بررسی تکثیر باکتری Sinorhizobium meliloti در چند محیط کشت ارزان قیمت

شیرین قربانی، احترام سادات رحیمی، کاظم خاوازی و محمدحسین ارزانش[1]*

چکیده

مرحله تکثیر سویه‌های انتخاب شده از باکتری مورد نظر، یکی از پرهزینه‌ترین مراحل تولید مایه تلقیح می‌باشد. لذا معمولاً در فرآیند تولید صنعتی ریزوبیوم‌ها سعی می‌گردد تا از فرآورده‌های فرعی کارخانجات صنایع غذایی به تنهایی و یا با افزودن مواد دیگر، به عنوان محیط تکثیر استفاده گردد. در این تحقیق نحوه تکثیر باکتری مذکور در سه محیط *Malt sprout extract*، *Dehydrated cheese whey* و پایه شیمیایی محیط *Yeast extract mannitol* به همراه سه نوع منبع نیتروژن؛ کلرور آمونیوم، نیترات پتاسیم و عصاره مخمر؛ چهار نوع منبع کربن: مانیتول، گلوکز، گالاکتوز و سوکروز و در دو pH (7، 6/8) بررسی گردید. این آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی، بصورت فاکتوریل و با سه تکرار انجام شد. در این آزمایش ایزوله SM-11 (*S. meliloti*) با جمعیت اولیه 2×10^5Cells/ml به ارلن‌های 100ml حاوی محیط‌های مذکور تلقیح و پس از دو روز، جمعیت باکتری با روش plate-count و روی محیط YMA حاوی کنگورد شمارش گردید. نتایج این آزمایش نشان داد که جمعیت باکتری پس از سه روز از زمان تلقیح در محیط پایه Malt به همراه قند مانیتول به عنوان منبع کربن و عصاره مخمر به عنوان منبع نیتروژن در pH=7 به $7/94\times10^9$ Cells/ml و نیز جمعیت باکتری در محیط مذکور به همراه قند سوکروز به عنوان منبع کربن و نیترات پتاسیم به عنوان منبع نیتروژن در pH=6/8 به $4/5\times10^9$ Cells/ml رسید و این در حالی بود که جمعیت باکتری در محیط استاندارد YMB به $5/24\times10^8$ Cells/ml رسید. همچنین جمعیت باکتری پس از سه روز از زمان تلقیح در محیط استانداردYMB وpH=6/8 به $2/07\times10^9$ Cells/ml و نیز جمعیت باکتری در محیط مذکور به همراه قند سوکروز به عنوان منبع کربن و عصاره مخمر به عنوان منبع نیتروژن در pH=7 به $5/24\times10^8$Cells/ml رسید. نتایج مذکور نشان داد که برای تکثیر ارزان قیمت این ایزوله جهت تولید صنعتی مایه تلقیح آن، می توان از محیط پایه Malt به همراه قند سوکروز و نیترات پتاسیم استفاده کرد.

واژه های کلیدی: مالت اسپروت، آب پنیر، سینوریزوبیوم ملیلوتی.

مقدمه

یونجه یکی از مهم‌ترین گیاهان علوفه‌ای است که بیش از ٦٠٠ هزار هکتار از زمین‌های زراعی کشور را به خود اختصاص می‌دهد (بی‌نام، ١٣٧٨). این گیاه قادر است از طریق همزیستی با باکتری *Sinorhizobium meliloti* تمام یا بخش قابل ملاحظه‌ای از نیتروژن مورد نیاز خود را تأمین نماید (Gault و همکاران، ١٩٩٥؛ Vance، ١٩٩٨) بنابراین در صورت وجود تعداد قابل قبولی از باکتری‌های *S. meliloti* مناسب در ریزوسفر و یا عرضه آن به سیستم ریشه‌ای یونجه از طریق مصرف مایه تلقیح و متعاقباً استقرار همزیستی، بخش قابل ملاحظه‌ای از کودهای شیمیایی نیتروژنه مصرفی قابل صرفه‌جویی است. مرحله تکثیر باکتری یکی از پرهزینه‌ترین و حساس‌ترین مراحل تولید یک مایه تلقیح ریزوبیومی می‌باشد (Bissonnette و همکاران، ١٩٨٦؛ Somasegaran و Hoben، ١٩٩٤) محتویات محیط کشت‌های تکثیر ریزوبیوم‌ها عموماً شامل مواد معدنی،

1- به ترتیب استادیار گروه زیست شناسی دانشکده علوم پایه، دانشگاه الزهرا(س)، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه الزهرا (س)، استادیار پژوهش مؤسسه تحقیقات خاک و آب، پژوهشگر مؤسسه تحقیقات خاک و آب

*- وصول: 83/7/6 و تصویب: 84/2/25

منبع کربن، منبع نیتروژن، ویتامین و فاکتورهای رشد است (Jordan، ۱۹۸٤؛ Cliquuet، ۱۹۹۲؛ Beck و همکاران ۱۹۹۳؛ Somasegaran و Hoben، ۱۹۹٤). اگرچه محیط کشت‌های بسیار گوناگونی برای ریزوبیوم‌ها گزارش شده است (Parcks، ۱۹۹۳) ولی محیط کشت Yeast Extract Mannitol Broth (YMB) مرسوم‌ترین محیط برای تکثیر باکتری‌های ریزوبیومی است (Vincent، ۱۹۷۰). که گاهی به دلیل عدم دسترسی به قند مانیتول و یا به دلایل اقتصادی ممکن است این قندها با قندهای سوکروز یا گلسیرول جایگزین شود (Somasegaran و Hoben، ۱۹۹٤). در این محیط کشت، نمک‌های دی‌پتاسیم فسفات، سولفات منیزیم و کلرور سدیم به عنوان مواد معدنی، قند مانیتول به عنوان منبع کربن و عصاره مخمر به عنوان منبع نیتروژن، ویتامین و فاکتورهای رشد محسوب می‌شوند (Beck و همکاران، ۱۹۹۳؛ Somasegaran و Hoben، ۱۹۹٤). در خصوص تنوع استفاده از منابع مختلف کربن توسط ریزوبیوم‌ها تحقیقات مفصلی انجام شده است (Stower، ۱۹۸۵؛ Bissonntte، ۱۹۸٦؛ Beck و همکاران، ۱۹۹۳). نتایج نشان داده است که ریزوبیوم‌ها می‌توانند به استثناء چند ترکیب محدود، طیف وسیعی از ترکیبات کربنی را برای سنتز و یا تولید انرژی استفاده کنند (Kahn و همکاران، ۱۹۹۸). این باکتری‌ها قادرند از ترکیبات کربنی بسیار گسترده‌ای شامل ترکیبات یک کربنه مانند دی‌اکسید کربن، ترکیبات دو کربنه مانند استات، ترکیبات سه کربنه مانند گلیسرول، ترکیبات چهار کربنه مانند سوکسینات، ترکیبات پنج کربنه مانند آرابینوز، ترکیبات شش کربنه مانند گلوکونات و همچنین از دی‌ساکاریدها، تری‌ساکاریدها، قندهای الکلی، اسیدهای آلی و ترکیبات حلقوی استفاده کنند (Kahn و همکاران، ۱۹۹۸). این توانایی در همه ریزوبیوم‌ها یکسان نبوده و جنس‌ها، گونه‌ها و حتی سویه‌های مختلف ریزوبیوم، رفتارهای متفاوتی را از خود به نمایش می‌گذارند که گاهی از این ویژگی برای گروه‌بندی ریزوبیوم‌ها در مطالعات «تنوع» نیز استفاده می‌شود (Amargar،۲۰۰۱). در خصوص دی‌ساکاریدها که یکی از مهم‌ترین منابع کربنی برای تکثیر ریزوبیوم‌ها به شمار می‌روند؛ تفاوت فاحشی بین ریزوبیوم‌های تند رشد و کند رشد وجود دارد. ریزوبیوم‌های کند رشد مانند *Bradyrhizobium japonicum* به دلیل نداشتن دی‌ساکاریدازهای[1] مناسب برای انجام ئیدرولیز، توانایی استفاده از دی‌ساکاریدهای سوکروز، لاکتوز و مالتوز را ندارند و بالعکس ریزوبیوم‌های تند رشد مانند *S meliloti* از این قندها استفاده می‌کنند (Kahn و همکاران، ۱۹۹۸). باکتری *S meliloti* قادر به استفاده از تعداد زیادی از قندها مانند قند مانیتول، سوکروز، گلسیرول، سلوبیوز، گالاکتوزومانوز می‌باشد ولی توانایی استفاده از قندهای اینوزیتول و رامینوز را ندارند (Jordan، ۱۹۸٤).

منبع نیتروژن نیز از جمله ارکان اساسی یک محیط کشت محسوب می‌شود. یکی از وجوه مشترک همه ریزوبیوم‌ها توانایی آنها در استفاده از همه ترکیبات معدنی به عنوان منبع نیتروژن می‌باشد (Kahn و همکاران، ۱۹۹۸). این ترکیبات می‌توانند شامل نیترات، نیتریت و آمونیوم باشند. عصاره مخمر، کلرید آمونیوم و نیترات پتاسیم رایج‌ترین منابع نیتروژن در محیط کشت‌های ریزوبیومی می‌باشند (Beck، ۱۹۹۳؛ Jordan، ۱۹۹٤؛ Somasegaran و Hoben، ۱۹۹٤).

عصاره مخمر، سوبسترای بسیار مناسبی برای اکثر میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. این ماده دراثر اتولیز مخمر نانوایی (در دمای ۵۰ –۵۵ درجه سانتی‌گراد) و یا پلاسمولیز آن در غلظت زیاد NaCl تولید می‌شود. عصاره مخمر حاوی اسیدهای آمینه, پپتیدها، ویتامینهای محلول در آب و هیدرات‌های کربن می‌باشد. عصاره مخمر علاوه بر تأمین گلیکوژن و ترهالوز به عنوان منبع کربن، نیتروژن مورد نیاز باکتری و بسیاری از ویتامین‌ها مانند تیامین، ریبوفلاوین، پیریدوکسین، نیاسین‌آمید و پنتوتیک اسید را تأمین می‌نماید (مرتضوی و همکاران، ۱۳۷٦). مخمر درحین تولید عصاره به گلوکز هیدرولیز می‌شود. این ماده در بعضی از گونه‌ها مثل *R. leguminosarum* می‌تواند هم به عنوان منبع کربن و هم منبع نیتروژنه مورد استفاده قرار گیرد (مرتضوی و همکاران، ۱۳۷٦).

باکتری‌های ریزوبیومی در دامنه متفاوتی ازpH رشدمی کنند به طوری که براین اساس آنها رابه دو دسته تندرشد وکندرشد تقسیم می‌کنند. در دسته باکتری‌های تندرشد که *Sinorhizobium* درراس آن قراردارد؛ باکتری پس از ۲ تا۳ روز در محیط pH،YMB محیط رابه سمت اسیدی پیش می‌برند درحالی که کندرشدها از جمله *B. japonicum* اسیدیته محیط را به سمت قلیائیت پیش می‌برد (۵). از طرفی یکی از مهمترین عواملی که روی جمعیت باکتری‌ها خصوصاً در محیط‌های تکثیر مؤثر می‌باشد pH است، به طوری که در اثر تغییر pH درمحیط به اندازه ۰/۲ واحدجمعیت به اندازه ۲ واحد لگاریتمی تغییر می‌کند (ارزانش و همکاران، ۱۳۷۹).

تولید صنعتی مایه تلقیح‌های ریزوبیومی نیازمند تکثیر مقادیر زیادی ریزوبیوم می‌باشد که بالطبع تهیه حجم زیادی از محیط کشت را طلب می‌نماید به عنوان مثال اگر

1- Disacharidases

قرار باشد که فقط صد هزار بسته نیم کیلـویی مایـه تلقـیح یونجه تهیه شود با فرض آنکه ظرفیت نگهـداری آب مـاده حامل دویست درصد باشد به حدود سی و پنج هـزار لیتـر محیط کشت نیاز است. بنـابراین عمـلاً اسـتفاده از محـیط کشت‌های استاندارد مانند YMB به دلایل اقتصادی توجیـه ندارد. لذا سعی می‌شود تا از موادی استفاده شود که ضمن داشتن قیمت ارزان بتوانند از طریق تأمین نیازهـای غـذایی ریزوبیوم‌هـا، بـالاخص کـربن و نیتـروژن، حـداکثر تـراکم جمعیت سلولی را بدست آورند. در ایـن خصـوص مـواد قابـل اسـتفاده و ارزان قیمـت داخلـی از اهمیـت ویـژه‌ای برخوردار می‌باشند. عصاره تفالـه جـو، آب پنیـر و مـلاس چغندر از جمله مهم‌ترین مواد ارزان قیمتی مـی‌باشـند کـه در صـنعت بـرای تکثیـر بـاکتری اسـتفاده شـده‌انـد (Churchill وMille، ۱۹۸٦).

عصاره تفاله‌جو سوبسترای بسـیار مناسـبی بـرای بسیاری از قارچها، مخمرها، و اکتینومیسـت‌هـا مـی‌باشـد. عصاره خشک آن مقدارقابل توجهی هیدرات کربن داردکه شامل هگزوزها (گلوکز وفروکتوز)، دی‌سـاکاریدها (مـالتوز وساکارز)، تری‌سـاکاریدها(تریـوز) ودکسـترین مـی‌باشـد. ترکیبـات نیتروژنـه موجـود در عصـاره مالـت، شـامل پروتئین‌ها، پپتیدها، اسیدهای آمینه، پورینهـا، پیریمیـدینها و ویتامینها می‌باشد. ترکیبات اسیدهای آمینه آن نیز بسـته بـه نوع جو مورد استفاده فرق می‌کنند. امـا همیشـه حـدود ۵% مجموع اسیدهای آمینه موجود راپرولین به خود اختصـاص می‌دهد (مرتضوی و همکاران، ۱۳۷٦؛ ارزانش و همکاران، ۱۳۷۹).

آب پنیـر محصـول جنبـی حاصـل از فرآینـد تولیدپنیر وکازئین است. تقریباً نیمی از ماده خشک شیر در طول این فرایند وارد آب پنیر می‌شود. آب پنیر حاوی ۷۵-۷۰% قندشیر (لاکتوز)، ٦ درصد مـواد معـدنی و ۲/٤-۱/۸۲ درصـد نیتـروژن اسـت کـه عمـدتاً نیتـروژن بـه صـورت اسیدهای آمینـه مـی‌باشـد (مرتضـوی و همکـاران، ۱۳۷٦؛ Bissonnette و همکاران، ۱۹۸٦).

عصاره تفاله جو، آب پنیر ومـلاس چغندرقنـد از جمله مواد ارزان قیمت و قابل دسترسی مـی‌باشـند کـه بـه ترتیـب در کارخانجـات نوشـابه‌سـازی، پنیرسـازی و کارخانجات قند و نیشکر بـه عنـوان محصـول جـانبی یـا ضایعات تولید می‌شوند. بنابراین با توجه به ترکیب موجود در آنها این مواد مـی‌تواننـد پتانسـیل خـوبی بـرای تکثیـر ریزوبیوم‌ها داشته باشند. لذا در این تحقیق سعی گردید تـا کارایی این مواد به تنهایی و یا اضافه کردن یکسری مواد و همچنین تغییرات pH، برای تکثیر صنعتی *Sinorhizobium meliloti* موردارزیابی قرارگیرد.

مواد و روشها

تهیه باکتری و اینوکولوم باکتری

به منظور دستیابی به باکتری همزیسـت بـا گیـاه یونجه در سـال ۱۳۷۹، از منـاطق زیرکشـت ایـن گیـاه در منطقه کرج، تعداد ۲۲ نمونه گرهک ریشـه‌ای یونجـه‌هـای یکساله جمع‌آوری گردید. گرهـک‌هـای جمـع‌آوری شـده نیزپس از میکروب زدایی سطحی و بـه منظـور جداسـازی باکتری‌های همزیست با گیـاه یونجـه روی محـیط غـذایی YMA+CR[1] کشت داده شدند (Vincent، ۱۹۷۰). پـس از این مرحله به منظور تأیید تشخیص ایزوله‌های جمـع‌آوری شده از آزمـون lant Infection Test اسـتفاده شـد (Beck، ۱۹۹۳). ایزوله‌هـایی کـه درایـن مرحلـه قـادر بودنـد روی مجموعه ریشه‌ای گیاه گرهک‌های فعـال کـه محـل تثبیـت ازت مولکولی اسـت بـه وجـود آورنـد، جـزء سـویه‌هـای همزیست بـا ایـن گیـاه قرارگرفتنـد. در مرحلـه بعـد ایـن ایزوله‌ها از نظر توانـایی تثبیـت ازت مولکـولی درظـروف جارلئونارد و تلقیح باکتری‌های مربوطـه در شـرایط کنتـرل شده آزمایشگاهی در دمای ۲٦ درجه سانتی‌گـراد در روز و ۲۰ درجه سانتی‌گـراد در شـب، ۱٦ سـاعت روشـنایی و ۸ ساعت خاموشی به مدت سـه مـاه نگهـداری شـدند. ایـن ایزوله‌ها با دو تیمار ازتـه ۳۵ و۷۰ میلـی‌گـرم در کیلـوگرم ازت NH_4NO_3 (Beck، ۱۹۹۳) و یک تیمـار شـاهد و سـه تکرار برای هر تیمار مـورد مقایسـه قـرار گرفـت. مقایسـه تیمارهـای باکتریـایی براسـاس محاسـبه کـارایی سیسـتم همزیسـتی بـا تیمـار ۷۰ میلـی‌گـرم در کیلـوگرم نیتـروژن NH_4NO_3 صـورت گرفـت و در نهایـت بهتـرین سـویه *S.meliloti* از نظر تثبیت ازت مولکولی از بـین ۲۲ ایزولـه جداسازی شده و برای آزمایش تکثیر انتخـاب گردیـد. در مرحله بعدی منحنی رشد باکتری مزبور رسم گردید. بـرای ایـن کـار از کشـت ٤۸ سـاعته بـاکتری روی محـیط YMA+CR یک کلنی برداشته و به ارلن ۲۵۰ میلـی‌لیتـری حاوی ۵۰ml محیط YMB کشت تلقیح شد. ارلـن مـذکور به مدت ٤۸ ساعت روی دستگاه تکان‌دهنده، در دمای ۲۸°C و در ۱۵۰ دور در دقیقه و در تاریکی قرار داده شد و سپس با استفاده از رقت‌های ده تـایی و پخـش روی پلیـت‌هـای حاوی YMA+CR جمعیت باکتری بـه روش Plate-count برآورد گردید. از ارلن مزبور یک میلی‌لیتر کـه حـاوی 10^8 سلول باکتری در هـر میلـی لیتـر بـود بـه ارلـن‌هـای ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی۵۰ml محیط YMB تلقیح شدند و سـپس

1- Yeast mannitol agar + Congo red

هر ۱۲ ساعت و در طی ۵ روز، جمعیت *S. meliloti* به روش Plate-count شمارش گردید.

محیط‌های تکثیر

در مرحله بهینه‌سازی محیط کشت باکتری *S. meliloti*، از محیط استاندارد YMB به عنوان شاهد و از عصاره تفاله جو و آب پنیر به ترتیب به عنوان فراورده‌های فرعی کارخانجات نوشابه سازی بهنوش و کارخانه شیر پاستوریزه یزد استفاده شد. عصاره تفاله جو پس از انتقال به آزمایشگاه به نسبت ۱ به ۵ با آب مقطر رقیق‌سازی (ارزانش و همکاران، ۱۳۷۹) و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱°C استریل شد. محلول آب پنیر نیز با حل کردن ۲۲ گرم پودر آب پنیر به یک لیتر آب مقطر، تهیه شد (Bissonnette و همکاران، ۱۹۸٦). به منظور بررسی امکان رشد باکتری مزبور در داخل این محیط مقدار ۱ml از ارلن حاوی $۲×۱۰^{۸}$ سلول در هر میلی لیتر از باکتر *S. meliloti* به ارلن‌های ۲۵۰ml حاوی ۵۰ml از محلول‌های مالت اسپروت (عصاره تفاله‌جو) و آب پنیر منتقل شد و سپس این نمونه‌ها به مدت ۲ روز در دمای ۲۸°C روی دستگاه تکان‌دهنده و در ۱۵۰ دور در دقیقه و در تاریکی شیکر شدند. بعد از طی این مدت رقت‌های ده تایی تهیه و در نهایت شمارش باکتری به روش Plate-count و با استفاده از پلیت‌های حاوی محیط کشت YMA+CR انجام شد.

تیمارها و طرح آزمایشی

به منظور بررسی تأثیر pH در دو سطح مختلف ٦/۸ و ۷، منبع کربن در چهار سطح (گلوکز، گالاکتوز، مانیتول و سوکروز) و به میزان ۱۰ گرم در لیتر (ارزانش و همکاران، ۱۳۷۹)، منبع نیتروژن در سه سطح (۰/۵ گرم در لیتر عصاره مخمر، ۰/۷ گرم نیترات پتاسیم و ۰/٦ گرم در لیتر کلرور آمونیوم) و نوع محیط کشت پایه در سه سطح (YMB، Malt sprout extract و Dehydrated cheese whey) در قالب یک طرح کاملاً تصادفی بصورت فاکتوریل و در سه تکرار طراحی گردید. بدین منظور پس از آماده کردن نمونه‌ها، مقدار۲۰ میلی‌لیتر از آنها را در ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته و پس از تنظیم pH، به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد استریل گردیدند. نمونه‌های عصاره تفاله جو و آب پنیر به دلیل نوسان pH بعد از اتوکلاو، ابتدا pH آنها قبل از استریل شدن اندازه‌گیری شد و پس از اتوکلاو با استفاده از KOH استریل ۰/۱ نرمال، pH نهایی محلول‌ها تنظیم گردید. در ادامه یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری ٤۸ ساعت کشت داده شده به داخل این ارلن‌ها تلقیح گردید. جمعیت اولیه باکتری در ارلن ها $۲×۱۰^{٥}$ سلول باکتری در هر میلی‌لیتر بود. سپس این ارلن‌های تلقیح شده روی دستگاه تکان‌دهنده با ۱۵۰ دور در دقیقه و دمای ۲۸°C به مدت ٤۸ ساعت قرار داده شدند و شمارش با استفاده از روش Plate-count و روی محیط YMA+CR انجام شد.

نتایج و بحث

اندازه‌گیری درجه کارآیی سیستم همزیستی یا S.E (Symbiotic Effectiveness)

ارزیابی و محاسبه کارآیی سیستم همزیستی ایزوله‌ها در مقایسه با تیمار ۷۰ میلی‌گرم در لیتر نیتروژن و با استفاده از ظروف لئونارد و پس از دو ماه و نیم از زمان تلقیح، و براساس وزن خشک اندام هوایی گیاه یونجه صورت گرفت (Beck و همکاران، ۱۹۹۳). نتایج نشان داد که کمتر از ۲۵ درصد از ایزوله‌ها دارای کارآیی بالایی در زمینه تثبیت بیولوژیک ازت هستند (شکل ۱). که از میان آنها ایزوله S M-11 با بالاترین درصد مقدار S.E به عنوان سویه مناسب انتخاب شد.

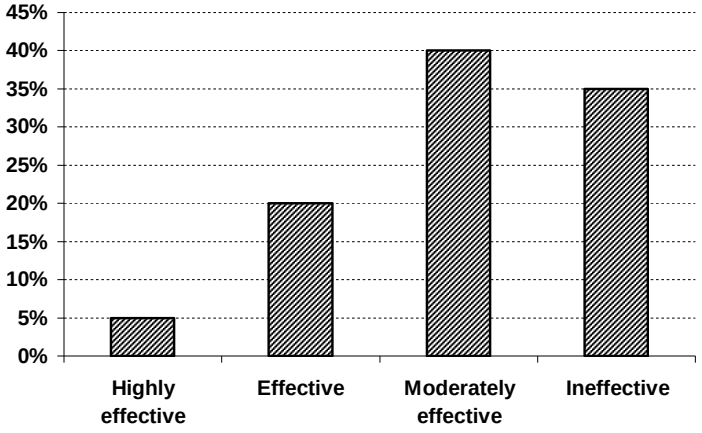
بررسی میزان همبستگی پارامترهای همزیستی (وزن خشک اندام هوایی، وزن خشک ریشه، وزن گرهک، تعداد گرهک، مقدار نیتروژن اندام هوایی) و میزان کارآیی همزیستی نشان داد که وزن خشک گرهک و تعداد گرهک با وزن خشک اندام‌های هوایی و در نهایت کارآیی همزیستی رابطه نداشته و سایر پارامترها با هم رابطه مثبتی داشتند. بنابراین در رابطه همزیستی ریزوبیوم ـ لگوم و در انتخاب سویه مؤثر و کارا از نظر همزیستی باید پارامتر وزن خشک اندام‌های هوایی مدنظر قرار گیرد و پارامترهای مربوط به گرهک نمی تواند در این مورد ملاک باشد.

همچنین بررسی منحنی رشد ایزوله SM-11 در محیط استاندارد YMB نشان می‌دهد که حداکثر جمعیت در ۷۲ ساعت مشاهده می‌شود و بعد از آن جمعیت ثابت و بعد از ۵ روز جمعیت کاهش می‌یابد در نتیجه بهترین زمان برداشت و شمارش در طی ۷۲ ساعت پس از تلقیح تعیین گردید.

در بررسی سطح عناصر غذایی در محیط‌های تکثیر حاصل از پساب کارخانه‌های صنایع غذایی و مقایسه آنها با محیط YMB مشاهده شده که پساب این دو کارخانه از لحاظ اکثر عناصر غذایی مورد نیاز باکتری *S. meliloti* به حد کافی غنی هستند. اما pH همه پساب‌ها بسیار اسیدی بود که با استفاده از KOH نرمال در حد pH استاندارد (٦/۸) تنظیم گردید (جدول ۲).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس مربوط به تأثیر نوع محیط کشت، منبع کربن و منبع نیتروژن در دو pH مختلف بر روی جمعیت ایزوله SM-11 نشان داد که تاثیر نوع محیط پایه، منبع نیتروژن و pH محیط کشت روی جمعیت باکتری مزبور معنی‌دار بوده و اثرات متقابل آنها نیز معنی‌دار

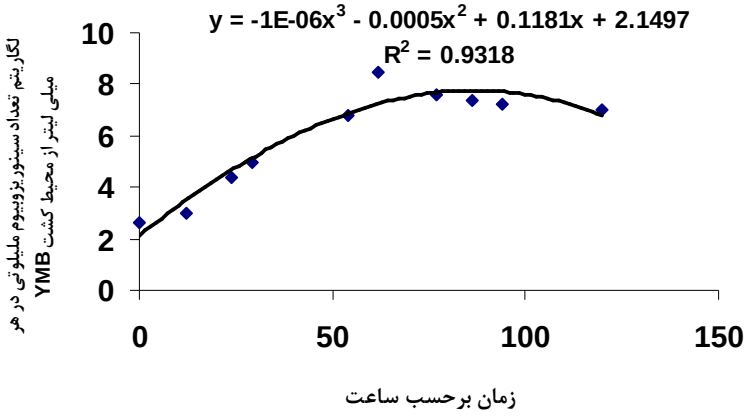
است. اما تأثیر نوع منبع کربن روی جمعیت باکتری مزبـور معنی‌دار نبود و اثرات متقابل این فاکتور در منبع نیتروژن و pH محیط کشت نیز معنی‌دار نبود.



شکل 1ـ طبقه‌بندی ایزوله‌ها از نظر درجه کارآیی همزیستی

جدول 1ـ بررسی ضریب همبستگی بین پارامترهای تثبیت نیتروژن

	وزن خشک اندام هوایی	وزن خشک ریشه	تعداد گرهک	وزن خشک گرهک	نیتروژن اندام هوایی	درجه کارایی
وزن خشک اندام هوایی	۱	—	—	—	—	—
وزن خشک ریشه	۰/۸۲۹	۱	—	—	—	—
تعداد گرهک	۰/۱۲	۰/۲۳۹	۱	—	—	—
وزن خشک گرهک	۰/۲۳۱	۰/۲۲۶	۰/۶۸۲	۱	—	—
نیتروژن اندام هوایی	۰/۴۷۲	۰/۳۳۶	۰/۳۲۵	۰/۲۲۶	۱	—
درجه کارایی	۰/۹۶۷	۰/۷۷۱	۰/۳۷۶	۰/۲۳۳	۰/۵۰۱	۱



شکل 2ـ منحنی رشد ایزوله SM-11 در محیط استاندارد تکثیر ریزوبیوم ها (YMB)

جدول 2- ترکیب شیمیایی مواد مورد استفاده برای تکثیر *Sinorhizbium meliloti* (ارزانش و همکاران، 1379)

مواد تکثیر کننده *Sinorhizbium meliloti*			
محلول 30% آب پنیر	محلول 20% مالت اسپروت	محیط کشت استاندارد YMB	عناصر و خصوصیات اندازه‌گیری شده
26/8	42/8	2	Ca (mg L^{-1})
20/97	48/2	15	Mg (mg L^{-1})
0	0	0	Cu (mg L^{-1})
	4/5	12	Zn (mg L^{-1})
3/35	1/4	8	Fe (mg L^{-1})
0	3/5	0	Mn (mg L^{-1})
2/56	1/32	0/78	C (%)
0/025	0/092	0/007	N (%)
0/011	0/0076	0/0105	P_2O_5 (%)
0/034	0/92	0/025	K (%)
0/03	0/0158	0/0055	Na (%)
1/47	0/92	0/7	D.M (%)
3/96	3/46	7/8	pH
2/49	2/096	7/21	EC (dS m^{-1})

جدول 3ـ تجزیه واریانس مربوط به تأثیر نوع محیط کشت، منبع کربن، منبع نیتروژن و pH بر جمعیت ایزوله SM-11

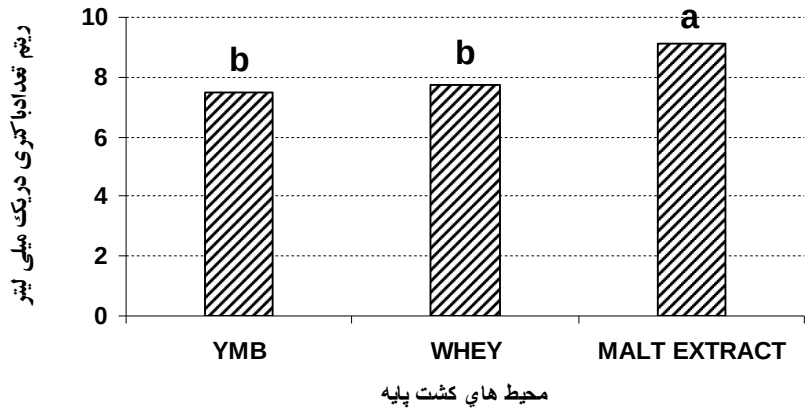
منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	مقدار F	احتمال خطا
فاکتور A	2	145/351	72/676	273/5306	0/0000
فاکتور B	1	0/281	0/281	1/0563	0/3058
AB	2	0/300	0/150	0/5640	0/0000
فاکتور C	3	10/285	3/428	12/9036	0/0000
AC	6	5/329	0/888	3/3427	0/0041
BC	3	1/120	0/373	1/4053	0/2437
ABC	6	11/063	1/844	6/9399	0/0000
فاکتور D	2	110/986	55/493	208/8596	0/0000
AD	4	34/829	8/707	32/7715	0/0000
BD	2	0/854	0/427	1/6175	0/2040
ABD	4	3/248	0/812	3/0558	0/0188
CD	6	21/164	3/527	13/2759	0/0000
ACD	12	13/786	1/149	4/3238	0/0000
BCD	6	9/311	1/552	5/8406	0/0000
ABCD	12	6/724	0/560	2/1089	0/0197
خطای آزمایش	144	38/260	0/266	ــــ	0/0000
کل	215	412/890	ــــ	ــــ	0/0000

فاکتور A: نوع محیط کشت پایه (عصاره تفاله جو، آب پنیر، محیط استاندارد YMB)

فاکتور B: منبع کربن (گلوکز، گالاکتوز، مانیتول، سوکروز)

فاکتور C: منبع نیتروژن (عصاره مخمر، KNO_3 و NH_4Cl)

فاکتور D: pH_2=7/00 و pH_1=6/8



شکل 3ـ تأثیر نوع محیط‌های کشت پایه بر جمعیت ایزوله SM-11

بررسی تأثیر نوع محیط کشت استفاده شده برای تکثیر باکتری *S. melilloti*

نتایج حاصل از تلقیح همزمان ایزوله SM-11 به محلول‌های عصاره تفاله جو و آب پنیر بطور همزمان با محیط استاندارد YMB نشان داد که بین محلول عصاره تفاله جو از نظر جمعیت باکتری پس از ۷۲ ساعت در مقایسه با محیط استاندارد و محلول آب پنیر، تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد وجود دارد.

استفاده از عصاره جو برای تکثیر ریزوبیوم ها به سال ۱۹۸۵ بر می‌گردد. بویاردی و ارتولا (Ertola و oiardi، ۱۹۸۵) با استفاده از عصاره جو بجای عصاره مخمر آب جو توانستند به جمعیت بالاتر از ۵×۱۰^{۹} سلول در هر میلی‌لیتر در تولید انبوه باکتری‌های *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*، *R. leguminosarum* bv. *viceae* و *B. japonicum* برسند. همچنین در سال ۱۳۷۷ ارزانش و همکاران با استفاده از محلول ۲۰% عصاره جو توانستند جمعیت باکتری *B. japonicum* را سه واحد لگاریتمی نسبت به زمان تلقیح (جمعیت تلقیح اولیه ۲×۱۰^{۵} باکتری در هر میلی لیتر بود) بالا ببرند (ارزانش و همکاران، ۱۳۷۹). در این بررسی نیز مشخص شد که محلول ۲۰% عصاره جو می‌تواند به عنوان محیط تکثیر باکتری *S. meliloti* استفاده شده و جمعیت باکتری را بیش از ٤ واحد لگاریتمی نسبت به زمان تلقیح (افزایش جمعیت بالاتر از محیط استاندارد) افزایش دهد.

آب پنیر (Whey) یکی از محصولات فرعی کارخانجات صنایع غذایی است که استفاده از آن به عنوان محیط رشد ریزوبیوم‌های تند رشد، بطور قابل توجهی افزایش پیدا کرده است. بیسونت و همکاران توانستند در سال ۱۹۸٦ با استفاده از آب پنیر جمعیت باکتری *S.meliloti* را به ۵×۱۰^{۹} در هر میلی‌لیتر برسانند (Bissonnette و همکاران، ۱۹۸٦). نتایج پژوهش حاضر نیز نشان داد که محیط آب پنیر (Whey) جمعیت باکتری *S. meliloti* را تقریباً دو واحد لگاریتمی و در حد محیط استاندارد نسبت به زمان تلقیح، افزایش دهد. با توجه به اینکه از محلول ۱۰۰ درصد آب پنیر استفاده شده است، به علت وجود درصد بالای نمک و فلزات تنها در مواردی که مکمل‌های مناسب مانند عصاره مخمر به آن اضافه شود، جمعیت باکتری در آن افزایش می‌یابد. بنابراین به نظر می‌رسد استفاده از محلول های رقیق ترآن، جمعیت باکتری را بیشتر افزایش داده است.

تأثیر pH محیط بر روی جمعیت باکتری *S. meliloti*

نتایج حاصل از تلقیح باکتری در دو pH مختلف (۷ و ٦/۸) نشان داد که بین جمعیت باکتری در pH=۷ و در مقایسه با pH=٦/۸ تفاوت معنی‌داری وجود ندارد.

بررسی تأثیر منبع کربن‌برروی‌جمعیت باکتری *S. meliloti*

بررسی تأثیر نوع قند بر جمعیت باکتری نشان داد که تأثیر قند سوکروز بر جمعیت این باکتری در مقایسه با سایر قندها بیشتر بوده لیکن از این نظر با قندهای مانیتول و گالاکتوز در سطح ۵ درصد آماری تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. همچنین قند گلوکز در اکثر تیمارها کمترین تأثیر را بر جمعیت باکتری داشت.

با توجه به اینکه این باکتری‌ها در دسته تند رشدها قرار می‌گیرند، بنابراین از دی‌ساکاریدها به راحتی می‌توانند استفاده کنند (Jordan، ۱۹۸٤؛ Bissonnette و

همکاران، ۱۹۸٦). بطور کلی در این بررسی نیز با توجه به خصوصیات این باکتری‌ها از همه قندها بخوبی استفاده شده است. با توجه به اینکه قندهایی مانند سوکروز، افزایش جمعیتی برابر با قند استاندارد را ایجاد می‌کند، لذا می‌توان این قندها رابه عنوان جایگزینی مناسب به جای قند مانیتول استفاده کرد.

بررسی تأثیر منبع نیتروژن بر روی جمعیت باکتری *S. meliloti*

استفاده از عصاره مخمر به عنوان منبع نیتروژن در مقایسه با نیترات پتاسیم و کلرور آمونیوم از نظر افزایش جمعیت باکتری تأثیر بیشتری داشته که از لحاظ آماری در سطح ۵ درصد این تفاوت معنی‌دار است.

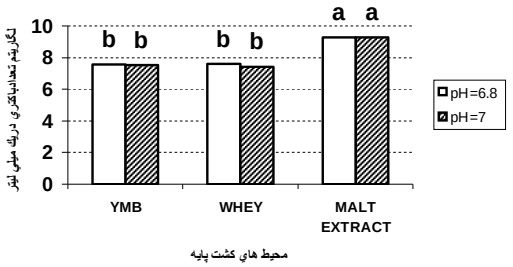
بررسی نتایج حاصله از این آزمایش نشان داد که باکتری *S. meliloti* عصاره مخمر را در مقایسه با دو منبع نیتروژنی دیگر ترجیح داده است که به نظر می‌رسد به دلیل تنوع ترکیبات شیمیایی و فاکتورهای رشد موجود در عصاره مخمر و استفاده از عصاره مخمر به عنوان منبع کربن علاوه بر منبع نیتروژن باشد (مرتضوی و همکاران، ۱۳۷٦).

همچنین ریزوبیوم ها می‌توانند از نیترات پتاسیم و نمک‌های آمونیوم به عنوان منبع نیتروژنی استفاده کنند. تحقیقات نشان داده است که کلرور آمونیوم برای بعضی از سویه ها دارای اثر کمتری از عصاره مخمر است. در این تحقیق نیز مشخص گردید که استفاده از کلرور آمونیوم به عنوان منبع نیتروژن در مقایسه با عصاره مخمر تأثیر کمتری بر جمعیت باکتری داشته است (Cliquuet و همکاران ۱۹۹۲). همچنین به جهت جذب یون آمونیوم و پایین آمدن pH و از طرفی تولید اسید توسط باکتری *S. meliloti* کلرور آمونیوم تا زمانی که pH محیط مساعد باشد، استفاده می‌شود و بقیه آن بلااستفاده در محیط کشت باقی می‌ماند (Bissonette و همکاران، ۱۹۸٦؛ Cliquuet، ۱۹۹۲).

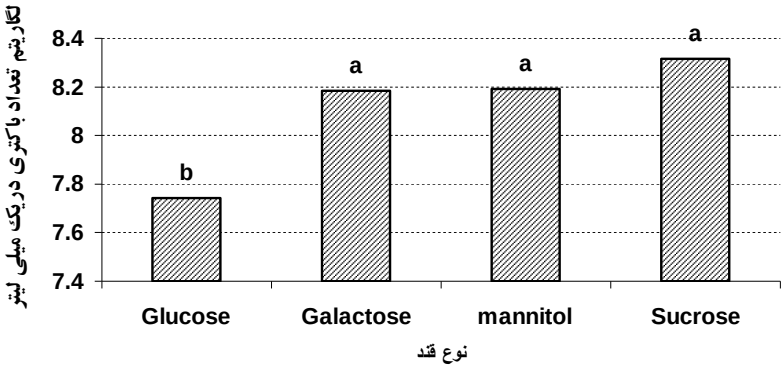
بررسی تأثیر متقابل نوع منبع کربن، منبع نیتروژن، pH و نوع محیط کشت استفاده شده برای تکثیر باکتری *S. meliloti*

با توجه به جدول تجزیه واریانس (جدول ۲) تأثیر متقابل این چهار فاکتور در سطح ۱ درصد معنی دار نیست اما در سطح ۵ درصد معنی دار است. در این میان تیمار محیط عصاره تفاله جو بعلاوه قند سوکروز و نیترات پتاسیم در pH =٦/۸ دارای بالاترین جمعیت باکتری است و استفاده از این تیمار پس از ٤۸ ساعت از زمان تلقیح جمعیت باکتری مذکور را ٤ واحد لگاریتمی افزایش داده است .

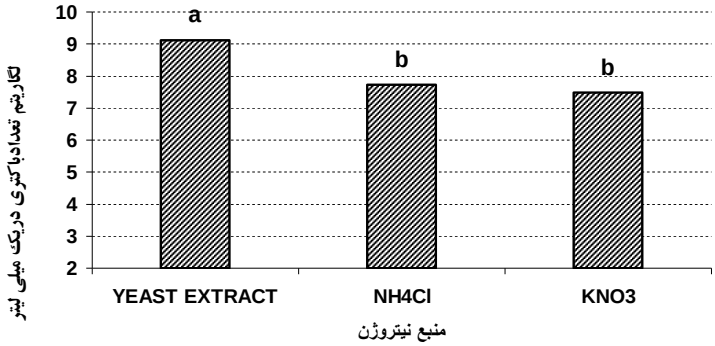
بررسی تأثیر متقابل منبع نیتروژن، منبع کربن، pH و نوع محیط با توجه به آنکه هر کدام از محیط‌های مورد استفاده حاوی اجزاء و ترکیبات شیمیایی متنوعی هستند نشان داد که محیط کشت استفاده شده برای تکثیر باکتری بیشتر از سایر عوامل می‌تواند در افزایش جمعیت این باکتری تأثیرگذار باشد و تأثیرات متقابل هر کدام از عوامل بر یکدیگر را نیز نباید نادیده گرفت. چند تیمار به عنوان بهترین تیمارها در نظر گرفته شد که تیمارهای محیط عصاره جو و محیط استاندارد با اختلاف بسیار کمی، اثرات مشابهی بر جمعیت باکتری داشتند. از این چند تیمار، عصاره تفاله جو، سوکروز، نیترات پتاسیم در pH=۷ به لحاظ استفاده از سه ماده ارزان قیمت در آن و اقتصادی بودن به عنوان مناسب‌ترین محیط کشت برای تکثیر باکتری *S. meliloti* انتخاب شد.



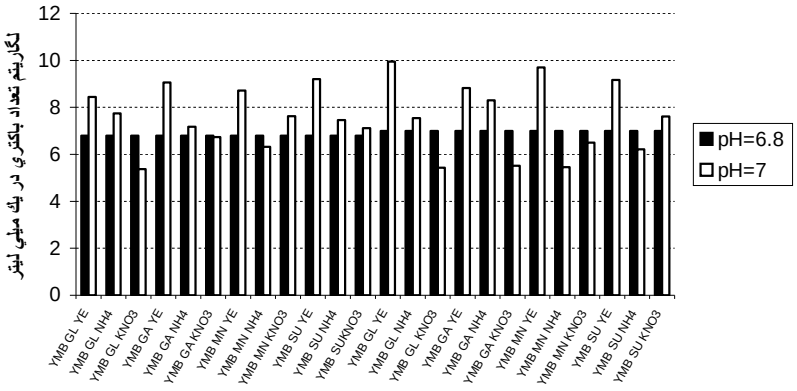
شکل 4ـ بررسی تأثیر متقابل pH و محیط بر جمعیت ایزوله SM-11



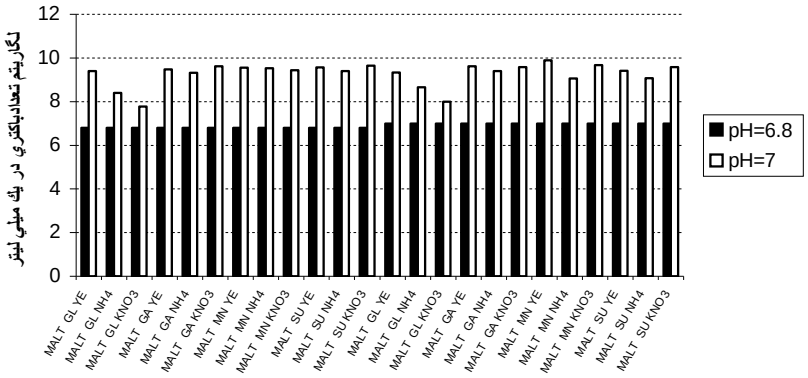
شکل 5 - بررسی تأثیر منبع کربن بر جمعیت ایزوله SM-11



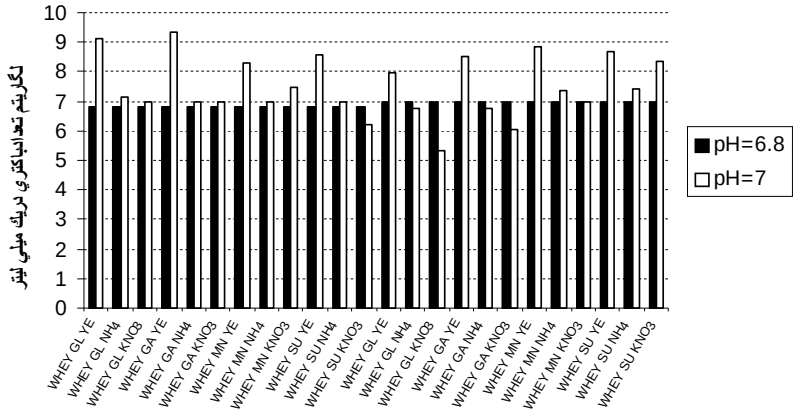
شکل 6 ـ بررسی تأثیر منبع نیتروژن بر جمعیت ایزوله SM-11



شکل 7ـ بررسی تأثیرات متقابل منبع کربن و منبع نیتروژن در دو pH مختلف در محیط پایه استانداردYMB



شکل 8 ـ بررسی تأثیرات متقابل منبع کربن و منبع نیتروژن در دو pH مختلف در محیط عصاره تفاله جو



شکل9 ـ بررسی تأثیرات متقابل منبع کربن و منبع نیتروژن در دو pH مختلف در محیط آب پنیر

فهرست منابع:

1. بی‌نام (1378). آمارنامه کشاورزی، معاونت آموزش وترویج کشاورزی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی.
2. ارزانـش، م، ح. (1379). بررسی تـوان تکثیر باکتری برادی ریزوبیوم ژاپنیکوم (*Bradyrhizobium japonicum*) درچند محیط ارزان قیمت. مجله علوم خاک وآب، جلد12, شماره 7, صفحات 11-1، تهران، ایران.
3. مرتضوی، ع. کریمی، م. کدخدایی، ر.ورحیمی یزدی،س.(1376). بیوتکنولوژی میکروبیولوژی صنعتی. انتشارت دانشگاه فردوسی مشهد.
4. جراح باشی ، ا (1373). آب پنیر واستفاده بهینه ازآن. مجله کشاورز، جلد179 ، صفحات 96-94.
5. Amarger, N. (2001). Rhizobia in the field. Advan. Agron. 73: 109-133.
6. Beck, D. P. Materon, L. Afandi, F. (1993). Practical *Rhizobium*-Legume Technology Manual, ICARDA, Syria.
7. Bissonnette, N., Lalande, R. R., and Bordeleau, L. M. (1986). Large-Scale production of *Rhizobium meliloti* on whey. Appl. Environ. Microbiol. 52: 838-841.
8. Boiard, J. J., and Ertola, R. J. (1985). Rhizobium biomass production in bath and continuous culture with a malt sprouts medium. MIRCEN J. Appl . Microbiol. Biotechnol. 1: 163-172.

9. Chakrabarti, S., Lee, M. S., and Gibson, A. H. (1981). Diversity in the nutritional requirements of strains of various *Rhizobium* species. Soil Biol. Biochem. 13:349-354.
10. Cliquuet, S. Durier, C., and Catroux,G.(1992).Use of centeral composite experimental design for development of *Bradyrhizobium japonicum* liquid inoculant. Biotech. Techniques 6:477-482.
11. Gault, R. R., Peoples, M. B. Turner, G. L., Lilley, D. M., Brockwell, J. and Bergersen, F. J. (1995). Nitrogen fixation by irrigated lucerne during the first three years after establishment. Aust. J. Agric. Res. 46: 1401-1425.
12. Hirsch, A. M.Lum,M.R.Downie,J.A.(2001). What makes the *Rhizobia* –legume symbiosis. Plant Physiol. 127:1484-1492.
13. Jordan, D. C. (1984). Rhizobiaceae. *In*: J. G. Holt & N. R. Krieg (eds.). Berggeys Manual of Systematic Bacteriology. Vol: 1, The Williams & Wilking Co. Bltimore.
14. Kahn, M. L., Mc Dermott, T. R., and udvardi, M. K. (1998). Carbon and nitrogen metabolism in rhizobia. In: Spaink, H. P., Kondrosi, A., and Hookyass, P. J.J. (eds.). The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria. Kluwer Academic Press. Netherland.
15. Maede, J., Higgins, P. and Ogara, F. (1985). Production and storage of *Rhizobium leguminosurm* cell concentration for use as inoculants. Appl. Bacteriol. 58:517-524
16. Miller, T. L., and churchill, B. W. (1986). Substrates for Large-Scale fermentations. In: Demain, A., and Solomon, N. A. (eds.) Manual of Industerial Microbiology and Biotechnology. Am. Soci. Microbiol. USA.
17. Paau, A.S.(1999).Improvement of *Rhizobium* inoculant. Appl. Environ. Microbiol. 55:520-522.
18. Parcks, L. C. (1993). Handbook of Microbiological Media. CRC Press, USA.
19. Somasegaran, P., and Hoben, H. J. (1994). Handbook for Rhizobia: Methods in Legume-Rhizobium Technology. Springer-Verlag, New York.
20. Stower, M. D. (1985). Carbon metabolism in *Rhizobium* species. Annu. Rev. Microbiol. 39: 89-108.
21. Teasa,M.B.(1984). Physiology basis of crop growth and development. Am. Soci. Agron. Inc Publisher, USA.
22. Vance, C. P. (1998). Legume symbiotic nitrogen fixation: Agronomic aspects. In: spaink, H. P., Kondorosi, A., and Hooykass, P.J.J. (eds.) The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant – Associated Bocteria. Kluwer Academic Press. Netherland.
23. Vincent, J. M. (1970). A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria. IBP Handbook N 0.15, Blackwell Scientific Publication, Oxford and Edinburgh.

Reproduction of *Sinorhizobium meliloti* Bacteria in some Inexpensive Culture Media

Sh. Ghorbani, E. Sadat Rahimi, K. Khavazi and M. H. Arzanesh[1]

Abstract

Reproduction of selected strains is one of the most expensive stages in the process of inoculum production. Therefore, for large scale industrial production of rhizobiums, efforts are made to use the by-products of food industry plants directly or in combination with some other ingredients as culture media. In this experiment multiplication of *S. meliloti* in three culture media, namely malt sprout extract, dehydrated cheese whey, and the chemical base medium of yeast extract mannitol along with three nitrogen sources: ammonium chloride, potassium nitrate, and yeast extract; four carbon sources: mannitol, glucose, galactose, and sucrose at two pH levels of 6.8 and 7.0 was investigated. The experiment was designed as a randomized complete block factorial test with three replications. Isolates of SM-11 (*S. meliloti*) with population densities of $2x10^5$ cells/ml were transferred to 100 ml Erlenmeyer flasks containing the culture media mentioned before, followed by making plate counts on YMA, growth medium containing Congo-red. After two days of bacterial growth, the results of the experiment showed that the bacterial populations reached a level of $7.94x10^9$ cells/ml in the malt culture containing mannitol as a carbon source and yeast extract as a nitrogen source with the pH of the medium adjusted to 7.0, while the population density in the same medium, but containing sucrose and potassium nitrate adjusted to pH 6.8 was measured to be $4.5x10^9$ cells/ml, as compared with $5.24x10^9$ cells/ml for the standard YMB culture medium. Likewise, the population density of the bacteria in the chemical base culture at pH of 6.8, was $2.07x10^9$ cell/ml after 3 days and in the same medium containing sucrose and yeast extract at pH of 7.0 was measured to be $5.24x10^8$ cells/ml. These results indicate that, to reproduce this isolate inexpensively on industrial scales for inoculum production, the malt sprout extract growth medium containing sucrose and potassium nitrate is recommendable.

Keywords: Malt sprout, Cheese whey, *Sinorhizobium meliloti*.

[1.] Member of Scientific Staff of Biology Dept. of School of Sciences, Alzahra University (s); Biology Dept. School of Sciences, Alzahra University (s); and Soil Biology Research Division, Soil and Water Research Institute.