شناسایی باکتری‌های *Thiobacillus thioparus* و *Thiobacillus novellus* در خاک‌های کرمانشاه از طریق ژن rRNA

احمدوند، اسما[۱]*، علی، بهشتی آل آقا[۲]*، دانیال، کهریزی[۳]*، هدا، بشیری[۴] و رزا، فخری[۵]
۱، ۲، ۳، ۴، و ۵ به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار گروه علوم و مهندسی خاک، دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشجوی دکترای زراعت و اصلاح نباتات و کارشناس گروه علوم و مهندسی خاک، دانشگاه رازی کرمانشاه

چکیده

باکتری *Thiobacillus* نقش مهمی در چرخه‌ی گوگرد، اصلاح خاک‌های آهکی و افزایش قابلیت فراهمی برخی از عناصر دارد. هدف از این پژوهش شناسایی باکتری‌های *T. thioparus* و *T . novellus* در خاک‌های کشاورزی شهرستان کرمانشاه بود. از سه منطقه در عمق ۰ تا ۳۰ سانتی متر سه نمونه در سه تکرار برداشت شد. کشت باکتری با استفاده از محیط کشت پستگیت اصلاح شده انجام شد، سپس استخراج DNA با کیت Analytik Jena آلمان انجام و به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[۱] باکتری‌های موردنظر شناسایی شدند. نتایج حاکی از وجود باکتری *T. thioparus* در مناطق مطالعاتی دو و سه و وجود باکتری *T. novellus* در منطقه مطالعاتی سه بود. اما منطقه یک فاقد هر دو گونه مورد بررسی بود.

واژه های کلیدی: *T. thioparus*، *T. novellus* ، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

مقدمه

میکروارگانیسم‌ها به عنوان جزء زنده معمولاً کمتر از یک درصد حجم خاک را به خود اختصاص می‌دهند با این حال تعداد و تأثیر آن‌ها بسیار زیاد است (اصغرزاده، ۲۰۰۶). باکتری‌ها یکی از مهم‌ترین اجزاء تشکیل دهنده میکروارگانیسم‌های خاک هستند که قادر به بهبود رشد گیاهان از طریق تأمین مواد مغذی گیاهی، ترشح هورمون‌های رشد گیاهی و اسیدهای آلی می‌باشد و سبب افزایش باروری خاک و حفظ سلامت محیط زیست می‌شوند(Esitken et al, 2010). یکی از مؤثرترین باکتری‌ها در چرخه‌ی گوگرد *Thiobacillus* هستند. این باکتری‌ها با اکسایش گوگرد در خاک‌های آهکی و قلیایی می‌توانند در کاهش pH، اصلاح خاک، تامین سولفات مورد نیاز گیاه، انحلال برخی از عناصر غذایی و افزایش قابلیت جذب آن‌ها مؤثر واقع شوند (Shabani et al, 2011). اکسیداسیون گوگرد و تبدیل آن به سولفات به دلیل نقش گوگرد در تشکیل پروتئین، روغن و بسیاری از ویتامین‌ها در گیاه اهمیت دارد (Ivan, 2007).

در ایران به دلیل وجود خاک‌های آهکی (Banaee et al, 2004) و pH بالا، عناصر غذایی (فسفر، آهن، روی، مس و منگنز) دارای حلالیت کمی بوده و جذب آن‌ها توسط گیاهان مشکل است (ملکوتی و همایی، ۱۹۹۴). یک راه کار موثر برای بهبود تغذیه گیاهان استفاده از مواد اسیدی مانند اسید سولفوریک و گوگرد عنصری است. اینگونه pH خاک حداقل در مقیاس کوچک کاهش و قابلیت جذب عناصر غذایی افزایش می‌یابد (Besharati, 2016). از آنجایی که بخش اعظم اکسیداسیون گوگرد توسط باکتری‌های *Thiobacillus* انجام می‌گیرد وجود این باکتری و فراهم کردن شرایط بهتر برای رشد آن‌ها به افزایش بازدهی اکسیداسیون و اصلاح خاک‌های آهکی کمک می‌کند (Tabatabai, 1994). برای شناسایی این باکتری از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز که روشی دقیق و قوی در تکثیر ردیف منتخبی از مولکول یک ژنوم می باشد استفاده می‌شود. در این فرآیند که تقلیدی از همانندسازی DNA است، الیگونوکلئوتیدهای مصنوعی که مکمل ردیف شناخته شده‌ی دو انتهای قطعه مورد نظر DNA هستند به عنوان آغازگر مورد استفاده قرار می گیرند تا واکنش آنزیمی همانندسازی DNA در درون لوله آزمایش امکان پذیر شود (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶).

[1] Polymerase Chain Reaction

در پژوهشی اکسیداسیون تیوسولفات بوسیله‌ی *T. thioparus* , *Halothiobacillus* و *T.* neapolitanus جدا شده از صنعت پتروشیمی مورد بررسی قرار گرفت. ترکیبات کاهنده گوگرد ترکیبات بدبویی هستند که از صنایع مختلف تولید می‌شوند و *T. thioparus* توانایی اکسیداسیون این ترکیبات را دارد و بطور معمول از این باکتری‌ها برای تصفیه زیستی این ترکیبات استفاده می‌کنند (Valdebenito et al, 2011). در این مطالعه دو نژاد اکسیدکننده تیوسولفات از یک صنعت پتروشیمی در پالایشگاه نفتی در شیلی به دست آمد که با استفاده از تجزیه‌ی مولکولی بوسیله‌ی RT-PCR با استفاده از پرایمرهای *Thiobacillus* بررسی شد. آن‌ها بر اساس توالی یابی 16rsDNA نتیجه گرفتند که یکی از سویه‌های جدا شده متعلق به *Thiobacillus* است.

در پژوهشی دیگر برای شناسایی و جدا کردن باکتری‌های حل کننده‌ی سنگ‌های فسفات تیلمسی در خاک‌های کشاورزی مختلف مشخص شد که باکتری‌های *T. thioparus*، *T. ferrooxidans* وتیوباسیلوس *T. thiooxidans*. می‌توانند فسفر موجود در آپاتیت را به وسیله اسید سولفوریک حاصل از اکسید شدن گوگرد، حل کنند. نتایج بدست آمده از PCR نشان داد که این خاک‌ها از لحاظ تیوباسیلوس‌ها فقیر هستند و مقدار اسید تولید شده و سنگ فسفات حل شده با رشد این باکترها ارتباط مستقیم دارد (Babana et al, 2010). این پژوهش با توجه به اهمیت وجود باکتری‌های تیوباسیلوس که نقش اصلاح کنندگی و افزایش باروری خاک به ویژه در خاک‌های آهکی را دارند با هدف شناسایی باکتری‌های *T. thioparus* و *T. novellus* در خاک‌های کشاورزی شهرستان کرمانشاه انجام شد.

مواد و روش‌ها

منطقه مطالعاتی

این آزمایش در سال ۱۳۹۵ و در سه منطقه از خاک‌های کشاورزی شهرستان کرمانشاه صورت گرفت. منطقه اول در ´۴۴ °۳۴ عرض شمالی و ´۹۸ °۴۶ طول شرقی، منطقه دوم در ´۵۰ °۳۴ عرض شمالی و ´۳ °۴۷ طول شرقی، و منطقه سوم در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه رازی کرمانشاه با ´۱۹ °۳۴ عرض شمالی و ´۶ °۴۷ طول شرقی بود. نمونه‌ها در سه تکرار برداشت شد. در نهایت از نمونه‌های ترکیبی جهت آنالیزهای آزمایشگاهی و شناسایی باکتری‌ها بهره گرفته شد. برخی از خصوصیات اولیه خاک‌های مورد آزمایش در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک‌های مورد مطالعه

	مواد آلی (٪)	کربنات کلسیم (٪)	pH	EC(دسی زیمنس بر متر)	بافت خاک
خاک منطقه اول	۱/۸۳	۲۷	۷/۸	۰/۶	لوم
خاک منطقه دوم	۱/۴۶	۲۳	۷/۶	۰/۵	لوم
خاک منطقه سوم	۲/۲۲	۱۷	۷/۳	۰/۴	لوم

پس از نمونه‌برداری، نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل شد و مقداری از آن‌ها جهت کشت باکتری در یخچال نگهداری گردید. باقی نمونه‌ها در هوای آزاد سایه خشک شد و از الک۲ میلی متر برای انجام برخی آزمایش‌ها عبور داده شد. مواد آلی با روش والکی- بلاک (Nelson and Sommers, 1996)، کربنات کلسیم به روش (Richards, 1954) و بافت خاک به روش (Gee and Bauder, 1986) اندازه گیری شد.

برای کشت باکتری از محیط کشت پستیگیت اصلاح شده، که یک محیط اختصاصی برای کشت باکتری *Thiobacillus* است استفاده شد. عناصر غذایی مورد نیاز برای تهیه محیط کشت شامل ۵ گرم تیوسولفات سدیم، ۳ گرم سولفات آمونیوم، ۰/۵ گرم سولفات منیزیم، ۰/۲۵ گرم کلرید کلسیم، ۳ گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات، ۱ میلی لیتر سولفات آهن آبدار، ۱۰ میلی لیتر عناصر کم مصرف و ۱۰ میلی لیتر معرف برموتیمول بلو است. عناصر کم مصرف شامل ۵ گرم EDTA بدون سدیم، ۲/۲ گرم سولفات روی آبدار، ۰/۵گرم کلرومنگنز، ۰/۱۶ گرم سولفات مس، ۰/۱۶ گرم کلرید کبالت، ۰/۱۱ گرم آمونیوم هپتا مولیبدات و ۰/۵۴ گرم کلرید کلسیم است. پس از تهیه محلول محیط کشت با استفاده از هیدروکسید پتاسیم دو نرمال pH

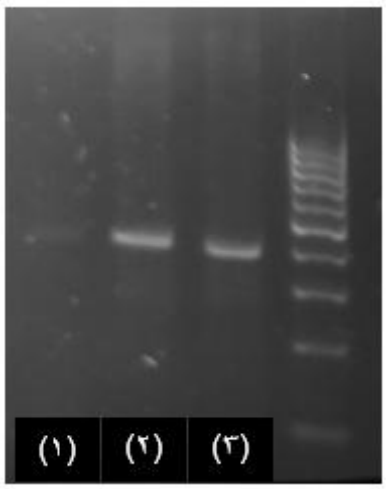
محیط روی ۷ تنظیم شد سپس ۴۰ میلی لیتر از محلول داخل ارلن مایر توزیع شد و در نهایت به آن یک گرم خاک اضافه شده و به مدت سه هفته در تکان دهنده با دور ۱۲۰ قرار داده شد. پس از تغییر رنگ محیط کشت از سبز به زرد که نشان دهنده رشد باکتری است استخراج DNA نمونه‌ها با استفاده از کیت Analytik Jena آلمان و در آزمایشگاه شرکت ایده سازان زیستی زاگرس واقع در مرکز رشد واحدهای فناوری دانشگاه رازی انجام شد. طبق دستورالعمل استخراج این کیت، مقدار یک میلی لیتر از محیط کشت برداشته و محلول‌های تعیین شده در پروتکل را به آن اضافه کرده و در نهایت DNA استخراج شد. برای این پژوهش پرایمرهای مورد نظر از مقالات گرفته شد (جدول ۲) و پس از سنتز، PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شد. محصول PCR به ژل آگارز منتقل و الکتروفورز گردید و توسط دستگاه ژل داک عکسبرداری صورت گرفت.

جدول ۲- توالی پرایمر باکتری‌های مورد مطالعه

باکتری		توالی پرایمر
T. thioparus	Forward	5-GAAACGGTACGCTCTAACATAGC-3
	Reverse	5-AGCACCTGTGTTCCGGTTCT-3
T . novellus	Forward	5-TTATCGCCATTGGATGAACCCG-3
	Reverse	5-AGTATCAAGGGCAGTTCTGGA-3

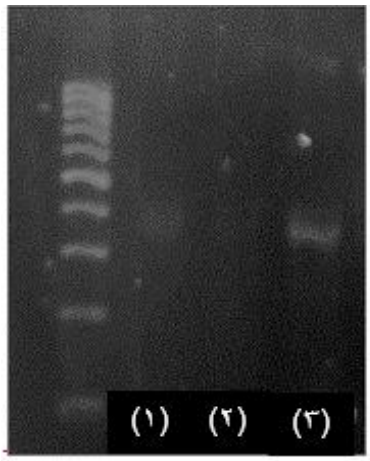
نتایج و بحث

نتایج حاصل از PCR نشان داد گونه *T. novellus* با توجه به باندهای ایجاد شده (شکل ۱) در خاک‌های منطقه دو و سه وجود دارد اما در خاک منطقه یک این باکتری یافت نمی‌شود.



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR ژن rRNA برای گونه *T. novellus* . باند ۱: منطقه یک، باند ۲: منصقه دو و باند ۳: منطقه سه بر روی ژل آگارز ۱ ٪

همچنین با توجه به محصول PCR ژن rRNA گونه *T. thioparus* (شکل ۲) مشخص گردید که فقط در خاک منطقه سه این گونه وجود دارد.



شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR ژن rRNA برای *T. thioparus*. باند ۱: منطقه یک، باند ۲: منصقه دو و باند ۳: منطقه سه بر روی ژل آگارز ۱ ٪

با توجه به اینکه *Thiobacillus* یک باکتری مفید برای خاک‌ها به ویژه برای اصلاح خاک‌های آهکی تلقی می‌شود و با توجه به پژوهش صورت گرفته و اثبات نبود این باکتری در برخی خاک‌های مورد مطالعه پیشنهاد می‌شود این باکتری به صورت تلقیح همراه با کود گوگردی به خاک اضافه شود تا باروری و حاصلخیزی خاک افزایش یابد.

منابع

اصغرزاده، ا. ۲۰۰۶. تکنیک‌های آزمایشگاهی بیولوژی خاک. انتشارات دانشگاه تبریز، ۵۲۲ ص.

ملکوتی، م، ج و م، همایی. ۱۹۹۴. حاصلخیزی خاک در مناطق خشک. انتشارات دانشگاه تربیت مدرس، ۴۹۴ ص.

نقوی، م، ر.، ب، قره یاضی و ق، حسینی سالکده. ۱۳۸۶. نشانگرهای مولکولی. چاپ دوم، انتشارات دانشگاه تهران، ۳۳۳ ص.

Babana, A, H., F, Samake., K, Maiga. 2011. characterization of soma agricultural soils: presence and activity of Tilemsi Rock Phosphate-Solubilizing thiobacilli, British Microbiology Research Journal, 1(1): 1-9.

Banaee M.H., Moemeni A., Baybordi M. and Malakouti, M.J. 2004. Soils of Iran. Soil and Water Research Institute, 481p.

Besharati H. 2016. Effects of sulfur application and *Thiobacillus* inoculation on soil nutrient availability, wheat yield and plant nutrient concentration in calcareous soils with different calcium carbonate content. Journal of Plant Nutrition (In press).

Esitken, A., Yildiz, H. E., Ercisli, S., Figen Donmez, M., Turan, M., Gunes, A., 2010. Effects of plnt growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient content contents of organically grown strawberry. Sciential Horticultural, 124:62-66.

Ivan J. 2007. Micronutrient innovation. Potato Grower Magazine. Harris Publishing Inc. USA, 1:58-61Gee, G. W., and Bauder J. W. 1986. Particle size analysis. In: A. Klute. (Ed), Methods of soil analysis, part 1, physical and mineralogical methods. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA. pp 383-411.

Nelson, D. W., and Sommers, L. E. 1996. Total carbone, organic carbone, and organic matter. In: Sparks, D. L., (Eds.), Methods of soil analysis, Part 3- chemical methods. Agronomy Monograph, vol. 9. ASA and SSSA, Madison, WI, pp. 961-1010.

Shabani, G., Ardakani, M, R., Chaichi, M, R., Feiedel, J, K., Khavazi, K., Eshghizadeh, H,R. 2011. Effect of Different Fertilizing Systems on Seed Yield and Phosphorus Uptake in Annual Medics under Dryland Farming Conditions. Notulae Botanica Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 39(1):191-197.

Tabatabai, M,A. 1994. "Sulfur oxidation and reduction in soils. In Weaver", et al. (ed). Methods of Soil Analysis. Part 2. Microbiological and Biochemical Properties. SSSA Inc.

Valdebenito-Rolack, E, H., , Araya T, C., , Abarzua L, E ., Ruiz-Tagle N, M ., , Sossa K, E., Aroca G, E ., , Urrutia, H, E. 2011. National Fund for Science and Tecnology, 1050318

Walkley, A., and Black, I. A. 1934. An examination of Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. Soil Science 37: 29-37.

.

Identification of *Thiobacillus thioparus* , *Thiobacillus novellus* bacteria in Kermanshah Province by rRNA gene.

A. Ahmadvand[1]., A. Beheshti Ale Agha[2]., D. Kahrizi[3]., H. Bashiri[4] and R. fakhri[5]
1-MSc student, , Razi University,
2- assistant professor of department of soil science, , Razi University,
3-associate professor of department of Agronomy and plant breebina , , Razi University,
4- Ph.D. student and expert of department of soil science, , Razi University,
5- college of agriculture, Razi University, Kermanshah.

Abstract

Thiobacillus bacteria play an important role in sulfur cycle and calcic soil amendment, they also increase availability of some nutrient elements. The purpose of this study was detecting the *T. thioparus* and *T. novellus* bacteria in farm soil in Kermanshah Province. 3 samples in 3 replications were used in depth of 0 -30 cm from 3 area. The culture of bacteria was done using modified postgete medium, then the DNA was extracted with the Analytik Jena kit in Germany and the bacteria were identified by polymerase chain reaction. Results showed the existence of *T. thioparus* bacteria in study area No. 2 and 3 and *T. novellus* in No.3 studied area. However the No. 1 study area had not shown any of both species.

Keywords : : *T. thioparus, T. novellus, PCR*