characterization of siderophores .Methods Enzymol . 235:329-344.
12- Persmark, M., T. Frejd and B. Mattiasson. 1990.Purification, characterization,and structure of pseudobactin 589 A, a siderophore from a plant growth promothig *Pseudomonas*. Biochemistry. 29:7348-7356.
13- Schwyn , B. and J.B.Neilands. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores . Anal. Biochem . 160:47-56.
14- Van Rossum , D.,A.Muyotcha and H.W.van Verseveld . 1994. Siderophore production by *Bradyrhizobium* spp. strains nodulating groundnut. Plant and Soil . 163:177-187.