

ارزیابی تحمل باکتری‌های سینوریزوبیوم ملیوتی (*Sinorhizobium meliloti*) همزیست با ریشه یونجه نسبت به فلزات سنگین، آنتی‌بیوتیک و شوری در استان خراسان رضوی

آزاده حداد سبزواری^۱، محبوبه نخعی مقدم^{۲*}، محمدرضا ذوالفقاری^۳

۱. کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.

۲. استادیار میکروب‌شناسی، گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.

۳. استادیار، گروه میکروب‌شناسی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۱/۲۳؛ تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۸/۲۸

چکیده

ریزوبیوم‌ها شناخته‌شده‌ترین گروه از باکتری‌های همزیست با ریشه گیاهان لگومینه هستند که نیتروژن را تثبیت می‌کنند. این باکتری‌ها در خاک با تنش‌های مختلفی که بر رشد، ایجاد همزیستی و توانایی تثبیت نیتروژن تأثیر می‌گذارند، روبه‌رو هستند. این تحقیق با هدف ارزیابی تحمل ۲۳ جدایه سینوریزوبیوم همزیست با ریشه یونجه در شهرستان‌های مشهد و سبزواری نسبت به فلزات سنگین، آنتی‌بیوتیک‌ها و غلظت‌های متفاوت شوری انجام شد. جدایه‌ها از نظر مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، تتراسیکلین، ونکومایسین، نالیدیکسیک اسید و استرپتومایسین با روش انتشار در آگار، مقاومت نسبت به فلزات سنگین شامل مس، کادمیوم، روی، منگنز و همچنین غلظت‌های مختلف کلرید سدیم شامل ۰/۵، ۱، ۲، ۳ و ۴٪ در محیط جامد مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج نشان داد که ۱۰٪ جدایه‌ها نسبت به پنی‌سیلین مقاوم و نسبت به تتراسیکلین حساس بودند. الگوی مقاومت نسبت به ونکومایسین، نالیدیکسیک اسید و استرپتومایسین متفاوت بود. جدایه‌ها در غلظت‌های ۰/۵ میلی مول مس، ۰/۶۵ میلی مول کادمیوم، ۰/۱۲۵ میلی مول روی و غلظت‌های ۱/۵ میلی مول منگنز رشد کردند. نتایج از نظر تحمل غلظت‌های مختلف شوری نشان داد که تمامی جدایه‌ها در غلظت‌های پایین کلرید سدیم توانایی رشد داشتند و تنها ۷ جدایه توانایی رشد در غلظت‌های بالا را دارا بودند.

واژه‌های کلیدی: ریزوبیوم، همزیستی، بقولات، تنش، کلرید سدیم.

مقدمه

انجام می‌گیرد (Denarie et al., 1996). کارایی این همزیستی تحت تأثیر شرایط محیطی خاک قرار می‌گیرد. فلزات سنگین درون خاک، آنتی‌بیوتیک‌های مترشحه توسط باکتری‌های درون خاک و میزان شوری خاک از این عوامل محیطی هستند.

فلزات سنگین گروهی از فلزات با چگالی بالاتر از ۵ گرم بر سانتی‌متر مکعب نظیر کادمیوم (Cd)، کروم (Cr)، جیوه (Hg)، سرب (Pb)، آلومینیوم (Al)، روی (Zn) و ... هستند. این عناصر مهم‌ترین آلاینده‌های زیست‌محیطی هستند. غلظت این عناصر در خاک بسته به منشأ مواد

یکی از مهم‌ترین فرایندهای چرخه‌های بیوشیمیایی خاک در اکوسیستم‌های کشاورزی، همزیستی باکتری‌های ریزوبیوم با بقولات است (Carrasco et al., 2005). از ویژگی‌های مهم گیاهان خانواده لگوم مانند یونجه (*Medicago sativa*)، توانایی آن‌ها در همزیستی با باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن است. همزیستی اختصاصی بین یک گونه خاص باکتری ریزوبیوم و گونه مشخصی از لگوم با مبادله علائم پیچیده مولکولی آغاز می‌شود و باکتری پس از ورود به داخل ریشه، گره‌هایی ایجاد می‌کند که درون این گره‌ها تثبیت بیولوژیکی نیتروژن

جدایه‌ها به روش کشت خطی از سوسپانسیون فوق روی محیط^۱ (YEMA) انجام شد (Singh et al., 2008). به منظور بررسی کارایی و تأیید همزیستی جدایه‌ها از آزمون آلودگی گیاه^۲ استفاده شد (Truchet et al., 1985).

تعیین مقاومت نسبت به فلزات سنگین

میزان مقاومت جدایه‌های سینوریزوبیوم نسبت به فلزات سنگین شامل مس (Cu)، کادمیوم (Cd)، روی (Zn) و منگنز (Mn) در پنج غلظت مختلف روی محیط YEMA بررسی شد. محلول عناصر سنگین مطابق جدول از ترکیبات $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ، CdCl_2 ، $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ و $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ به عنوان منبع عناصر Cu، Cd، Zn و Mn تهیه و پس از فیلتر و سترون شدن به محیط YEMA اضافه شد. محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های مختلف عناصر سنگین با سوسپانسیون میکروبی معادل 10^8 cfu/ml تلقیح شدند و نتایج از نظر رشد و عدم رشد بعد از ۷۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد بررسی شد (Cevheri et al., 2011).

تعیین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک

سنجش مقاومت جدایه‌های سینوریزوبیوم به آنتی‌بیوتیک بر روی محیط YEMA با روش استاندارد کربای یایر انجام شد (Antoun et al., 1982). دیسک‌های آنتی‌بیوتیک شامل پنی‌سیلین (PG, 30 μg)، استرپتومایسین (S, 30 μg)، ونکومایسین (Va, 30 μg)، تتراسیکلین (T, 30 μg) و نالیدیکسیک اسید (NA, 30 μg) از شرکت MAST (ساخت کشور انگلستان) تهیه شدند. صد میکرو لیتر (10^8 cfu/ml) از سوسپانسیون خالص باکتری‌ها بر روی محیط کشت شد و دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی با فواصل استاندارد بر روی محیط قرار گرفتند. پلیت‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در گرمخانه نگهداری شدند. قطر هاله عدم رشد با خط کش میلی‌متری اندازه‌گیری و نتایج ثبت شد.

تعیین تحمل به شوری

تحمل جدایه‌ها به غلظت‌های مختلف شوری (صفر، ۰/۵، ۱، ۲، ۳ و ۴ درصد کلرید سدیم) روی محیط کشت YEMA تعیین شد. پس از تلقیح محیط کشت، پلیت‌ها در گرمخانه با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد و بعد از گذشت ۷۲ ساعت جدایه‌ها از نظر رشد کلنی مورد بررسی و مقایسه

تشکیل‌دهنده خاک و فعالیت‌های صنعتی انسان تغییر می‌کند (Buremmer et al., 1986). افزایش غلظت برخی از فلزات سنگین نظیر کادمیوم، کروم، مس، نیکل و روی در خاک، تعادل اکوسیستم‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. هرچند میزان سمی این عناصر در خاک به ندرت مشاهده می‌شود، اما فعالیت‌های کشاورزی و صنعتی انسان نظیر استخراج معادن، فاضلاب‌های صنعتی و استفاده از کودهای فسفاته (دارای ناخالصی کادمیوم) منجر به افزایش روزافزون این عناصر در خاک می‌شوند (Hafezi et al., 2010).

توانایی تشکیل گره و تثبیت زیستی نیتروژن تحت تنش‌های مختلف محیطی نظیر گرما، خشکی، شوری و فلزات سنگین کاهش می‌یابد (Balestrasse and Gallego, 2004). گیاه بونجه توانایی بالایی در جذب و نگهداری فلزات سنگین در غلظت‌های مختلف دارد و استفاده از این گیاه به منظور جذب و تصفیه زیستی خاک‌ها از آلودگی کادمیوم نیز مورد مطالعه قرار گرفته است (Gardea-Torresdey et al., 1996). تحقیقات نشان می‌دهد که سینوریزوبیوم (انسیفر) میلیوتی با تولید ترکیبات پلیمری خارج سلولی (EPS) می‌تواند باعث افزایش تحمل این باکتری نسبت به یون مس شود. ترکیبات پلیمری خارج سلولی اتصال یافته به طور سست در سطح باکتری نقش مهم‌تری از EPS محلول و EPS اتصال یافته به طور محکم در تثبیت یون Cu^{2+} دارد (Hou et al., 2013). بنابراین یافتن سوش‌های باکتریایی خاصی که بتوانند در چنین مناطقی منجر به گره‌زایی و رشد بهتر این گیاه شوند مفید خواهند بود. ریزوبیوم‌ها مقاومت متفاوتی به آنتی‌بیوتیک‌ها، شوری و فلزات سنگین دارند. هدف از این مطالعه بررسی اثرات فلزات سنگین، آنتی‌بیوتیک‌ها و شوری بر رشد سینوریزوبیوم‌های بومی جدا شده از ریشه بونجه است.

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتری‌ها

ریشه گیاهان بونجه از بعضی نواحی استان خراسان رضوی مثل اطراف مشهد و سبزوار جمع‌آوری شد. گره‌ها به مدت ۱۰ ثانیه با الکل اتیلیک ۹۶٪ و ۲ دقیقه با محلول هیپوکلریت ۵ درصد ضدعفونی و چندین مرتبه با آب مقطر سترون شسته شدند تا اثر اتانول و هیپوکلریت سدیم از بین برود (Panahpour, 2005). سپس با له کردن گره‌ها، سوسپانسیون یکنواخت از باکتری تهیه شد. خالص شدن

1. Yeast Extract Mannitol Agar

2. Plant infection test

فضای پری پلاسمی سودوموناس^۱ توسط پروتئین های CopA و CopB جمع می شود (Silver and Phung, 1996). یک پلاسمید در حدود ۷۰ کیلو جفت باز که مسئول مقاومت به فلزات در ریزوبیوم است، گزارش شده است (Lakzian et al., 2002). سوری و همکاران (Cevheri et al., 2011) نشان دادند که جدایه های ریزوبیوم به فلزات سنگین مس در غلظت ۰/۵ mmol، کادمیوم ۰/۰۶۵ mmol، روی ۰/۱۲۵ mmol و ۰/۲۵۰ mmol منگنز ۰/۷۵ mmol مقاومت داشتند.

مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها

نتایج سنجش حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه های سینوریزوبیوم نشان داد که همه جدایه ها نسبت به یک یا تعداد بیشتری از آنتی بیوتیک ها مقاومت داشتند (شکل ۱). نتایج این تحقیق نشان داد که ۱۰۰٪ جدایه ها نسبت به پنی سیلین مقاوم و نسبت به تتراسیکلین حساس بودند. میزان مقاومت نسبت به ونکومایسین و نالیدیکسیک اسید و استرپتومایسین به ترتیب برابر با ۷۳/۹۱٪، ۲۶/۰۸٪ و ۲۱/۷۳٪ بود. گزارش شده است که سه عامل آب گریزی، بار الکتریکی و مقدار آنتی بیوتیک در نفوذپذیری پوشش باکتری نسبت به آنتی بیوتیک مؤثرند و ریزوبیوم ها سطح بالایی از مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها را نشان می دهند (Hungria et al., 2001).

می توان گفت سینوریزوبیوم ملیوتی نسبت به بسیاری از آنتی بیوتیک ها مقاوم است و الگوی مهاری همیشه برای جدایه ها یکسان نیست. نتایج پژوهش حاضر نشان داد تمامی سویه های سینوریزوبیوم ملیوتی مقاوم به استرپتومایسین نیستند. حساسیت به نسبت بالا در مقابل استرپتومایسین در این پژوهش تا حدودی با نتایج آنتون و همکاران (Antoun et al., 1982) همخوانی دارد. شش جدایه (۲۶/۸۶٪) حساس و ۱۷ جدایه (۷۳/۹۱٪) نسبت به ونکومایسین مقاوم بودند. در برخی از پژوهش ها مقاومت بالای جدایه های سینوریزوبیوم ملیوتی نسبت به استرپتومایسین و تتراسیکلین نشان داده شده است (Thami-Alami et al., 2010).

تحمل به شوری

همان طور که در جدول ۲ نشان داده شده است، ۱۰۰٪ جدایه ها در محیط حاوی کلرید سدیم با غلظت ۰/۵ و ۱٪

قرار گرفتند. نتایج از نظر رشد باکتری و ایجاد کلنی به صورت ۱⁺ (حساس)، ۲⁺ (نیمه حساس) و ۳⁺ (متحمل) بر اساس افزایش سطح اندازه کلنی گزارش شد (Talebi Badaf et al., 2005). جدایه هایی که در غلظت ۲ درصد نمک قادر به رشد نبودند، در گروه جدایه های حساس به شوری و جدایه هایی که توانسته بودند در غلظت ۴ درصد نمک رشد کنند، در گروه جدایه های مقاوم به شوری قرار گرفتند و جدایه های نیمه حساس حد میانه این دو گروه بودند.

نتایج و بحث

جداسازی باکتری ها

در این تحقیق، ۲۳ باکتری سینوریزوبیوم از گره ریشه گیاهان یونجه جدا شد. باکتری ها از مزارعی در نواحی دلفند، خسروجرده، نامن، باشتن و شاره از توابع سبزوآر، نزل آباد، دهبار و دولت آباد از توابع مشهد جمع آوری شدند.

مقاومت نسبت به فلزات سنگین

نتایج حاصل از میزان مقاومت باکتری های بومی سینوریزوبیوم نسبت به فلزات سنگین نشان داد که تمام جدایه ها به غلظت های ۰/۵ میلی مول CuCl₂، ۰/۰۶۵ میلی مول CdCl₂، غلظت های ۰/۱۲۵ و ۰/۲۵۰ میلی مول ZnSO₄ و ۰/۷۵ و ۱/۵ میلی مول MnSO₄ مقاوم بودند (جدول ۱). در میان عناصر سنگین مورد آزمایش مقاومت جدایه ها نسبت به منگنز و مس بیشتر بود، طوری که تمامی جدایه ها به غلظت ۱/۵ میلی مول منگنز و ۴۷/۸۲٪ جدایه ها نسبت به غلظت یک میلی مول مس مقاوم بودند. در حالی که هیچ کدام از جدایه ها در این غلظت ها (حتی در ۰/۵ mmol) نسبت به روی و کادمیوم مقاوم نبودند. در غلظت ۰/۲۵ میلی مول کادمیوم، ۱۳/۰۴٪ جدایه ها مقاومت نشان دادند، ولی در غلظت های بالاتر قادر به رشد نبودند. با افزایش غلظت فلزات سنگین مقاومت کاهش یافت. به عبارتی غلظت های بالاتر باعث سرکوب رشد باکتری ها شد. تمامی جدایه ها در غلظت های پایین تر فلزات سنگین رشد داشتند. رشد در غلظت های بالاتر فلزات نشان داد که تنها ۳۰/۴۳٪ جدایه ها توانستند در غلظت های بالای مس (۲/۵ mmol) مقاومت داشته باشند. مقاومت به فلز مس می تواند نتیجه مکانیسم های جداسازی و پیوندی یکسری از پلی ساکاریدها یا پروتئین ها باشد که در محل های اتصال هستند. مس در

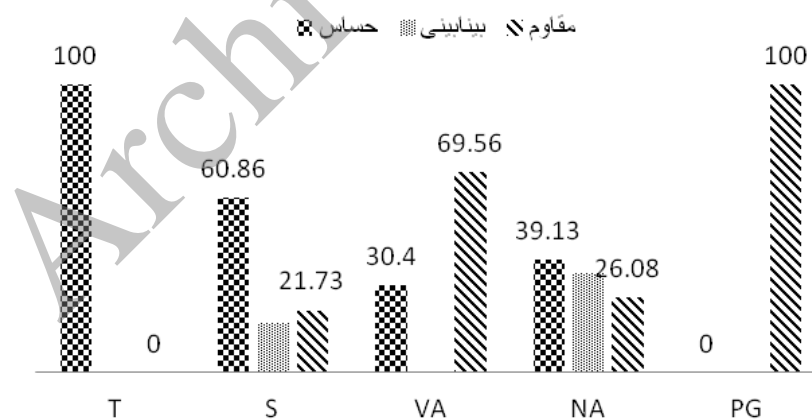
¹- *Pseudomonas*

رشد داشتند. اما با افزایش غلظت نمک رشد کاهش یافت، به طوری که ۸۲/۶۱٪ به غلظت ۲ درصد کلرید سدیم متحمل بودند. جدایه‌هایی که در این غلظت توانایی رشد را نداشتند، در گروه حساس قرار گرفتند. در غلظت ۳٪ و ۴٪ نمک به ترتیب ۴۷/۸۲٪ و ۳۰/۴۳٪ جدایه‌ها مقاوم بودند.

جدول ۱. اثر غلظت‌های متفاوت فلزات سنگین بر رشد جدایه های سینوریزوبیوم میلیوتی

Table 1. Effect of different concentrations of heavy metals on the growth of *Sinorhizobium meliloti* isolates

| فلزات Metals | غلظت (mmol) Concentration (mmol) | میزان مقاومت جدایه ها (%) Isolates resistance (%) |
|-----------------|-------------------------------------|--|
| Cu | 0.5 | 100 |
| | 1.0 | 47.82 |
| | 1.5 | 39.13 |
| | 2.0 | 34.78 |
| | 2.5 | 30.43 |
| Cd | 0.065 | 100 |
| | 0.125 | 69.56 |
| | 0.250 | 13.04 |
| | 0.500 | 0 |
| | 1.0 | 0 |
| Zn | 0.125 | 100 |
| | 0.250 | 100 |
| | 0.500 | 43.47 |
| | 1.0 | 0 |
| | 2.0 | 0 |
| Mn | 0.75 | 100 |
| | 1.5 | 100 |
| | 3.0 | 8.69 |
| | 6.0 | 0 |
| | 12.0 | 0 |



شکل ۱. الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه های سینوریزوبیوم (T: تتراسیکلین، S: استرپتومایسین، VA: ونکومایسین، NA: نالیدیسیک اسید، PG: پنی‌سیلین).

Fig. 1. Antibiotic susceptibility pattern of *Sinorhizobium* isolates (T: Tetracycline, S: Streptomycin, VA: Vancomycin, NA: Nalidixic acid, PG; Penicillin).

جدول ۲. اثر غلظت‌های مختلف کلرید سدیم بر رشد جدایه های سینوریزوبیوم میلیوتی (S1K- S38K: شماره جدایه‌ها) بر اساس افزایش سطح کلنی پس از سه بار تکرار

Table 2. The effect of different concentrations of sodium chloride on growth *Sinorhizobium meliloti* isolates (S1K-S38K: Number of isolates) based on increasing the area of the colony after three repetitions

| جدایه Isolate | Sodium chloride (%) | | | | | | | | | | | | | | | وضعیت Status | | | | |
|------------------|------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|----|
| | شاهد (۰) Cotrol (0) | | | 0.5 | | | 1 | | | 2 | | | 3 | | | | 4 | | | |
| S1K | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 2 ⁺ | 2 ⁺ | 2 ⁺ | 1 ⁺ | 1 ⁺ | 2 ⁺ | SS | |
| S4K | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 2 ⁺ | 2 ⁺ | 3 ⁺ | 1 ⁺ | 2 ⁺ | 1 ⁺ | 1 ⁺ | 1 ⁺ | 1 ⁺ | 1 ⁺ | 1 ⁺ | S | |
| S5K | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 2 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 1 ⁺ | 2 ⁺ | 1 ⁺ | 1 ⁺ | 1 ⁺ | 1 ⁺ | 1 ⁺ | 1 ⁺ | S | |
| S6K | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 2 ⁺ | 3 ⁺ | 2 ⁺ | 2 ⁺ | 1 ⁺ | 1 ⁺ | 1 ⁺ | SS |
| S9K | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 2 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 2 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 1 ⁺ | R |
| S10K | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 2 ⁺ | 3 ⁺ | 1 ⁺ | 1 ⁺ | 2 ⁺ | 1 ⁺ | 1 ⁺ | 1 ⁺ | SS |
| S14K | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 2 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 2 ⁺ | 3 ⁺ | 1 ⁺ | R |
| S15K | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 2 ⁺ | 3 ⁺ | 1 ⁺ | 2 ⁺ | 1 ⁺ | 1 ⁺ | 1 ⁺ | SS |
| S16K | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 2 ⁺ | 1 ⁺ | 2 ⁺ | 1 ⁺ | 2 ⁺ | 1 ⁺ | 1 ⁺ | 1 ⁺ | 1 ⁺ | S |
| S20K | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 2 ⁺ | 3 ⁺ | 2 ⁺ | 1 ⁺ | 3 ⁺ | 1 ⁺ | 1 ⁺ | 1 ⁺ | SS |
| S22K | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 2 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 2 ⁺ | 2 ⁺ | 3 ⁺ | 1 ⁺ | R |
| S23K | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 2 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 2 ⁺ | 2 ⁺ | 3 ⁺ | 1 ⁺ | R |
| S24K | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 2 ⁺ | 3 ⁺ | 2 ⁺ | 3 ⁺ | 2 ⁺ | 2 ⁺ | 2 ⁺ | R |
| S26K | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 2 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 2 ⁺ | 2 ⁺ | 3 ⁺ | 1 ⁺ | R |
| S28K | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 2 ⁺ | 3 ⁺ | 2 ⁺ | 2 ⁺ | 2 ⁺ | 1 ⁺ | 1 ⁺ | SS |
| S29K | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 2 ⁺ | 1 ⁺ | 2 ⁺ | 2 ⁺ | 1 ⁺ | 2 ⁺ | 1 ⁺ | SS |
| S31K | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 2 ⁺ | 2 ⁺ | 2 ⁺ | 3 ⁺ | 1 ⁺ | 1 ⁺ | 1 ⁺ | 1 ⁺ | 1 ⁺ | 1 ⁺ | SS |
| S32K | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 2 ⁺ | 2 ⁺ | 2 ⁺ | 2 ⁺ | 2 ⁺ | 1 ⁺ | 1 ⁺ | 1 ⁺ | 1 ⁺ | 1 ⁺ | SS |
| S34K | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 2 ⁺ | 3 ⁺ | 2 ⁺ | 3 ⁺ | 2 ⁺ | 1 ⁺ | 2 ⁺ | 2 ⁺ | 1 ⁺ | 1 ⁺ | 1 ⁺ | 1 ⁺ | SS |
| S35K | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 2 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 2 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 2 ⁺ | 2 ⁺ | 3 ⁺ | 1 ⁺ | 1 ⁺ | R |
| S36K | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 2 ⁺ | 2 ⁺ | 2 ⁺ | 3 ⁺ | 1 ⁺ | 2 ⁺ | 3 ⁺ | 1 ⁺ | 1 ⁺ | 1 ⁺ | SS |
| S37K | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 2 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 2 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 2 ⁺ | 2 ⁺ | 2 ⁺ | 1 ⁺ | 1 ⁺ | 2 ⁺ | SS |
| S38K | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 2 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 3 ⁺ | 2 ⁺ | 3 ⁺ | 2 ⁺ | 2 ⁺ | 2 ⁺ | 2 ⁺ | 1 ⁺ | 1 ⁺ | 1 ⁺ | SS |

SS: نیمه حساس؛ S: حساس؛ R: مقاوم

SS: Semi-Sensitive; S: Sensitive; R: Resistant

ظرفیت و توان مقاومت به نمک در باکتری مؤثر بوده است. رشد مناسب جدایه‌های سینوریزوبیوم در غلظت‌های زیاد نمک می‌تواند ناشی از تجمع سریع ترکیبات اسیدآمینیه مانند گلوتامات و بتائین در سلول‌های سینوریزوبیومی باشد. برخی پژوهشگران گزارش کرده‌اند که تجمع این ترکیبات در سلول‌های باکتری منجر به تعدیل در پتانسیل اسمزی باکتری می‌شود و باکتری به میزان قابل قبولی به شوری متحمل می‌گردد (Pocard et al., 1997; Leena et al., 2004). لوکاس‌های *asnO* و *ngg* با تحمل تنش‌های شوری، خشکی و پاسخ به تنش‌های اسمزی در ارتباط است (Vriezen et al., 2013). مطالعات ژنتیکی بر پایه تحمل به آنتی‌بیوتیک، فلزات و شوری برای شناسایی ژن‌های درگیر در مقاومت به فلزات سنگین و آنتی‌بیوتیک و ارتباط این ژن‌ها با ژن‌های همزیستی مورد نیاز است. این مطالعات می‌تواند برای بهره‌وری همزیستی و تلقیح در سیستم کشاورزی مناسب باشند.

غلظت زیاد نمک‌های سدیم و کلسیم برای باکتری‌های ریزوبیوم سمی هستند و غلظت‌های بیش از یک درصد نمک (NaCl) از رشد باکتری‌های ریزوبیومی جلوگیری می‌کنند (Xiong and Zhu, 2001; Munns, 2002). ریزوبیوم‌های جدا شده از Fenugreek قادر به رشد متوسط بر روی نمک ۱٪ بودند و در غلظت‌های بالاتر قادر به رشد نبودند و در گروه حساس به نمک قرار گرفتند (Singh et al., 2008). کوکوک و همکاران (Kucuk et al., 2006) نشان دادند که برخی از جدایه‌های ریزوبیوم در غلظت بالای ۴ و ۵٪ نمک قادر به رشد هستند. نتایج برخی از آزمایش‌های دیگر نیز با داده‌های تحقیق حاضر مطابقت داشت (Graham and Parker, 1964; Shamseldin and Werner, 2004; Amarger et al., 1997). این نکته قابل ذکر است که جدایه‌های متحمل به شوری به علت شرایط اقلیمی، آب و هوایی و همچنین شرایط خاک در عرصه‌های مختلف به تدریج مقاومت به نمک در آن‌ها ایجاد شده است و در نتیجه شرایط سخت محیطی در بالا بردن

ریزوبیوم به‌ویژه انواع مقاوم در برابر تنش‌ها می‌تواند در تهیه کودهای زیستی و معرفی آن‌ها به کشاورزان به‌منظور افزایش محصول و منابع سلامت محیط‌زیست مفید واقع شود.

خاک‌های شور ایران و خاک‌های دارای فلزات سنگین نیازمند سویه‌های مقاوم به این ترکیبات برای استفاده در فرایند هم‌زیستی هستند. نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق نشان می‌دهد که شناسایی و جداسازی سویه‌های بومی

منابع

- Amarger, N., Macheret, V., Laguerre, G., 1997. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. International Journal of Systematic Bacteriology. 47, 996-1006.
- Antoun, H., Bordeleau, L.M., Prevost, D., 1982. Strain identification in *Rhizobium meliloti* using the antibiotic disk susceptibility test. Plant and Soil. 66, 45-50.
- Balestrasse, K.B., Gallego, S.M., 2004. Cadmium induced senescence in nodules of soybean (*Glycine max* L.) plant. Plant and Soil. 269, 373- 381.
- Buremmer, G.W., Gerth, J., Herms, U., 1986. Heavy metal species, mobility and availability in soils. Journal of Plant Nutrition and Soil Science. 49, 382-398 .
- Carrasco, J.A., Armario, P., Pajuelo, E., Burgos, A., Cavides, M.A., Lopez, R., Chamber, M.A., Palomares, A.J., 2005. Isolation and characterization of symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Aznalcollar pyrite mine. Soil Biology and Biochemistry. 37, 1131-1140 .
- Cevheri, C., Küçük, C.D., Çetin, E., 2011. Fungicide, antibiotic, heavy metal resistance and salt tolerance of root nodule isolates from *Vicia palaestina*. African Journal of Biotechnology. 10, 2423-2429 .
- Denarie, J., F. Debelle, Prome, J.C., 1996. *Rhizobium* lipo-chitoooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. Annual Review of Biochemistry. 65, 503-535.
- Gardea- Torresdey, J.L., Tiemann, K.J., Gamez, G., Dokken, K., 1999. Effects of chemical competition for multi-metal binding by *Medicago sativa_alfalfa*. Journal of Hazardous Materials. 69, 41-51.
- Graham, P.H., Parker, C.A., 1964. Diagnostic features in the characterization of the root nodule bacteria of legumes. Plant and Soil. 20, 383-396.
- Hafezi, M., Shoushtari, A.N., Asrar, Z., Torkzadeh, M., 2010. Effects of toxic concentrations of cadmium on nodulation and nitrogen fixation of different strains of *S. meliloti* in *M. sativa*. Iranian Journal of Biology. 4, 626-635. [In Persian with English Summar].
- Hou, W., Ma, Z., Sun, L., Han, M., Lu, J., Li, Z., Abdalla Mohamad, O., Wei, O., 2013. Extracellular polymeric substances from copper-tolerance *Sinorhizobium meliloti* immobilize Cu^{2+} . Journal of Hazardous Materials. 261, 614-620.
- Hungria, M., de O'Cheuerie, L.M., Coca, R.G., Megias, M., 2001. Preliminary characterization of fast growing rhizobial isolated from soybean nodules in Brazil. Soil Biology and Biochemistry. 33, 1349-1361.
- Kucuk, C., Kivanc, M., Kinaci, E., 2006. Characterization of *Rhizobium* sp. isolated from Bean. Turkish Journal of Biology. 30, 127-132.
- Lakzian, A, Murphy, P., Turner, A., Beynon, V.L, Giller, K.E., 2002. *Rhizobium leguminosarum* bv. vicia populations in soils with increasing heavy metal contamination: abundance, plasmid profiles, diversity and metal tolerance. Soil Biology and Biochemistry. 34, 519-529.
- Leena, A.R., Saijets, S., Jokinen, K., Lindstrom, K., 2004. Evaluation of the roles of two compatible solutes, glycine betaine and trehalose, for the *Acacia senegal*-*Sinorhizobium* symbiosis exposed to drought stress. Plant and Soil. 260, 237-251 .
- Munns, R., 2002. Comparative physiology of salt and water stress. Plant Cell and Environment. 25, 239-250.
- Panahpour, H., 2007. Effects of different climatic *Sinorhizobium meliloti* sp. on N fixation and forage yield of 3 alfalfa

- (*Medicago sativa* L.) cultivars. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research. 15, 243-252. [In Persian with English Summary].
- Pocard, J., Vincent, N., Boncompagni, E., Smith, L.T., Poggi, M.C., Rudulier, D.L., 1997. Molecular characterization of the bet genes encoding glycine betaine synthesis in *Sinorhizobium meliloti* 102F34. Microbiolology. 143, 1369-1379.
- Shamseldin, A., Werner, D., 2004. Selection of competitive strains of Rhizobium nodulating Phaseolus vulgaris and adapted to environmental conditions in Egypt, using the gus-reporter gene technique. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 20, 377-382.
- Silver, S., Phung, L.T., 1996. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. Annual Review of Microbiology. 50, 753-789.
- Singh, B., Kaur, R., Singh, K., 2008. Characterization of Rhizobium strain isolated from the roots of *Trigonella foenumgraecum* (Fenugreek). African Journal of Biotechnology. 7, 3671-3676.
- Talebi Badaf, M., Bahar, M., Saeedi, Gh, Mohammadi, S. A., 2009. Genetic diversity of native Rhizobium population coexists with three clover species using rep-PCR fingerprinting technique. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources. 13, 726-717. [In Persian with English Summary].
- Thami-Alami, I., Elboutahiri, N., Udupa, S.M., 2010. Variability in natural populations of *Sinorhizobium meliloti* in Morocco, Options Mediterraneennes. 92, 265-269 .
- Truchet, G., Debelle, F., Vasse, J., Terzaghi, B., Generone, A.M., Rosenberg, C., Batut, J., Mallet, F., Denarie, J., 1985. Identification of Rhizobium meliloti pSYM 2011 region controlling the host specificity of root hair curling and nodulation. Journal of Bacteriology. 164, 1200-1210.
- Vriezen, J.A., de Bruijn, F.J., Nüsslein, K., 2013. Identification and characterization of a NaCl-responsive genetic locus involved in survival during desiccation in *Sinorhizobium meliloti*. Applied and Environmental Microbiology. 79(18), 5693-5700.
- Xiong, L., Zhu, J.K., 2001. Abiotic stress signal transduction in plants: Molecular and genetic perspectives. Physiologia Plantarum. 112, 152-166.

Archive