جداسازی و شناسایی مولکولی سویه‌های سینوریزوبیوم ملیلوتی مقاوم به فلزات سنگین از خاکهای آلوده استان زنجان

اسماعیل معمار کوچه‌باغ[1]، داریوش شانه‌بندی[2]، احمد گلچین[3]، حسین بشارتی[4]
1- فارغ التحصیل کارشناسی ارشد خاکشناسی دانشگاه زنجان، زنجان، دانشکده کشاورزی، گروه خاکشناسی
2- فارغ التحصیل کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه پیام نور، کرج، دانشگاه پیام نور، گروه مهندسی بیوتکنولوژی
3- مدیر گروه خاکشناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان، زنجان، دانشکده کشاورزی، گروه خاکشناسی
4- رئیس موسسه تحقیقات خاک و آب تهران، کرج، میدان استاندارد، جاده مشکین دشت بعد از رزکان نو، بلوار امام خمینی
smaeil memar@yahoo.com

چکیده

سویه‌های مختلف باکتری سینوریزوبیوم ملیلوتی دارای درجات متفاوتی از نظر تحمل به استرس فلزات سنگین می‌باشند. این تحقیق با هدف جداسازی و شناسایی مولکولی سویه‌های مقاوم به کادمیم، سرب و روی جهت تولید مایه تلقیح برای مناطق آلوده و همچنین استفاده از آنها در زیست پالایی خاک‌های آلوده انجام گرفت. به منظور تهیه سویه‌های بومی، پس از جداسازی باکتری‌ها، بررسی مقاومت سویه‌ها به سمیت فلزات سنگین انجام گرفت و S_{41} بر اساس میزان تحمل به هر سه فلز مؤثرترین سویه معرفی شد. شناسایی مولکولی به کمک قطعه Intergenic Spacer انجام گرفت و بیشترین شباهت با سویه *Sinorhizobium meliloti 1021* در NCBI[1] مشاهده شد.

کلمات کلیدی: زیست پالایی، سینوریزوبیوم ملیلوتی، فلزات سنگین

مقدمه

آلودگی محیط زیست و افزایش روند تخریب اکوسیستم‌های طبیعی از جمله خاک، ناشی از برخورد غیر معقول انسان با محیط زیست و استفادهٔ نامناسب از منابع موجود در طبیعت است. فعالیتهای حفاری و معدنی، سوزاندن زباله و مواد زائد، وسایل نقلیه و ترافیک، مصرف حشره‌کشها و کودهای شیمیایی در کشاورزی و دفن زباله‌های خانگی و صنعتی و بیمارستانی در محیط زیست از جمله منابع انسانی آلاینده محیط زیست به فلزات سنگین به حساب می‌آیند. امروزه یکی از مسائل مهم زیست محیطی، آلوده شدن خاکهای زیر کشت، به فلزات سنگین از جمله کادمیم، سرب، روی و غیره می‌باشد. ورود این آلاینده‌ها به خاک سبب حذف تدریجی بسیاری از موجودات مفید این زیستگاه‌ها شده، درنتیجه تنوع زیستی که شرط اصلی پویایی، خود تنظیمی، تعادل و پایداری اکوسیستم خاک است به آسیبی غیر قابل جبران دچار می‌گردد (Angle, 1991).

توجه به نقش ریزوبیوم‌ها در ارتقاء سطح حاصلخیزی خاک به دلیل امکان برقراری رابطهٔ همزیستی با گیاهان خانوادهٔ لگومینوز جهت تثبیت نیتروژن می‌باشد. توان مقاومت در برابر تنش‌های محیطی مانند شوری، خشکی و آلودگی خاک به سموم و فلزات سنگین از جمله مشخصات مطلوب برخی سویه‌های ریزوبیومی محسوب می‌شود که می‌تواند به عنوان مبنایی جهت انتخاب آنها برای شرایط محیطی خاص قرار گیرد (Zahran, 1999).

شرایط محیطی از جمله تنش‌ها بر میزان تولید پلی‌ساکاریدهای برون یاخته‌ای جدایه‌های ریزوبیومی تأثیر دارد، به طوری که جدایه‌های ریزوبیومی برای مقاومت در برابر شرایط نامساعد محیطی، میزان پلی‌ساکارید بیشتری تولید می‌کنند. پلی‌ساکاریدهای برون یاخته‌ای جدایه‌ها در فرایند تشخیص لگوم-ریزوبیوم و همچنین به عنوان محافظ در برابر تنش‌های محیطی نقش مهمی را برای سلول باکتری ایفا می‌کنند (Delavechia *et al*, 2003).

1. National Center for Biotechnology Information

تاکنون مطالعه‌ای جهت معرفی سویه‌های بومی سینوریزوبیوم ملیلوتی مقاوم به فلزات سنگین با قابلیت تثبیت نیتروژن مولکولی بسیار مؤثر در استان زنجان انجام نگرفته، بنابراین معرفی مناسبترین جدایه همزیست گیاه یونجه جهت تولید مایه تلقیح و افزودن آن به عنوان کود بیولوژیکی برای تولید محصول بیشتر بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

مواد و روشها:

به علت قرار گرفتن تعداد زیادی از مزارع استان زنجان در نزدیکی کارخانجات سرب و روی اکثر مزارع یونجه این استان آلوده به فلزات سنگین می‌باشند. پس از تهیه نمونه‌های گره از گیاه یونجه، جداسازی سویه‌های خالص سینوریزوبیوم ملیلوتی از گره‌های ریشه‌ای انجام گرفت. پس از خالص‌سازی ریزوبیوم‌ها بررسی میکروسکوپی و نوع واکنش در برابر رنگ آمیزی گرم[1] مورد مطالعه قرار گرفت. در مرحله بعد توانایی سویه‌ها در تغییر pH محیط کشت Y.M.A حاوی معرف برم تیمول آبی بررسی گردید. معمولاً تشخیص نهایی هر گونه ریزوبیوم بر اساس توان برقراری همزیستی یعنی ایجاد گره بر سیستم ریشه‌ای گیاه میزبان[2] انجام می‌گیرد. بنابراین در مرحله بعد، توان هر یک از سویه‌های خالص سازی شده در ایجاد رابطه همزیستی با گیاه میزبان بررسی گردید (Vincent, 1982).

در مرحله دیگر برای بررسی توان تثبیت نیتروژن سویه‌های ریزوبیومی آزمایش گلخانه‌ای با استفاده از 45 سویه ریزوبیوم به همراه تیمار شاهد بدون باکتری و دو تیمار نیتروژنی معادل 35 و 70 میلی‌گرم در کیلوگرم نیتروژن در گلدان‌های یک کیلوگرمی با استفاده از مخلوطی از ماسه و پرلیت استریل (به نسبت 9 به 1) در قالب طرح کاملاً تصادفی و با 3 تکرار انجام گردید. کارایی همزیستی سویه‌ها (S.E.)[3] با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{S.E.} = \frac{\text{وزن خشک تیمار شاهد- وزن خشک تیمار تلقیح شده با سویهٔ باکتری}}{\text{وزن خشک تیمار شاهد- وزن خشک تیمار70 میلی‌گرم در کیلوگرم نیتروژن}} \times ۱۰۰$$

تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم افزار Mststc و رسم نمودارها با نرم افزار Excel 97 انجام شد.

به منظور تعیین مقاومت نسبی باکتری‌های سینوریزوبیوم ملیلوتی در برابر سطوح مختلف کادمیوم، سرب و روی از محیط کشت جامد H.M.[4] استفاده شد (Beck *et al*, 1993).

سویه‌های مختلف ریزوبیوم بر اساس میزان تحملی که در برابر فلزات سنگین از خود نشان دادند در یکی از گروههای مقاوم، نسبتاً حساس و حساس قرار داده شدند. پس از اتمام این مرحله سویه‌های نسبتاً حساس و مقاوم به فلزات انتخاب و در سطوح بالاتر از فلز سنگین با سطح قبلی مورد ارزیابی قرار گرفتند (Vincent, 1982).

جهت شناسایی مولکولی سویه‌ها، استخراج DNA از باکتری‌های کشت شده در محیط Y.M.B انجام گرفته و PCR[5] برای تکثیر قطعه Intergenic spacer[6] با پرایمرهای P1 و P2 صورت پذیرفت. قطعه تکثیر یافته در وکتور پلاسمیدی pGEM-T محصول شرکت Promega کلون گردید و برای توالی‌یابی ارسال شد. توالی بدست آمده با توالی‌های NCBI بلاست گردیده و بررسی شباهت‌ها انجام گرفت (Brosius *et al*, 1978).

نتیجه‌گیری

با مطالعه سویه‌های ریزوبیومی در زیر میکروسکوپ، فرم تیپیک سویه‌ها، میله‌ای کوتاه، گرم منفی و فاقد اسپور مشاهده و مورد تأیید قرار گرفت. یکی دیگر از معیارهای تقسیم‌بندی باکتری‌های جداسازی شده از گره‌های ریشه‌ای

1. Gram staining
2. Plant Infection Test
3. Symbiotic Efficiency
4. HEPES-MES
5. Polymerase Chain Reaction
6. 16S-23S Ribosomal RNA Intergenic Spacer

گیاه، تند رشد و کند رشد بودن و توانایی آنها در تولید اسید یا باز در محیط کشت می‌باشد. باکتری‌های سینوریزوبیوم ملیلوتی که تند رشد می‌باشند قادر به تولید اسید بوده و محیط کشت Y.M.A. حاوی برم تیمول بلو پس از سه روز انکوباسیون به رنگ زرد در می‌آورند. معمولاً تشخیص نهایی هر گونهٔ ریزوبیوم بر اساس توان برقراری همزیستی یعنی ایجاد گره بر روی سیستم ریشه‌ای گیاه میزبان صورت می‌گیرد. نتایج بدست آمده نشانگر وجود اختلاف نسبتاً زیاد در بین سویه‌های سینوریزوبیوم ملیلوتی از نظر توان گره‌زایی بر روی ریشهٔ گیاه یونجه است. بیشترین تعداد گره به ترتیب در سویه‌های S_{41}، S_{51} و S_6 مشاهده شد و سویه‌های S_1، S_3 و S_{23} دارای کمترین توان گره‌زایی بودند، به طوریکه تعداد گره‌های ایجاد شده توسط این سویه‌ها حدود 70 درصد کمتر از سویه‌های برتر از نظر این صفت بود. آزمون بررسی توان تثبیت نیتروژن مولکولی سویه‌های سینوریزوبیوم ملیلوتی در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد و سویه‌ها بر اساس شاخص‌های وزن خشک بخش هوایی گیاه و کارآیی همزیستی (S.E.)، با یکدیگر مقایسه شدند. نتایج مندرج در جدول تجزیه واریانس اثر سویه‌ها بر وزن خشک بخش هوایی یونجه و کارایی همزیستی نشان داد که اثر تیمارها (سویه‌ها و سطوح کود نیتروژنی) بر شاخص‌های مذکور در سطح 1% معنی‌دار می‌باشد (جدول 1).

جدول 1- تجزیه واریانس اثر سویه‌های ریزوبیومی بر صفات ارزیابی شده در آزمون توان تثبیت نیتروژن مولکولی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات(MS)	
		وزن خشک اندام هوایی	کارایی همزیستی (S.E.)
سویه باکتری یا سطح نیتروژن	47	1/636 **	137691/667 **
(خطای آزمایش)	96	0/002	173/333
جمع کل	143		
C.V		1/28	2/80

** معنی‌دار در سطح 1 درصد

جدول 2- میزان تحمل سویه‌های سینوریزوبیوم ملیلوتی به سطوح مختلف کادمیم، سرب و روی

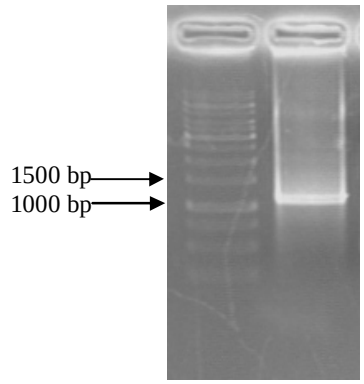
ردیف	سویه	میزان مقاومت به فلزات سنگین														
		Cd (mg l^{-1})					Pb (mg l^{-1})					Zn (mg l^{-1})				
		60	70	80	90	100	100	200	300	400	500	50	100	150	200	250
1	S_6	PS	PS	PS	S	S	T	T	PS	S	S	T	T	PS	S	S
2	S_9	PS	PS	PS	S	S	T	T	T	PS	S	T	T	T	S	S
3	S_{24}	PS	PS	S	S	S	T	PS	S	S	S	PS	S	S	S	S
4	S_{41}	T	T	T	T	T	T	T	T	T	PS	T	T	T	T	PS
5	S_{48}	PS	PS	PS	S	S	T	T	PS	S	S	T	T	T	T	PS
6	S_{49}	PS	PS	PS	S	S	T	T	PS	S	S	T	T	T	T	S
7	S_{51}	PS	PS	PS	S	S	T	T	PS	PS	S	T	T	S	S	S
8	S_{54}	PS	PS	PS	S	S	T	PS	S	S	S	T	T	T	T	S
9	S_{57}	PS	PS	PS	S	S	T	T	PS	S	S	T	T	T	T	PS
10	S_{58}	PS	PS	PS	S	S	PS	S	S	S	S	PS	S	S	S	S

P.S.: Partially Sensitive S: Sensitive T: Tolerant

در همزیستی ریزوبیوم- لگومینوز، افزایش غلظت فلز سنگین در خاک، رشد گیاه، باکتری و به دنبال آن توان همزیستی گیاه و باکتری کاهش می‌یابد (Rossbach *et al*, 2008). توانایی میکروارگانیسم‌ها جهت رشد و تکثیر در محیطهای آلوده به فلز سنگین به ویژگی‌های ژنتیکی و فیزیولوژیک آنها بستگی دارد (Angle *et al*, 1991). باکتری‌های سینوریزوبیوم ملیلوتی که اصلاح ژنتیکی گردیده‌اند همزمان دارای توان خاصیت افزایش حاصلخیزی خاک از طریق ایجاد رابطه همزیستی با گیاه یونجه و تثبیت نیتروژن و همچنین توان زیست پالایی و اصلاح خاک‌های آلوده به ماده سمی آلی بنام پلی‌کلرید بی‌فنیل (PCB) می‌باشند (Chen *et al*, 2005).

در جدول 2 نتایج مربوط به بررسی میزان تحمل 10 سویه برتر سینوریزوبیوم ملیلوتی به سطوح مختلف فلزات سنگین نشان داده شده است. با در نظر گرفتن کلیه سطوح فلزات سنگین (کادمیم، سرب و روی)، سویه S_{41} به عنوان مقاومترین سویه از نظر تحمل به هر سه فلز سنگین با کارایی همزیستی بسیار مؤثر، (139%) شناخته شد.

شناسایی مولکولی به کمک قطعه Intergenic spacer **انجام گرفت**. محصول PCR با آغازگرهای P1 و P2 قطعه‌ای به اندازه تقریبی 1200 bp می‌باشد. با انجام nBLAST توالی قطعه مذکور در سایت NCBI مشاهده گردید که سویه حاضر با سویه *Sinorhizobium meliloti* 1021 به میزان 99% شباهت دارد. توالی مربوطه در حال ثبت در NCBI می باشد.



شکل 1- قطعه Intergenic Spacer مربوط به سویه S_{41} با اندازه تقریبی 1200 bp

منابع

Angle, J. S. and R. L. Chaney. 1991. Heavy metal effects on soil population and heavy metal tolerance of *Rhizobium meliloti*, nodulation and growth of alfalfa. Water, Air and Soil Pollution 57-58: 597-604.

Beck, D.P., L.A. Materun and F. Afandi. 1993. Practical Rhizobium legume Technology Manual. Technical manual, no: 19, ICARDA.

Brosius, J., Palmer, M. L., Kennedy, P. J. & Noller, H. F Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal (1978). RNA gene from Escherichia coli. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America.75/4801–4805

Chen, Y., A. Adam, O. Toure and S.K. Dutta. 2005. "Molecular evidence of genetic modification of *Sinorhizobium meliloti*: enhanced PCB bioremediation." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 32(11): 561-566.

Delavechia, C., E. Hampp, A. Fabra, and S. Castro. 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 Soil. 38: 110-114.

Rossbach, S., Mai, Danielle J., Carter, Eric L., Sauviac, Laurent, Capela, Delphine, Bruand, Claude, de Bruijn, Frans J. 2008. "Response of *Sinorhizobium meliloti* to Elevated Concentrations of Cadmium and Zinc." Applied and Environmental Microbiology 74: 4218- 4221.

Vincent, J.M. 1982. Nitrogen Fixation in Legume. Academic press, London.

Zahran, H. H. 1999. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 63: 968-989