مجله دنیای میکروب‌ها
سال هشتم شماره اول (پیاپی ۲۲) بهار ۱۳۹۴
صفحات ۳۷-۲۶

Original Article

بررسی ویژگی های بیوشیمیایی و مولکولی باکتری *سینوریزوبیوم ملی لوتی* جدا شده از ریشه گیاهان یونجه در دو منطقه از ایران

آزاده حداد سبزوار[۱]، محبوبه نخعی مقدم[۲*]

[۱] کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، [۲] استادیار، گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد

چکیده

سابقه و هدف: ریزوبیوم ها می توانند نیتروژن اتمسفری را تثبیت و مقدار قابل توجهی از نیتروژن موجود در خاک را تامین کنند. این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی ویژگی های بیوشیمیایی و مولکولی باکتری های بومی *سینوریزوبیوم ملی لوتی* جدا شده از گره ریشه گیاهان یونجه در دو منطقه آب و هوایی متفاوت و نیز شناسایی سویه های با کارائی بالا به عنوان کود زیستی انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه مقطعی-توصیفی، بوته های یونجه از مناطق مختلف استان های قم و خراسان جمع آوری شدند. باکتری ها با استفاده از آزمون های گره زایی، بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی شدند. منحنی رشد جدایه ها رسم و سپس با تلقیح باکتری ها به بذرهای یونجه، گیاهان از نظر میزان رشد مقایسه گردیدند و جدایه های با کارآیی بالاتر شناسایی شدند.

یافته ها: باکتری ها در محیط لیتموس میلک واکنش یکسانی نداشتند. همگی ژلاتیناز منفی بودند و تنها چند سویه توانستند نشاسته موجود در محیط را استفاده کنند. برخی قابلیت رشد در حضور ترکیبات هیدروفوب را داشتند. مانیتول، سوکروز و مالتوز بهترین منبع کربن برای رشد جدایه ها بودند. سویه های S22K، S36K از استان خراسان و S3Q و S12Q از استان قم در مقایسه با سایر جدایه ها رشد گیاهان آزمون را بیشتر تقویت کردند.

نتیجه گیری: نتایج تحقیق نشان داد که برخی باکتری های بومی *سینوریزوبیوم ملی لوتی* توانایی تجزیه نشاسته و توانایی رشد در حضور SDS را دارند. در میان جدایه ها، سویه های S22K و S3Q پتانسیل بهتری را برای استفاده به عنوان کود زیستی داشتند. این تحقیق می تواند گامی برای تولید کودهای زیستی در کشور باشد.

واژگان کلیدی: *سینوریزوبیوم ملی لوتی*، یونجه، ویژگی های بیوشیمیایی، منحنی رشد.

دریافت مقاله: آذر ماه ۹۳ پذیرش برای چاپ: بهمن ماه ۹۳

مقدمه

تثبیت زیستی گاز نیتروژن یکی از راه های اصلی ذخیره نیتروژن به فرم قابل جذب برای گیاه در خاک های کشاورزی است (۱). به دست آوردن نیتروژن به شکل قابل جذب به وسیله گیاه یکی از مهم ترین عوامل برای رشد و نمو گیاهان است و به احتمال زیاد نیتروژن یکی از عوامل بسیار مهم در محدودیت تولید محصولات گیاهی می باشد (۲). خانواده لگومیناسه (Leguminosae) یکی از بزرگ ترین خانواده های گیاهان گلدار و شامل ٤٦٣ جنس و ۱۸۰۰۰ گونه (۳)، با توزیع جهانی است که نقش بسیار مهمی در تمدن انسانی ایفا می کند. لگوم ها دارای ظرفیت های قابل توجهی برای ایجاد ارتباط همزیستی با گونه های مختلف باکتری های خاک هستند (٤). ریزوبیوم ها یک گروه از باکتری ها هستند که به طور معمول در خاک یافت می شوند و موجب تثبیت نیتروژن در گره ریشه گیاهان خانواده لگومینه می گردند (۵). در نتیجه این رابطه

*) آدرس برای مکاتبه: مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، گروه زیست شناسی.
تلفن: ۰۹۱۵۵۱۳۱٤٦٤ پست الکترونیک: m.nakhaei@mshdiau.ac.ir

همزیستی که از گره ریشه توسعه می یابد، باکتری نیتروژن گازی را به شکل قابل استفاده برای گیاه میزبان فراهم می کند (۲). یونجه (Medicago sativa) علوفه چندساله با ریشه عمیق است و یکی از مهم ترین منابع پروتئین برای تغذیه دام به شمار می آید (٦). ارزش غذایی عالی آن باعث شده است که در میان علوفه محصول ایده آلی باشد. یونجه توانایی استفاده از نیتروژن جو را دارد و مقدار قابل توجهی از نیتروژن را هنگام رشد می تواند تأمین نماید. مطالعات فراوان نشان داده اند که محصول یونجه ماده آلی خاک را افزایش می دهد و باعث بهبود ساختار خاک می شود (۷).

این محصول علوفه ای بیش از ۳۰ درصد مناطق قابل کشت را به طور معمول اشغال کرده است. بیش از ٦۰۰۰ کیلومتر مربع از زمین های قابل کشت در ایران زیر کشت یونجه قرار دارد (۸). *سینوریزوبیوم ملی لوتی* (*Sinorhizobium meliloti*) یک آلفا پروتئوباکتر از خانواده ریزوبیاسه (Rhizobiaceae) است که به تناوب بین مرحله آزاد در خاک و مرحله همزیستی در داخل سلول های گیاه میزبان دیده می شود. باکتری در شکل همزیستی در نهایت به باکتروئید تبدیل می شود و تثبیت نیتروژن را انجام می دهد (۹).

لک زیان (Lakzian) و همکاران در سال ۲۰۰۸ بر اساس ویژگی های مولکولی، باکتری های *سینوریزوبیوم* جدا شده از خاک استان همدان را به سه گروه دسته بندی کردند. به طوری که دو گروه بزرگ به عنوان *سینوریزوبیوم ملی لوتی* و *سینوریزوبیوم مدیکیه* (*S. medicae*) و گروه سوم متفاوت از دو گروه دیگر بود (۸).

در مطالعه ای که بر روی تنوع گونه های ریزوبیومی همزیست با نخود در مناطق غربی ایران بر اساس روش های مورفولوژیکی و مولکولی شامل PCR-RFLP و تعیین توالی نوکلئوتیدی انجام شد، مشخص گردید که اکثر جدایه های همزیست از گونه *مزوریزوبیوم سیسر* (*Mesorhizobium cicer*) بودند (۱۰). باکتری های ریزوبیوم جدا شده از شهرستان های استان اصفهان در قالب ۷ سویه باکتری *ریزوبیوم ملی لوتی* از یونجه و اسپرس شناسایی شدند (۱۱).

جدایه های *ریزوبیوم* از گیاهان لوبیا (Haricot bean) در اتیوپی جداسازی و ویژگی های بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی آن ها بررسی شد (۱۲). تنوع فنوتیپی و ژنوتیپی سویه های *سینوریزوبیوم ملی لوتی* و *سینوریزوبیوم مدیکیه* در مناطق خشک و نیمه خشک متاثر از نمک و خشکسالی مراکش نشان داد که می توان از پتانسیل تحمل برخی از سویه ها برای بهره برداری در مناطق حاوی نمک و خشکسالی برای تثبیت نیتروژن زیستی یونجه استفاده نمود (۱۳).

هدف از این پژوهش جداسازی و شناسایی ویژگی های بیوشیمیایی و مولکولی باکتری های بومی *سینوریزوبیوم ملی لوتی* جدا شده از گره ریشه گیاهان یونجه در دو منطقه آب و هوایی متفاوت و شناسایی سویه های با کارایی بالا بود که پتانسیل استفاده به عنوان کود بیولوژیک را داشته باشند.

مواد و روش ها

الف) جداسازی باکتری ها: در این مطالعه مقطعی از عمق ۳۰ تا ۵۰ سانتی متری و بخش LO (بخش سست خاک دارای شن و ماسه) خاک های مختلف مزارع زیر کشت یونجه در استان خراسان رضوی (نواحی خسروجرد، دلقند، نامن، نزل آباد، باشتن، شاره، دهبار و دولت آباد در منطقه سبزوار) و قم (منطقه دستجرد، نایه و سفت)، بوته هایی به صورت تصادفی برداشت شدند. بخش هوایی گیاهان حذف و ریشه ها با آب معمولی به آرامی شسته شدند. گره های سالم، درشت و صورتی رنگ موجود در بخش بالای ریشه انتخاب و هر گره با اندکی ریشه (برای جلوگیری از ایجاد زخم و آلودگی در گره) جدا شدند. گره های با اندازه بزرگ و فعال (با رنگ صورتی) به صورت تصادفی انتخاب گردیدند. گره ها به مدت ۱۰ ثانیه با الکل اتیلیک ۹٦ درصد و ۳ دقیقه با محلول هیپوکلریت ۳ درصد ضدعفونی و چندین مرتبه با آب مقطر استریل شسته شدند (۱٤).

گره ها در شرایط استریل در کمی آب مقطر استریل به صورت هموژنیزه و سوسپانسیون یکنواخت در آورده شدند. سپس از سوسپانسیون حاصل از هر گره یک لوپ به سطح محیط کشت

YEMA (Yeast Extract Manitol Agar) (مرک، آلمان) تلقیح و در گرمخانه ۲۸ درجه سیلیسیوس به مدت ۷۲ ساعت قرار داده شد. با تکرار کشت های پی در پی باکتری های تثبیت کننده نیتروژن خالص سازی شدند (۱۵).

ب) آزمون گره زایی: به منظور بررسی توانایی باکتری ها در تولید گرهک در ریشه گیاه میزبان، تمامی جدایه های به دست آمده از مناطق مختلف، در شرایط گلخانه ای به گیاه تلقیح و فعال بودن آن ها از نظر تشکیل گرهک مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور از محلول غذایی بدون نیتروژن (محیط Finish peat) استفاده شد که شامل ۲/۵ ml کلرید کلسیم (٤٠ g/l)، ۳ ml از محلول $MgSO_4,7H_2O$ (٤٠ g/l)، ۳/۳ ml از محلول $K_2HPO_4,3H_2O$ (۳۰ g/l)، ۳/۳ ml از محلول Na_2HPO_4 (٤٥ g/l)، ۲ ml از $C_6H_5O_7Fe$ (۲/۵ g/l) و ۱ ml عناصر کم مصرف در یک لیتر آب مقطر بود. محلول عناصر کم مصرف دارای ۲/۸٤ گرم اسید بوریک، ۲/۰۳ گرم سولفات منگنز، ۰/۰۸ گرم سولفات مس، ۰/۲۲ گرم سولفات روی و ۰/۰۸ گرم مولیبدات سدیم در لیتر بود. برای جامد نمودن محیط کشت ۸ گرم آگار به یک لیتر محیط کشت اضافه شد. pH محیط بین ۷-٦/۸ تنظیم و در اتوکلاو استریل گردید. در نهایت محیط به صورت شیب دار در لوله آماده شد (١٦).

برای انجام آزمون گره زایی، تعدادی بذر یونجه (واریته همدانی) استریل شده به ظروف پتری حاوی آب-آگار ۱/۵ درصد منتقل و در گرمخانه تاریک با دمای ۲۵ °C تا دو برگی شدن گیاه نگهداری شدند (۱۲). سپس لوله های آزمایش از زمان کاشت تا سبز شدن با محلول مایه تلقیح حاوی جدایه های *سینوریزوبیوم* و پس از سبز شدن بذرها با استفاده از محلول غذایی فاقد نیتروژن تا شروع دوره گلدهی آبیاری شدند.

برای مایه تلقیح از کشت خالص باکتریایی در محیط YEMB (Yeast Extract Mannitol Broth) با چگالی نوری ۰/۲ در طول موج ٦۰۰ نانومتر استفاده شد. در مرحله بعد، بذرهای جوانه زده یونجه در منافذی که به طور عمودی در راستای لوله توسط لوپ سرسوزنی استریل در محیط کشت Finish peat ایجاد شده بود، قرار داده شدند. پس از سبز شدن و رویش گیاهچه، در زمان ظاهر شدن تارهای کشنده، به هر لوله حدود یک میلی لیتر مایه تلقیح در اطراف ریشه اضافه شد. سه تکرار برای هر نمونه آماده شد. همچنین سه لوله شاهد بدون اضافه کردن مایه تلقیحی به منظور کنترل در نظر گرفته شد. پس از پوشاندن قسمتی از لوله که محل رویش ریشه است، لوله ها در اتاقک رشد با دما و رطوبت و نور مناسب قرار داده شدند. از محلول فاقد نیتروژن برای آبیاری گیاهان استفاده شد. پس از گذشت ٦ هفته، گیاهان از نظر گره زایی و وضعیت رشد مورد بررسی قرار گرفتند (۱۷).

ج) بررسی ویژگی های مورفولوژی و بیوشیمیایی جدایه های باکتریایی: به منظور شناسایی ویژگی های باکتری *سینوریزوبیوم* جدا شده از آزمون های کاتالاز، اکسیداز، لاکتاز و پروتئیناز، ژلاتیناز و رنگ آمیزی گرم استفاده شد (۱۵ و ۱۸).

برای تعیین قابلیت تولید آنزیم آمیلاز در باکتری ها از آزمون هیدرولیز نشاسته استفاده شد. برای این منظور باکتری به محیط نشاسته آگار تلقیح و به مدت ٤٨ ساعت در دمای ۲۸ °C قرار داده شد. رنگ آبی پس از اضافه کردن معرف یدیدوره نشان دهنده عدم استفاده از نشاسته است (۱۵). به منظور بررسی قابلیت جذب رنگ قرمز کنگو، محیط کشت CRYEM (Congo red yeast extract manitol agar) تهیه شد و پس از کشت جدایه ها و رشد آن ها رنگ کلنی ها مورد بررسی قرار گرفت.

از محیط کشت YEMB که با اضافه کردن ۰/۱۵ درصد آگار به صورت نیمه جامد در آمد، برای بررسی حرکت باکتری ها استفاده شد. لوله ها در گرمخانه ۲۸ °C به مدت ٤٨ ساعت قرار گرفتند. قابلیت رشد جدایه های *سینوریزوبیوم* در حضور ترکیبات هیدروفوب توسط تلقیح باکتری در محیط جامد TY (Trypton yeast extract) حاوی ۰/۱ گرم SDS در هر لیتر بررسی شد (۱۹).

د) شناسایی مولکولی با روش واکنش زنجیره پلی مراز (PCR): پس از استخراج DNA باکتری ها با روش چن (Chen) و همکاران (۲۰)، به منظور تکثیر ژن *16S rRNA* از

پرایمرهای Fd1: 5′-AAGGAGGTGATCCAGCC-3′ و Rd1: 5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′ استفاده شد (۹). واکنش PCR در حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر شامل ۵۰ نانوگرم از DNA استخراج شده، ۳ میکرولیتر از بافر 10X، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (۲۵ mM)، یک میکرولیتر dNTPs) mM ۱۰)، یک میکرولیتر از هر پرایمر و ۰/۲ میکرولیتر از آنزیم Taq DNA polymerase انجام شد (۹).

در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (مدل Kyratec، ساخت کشور سنگاپور) با شرایط دمایی ٤ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سیلیسیوس و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹٤ درجه سیلیسیوس به مدت ٤۵ ثانیه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سیلیسیوس به مدت ٤۵ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سیلیسیوس به مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سیلیسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصولات PCR به ژل آگاروز ۱/۵ درصد واجد اتیدیوم برماید منتقل و الکتروفورز گردیدند. قطعات DNA به کمک دستگاه Uvidoc مشاهده و عکس برداری شدند.

ه) بررسی تاثیر نوع منبع کربن بر رشد جدایه: رشد جدایه ها در حضور هفت نوع منبع کربن در محیط استاندارد YEMA بررسی شد. برای این منظور مقدار یک درصد از منابع قندی مانتیول، گلوکز، مانوز، مالتوز، آرابینوز، گالاکتوز و سوکروز به طور جداگانه به محیط کشت یاد شده اضافه گردید. محیط ها پس از تلقیح باکتری، در دمای ۲۸ °C به مدت ٤۸ ساعت قرار داده شدند (۱۸).

و) رسم منحنی رشد جدایه های سینوریزوبیوم: نمودار رشد باکتری در محیط YEMB بررسی و رسم گردید. برای این منظور ۰/۱ میلی لیتر از سوسپانسیون خالص باکتریایی در محیط YEMB با OD_{600}=۰/۲ به لوله های حاوی ۲۰ میلی لیتر YEMB تلقیح شد. میزان رشد نمونه ها به مدت ۷۲ ساعت گرمخانه گذاری با شرایط یاد شده، در فواصل زمانی ۱۲ ساعته با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (شرکت Hitachi ساخت ژاپن) در طول موج ٦۰۰ نانومتر قرائت و منحنی رشد رسم گردید.

ز) آنالیز آماری: مقدار رشد گیاهان یونجه پس از رشد بذر تلقیح یافته با جدایه های *سینوریزوبیوم* با گیاهان شاهد مقایسه شد. برای این منظور مشخصات گیاهان رشد یافته در آزمون گره زایی از نظر ارتفاع گیاه، طول ساقه، طول ریشه و تعداد گره بررسی و مقادیر ثبت شدند و با استفاده از نسخه بیستم نرم افزار آماری *SPSS* مورد بررسی قرار گرفتند. پس از رسم جداول توصیفی میانگین صفات با آزمون *ANOVA* مقایسه و سپس از نظر معنی داری با استفاده از آزمون دانکن مقایسه شدند. نتایج با p value کم تر از ۰/۰۵ به عنوان اختلاف معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

در این پژوهش، ۱۹ باکتری *سینوریزوبیوم* از گیاهان یونجه جمع آوری شده از استان قم (منطقه دستجرد، نایه و سفت) و ۲۳ باکتری از گره های گیاهان یونجه جمع آوری شده از استان خراسان رضوی (نواحی خسروجرد، دلقند، نامن، نزل آباد، باشتن، شاره، دهبار و دولت آباد در منطقه سبزوار) جداسازی گردید. در آزمون گره زایی، تمامی باکتری ها در ریشه گیاهان رشد یافته از بذرهای تلقیح شده توسط باکتری ها، گرهک ایجاد کردند. سرعت گرهک سازی در برخی از جدایه ها بیشتر از سایر جدایه ها بود. همچنین گره های ایجاد شده در ابتدا ریز و سفید بودند و با گذشت زمان درشت و صورتی شدند. به عبارتی گره ها از نظر تثبیت زیستی نیتروژن فعال و دارای آنزیم نیتروژناز بودند. نتایج نشان داد که آن دسته از گیاهانی که با باکتری های *سینوریزوبیوم* تلقیح شده بودند از رشد بهتری نسبت به گیاهان شاهد برخوردار بودند. بررسی کلنی های *سینوریزوبیوم* در محیط YEMA پس از گذشت ۷۲ ساعت در دمای ۲۸ °C نشان داد که کلنی ها به رنگ سفید، مدور با لبه های صاف، محدب و لعاب دار بودند و برخی از کلنی های *سینوریزوبیوم* پس از گذشت ۳ تا ٤ روز در محیط کشت به رنگ مایل به زرد در آمدند. این کلنی ها قطری حدود ۳ تا ۵ میلی متر و ظاهری چسبنده داشتند که نشان دهنده تولید

ترکیبات لعابی بود. باکتری ها در بررسی میکروسکوپی به صورت گرم منفی، باسیل یا کوکوباسیل و بدون اسپور تشخیص داده شدند.

نتایج آزمایشات بیوشیمیایی برای جدایه های *سینوریزوبیوم* در استان خراسان و قم نشان داد که تمامی جدایه ها، اکسیداز و کاتالاز مثبت و متحرک بودند. از آزمایشات کشت باکتری در محیط لیتموس میلک، ٦۰/۸٦ درصد از جدایه های استان خراسان و ٤۷/۳٦ درصد از جدایه های *سینوریزوبیوم* استان قم واکنش اسیدی نشان دادند. ۱۷/۳۹ درصد از جدایه های استان خراسان و ۲٦/۱۳ درصد از جدایه های استان قم واکنش قلیایی نشان دادند. در این میان ۱۷/۲۹ درصد از جدایه های استان خراسان و ۲۱/۰۵ درصد از جدایه های استان قم هیچ تغییری در این محیط ایجاد نکردند. بنابراین می توان نتیجه گرفت که واکنش جدایه های *سینوریزوبیوم* در این محیط متفاوت است.

باکتری های *سینوریزوبیوم* جدا شده فاقد آنزیم ژلاتیناز بودند و ژلاتین را در محیط نوترینت ژلاتین ذوب نکردند. از جدایه های استان قم ۳ جدایه (۱۵/۷۸ درصد) قادر به هیدرولیز نشاسته بودند و تمامی جدایه های استان خراسان فاقد آنزیم آمیلاز بودند.

حضور قرمز کنگو در محیط کشت سبب تسهیل در شناسایی جنس *سینوریزوبیوم* به علت کاهش رشد ساپروفیت ها از یک سو و تشخیص افتراقی کلنی موکوئیدی *سینوریزوبیوم* به دلیل عدم جذب معرف از سوی دیگر می گردد. تمامی جدایه های قم و خراسان رضوی در این محیط رنگ صورتی کم رنگ ایجاد کردند.

همچنین برای بررسی قابلیت رشد باکتری *سینوریزوبیوم* در حضور ترکیبات هیدروفوب از محیط TY با ۰/۰۱ درصد SDS استفاده شد و در بین جدایه های *سینوریزوبیوم* استان خراسان و قم ۲۱/۷۳ درصد از جدایه های استان خراسان و ۵۲/٦۳ درصد از جدایه های استان قم قابلیت رشد در حضور ترکیبات هیدروفوب را دارا بودند. این احتمال وجود دارد که جدایه های *سینوریزوبیوم ملی لوتی* مورد آزمایش استان قم مقاومت بیشتری نسبت به ترکیبات هیدروفوب نشان می دهند. تمامی جدایه های *سینوریزوبیوم* استان خرسان و قم در محیط حاوی منبع کربن مانیتول، ساکاروز و مالتوز رشد داشتند. از نظر استفاده از قند گلوکز ٦۵/۲۱ درصد جدایه ها از استان خراسان و ۳٦/۸٤ درصد از استان قم توانایی رشد در محیط حاوی گلوکز را داشتند. ٦۵/۲۱ درصد جدایه ها از استان خراسان و ٤۷/۳٦ درصد جدایه ها از استان قم آرابینوز و مانوز مثبت بودند. تمامی جدایه های استان خراسان توانایی رشد در محیط حاوی قند گالاکتوز را دارا بودند، اما ٦۸/٤۲ درصد از جدایه های *سینوریزوبیوم* استان قم توانایی رشد در این محیط را داشتند.

تمامی جدایه ها پس از الکتروفورز بر روی ژل ۱/۵ درصد، باندهای یکسان با اندازه تقریبی ۱۵۰۰ bp را نشان دادند.

نتایج تعیین منحنی رشد جدایه های سینوریزوبیومی نشان داد که این جدایه ها از نظر رشد با یکدیگر تفاوت معنی داری دارند. نتایج میانگین چگالی نوری (میزان رشد) جدایه های *سینوریزوبیوم ملی لوتی* در استان خراسان و قم در زمان های متفاوت به ترتیب در جدول های ۱ و ۲ نشان داده شده است. منحنی رشد تک تک جدایه های مختلف *سینوریزوبیوم* استان خراسان و قم رسم شد که در اینجا تنها منحنی کلی رشد باکتری ها در نمودار ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان می دهد که رشد جدایه ها حالت سیگموئیدی دارد و در منحنی رشد هر گروه چهار مرحله مختلف مشاهده می شود. این مراحل شامل فاز تاخیری، نمایی، ماکزیمم رشد و مرگ است. در این آزمایش قبل از این که جدایه ها وارد مرحله مرگ شوند آزمایش قطع شده است.

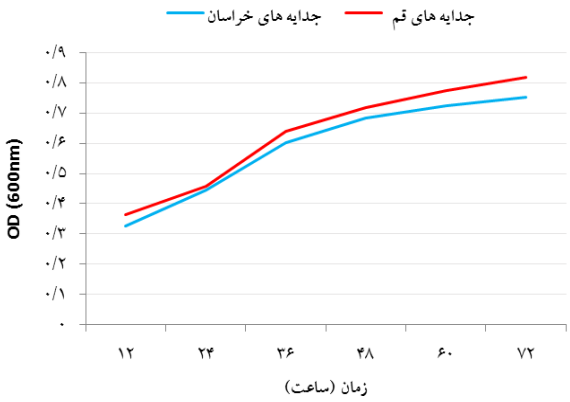
منحنی رشد ٤۲ جدایه *سینوریزوبیوم* در استان خرسان و قم نشان داد که بیشترین تفاوت در میزان رشد جدایه ها پس از گذشت ۳٦ ساعت از آغاز رشد رخ داده است؛ یعنی زمانی که رشد جدایه ها در مرحله نمایی قرار داشت. نتایج نشان داد که برخی از جدایه ها بیشترین میزان چگالی نوری را پس از ۷۲ ساعت در شرایط آزمایشگاهی داشته اند و برخی رشد سریع تری را در مقایسه با سایر جدایه ها داشته اند. جدایه

جدول ۱: میانگین چگالی نوری (میزان رشد) جدایه های *سینوریزوبیوم ملی لوتی* در استان خراسان در زمان های متفاوت در محیط کشت مایع.

ردیف	جدایه باکتری	۱۲ ساعت	۲۴ ساعت	۳۶ ساعت	۴۸ ساعت	۶۰ ساعت	۷۲ ساعت
۱	**S1K**	۰/۳۱۲	۰/۳۸۳	۰/۵۹۰	۰/٦۵۰	۰/۷۲٦	۰/۷٤۳
۲	**S4K**	۰/۲۷۳	۰/٤۳٤	۰/۷۳۸	۰/۷۸۳	۰/۷۹۸	۰/۸۱۰
۳	**S5K**	۰/٤٦۸	۰/۵۳۸	۰/٦٤۸	۰/۸٦٦	۰/۸۵۳	۰/۸۳۷
۴	**S6K**	۰/۳۷۰	۰/٦۵۲	۰/۷۰۱	۰/۸۱٦	۰/۸۲۷	۰/۸۵٤
۵	**S9K**	۰/۳۸۱	۰/۵۳۹	۰/٦۵٤	۰/٦۸۸	۰/۷۵۱	۰/۸۱٦
۶	**S10K**	۰/۳۲۱	۰/۳۸۳	۰/۵۹۰	۰/٦۵۰	۰/۷۲٦	۰/۷٤۳
۷	**S14K**	۰/۳۰۰	۰/٤٤۱	۰/٦۲۵	۰/٦٦۱	۰/۷۲۵	۰/۷۸۸
۸	**S15K**	۰/۳٦۱	۰/٤۵۸	۰/٦٦۹	۰/۷۱۰	۰/۷۵۸	۰/۷۷۰
۹	**S16K**	۰/۲٦٤	۰/۳۸۰	۰/۵۹۸	۰/٦۸٦	۰/۷۰۵	۰/۷۳٦
۱۰	**S20K**	۰/۲۹۵	۰/۳۸۸	۰/٦٤۹	۰/٦۳٦	۰/۷۰۷	۰/۸۱۰
۱۱	**S22K**	۰/۲۸۲	۰/٤۵۹	۰/٦۰۵	۰/٦۲۰	۰/۷۲۵	۰/۷۲۵
۱۲	**S23K**	۰/۲۵۲	۰/٤۳٦	۰/٦۲۵	۰/٦۳۵	۰/۷۰۷	۰/۷۲۵
۱۳	**S24K**	۰/۳۰۳	۰/٤۹۳	۰/۵۱۰	۰/٦۳۹	۰/٦۵۲	۰/٦۹۳
۱۴	**S26K**	۰/۳٦۲	۰/۵۱۹	۰/٦۱۰	۰/۷۹۵	۰/۸۲٦	۰/۸٤۲
۱۵	**S28K**	۰/۲٦٤	۰/٤۷۸	۰/۵۲٦	۰/٦۹٦	۰/۷۰۸	۰/۷۳۲
۱۶	**S29K**	۰/۳۳۵	۰/٤۹٤	۰/۵٦۲	۰/۷۰۰	۰/۷۲٦	۰/۷۵۱
۱۷	**S31K**	۰/۲۵٤	۰/۳۲٦	۰/۵۱٦	۰/٦۲۲	۰/٦٤۹	۰/٦۸۸
۱۸	**S32K**	۰/۳۱٤	۰/٤۳٤	۰/٦٤۸	۰/۸۲٦	۰/۸۵۲	۰/۸۸۳
۱۹	**S34K**	۰/۲۹۸	۰/۳۷٦	۰/۵۹۰	۰/٦٦۹	۰/٦۹۳	۰/۷۱۳
۲۰	**S35K**	۰/۲۲۱	۰/۳۱٦	۰/٤۹۹	۰/۵۰۳	۰/۵۵۳	۰/۵۵۳
۲۱	**S36K**	۰/۳۱۸	۰/٤۳٦	۰/۵۵۲	۰/٦۰۵	۰/٦٦۲	۰/٦۸٦
۲۲	**S37K**	۰/۳٤۹	۰/٤٦۵	۰/۵۲۵	۰/٦۳۲	۰/٦۷۳	۰/۷۱۰
۲۳	**S38K**	۰/۳۵٦	۰/٤۰۵	۰/٦۱۰	۰/٦٤۷	۰/٦۹۰	۰/۷۲٤
	میانگین	**۰/۳۱۵**	**۰/۴۴۴**	**۰/۶۰۱**	**۰/۶۸۴**	**۰/۷۲۵**	**۰/۷۵۳**

جدول ۲: میانگین چگالی نوری (میزان رشد) جدایه های *سینوریزوبیوم ملی لوتی* در استان قم در زمان های متفاوت در محیط کشت مایع.

ردیف	جدایه باکتری	۱۲ ساعت	۲۴ ساعت	۳۶ ساعت	۴۸ ساعت	۶۰ ساعت	۷۲ ساعت
۱	S1Q	۰/۳٦٤	۰/٤۱۹	۰/۵۷۸	۰/٦٦۵	۰/۷۱۰	۰/۷۹٤
۲	S2Q	۰/٤۷۳	۰/٤۸۱	۰/۵۸۸	۰/٦۰٦	۰/٦۱۲	۰/٦۱۲
۳	S3Q	۰/۵۰۷	۰/۵۵۲	۰/٦۲٦	۰/۷۵٦	۰/۷۸۹	۰/۸۲٦
۴	S4Q	۰/۳۸۷	۰/٤٤۸	۰/٦۵۳	۰/٦۹۸	۰/۷۹۵	۰/۸٤۰
۵	S7Q	۰/۲٦۰	۰/٤۵۸	۰/٦۹۲	۰/۷۲۰	۰/۷٤۸	۰/۸۱۱
۶	S8Q	۰/۲۷۵	۰/۵۰٦	۰/٦۹٦	۰/۷۳٤	۰/۷۸۱	۰/۹۳۳
۷	S9Q	۰/۳۳٦	۰/٤۵۰	۰/٦۱۰	۰/٦۸۵	۰/۸۲٤	۰/۹۹٤
۸	S11Q	۰/۳۲۰	۰/٤۲۷	۰/٦٤۸	۰/۷۵۸	۰/۷۹۳	۰/۷۵۹
۹	S12Q	۰/۲۵۷	۰/٤٤۳	۰/۷۱٦	۰/۷۹۵	۰/۸۰۱	۰/۸۲۲
۱۰	S13Q	۰/۳۵۱	۰/٤۲۷	۰/٦٤٤	۰/٦۷٤	۰/۷۹۱	۰/۷۹٤
۱۱	S14Q	۰/٤۲۱	۰/٤٤۸	۰/۷۱۲	۰/۷٤٤	۰/۸۵۲	۰/۸٦۲
۱۲	S15Q	۰/۳۵۱	۰/٤۲۷	۰/٦٤٤	۰/٦۷۳	۰/۷۹۱	۰/۷۹٦
۱۳	S16Q	۰/٤۰۷	۰/۵۰٤	۰/۵۹۲	۰/۷٤٤	۰/۷۹۲	۰/۸۱٦
۱۴	S17Q	۰/۳۷٦	۰/٤۵۰	۰/٦۲۳	۰/۷۱۸	۰/۷۹۳	۰/۸۳۰
۱۵	S18Q	۰/٤٦۳	۰/۵۹۱	۰/٦۷۸	۰/۸٦۹	۰/۸۱۸	۰/۹۲٦
۱۶	S19Q	۰/۲۹۸	۰/۳۲٦	۰/٤۹۰	۰/۵۰۹	۰/٦۲۵	۰/٦٤۵
۱۷	S20Q	۰/۳٤٦	۰/٤۳۸	۰/٦۹۵	۰/۷۹۵	۰/۸۲۱	۰/۸٤۲
۱۸	S21Q	۰/۲۹۰	۰/٤۳۲	۰/٦٤٦	۰/۷۳۲	۰/۷٦۲	۰/۷۹۰
۱۹	S22Q	۰/٤۵٦	۰/٤۹٦	۰/٦۱۹	۰/۷٦۲	۰/۸۱۳	۰/۸۵٦
	میانگین	**۰/۳۶۵**	**۰/۴۵۹**	**۰/۶۳۹**	**۰/۷۱۷**	**۰/۷۷۴**	**۰/۸۱۸**



نمودار ۱: منحنی رشد جدایه های بومی *سینوریزوبیوم ملی لوتی* استان خراسان و قم پس از گذشت ۷۲ ساعت رشد در محیط کشت مایع (YEMB)

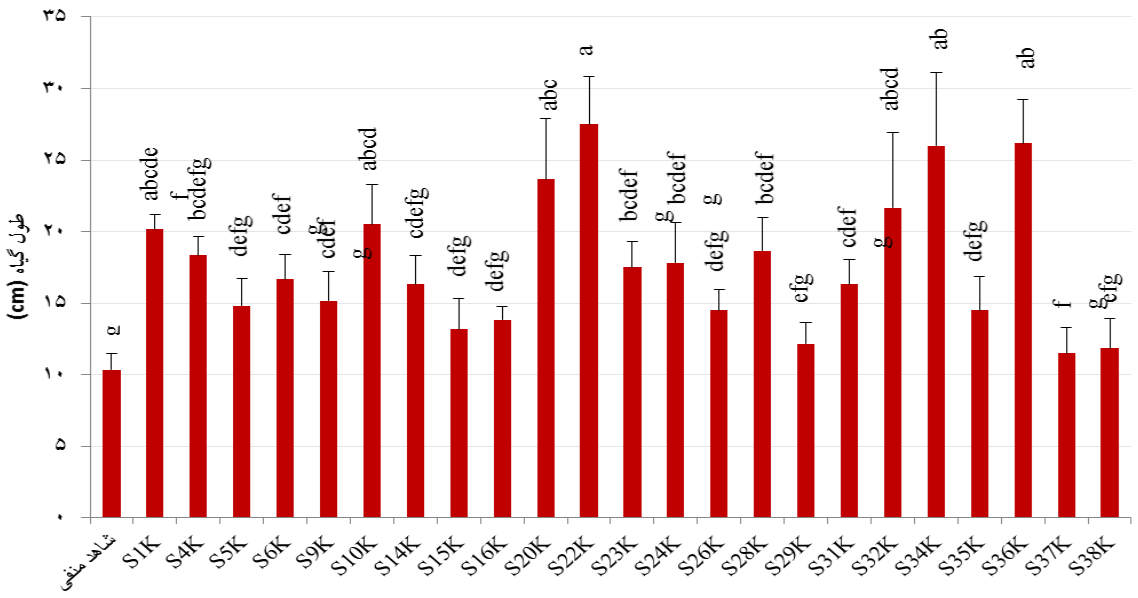
S32K که از منطقه خراسان جمع آوری شده بود، بیشترین میزان چگالی نوری را پس از ۷۲ ساعت در شرایط آزمایشگاهی داشت. همچنین مشاهده شد که جدایه S5K رشد سریع تری را در مقایسه با سایر جدایه های استان خراسان دارد و زودتر از سایر جدایه ها به مرحله رشد نمایی و سپس مرحله ثابت رسیده است.

نتایج چگالی نوری (میزان رشد) بین باکتری های مورد آزمایش در استان قم نشان داد که جدایه های S8Q، S9Q و S18Q بیشترین میزان چگالی نوری را پس از ۷۲ ساعت در شرایط آزمایشگاهی داشتند و جدایه S3Q رشد سریع تری را در مقایسه با سایر جدایه های *سینوریزوبیوم* استان قم داشت. این احتمال وجود دارد که چنین سویه هایی پتانسیل بهتر و بالاتری را برای استفاده به عنوان کود بیولوژیک با توجه به شرایط بومی و آب و هوایی مناطق داشته باشند.

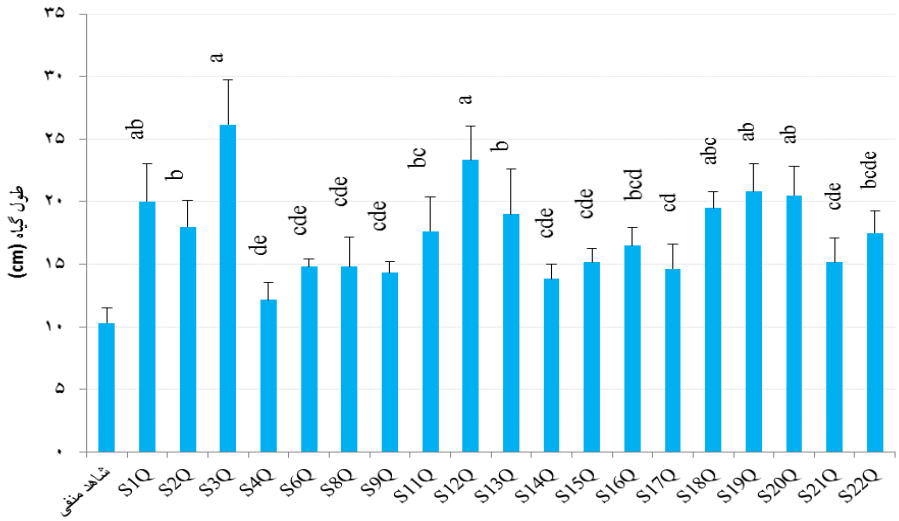
نتایج نشان داد که میزان رشد گیاهان همزیست با جدایه های *سینوریزوبیوم* به طور معنی داری از گیاه شاهد (بدون باکتری) بیشتر بود و در میان گیاهان تلقیح شده با جدایه های بومی *سینوریزوبیوم ملی لوتی*، میزان رشد گیاهان تلقیحی جدایه های *سینوریزوبیوم* S22K، S34K و S36K از استان خراسان (نمودار ۲) و S3Q و S12Q (نمودار ۳) از استان قم بیشتر از شاهد بود که می تواند نشان دهنده کارایی بیشتر این جدایه ها باشد.

بحث

در مطالعه حاضر ٤۲ باکتری *سینوریزوبیوم* از گیاهان یونجه استان های خراسان رضوی و قم جداسازی شدند. تمامی



نمودار ۲: مقایسه میانگین گیاهان تلقیحی با جدایه های *سینوریزوبیوم* استان خراسان و گیاه شاهد از نظر طول گیاه (حروف بالای هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار در بین جدایه ها و وجود حداقل یک حرف مشترک نشان دهنده عدم معنی دار بودن است).



نمودار ۳: مقایسه میانگین گیاهان تلقیحی با جدایه های *سینوریزوبیوم* استان قم و گیاه شاهد از نظر طول کل گیاه (حروف بالای هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار در بین جدایه ها و وجود حداقل یک حرف مشترک نشان دهنده عدم معنی دار بودن است).

باکتری ها گرم منفی، بدون اسپور، متحرک، اکسیداز و کاتالاز مثبت بودند و واکنش متفاوت در محیط لیتموس میلک داشتند. در بررسی مورفولوژی و بیوشمیایی، خنافری (Khanaferi) و همکاران در سال ۲۰۰۹ (۲۱)، شهزاد (Shahzad) در سال ۲۰۱۲ (۱۸)، فتاهون (Fentahun) و همکاران در سال ۲۰۱٤ (۱۲) و اوبلیسامی (Oblisami) و همکاران در سال ۲۰۰۵ (۲۲) *سینوریزوبیوم ملی لوتی* را با ویژگی های یاد شده از یونجه جداسازی کردند.

هیچکدام از جدایه ها توان تجزیه ژلاتین را در محیط نوترینت ژلاتین نداشتند. این یافته با نتایج گزارش شده توسط سایر محققان مطابقت دارد (۱۵، ۲۳). به نظر می رسد این باکتری ها فاقد آنزیم ژلاتیناز باشند.

از ٤۲ باکتری جدا شده در تحقیق حاضر ۳ جدایه توانایی تجزیه نشاسته را داشتند که از استان قم جدا شده بودند. نتیجه حاصل مغایر با گزارش هولت (Holt) و همکاران در سال ۱۹۹٤ مبنی بر عدم هیدرولیز نشاسته توسط ریزوبیوم هاست (۲٤).

اختلاف می تواند مربوط به جداسازی باکتری ها از گیاهان متفاوت باشد. سینگ (Singh) و همکاران در سال ۲۰۰۸ (۱۵) و اولیورا (De Olivera) و همکاران در سال ۲۰۰۷ (۲۵) گزارش کردند که به ترتیب ریزوبیوم های جدا شده از Fenugreck و شبدر نیز توانایی استفاده از نشاسته از منابع مختلف را دارند.

تمامی جدایه ها در پژوهش حاضر توانایی استفاده از مالتوز و سوکروز را به عنوان منبع کربن داشتند. در حالی که برخی از آن ها توانایی استفاده از گالاکتوز (۸۵/۷۱ درصد)، آرابینوز (۵۷/۱٤ درصد)، مانوز (۵۷/۱٤ درصد) و گلوکز (۵۲/۳۸ درصد) را داشتند. توانایی جدایه های استان خراسان در مصرف این قندها بیشتر بود.

نتایج گزارش شده توسط خنافری (Khanaferi) و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان داد که باکتری *ریزوبیوم* بیشترین میزان رشد را در محیط حاوی قند مانیتول داشته است. از طرفی توانایی رشد باکتری در محیط گلوکز و سوکروز کمتر از مانیتول بوده است (۲۱). یافته های شهزاد (Shahzad) در سال ۲۰۱۲ (۱٤)، اوبلیسامی (Oblisami) در سال ۲۰۰۵ (۲۲)، الزاناتی (Elzanaty) در سال ۲۰۱۵ (۲٦) و سینگ (Singh) در سال ۲۰۰۸ (۱۵) حاکی از مثبت بودن رشد باکتری *سینوریزوبیوم* در محیط های حاوی قند گلوکز، گالاکتوز، مانوز و مانتیول دارد. در نتیجه جدایه ها از نظر توانایی در مصرف منبع کربن متفاوت می باشند.

تمامی جدایه ها قابلیت رشد در حضور SDS را نداشتند و ۲۱/۷۳ درصد از جدایه های استان خراسان و ۵۲/۶۳ درصد از جدایه های استان قم توانایی رشد را در حضور این ترکیبات دارا بودند.

باکتری های جدا شده از خاک قم مقاومت بیشتری را نسبت به ترکیبات هیدروفوب داشتند. این نتیجه را می توان مربوط به اختلاف در خاک نواحی جدا شده دانست. به طوری که این احتمال وجود دارد که خاک این نواحی آلودگی بیشتری را با ترکیبات هیدروفوب دارد و ناشی از سازگاری باکتری با محیط باشد.

نتایج تعیین منحنی رشد باکتری های *سینوریزوبیوم* نشان داد که این جدایه ها از نظر رشد با یکدیگر تفاوت معنی داری دارند. جدایه S5K از خراسان و جدایه S3Q رشد سریع تری را در مقایسه با سایر جدایه ها داشتند و در ساعات اولیه (پس از ۱۲ و ۲٤ ساعت) میزان کدورت بیشتری را نسبت به سایرین ایجاد کردند.

در میان گیاهان تلقیح شده با جدایه های بومی *سینوریزوبیوم ملی لوتی*، میزان رشد گیاهان تلقیحی با جدایه های S22K و S36K از استان خراسان، S3Q و S12Q از استان قم بیشتر از سایر جدایه ها بود که می تواند نشان دهنده کارایی بیشتر این جدایه ها باشد. شایان یادآوری است که مشخص کردن سویه هایی با کارایی بالا برای کشت یونجه، نیاز به بررسی بیشتر و یا بررسی در محیط طبیعی و خاک نیز دارد. زیرا همیارهای همزیست بهینه در شرایط زراعی تشکیل می شوند. این احتمال وجود دارد که ریزوبیوم های بومی اثر سویه های تلقیحی را توسط رقابت در گره زایی گیاه میزبان کاهش دهند. تحقیقات فتاهون (Fentahun) و همکاران در سال ۲۰۱٤ نشان داد که باکتری های تثبیت کننده نیتروژن بر روی بعضی از ویژگی های بذر یونجه به خصوص بر روی طول گیاهچه و همچنین تعداد گره ها و وزن خشک گره ها اثر مثبت و معنی دار دارند (۱۲).

در گزارش راستین (Rastin) در سال ۱۹۷۸ (۲۷) تلقیح سویه های باکتری متناسب با شرایط محیطی و خاکی و در نتایج پناه پور (Panahpour) (2008) تاثیر جدایه های *سینوریزوبیوم* اقلیم های مختلف بر روی تثبیت نیتروژن و عملکرد علوفه ارقام یونجه معنی دار توصیف شده است. اثر معنی دار و مثبت همبستگی فنوتیپی بین تعداد گره با صفات مهمی مانند طول ریشه چه، طول گیاهچه و وزن خشک زی توده، اهمیت تأثیر همزیستی بر روی افزایش رشد و نمو اولیه گیاهچه یونجه را نشان می دهد.

این امر در مناطق خشک و نیمه خشک برای استقرار نهال های جوان از اهمیت زیادی برخوردار می باشد (۱٤). استفاده از جدایه های *سینوریزوبیوم* مناسب با تأثیر بر روی رشد طولی ریشه و تشکیل گره های تثبیت نیتروژن در مقایسه با شاهد این امکان را فراهم خواهد نمود که نهال های یونجه زودتر و بهتر بتوانند در محل کشت استقرار یابند. بنابراین می توانند بر مشکلات ناشی از تنش های رطوبتی و رشد کند گیاهچه های یونجه در اوایل رشد غلبه نمایند و با تولید گره بیشتر، نیتروژن زیادی را تثبیت کنند. در نتیجه با ریشه های عمیق در حفظ آب و خاک بسیار مفید و مؤثر واقع خواهند شد (۲۸).

نتیجه گیری

نتایج پژوهش نشان داد که بین جدایه های مختلف از نظر برخی ویژگی های بیوشیمیایی مانند واکنش در محیط لیتموس میلک، قابلیت هیدرولیز نشاسته، قابلیت رشد در حضور ترکیبات هیدروفوب و مصرف قندهای مختلف به عنوان منبع کربن تفاوت وجود دارد. همچنین مشخص گردید که سویه S22K از استان خراسان و S3Q از استان قم تأثیر مثبتی در تلقیح بذر یونجه از نظر شاخص های رشد به ویژه طول گیاه، طول ریشه، طول ساقه، تعداد برگ و تعداد گره دارند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از مسئولین دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Swain H, Abhijita S. Nitrogen fixation and its improvement through nitrogen fixation and its improvement through. J Global Biosci. 2013; 2(5): 98-112.

2. Bradic M, Sikora S, Redzepovic S, Stafa Z. Genetic identification and symbiotic efficiency of an indigenous *Sinorhizobium meliloti* field population. Food Technol Biotech. 2003; 41(1): 69-75.

3. Sprent JI. Nitrogen fixation and growth of non-crop legume species in diverse environments. Perspect Plant Ecol Evol Syst. 1999; 2(2): 149-162.

4. Requena N, Perez-Solis E, Azcon-Aguilar C, Jeffries P, Barea JM. Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of decertified ecosystems. Appl Environ Microbiol. 2001; 67(2): 495-498.

5. Schulz S, Engel M, Fischer D, Buegger F, Elmer M, Welzl G, Schloter M. Diversity pattern of nitrogen fixing microbes in nodules of *Trifolium arvense* (L.) at different initial stages of ecosystem development. Biogeosci. 2013; 10(2): 1183-1192.

6. Al-barakah FN, Abdel-Aziz RAA, Radwan SMA. Response of alfalfa to inoculation with *Sinorhizobium meliloti* strains indigenous to Saudi Arabian soils. Am Eurasian J Agric Environ Sci. 2011; 10(2): 193-199.

7. Peterson TA, Russella MP. Alfalfa and nitrogen cycle in the Corn Belt. J Soil Water Conserv. 1991; 46(3): 229-235.

8. Lakzian A, Karimi E, Khavazi K, Haghnia G. Genetic diversity of *Sinorhizobium meliloti* isolated from root nodules of alfalfa (*Medicago sativa*) growing in Hamadan soils (Iran) using plasmid profile and PCR/RFLP. Int J Agri Biol. 2008; 10(6): 669-672.

9. Shamseldin A, Sadowsky M, El-Saadani M, Sun An C. Molecular biodiversity and identification of free living *Rhizobium* strains from diversity Egyptian soil as assessed by direct isolation without trap hosts. Am Eurasian J Agric Environ Sci. 2008; 4(5): 541-549.

10. Alavian Mehrian E, Bahar M, Taleb Badaf M. Molecular identification of chickpea nodulating rhizobia in western regions of Iran. Iran J Field Crop Sci. 2014; 45(1): 135-146.

11. Shafizadeh Sh, Seyf Elahi AR, Eskandari ZA. Extraction and identification of sypbiotic *rezibium* race from the moset important ranglands legumes in Esfahan province. Iran J Range Desert Res. 2007; 14(3): 302- 312.

12. Fentahun M, Akhtar MS, Muleta D, Lemessa F. Isolation and characterization of nitrogen deficit *Rhizobium* isolates and their effect on growth of haricot bean. Afr J Agric Res. 2013; 8(46): 5942-5952.

13. Elboutahiri N, Thami-Alami E, Udupa S. Phenotypic and genetic diversity in *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* from drought and salt affected regions of Morocco. BMC Microbiol. 2010; 10: 15.

14. Panahpour H. Effects of *Sinorhizobium* strain inoculation on seedling growth and establishment of alfalfa (*Medicago sativa* L.) in arid and semi-arid regions of Iran. Iran J Range

Desert Res. 2008; 15(1): 129-138. [In Persian]

15. Singh B, Kaur R, Singh K. Characterization of *Rhizobium* strain isolated from the roots of *Trigonella foenumgraecum* (Fenugreek). Afr J Biotechnol. 2008; 7(20): 3671-3676.

16. Namaki Shoshtari A. 1997. Genetics and molecular characterization of the *Agrobacterium* nitrogen fixation system. Thesis for degree of Ph.D. School of Biology. University of England.

17. Truchet G, Debelle F, Vasse J, Terzaghi B, Generone AM, Rosenberg C, Batut J, Mallet F, Denarie J. Identification of *Rhizobium meliloti* pSYM 2011 region controlling the host specificity of root hair curling and nodulation. J Bacteriol. 1985; 164(3): 1200-1210.

18. Shahzad F, Shafee M, Abbas F, Babar S, Tariq MM and Ahmad Z. Isolation and biochemical characterization of *Rhizobium meliloti* from root nodules of alfalfa (*Medicago sativa*). J Anim Plant Sci. 2012; 22(2): 522-524.

19. Del Papa MF, Balague LJ, Castro Sowinski S, Wegener C, Segundo E, Martinez Abarca F, Toro N, Niehaus K, Puhler A, Aguilar OM, Martinez-Drets G, Lagares A. Isolation and characterization of alfalfa-nodulating Rhizobia present in acidic soils of central Argentina and Uruguay. Appl Environ Microbiol. 1999. 65(4): 1420-1427.

20. Schmid J, Koenig S, Pick A, Steffler F, Yoshida S, Miyamoto K, Sieber V. Draft genome sequence ofKozakia baliensis SR-745, the first sequenced Kozakiastrain from the family Acetobacteraceae. Genome Announc. 2014; 2(3): e00594-14.

21. Khanaferi A, Mansubi M, Arbabian S. Evaluation of anthocyanin production in *Rhizobium* symbiotic and free-living. J Microbiol Knowledge. 2009; 1(2): 53-62. [In Persian]

22. Oblisami G. On in vitro growth of five species of ectomycorrhizal fungi. Euro J For Path. 1995; 1(7): 204-210.

23. Deb K, Deb B, Pande P. Isolation and characterization of root nodule bacteria associated with *Cassia alata* of Southern parts of Assam, India. Int J Pure App Biosci. 2015; 3(1): 58-63.

24. Holt JG, Kriey NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. Editor: Hensyl R W. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th edition. Baltimore, United States Lippincott Williams & Wilkins; 1994.

25. De-Oliveira AN, de Oliveira LA, Andrade JS, Chagas JAF. Rhizobia amylase production using various starchy substances as carbon substrates. Braz J Microbiol. 2007; 38(2): 208-216.

26. Elzanaty AM, Hewedy OA, Nagaty HH, Abd Elbary MI. Molecular and biochemical characterization of some Egyptian genotypes *Rhizobium* (*Vicia Faba*) isolates. J Bioengineer Biomedical Sci. 2015; 5(1): 145.

27. Rastin Saleh N. Soil Biology. Tehran. Tehran University Press. 1978. [In Persian]

28. Bohrani M. Processing of forage plants. Shiraz. Shiraz University Publication Center. 2001. [In Persian]

Journal of Microbial World
Volume 8, No. 1, April 2015

Original Article

Study of biochemical and molecular properties of *Sinorhizobium meliloti* bacteria isolated from alfalfa roots in two regions of Iran

Azadeh Haddad Sabzevar[1], Mahboobeh Nakhaei Moghaddam[2]

[1]MS.c., Department of Biology, Mashhad branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.
[2]Assistant Professor, Department of Biology, Mashhad branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Rhizobia are able to fix atmospheric nitrogen and provide a significant amount of nitrogen in the soil. The purpose of this study was to isolate and identify the biochemical properties of indigenous *Sinorhizobium meliloti* bacteria in two regions of Iran, and also to detect the strains with higher efficiency, which have the potential to be used as bio-fertilizer.

Materials & Methods: In this cross- sectional study, bacteria were collected from alfalfa plants in areas around Qom and Khorasan Provinces. These bacteria were identified using nodulation test, as well as biochemical and molecular examinations. The growth curves of these isolates were drawn. The isolates with higher efficiency were identified by inoculation of bacteria into alfalfa seeds and comparison of the rate of plant growth.

Results: The isolated bacteria did not show a same reaction in Lithmus milk medium. All bacteria were gelatinase-negative, and only a few strains were able to utilize starch of the media. Some bacteria were able to grow in the presence of hydrophobic compounds. S22K and S36k from Khorasan, S3Q and S12Q from Qom showed better effects on the growth of test plants in comparison to other isolates.

Conclusion: The results of these research showed that some indigenous bacteria of *S. meliloti* are able to digest starch and were able to grow in the presence of SDS. Among the isolates, strains S3Q and S22K had the better potential for application as biological fertilizer. This research could be a step for the production of bio-fertilizers in our country.

Keywords: *Sinorhizobium meliloti*, Alfalfa, Biochemical properties, Growth curve.

Correspondence to: Mahboobeh Nakhaei Moghaddam

Tel: +989155131464

E-mail: m.nakhaei@mshdiau.ac.ir

Journal of Microbial World 2015, 8(1): 26-37.