مطالعه انتقال پلاسمید بین ایزوله‌های ریزوبیوم لگومینوزارم در خاکهای آلوده به فاضلاب

امیر لکزیان[۱]

مواد ژنتیکی باکتریها، در کروموزوم و پلاسمیدها وجود دارند که در داخل سلول دارای ثبات و پایداری دائمی نمی‌باشند. بطور کلی سه مکانیزم نو ترکیبی ژنتیکی در بین باکتریها شناخته شده است که باکتریهای ریزوبیوم نیز از این امر مستثنی نمی‌باشند. ترانسفورمیشن که در این روش قطعه‌ای از DNA خارجی توسط سلول باکتری‌های جذب شده و بخشی از مواد ژنتیکی سلول جدید را تشکیل می‌دهد. ترانسداکشن که در این روش قطعه‌ای از DNA توسط ویروسها به سلول باکتریها منتقل می‌شود، سلولهایی که قطعه DNA را دریافت می‌کنند طبیعتاً دارای ترکیب ژنتیکی جدیدی خواهند بود. روش سوم کانجوگیشن است که DNA در اثر تماس مستقیم دو سلول با یکدیگر منتقل می‌شود. همچنین در اثر تماس دو سلول امکان انتقال DNA پلاسمیدی از سلولی به سلول دیگر نیز وجود دارد. انتقال پلاسمیدها در میان جمعیتهای باکتریایی در محیطهای طبیعی از نقطه‌نظر اکولوژیکی دارای اهمیت ویژه‌ای می‌باشد. زیرا بسیاری از ژنهای ضروری برای رشد در شرایط نامساعد محیطی، توسط پلاسمیدها حمل می‌شوند. مطالعات زیادی در این زمینه صورت گرفته است که نشان می‌دهد عوامل متعددی نظیر مواد غذایی، کانیهای رسی، اسیدیته خاک و موجوداتی نظیر کرمهای خاکی می‌توانند در انتقال مواد ژنتیکی تأثیر داشته باشند. بنابراین از دست دادن وبدست آوردن پلاسمید در بین جمعیتهای طبیعی باکتریها، موضوعی شناخته شده است. اما راجع به تأثیر فاضلاب روی انتقال پلاسمیدها در بین باکتریها بویژه بین باکتریهای ریزوبیوم مطالعه‌ای صورت نگرفته است.

هدف از انجام این تحقیق این بود که احتمال انتقال پلاسمید در بین ایزوله‌های ریزوبیوم لگومینوزارم بیووار ویسیه در خاکهای آلوده شده با فاضلاب که بالطبع دارای مقادیر زیادی عناصر سنگین می‌باشند بررسی شود.

برای انجام این آزمایش چهار نمونه خاک که بمدت ده سال با سطوح مختلفی از فاضلاب مخلوط شده بودند انتخاب شدند. تیمارها شامل نمونه شاهد بدون فاضلاب، ۱۰۰ مترمکعب فاضلاب، ۳۰۰ مترمکعب فاضلاب و ۳۰۰ مترمکعب فاضلاب همراه کلرور عناصر سنگین در هکتار در سال بودند. ضمناً برای هر نمونه خاک سه تکرار وجود داشت و جمعاً دوازده نمونه خاک توسط اشعه گاما استریل شدند. بمنظور حصول اطمینان از فرآیند استریل شدن، گیاه میزبان ماشک (*Vicia hersuta*) درهمه نمونه‌های

---

[۱] عضو هیأت علمی دانشگاه فردوسی مشهد

خاک رشد داده شدند. نمونه‌های استریل شده خاک با ۷ ایزوله ریزوبیوم لگومینوزارم تلقیح شدند (هر نمونه خاک با $۱۰^{۵} \times ۱$ سلول از هر ایزوله و مجموعاً با $۱۰^{۵} \times ۷$). نمونه‌های خاک در ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۵۰ درصد ظرفیت نگهداری آب به مدت یکسال نگهداری شدند. پس از یک سال مجدداً تعداد باکتریهای ریزوبیوم لگومینوزارم بوسیله تکنیک بیشترین تعداد محتمل شمارش شدند. بمنظور شناسایی مجدد ایزوله‌ها از تکنیک پروفیل پلاسمیدی استفاده شد. برای انجام مطالعات هیبریدسازی و انتقال DNA پلاسمیدی به صفحات باردار از تکنیک سوترن بلات استفاده شد. محلول هیبریدسازی متشکل از ۲ میکرولیتر DNA تک رشته‌ای (با حرارت دادن DNA دو رشته‌ای در ۹۵ درجه سانتیگراد حاصل می‌شود)، ۱۲ میکرولیتر آب خالص، ۵ میکرولیتر بافر هیبریدسازی، یک میکرولیتر BSA ، ۳ میکرولیتر dCTP ρ 32، یک میکرولیتر $dNTP_s$ و یک میکرولیتر آنزیم DNA پلیمراز (Klenow) می‌باشد. پس از انجام عمل هیبریداسیون صفحات باردار در ورقه‌های پلاستیکی بسیار نازک پیچیده و بر روی آنها فیلمهای حساس به اشعه ایکس قرار داده شد. پس از یک الی ۵ روز فیلمها در اتاق تاریک ظاهر شدند. و نتایج مورد بحث و بررسی قرار گرفت.

نتایج حاصل از شمارش باکتریها نشان داد که جمعیت ریزوبیوم لگومینوزارم بیووار ویسیه در تمام تیمارها بدون توجه به افزایش فاضلاب و نهایتاً وجود مقادیر زیاد روی (Zn) در نمونه‌های خاک، پس از یک سال نگهداری نمونه‌ها، افزایش یافته بود. البته این نتایج دور از انتظار نبود زیرا در حقیقت با استریل کردن نمونه‌های خاک امکان هرگونه رقابت بین باکتریهای ریزوبیوم و دیگر باکتریهای بومی خاک برای استفاده از مواد غذایی خاک از بین رفته بود. ثانیاً این احتمال وجود دارد که تمام شکارچیان باکتریهای ریزوبیوم که می‌توانند روی اندازه جمعیت آنها تأثیر منفی داشته باشند از صحنه رقابت حذف شده بودند. همچنین تعداد ۱۱۶ ایزوله از نمونه‌هایی خاک بازیافت شدند و پروفیلهای پلاسمیدی تمام ایزوله‌ها مطالعه شدند. پروفیلهای پلاسمیدی ایزوله‌های بازیافت شده با ایزوله‌های مادری مقایسه و گروه‌بندی شدند. نتایج حاصله از مطالعه پروفیلهای پلاسمیدی نشان داد که پس از یکسال تغییراتی در ساختمان ژنتیکی جمعیت باکتریها رخ داده است. اگرچه از هر ایزوله تعداد سلول مساوی به نمونه‌های خاک تلقیح شده بودند اما در هنگام بازیافت آنها ایزوله ۲۸۲۷ بدلیل سرعت رشد، بیشتر ایزوله غالب در تمام تیمارها بود. برعکس ایزوله‌های ۲۸۱۱ و ۷۱۳۴۵ از نمونه‌های خاک بازیافت نشدند. احتمالاً این دو ایزوله نیز در خاک وجود داشته‌اند اما بدلیل توان رقابتی ضعیفتر و تعداد کمتر، بازیافت نشده‌اند. نکته جالب توجه این بود که تعدادی ایزوله جدید شناسایی شدند که در بین ایزوله‌های مادری که برای تلقیح نمونه‌های خاک استفاده شده بودند، وجود نداشتند از جمله ایزوله ۱-۲۸۱ که از نظر پروفیلهای پلاسمیدی مشابه ایزوله ۲۸۱ بود که فقط یک پلاسمید از دست داده بود. همچنین سه ایزوله جدید دیگر ۱+۲۸۲۷ نیز مشاهده شدند. این ایزوله‌ها دارای پروفیلهای پلاسمیدی مشابه ۲۸۲۷ بودند با این تفاوت که یک پلاسمید اضافی نیز داشتند. اندازه این پلاسمید مشابه کوچکترین پلاسمید ایزوله ۷۱۳۱ بود. نتایج حاصل از این بررسی، نشان داد که ایزوله ۷۱۳۱(pAL7131) بعنوان دهنده پلاسمید (Donor cell) و ایزوله ۲۸۲۷ بعنوان

پذیرنده پلاسمید (Recipient) رفتار کرده و ایزوله جدید ۱+۲۸۲۷ (Transconjugant) را بوجود آورده‌اند. بعبارت دیگر کوچکترین پلاسمید ایزوله ۷۱۳۱ (پلاسمید pAL7311) از این ایزوله به ایزوله ۲۸۲۷ منتقل شده و ایزوله‌های جدیدی را بوجود آورده است. انتقال پلاسمید در خاکهای آلوده با فاضلاب در مقایسه با تیمارهای دیگر بیشتر بود.