تحقیقات آب و خاک ایران،مجله علوم کشاورزی،دوره۴۴،شماره۱،بهار۱۳۹۲،ص ۸۰-۶۹

تغییرات پروفیل پلاسمیدی چندسویهٔ بومی سودوموناس فلورسنس تحت تأثیر مقادیر مختلف عناصر روی و کادمیوم

حسینعلی علیخانی[۱*]، پویان شهیدی صادقی[۲]، باقر یخچالی[۳]، هوشنگ علیزاده[۴]

۱. دانشیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
۲. دانشجوی کارشناسی ارشد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
۳. دانشیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری
۴. استادیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۸/۱۲ ـ تاریخ تصویب: ۱۳۹۱/۱۱/۲۹)

چکیده

مقاومت گونه‌های مختلف باکتری جنس سودوموناس در برابر آلودگی فلزات سنگین متفاوت است. از آنجا که بین مقاومت به فلزات سنگین و پلاسمیدهای موجود در باکتری‌ها رابطه وجود دارد، در این مطالعه پروفیل پلاسمیدی جدایه‌های ریزوباکتری محرک رشد گیاه Pseudomonas flouroscens در معرض مقادیر مختلف کادمیوم و روی مطالعه و بررسی شد. باکتری‌های مورد استفاده قبلاً از فراریش گیاه سویا جدا شده بودند. جدایه‌های مذکور خالص‌سازی و با آزمون‌های بیوشیمیایی و زیستی شناسایی شدند. سپس برای تعیین میزان مقاومت این سویه‌ها از غلظت‌های مختلف عناصر روی و کادمیوم در محیط کشت جامد H.E.P.E.S و M.E.S استفاده شد. براساس میزان رشد در حضور فلزات روی و کادمیوم، سویه‌ها به چهار گروه دسته‌بندی شدند. سپس دو سویه از هر گروه مقاومتی به مدت دو ماه در معرض غلظت‌های مختلف آلاینده‌های روی و کادمیوم قرار گرفت. پس از طی مدت گرماگذاری، سویه‌ها بازکشت شدند و از کشت‌های حاصل، با استفاده از روش لیز قلیایی، پلاسمید استخراج و پروفیل پلاسمیدی تهیه شد. بررسی‌ها نشان داد اثرات سمی کادمیوم حتی در غلظت کمتر از روی شدیدتر است و در تراکم بالای کادمیوم همهٔ سویه‌ها پلاسمید از دست می‌دهند. همچنین سه سویه دارای مقاومت چندگانه[۱] بودند.

کلیدواژگان

پلاسمید، روی، سودوموناس فلورسنس، کادمیوم، مقاومت به فلز سنگین.

* نویسنده مسئول : halikhan@ut.ac.ir

1. Multiple Resistance

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

آلودگی محیط زیست و افزایش روند تخریب اکوسیستم‌های طبیعی، از جمله خاک، ناشی از رفتار نامعقول انسان با محیط زیست و استفادهٔ نامناسب از منابع پایه است. توسعهٔ مصرف نهاده‌های کشاورزی مشکلات و پیامدهای زیست‌محیطی متعددی را به‌وجود آورده است (Sposito, 1989; Erfanmanesh and Afioni, 2000). امروزه یکی از مسائل مهم زیست‌محیطی آلوده‌شدن خاک‌های کشاورزی به فلزات سنگین، از جمله کادمیوم و روی، است. ورود این آلاینده‌ها به خاک سبب حذف تدریجی بسیاری از موجودات مفید این زیستگاه شده است (Alloway, 1990).

کادمیوم از فلزات سنگین مهم آلایندهٔ خاک به‌شمار می‌رود که از منابع متعددی، از جمله صنایع ذوب فلزات، کارکرد خودروها، استخراج معادن، مصرف کودهای شیمیایی فسفره، و پسماندهای صنعتی وارد خاک می‌شود (Mordvert and Osborn, 1982; Mulla et al, 1980; Tiller et al, 1994). مصرف بی‌رویهٔ کودهای شیمیایی طی دهه‌های اخیر موجب تجمع کادمیوم در خاک‌های زراعی و ایجاد تأثیرات سوء آن بر جامعهٔ زیستی خاک شده است (Soheili 1997; Williams and David, 1973 and 1976; Smidle and Van Luit, 1993). همچنین افزایش غلظت عنصر روی در برخی خاک‌ها، به‌دلیل استفاده از پسماندهای صنایع و دیگر عوامل آلوده‌کننده، باعث پدیدآمدن مشکلاتی در این خاک‌ها شده است (Fergusson, 1990; Kabata – Pendias and Pendias, 1994; McGrath, 1994; Wolt, 1994).

گسترش علوم و فناوری زیستی استفاده از حداکثر کارایی باکتری‌های مفید خاکزی را امکان‌پذیر کرده است (Hayat et al, 2010). روش‌های مهندسی ژنتیک در جهت تولید باکتری‌های مقاوم به فلزات سنگین، نظیر کادمیوم و روی، در حال حاضر دشوار و پرهزینه است. بنابراین، شناسایی و جمع‌آوری باکتری‌های بومی مقاوم به این فلزات و در عین حال دارای خصوصیات محرک رشد گیاه می‌تواند یکی از روش‌های پالایش خاک‌های آلوده به فلزات سنگین جهت توسعهٔ اراضی زیر کشت محصولات کشاورزی به‌شمار آید (Alavi and Ahoonmanesh, 1997).

یکی از ریزموجودات خاکزی باکتری سودوموناس فلورسنس است. سودوموناس فلورسنس نوعی باکتری آزادزی با توانایی تولید مواد محرک رشد گیاه است که موجب تسریع رشد گیاه و بهبود کمیت و کیفیت محصولات گیاهی می‌شود (Aliasgharzade, 1997; Elliott and Lynch, 1984; Moenne-Loccoz et al, 1998). این باکتری‌ها به محیطی متعادل، از نظر عناصر پرمصرف و کم‌مصرف و دیگر عوامل محیطی مانند بافت و پتانسیل اکسیداسیون و احیا و اسیدیته و هدایت الکتریکی، نیاز دارند (Duffy and Défago, 1999; Rainey, 1999). با استفاده از کودهای شیمیایی و سموم دفع آفات نباتی و غیره این تعادل محیطی دستخوش تغییر می‌شود و ناچار این باکتری‌ها، در اثر به‌هم‌خوردن تعادل محیطی، از بین می‌روند یا با مخاطراتی روبه‌رو می‌شوند و در نهایت از کارایی بهینهٔ آن‌ها کاسته می‌شود (Baath, 1989; Fergusson, 1990; McGrath, 1994; Witter, 1992). مطالعات نشان داده یکی از واکنش‌های باکتری‌ها به شرایط نامساعد محیطی تغییرات پلاسمیدی آن‌هاست و عوامل مختلف، به‌ویژه تنش‌های محیطی و از جمله تنش فلزات سنگین، می‌تواند وضعیت پروفیل پلاسمیدی باکتری‌ها و صفات آن‌ها را تغییر دهد (Alloway, 1990).

در این پژوهش تنوع پلاسمیدی جدایه‌های باکتری سودوموناس فلورسنس در حضور غلظت‌های مختلف روی و کادمیوم و تغییرات پروفیل پلاسمیدی این جدایه‌ها تحت تأثیر غلظت‌های مختلف روی و کادمیوم بررسی شد.

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش‌ها

جداسازی سودوموناس فلورسنس

در این تحقیق از صد ایزولهٔ سودوموناس کلکسیون میکروبی گروه مهندسی علوم خاک دانشکدهٔ مهندسی و فناوری پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران استفاده شد. این ایزوله‌ها طی تحقیقات قبلی از فرایشهٔ گیاه سویا جدا شده بودند. برای غربالگری و انتخاب باکتری‌های سودوموناس فلورسنس از بین جدایه‌های مذکور از محیط کشت جامد S_1 (۱۰ گرم ساکاروز، ۱۰ میلی‌لیتر گلیسرول، ۵ گرم کازآمینواسید، ۱/۲ گرم sodium lauroyl sarcosine (SLS)، ۱ گرم $NaHCO_3$، ۱ گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۲/۵ گرم K_2HPO_4، ۲۰ میلی‌گرم تری متوپریم، ۱۶ گرم آگار، ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر در pH ۷/۵) استفاده شد (Gould et al, 1985). برای تفکیک جدایهٔ باکتری از بروز پدیدهٔ فلورسنت و برای شناسایی از آزمون‌های میکروبیولوژیکی و بیوشیمیایی، از قبیل رنگ‌آمیزی گرم، رشد در دمای ۴ و ۴۱ درجهٔ سانتی‌گراد، واکنش اکسیداز، کاتالاز، مصرف گلوکز (O/F)، هیدرولیز ژلاتین، و هیدرولیز نشاسته استفاده شد (Bergey's manual of determinative bacteriology).

تیمار آلودگی در محیط کشت جامد

پایهٔ اصلی محیط کشت مورد استفاده محیط کشت نوترینت آگار (Nutrient Agar) بود. اما برای جلوگیری از تشکیل احتمالی کمپلکس‌های پایدار بین عناصر روی و کادمیوم و مواد آلی موجود در محیط کشت و بروز خطا از نظر میزان غلظت عناصر (Bopp and Ehrlich, 1988) از بافرهای H.E.P.E.S و M.E.S با مقادیر ۱۳۰۰ و ۱۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر محیط کشت نوترینت آگار استفاده (Angle, 1992) و محیط کشت
H.M (حاوی بافرهای H.E.P.E.S و M.E.S) ساخته شد.

آزمون مقاومت‌سنجی

ابتدا محیط کشت H.M حاوی مقادیر صفر (شاهد منفی) ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر عنصر کادمیوم و مقادیر صفر (شاهد منفی) ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر عنصر روی به‌طور جداگانه در ظروف ارلن یک لیتری تهیه و در دمای $121^{\circ}c$ به‌مدت ۳۰ دقیقه استریل و در دمای $45^{\circ}c$ در ظروف پتری استریل توزیع شد. در مرحلهٔ بعد هر ظرف پتری حاوی محیط کشت H.M به چهار قسمت مساوی تقسیم و هر سویهٔ مورد آزمون به روش قطره‌گذاری (Drop plate)، با استفاده از $5\ \mu l$ سوسپانسیون خالص باکتری حاوی CFU/ml 5×10^{8}، در چهار بخش پلیت تلقیح گردید. بدین صورت، در هر پلیت یک‌سویه و برای هر سویه چهار بخش یک ظرف پتری اختصاص یافت. جهت رشد سویه‌های باکتری، ظروف پتری در دمای $28^{\circ}c$ گرماگذاری شدند. ۲۴ ساعت بعد، قطر کلونی باکتری‌ها با ذره‌بین مدرج اندازه‌گیری شد و سپس گرماگذاری به‌مدت ۳۰ روز ادامه پیدا کرد. در پایان دورهٔ ۳۰ روزه، سویه‌ها براساس میزان مقاومت آن‌ها به سطوح مختلف عناصر سنگین روی و کادمیوم به چهار دستهٔ حساس، نیمه‌حساس، مقاوم، و خیلی مقاوم دسته‌بندی شدند. اساس دسته‌بندی بر پایهٔ رشد مناسب و افزایش قطر کلونی‌ها بود.

منظور از رشد مناسب سویه‌ها روند افزایشی قطر کلونی در طول دورهٔ گرماگذاری تحت تیمار مقادیر مختلف عناصر روی و کادمیوم است. در صورتی که در سویه‌های حساس و نیمه‌حساس عدم رشد باکتری و افزایش نامحسوس قطر کلونی و حتی توقف رشد کلونی مشاهده شد.

تهیهٔ پروفیل پلاسمیدی

سویه‌های خالص در محیط کشت N.B کشت شدند و به‌مدت ۱۲ الی ۱۴ ساعت در ۱۱۰ دور در دقیقه در

Archive of SID

www.SID.ir

دمای ۲۸°c رشد داده شدند (Glazer and Nikaido, 2007). استخراج پلاسمید به‌روش لیز قلیایی و پروفیل پلاسمیدی سویه‌ها با استفاده از روش الکتروفورز ژل آگارز انجام شد (Sambrook and Russell, 2001). محلول پلاسمیدی به‌وسیلهٔ ژل آگاروز ۰/۷ درصد در ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۳۰ دقیقه الکتروفورز شد. ژل در محلول نیم میکروگرم در میلی‌لیتر اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و عکس‌برداری شد.

در الکتروفورز از مارکر پلاسمیدی سوپر کویل به‌منزلهٔ استاندارد استفاده شد (Ibid). کلیهٔ مراحل و عملیات مذکور بر سویه‌های تحت تیمار آلودگی انجام شد و پروفیل پلاسمیدی سویه‌های مذکور به‌دست آمد. پس از این مرحله، تغییرات حاصله بر پلاسمیدها با نرم‌افزار LABWORKS 5.6 مطالعه و بررسی شد.

یافته‌ها و بحث

جداسازی و شناسایی سودوموناس فلورسنس

از صد جدایهٔ اولیه پنجاه جدایه براساس واکنش گرم منفی، رشد در ۴ درجه و عدم رشد در ۴۱ درجه، واکنش کاتالاز، اکسیداز، گلوکز، هیدرولیز ژلاتین، و عدم هیدرولیز نشاسته، به‌منزلهٔ سویه‌های سودوموناس فلورسنس انتخاب و در مراحل بعدی تحقیق استفاده شدند. pH مناسب جهت رشد سویه‌ها، در محیط کشت H.M، ۶/۵ به‌دست آمد. کربوهیدرات مناسب جهت رشد سویه‌ها قند گلوکز بود که به مقدار ۱ گرم در لیتر محیط کشت استفاده شد.

تعیین مقاومت سویه‌ها به عناصر روی و کادمیوم

با آزمایش‌های مقاومت‌سنجی، این سویه‌ها به چهار دسته سویه‌های حساس (رشد بسیار اندک و غیر قابل اندازه‌گیری در اولین سطح آلودگی، ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر کادمیوم، ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر روی)، سویه‌های نیمه‌حساس (رشد کم و کلونی‌های حدود ۲ میلی‌متر غیر لعابی و مسطح و خشکیده در حضور ۴۰ میلی گرم در لیتر کادمیوم و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر روی)، سویه‌های مقاوم (رشد متوسط و کلونی‌های کمتر از ۴ میلی‌متر مسطح و گاهی خشک در غلظت ۶۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر روی)، و سویه‌های خیلی مقاوم (سویه‌هایی که رشد خوب کلونی‌های لعابی برجسته به قطر ۳ تا ۴ میلی‌متر در غلظت ۸۰ میلی‌گرم در لیتر و بالاتر کادمیوم و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر و بالاتر روی) تقسیم شدند. پس از آزمون‌های مقاومت‌سنجی طی مدت ۳۰ روز، تعداد ۲۱ سویه از بین سویه‌های مورد آزمایش انتخاب شد تا از بین آن‌ها ۱۶ سویه جهت آزمایش‌های نهایی و تهیهٔ پروفیل‌های پلاسمیدی استفاده شود (جدول ۱).

جدول ۱. سویه‌های انتخاب‌شده جهت اعمال تیمارهای آلودگی عناصر روی و کادمیوم

نوع مقاومت	حساس	نیمه‌حساس	مقاوم	خیلی مقاوم
مقاوم به کادمیوم	S12 و S86	S47 و S8	S77 و S41	S5 و S36
مقاوم به روی	S54 و S88	S8 و S53	S33 و S38	S5 و S36

در بررسی‌های اولیه مشخص شد از بین سویه‌های منتخب سویه‌های ۵ و ۸ و ۳۶ در مقابل تیمارهای مختلف روی و کادمیوم رفتاری یکسان بروز می‌دهند. بدین صورت که سویه‌های ۵ و ۳۶ هم در عنصر روی و هم در عنصر کادمیوم در گروه مقاومتی خیلی مقاوم قرار گرفتند. سویهٔ ۸ نیز هم در عنصر روی و هم در عنصر کادمیوم در گروه نیمه‌حساس قرار گرفت. بنابراین، با توجه به نتایج، وجود مقاومت چندگانه در برابر عوامل محیطی، مانند سمّیت عناصر فلزی سنگین، در این سویه‌ها محتمل است (Doelman, 1986).

Archive of SID

www.SID.ir

بررسی پروفیل‌های پلاسمیدی

از باکتری‌های منتخب جمعاً ۳۲۰ پروفیل پلاسمیدی تهیه شد. در شکل ۱ نمونه‌ای از پروفیل پلاسمیدی حاصل از الکتروفورز پلاسمیدهای استخراجی از باکتری‌های تحت تیمار عناصر مورد بررسی آمده است. در بررسی‌های اولیه مشاهده شد ۴ پروفیل از ۳۲۰ پروفیل تهیه‌شده در تیمارهای مختلف کادمیوم و روی فاقد پلاسمیدند. سویهٔ ۸۶، که جزء سویه‌های حساس به کادمیوم است، در تیمار با ۸۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم پلاسمید خود را از دست داد، درحالی‌که در تیمار شاهد و سه تیمار دیگر دارای پلاسمید بود. ۲۸ پروفیل واجد یک پلاسمید بودند. سویهٔ حساس به کادمیوم ۱۲ (شکل ۱) و سویه‌های نیمه‌حساس به کادمیوم ۸ و ۴۷ در ۸۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم دارای یک پلاسمید بودند. ۱۲۸ پروفیل دارای دو پلاسمید بودند. سویه‌های ۸۶ و ۱۲ از گروه حساس به کادمیوم و سویهٔ ۴۷ از گروه سویه‌های نیمه‌حساس به کادمیوم در مقادیر ۰ تا ۶۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم دارای ۲ پلاسمید بودند. همچنین سویه‌های ۵۴ و ۸۸ از گروه حساس به روی و سویه‌های ۸ و ۵۳ از گروه نیمه‌حساس به روی در همهٔ مقادیر روی دارای ۲ پلاسمید بودند. ۷ پروفیل حاوی سه پلاسمید بودند. سویهٔ ۴۱ از گروه سویه‌های مقاوم به کادمیوم در ۸۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم و سویهٔ ۳۸ از گروه سویه‌های مقاوم به روی در ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر روی دارای ۳ پلاسمید بودند. ۵۷ پروفیل دارای چهار پلاسمید بودند. سویه‌های ۴۱ و ۷۷ از گروه مقاوم به کادمیوم در مقادیر ۰ تا ۶۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم و سویه‌های ۳۳ و ۳۸ از گروه سویه‌های مقاوم به روی در مقادیر ۰ تا ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر روی دارای ۴ پلاسمید بودند. سویهٔ ۴۱ مقاوم به کادمیوم در ۱ تکرار از ۴ تکرار تیمار با ۸۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم دارای ۴ پلاسمید بود. ۱۶ پروفیل واجد پنج پلاسمید بودند. سویهٔ ۷۷ از گروه سویه‌های مقاوم به کادمیوم در مقادیر ۰ تا ۶۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم دارای ۵ پلاسمید بود. ۸ پروفیل دارای ۷ پلاسمید بودند. سویه‌های ۵ و ۳۶ از گروه سویه‌های خیلی مقاوم به کادمیوم در مقدار ۸۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم دارای ۷ پلاسمید بودند. ۶۴ پروفیل حاوی ۸ پلاسمید بودند. سویه‌های ۵ و ۳۶ از گروه سویه‌های خیلی مقاوم به کادمیوم در مقادیر ۰ تا ۶۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم و سویهٔ ۵ از گروه سویه‌های خیلی مقاوم به روی در همهٔ مقادیر روی و سویهٔ ۳۶ از گروه سویه‌های خیلی مقاوم به روی در مقادیر ۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر روی دارای ۸ پلاسمید بودند. ۸ پروفیل دارای ۹ پلاسمید بودند. سویهٔ ۳۶ از گروه سویه‌های خیلی مقاوم به روی در مقادیر ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر روی دارای ۹ پلاسمید بود (جدول ۲).

وجود ژن‌های مقاوم پلاسمیدی در یک باکتری می‌تواند در مقابل عوامل خارجی مقاومت ایجاد کند. بنابراین، اگر تعداد و تنوع پلاسمیدها در یک باکتری بیشتر شود، احتمال اینکه ژن‌های مقاومت به عوامل مختلف در این باکتری وجود داشته باشد بیشتر می‌شود. همچنین ممکن است پلاسمیدهای باکتری‌هایی که به یک عامل خارجی مقاوم‌اند دارای شرایط زیر باشند (Shoeb, 2006):

- پلاسمیدهای با وزن مولکولی بالا احتمال وجود تعداد بیشتری ژن را فراهم می‌کند. درنتیجه، احتمال مقاومت باکتری حاوی آن به عامل خارجی افزایش می‌یابد.
- وجود تعداد زیاد پلاسمید در باکتری احتمال حضور ژن‌های مقاومتی را افزایش می‌دهد.
- تنوع بالای پلاسمیدها از نظر کیفی در باکتری نیز احتمال حضور ژن‌های مقاومتی را افزایش می‌دهد (Lakzian and Murphy, 2001).

در اثر اعمال تنش‌های فلز سنگین ممکن است قطعه‌ای از ژن‌های پلاسمید حذف یا به آن اضافه شود؛ که نتیجهٔ آن پدیدآمدن سویهٔ جهش‌یافتهٔ باکتری است (Castro et al, 2002).

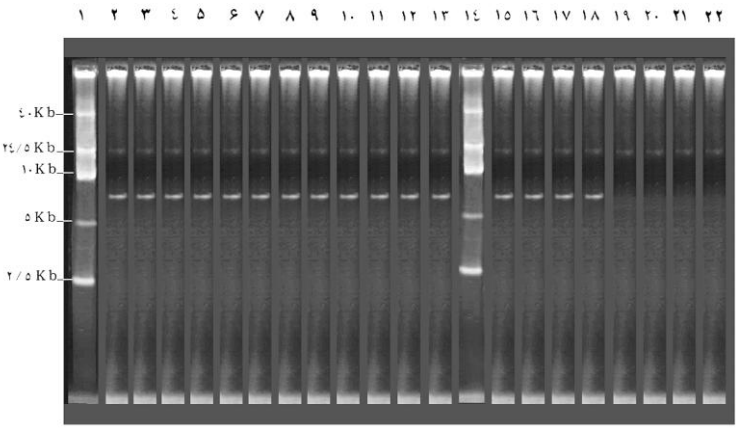
Archive of SID

www.SID.ir

در این تحقیق تعداد و اندازه و تنوع در اندازهٔ پلاسمیدها در مواجههٔ باکتری با فلزات سنگین روی و کادمیوم بررسی شد. در بررسی‌های اولیه پروفیل‌های پلاسمیدی و تعداد و اندازهٔ پلاسمیدها در هر سویه مطالعه شد. نتایج این بررسی‌ها به‌گونه‌ای بود که انتظار اولیه را تأیید کرد دربارهٔ این موضوع که احتمالاً سویه‌های مقاوم‌تر تعداد پلاسمیدهای بیشتر با وزن مولکولی بالاتری دارند.

جدول ۲. وضعیت پروفیل‌ها و درصد فراوانی آن‌ها

وضعیت پروفیل‌ها	تعداد پروفیل‌ها	درصد پروفیل‌ها
بدون پلاسمید	۴	٪ ۱/۲۵
۱ پلاسمید	۲۸	٪ ۸/۷۵
۲ پلاسمید	۱۲۸	٪ ۴۰/۰۰
۳ پلاسمید	۷	٪ ۲/۱۸
۴ پلاسمید	۵۷	٪ ۱۷/۸۱
۵ پلاسمید	۱۶	٪ ۵/۰۰
۷ پلاسمید	۸	٪ ۲/۵۰
۸ پلاسمید	۶۴	٪ ۲۰/۰۰
۹ پلاسمید	۸	٪ ۲/۵۰
جمع	۳۲۰	۱۰۰



شکل ۱. پروفیل پلاسمیدی سویهٔ s۱۲ تحت تیمار مقادیر مختلف کادمیوم

پروفیل‌های ۱ و ۱۴ مارکر سوپر کویل پلاسمیدی
پروفیل‌های ۲، ۳ ، ۴، ۵ تیمار شاهد (فاقد کادمیوم)
پروفیل‌های ۶ ، ۷، ۸، ۹ تیمار ۲۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم
پروفیل‌های ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳ تیمار ۴۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم
پروفیل‌های ۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸ تیمار ۶۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم
پروفیل‌های ۱۹ ،۲۰، ۲۱، ۲۲ تیمار ۸۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم

www.SID.ir

ارتباط بین پروفیل پلاسمیدی با مقاومت به کادمیوم

انتظار می‌رفت سویه‌های ۱۲ و ۸۶ حساس به کادمیوم، که توانایی مقاومت در برابر ۲۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم را نداشتند و رشد آن‌ها بسیار اندک بود، تعداد پلاسمید کم با اندازهٔ کوچک داشته باشند (Lakzian and Murphy, 2001).

با بررسی پروفیل پلاسمیدی این دو سویه مشخص شد انتظارات از این دو سویه درست بوده است. چنان‌که سویهٔ ۸۶ فقط یک باند پلاسمیدی با وزن مولکولی تقریبی ۲/۳ Kb داشت و سویهٔ ۱۲ دو باند پلاسمیدی با وزن مولکولی تقریبی ۲۴/۴ Kb و ۶/۵ Kb داشت (شکل ۱).

سویه‌های ۸ و ۴۷ حساسیت کمی در مقابل کادمیوم داشتند. این سویه‌ها توانایی مقاومت در برابر ۴۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم را نداشتند. بررسی پروفیل پلاسمیدی این سویه‌ها نشان داد از لحاظ تعداد باندهای پلاسمیدی تفاوتی با سویهٔ ۱۲ وجود ندارد. ولی هر دو سویه پلاسمیدهای بزرگ‌تری دارند. وزن مولکولی پلاسمیدهای سویهٔ ۸ در حدود ۱۰۰ Kb و ۲۹ Kb و وزن مولکولی پلاسمیدهای سویهٔ ۴۷ در حدود ۹۰ Kb و ۲۷/۵ Kb بود که هر دو پلاسمید جزء پلاسمیدهای با اندازهٔ مولکولی بالا هستند.

سویه‌های ۴۱ و ۷۷ در مقابل کادمیوم مقاوم بودند. از آنجا که این سویه‌ها در مقادیر ۶۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم نیز رشد کردند، انتظار می‌رفت این دو سویه پلاسمیدهایی با وزن مولکولی بالا و تعداد بیشتری باند پلاسمیدی نسبت به سویه‌های قبلی داشته باشند. مطالعهٔ پروفیل‌های پلاسمیدی دوسویه نشان داد هر دوی این سویه‌ها در مقادیر کمتر از ۸۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم دارای چهار و پنج باند پلاسمیدی متفاوت دارای وزن مولکولی تقریبی ۴۰ Kb، ۲۴/۵ Kb، ۸/۵ Kb، ۵ Kb (سویهٔ ۴۱) و ۳۶ Kb، ۲۵ Kb، ۲۴ Kb، ۶/۵ Kb، ۴/۳ Kb (سویهٔ ۷۷) هستند.

در مورد سویهٔ ۷۷ با اعمال تیمارهای بالا (۸۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم) حذف پلاسمید وجود نداشت؛ ولی در سویهٔ ۴۱ در مقادیر ۸۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم سه تکرار از چهار تکرار پلاسمید ۵ Kb خود را از دست داده بودند.

سویه‌های خیلی مقاوم شامل سویه‌های ۵ و ۳۶ بودند. با توجه به اینکه این دو سویه حتی در ۸۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم نیز رشد کردند و جزء سویه‌های با مقاومت بسیار بالا هستند، انتظار می‌رفت هم از لحاظ اندازهٔ پلاسمیدی و هم از لحاظ تعداد باندها غنی‌تر از سه گروه قبلی باشند.

بررسی‌ها نشان داد هر دو سویه بیشترین تعداد پلاسمید را در بین همهٔ گروه‌ها دارند.

در سویهٔ ۵ تعداد ۸ پلاسمید با وزن‌های مولکولی تقریبی ۴۰ Kb، ۲۵ Kb، ۵ Kb، ۳/۶ Kb، ۳/۴ Kb، ۲/۷ Kb، ۲/۵ Kb، ۲ Kb وجود داشت. البته پلاسمید با وزن مولکولی ۵ Kb در تیمارهای با مقدار ۸۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم در هر چهار تکرار حذف شد؛ اما، با توجه به اینکه این سویه توانایی رشد در مقادیر بالاتر از ۸۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم را دارد، پلاسمید حذف‌شده تأثیری بر مقاومت آن نداشت.

سویهٔ ۳۶ هم رفتاری دقیقاً مشابه سویهٔ ۵ داشت و پلاسمید ۵ Kb خود را در مقادیر ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر کادمیوم از دست داد (جدول ۳).

ارتباط پروفیل پلاسمیدی مقاوم به روی

سویه‌هایی که تیمارهای با مقادیر مختلف فلز روی بر آن‌ها اعمال شد شامل سویه‌های ۵، ۸، ۳۳، ۳۶، ۳۸، ۵۳، ۵۴، ۸۸ بودند.

سویه‌های ۵۴ و ۸ حساس به اعمال تیمارهای روی توانایی رشد در مقادیر ۵۰ میلی‌گرم در لیتر روی را همانند حالت فاقد تیمار فلزی نداشتند و رشد

Archive of SID

www.SID.ir

آن‌ها کاهش یافت. با توجه به اینکه سویهٔ ۵۴ جزء سویه‌های حساس به تیمار فلز روی بود، انتظار می‌رفت از لحاظ تعداد باندهای پلاسمیدی ضعیف باشد؛ یعنی تعداد باندهای پلاسمیدی کمی داشته باشد (Ibid). با بررسی پروفیل پلاسمیدی این سویه مشخص شد این سویه فقط دو باند پلاسمیدی دارد. این دو باند پلاسمیدی در هر چهار تکرار تیمارهای اعمال‌شده حضور داشتند و تحت شرایط تنشی حذف نشدند.

سویهٔ ۸۸ نیز همانند سویهٔ ۵۴ سویه‌ای حساس به مقادیر ۵۰ میلی‌گرم در لیتر روی بود و انتظار می‌رفت همانند این سویه تعداد باندهای پلاسمیدی کمی داشته باشد. بررسی پروفیل‌های پلاسمیدی این سویه مشخص کرد سویهٔ ۸۸ فقط دو باند پلاسمیدی، آن هم با وزن مولکولی ۲۴ Kb و ۶/۵ Kb، دارد. این پلاسمیدها در هر چهار تکرار همهٔ تیمارهای اعمال‌شده پایدار بودند و حذف نشدند.

سویه‌های ۸ و ۵۳ توانایی رشد در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر روی را داشتند (نیمه‌حساس).

سویه‌های ۵۳ و ۸ دو باند پلاسمیدی با وزن تقریبی ۱۰۰ Kb و ۲۴/۵ Kb داشتند که بیشتر از وزن مولکولی پلاسمیدهای سویهٔ حساس است. هیچ‌یک از این سویه‌ها در اثر اعمال تیمارهای فلزی پلاسمیدهای خود را از دست ندادند. دلیل مقاومت این سویه‌ها احتمالاً وجود پلاسمیدهایی با وزن مولکولی بالا بود.

دو سویهٔ ۳۳ و ۳۸ در برابر اعمال تیمارهای فلزی مقاومت مناسبی نشان دادند. بنابراین انتظار می‌رفت این دو سویه تعداد باند پلاسمیدی بیشتری نسبت به دو گروه قبلی داشته باشند.

بررسی پروفیل پلاسمیدی سویهٔ ۳۳ نشان داد این سویه چهار باند پلاسمیدی با وزن مولکولی Kb ۷۰، ۲۵/۵ Kb، ۸ Kb، ۳/۳ Kb دارد. در هر چهار تکرار در همهٔ تیمارهای اعمال‌شده پلاسمیدی حذف نشده بود.

سویهٔ ۳۸ نیز ۴ باند مختلف پلاسمیدی با وزن مولکولی (تقریباً متفاوت از پلاسمیدهای سویه ۳۳) ۵۰ Kb، ۲۵ Kb، ۱۰ Kb، ۳/ ۴ داشت. برخلاف سویهٔ ۳۳، پلاسمید ۴/۳ Kb این سویه در هر چهار تکرار تیمار با ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر روی حذف شد.

سویه های ۵ و ۳۶ در مقادیر ۲۰۰ میلی گرم در لیتر روی و بالاتر به‌خوبی رشد کردند و در برابر اعمال

جدول ۳. تأثیر تیمار کادمیوم بر پایداری پلاسمید

گروه مقاومتی	نام سویه	تیمار منجر به حذف پلاسمید	تعداد پلاسمید در تیمار شاهد	تعداد پلاسمید پس از تیمار	درصد پلاسمید حذف‌شده از کل پلاسمیدها
حساس	۱۲	۸۰ میلی‌گرم در لیتر	۲	۱	٪ ۵۰
حساس	۸۶	۸۰ میلی‌گرم در لیتر	۱	۰	٪ ۱۰۰
نیمه‌حساس	۸	۸۰ میلی‌گرم در لیتر	۲	۱	٪ ۵۰
نیمه‌حساس	۴۷	۸۰ میلی‌گرم در لیتر	۲	۱	٪ ۵۰
مقاوم	۴۱	۸۰ میلی‌گرم در لیتر	۴	۳	٪ ۲۵
مقاوم	۷۷	۸۰ میلی‌گرم در لیتر	۵	۴	٪ ۲۰
خیلی مقاوم	۵	۸۰ میلی‌گرم در لیتر	۸	۷	٪ ۱۲/۵
خیلی مقاوم	۳۶	۸۰ میلی‌گرم در لیتر	۸	۷	٪ ۱۲/۵

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۴. تأثیر تیمار روی بر پایداری پلاسمید

گروه مقاومتی	نام سویه	تیمار منجر به حذف پلاسمید	تعداد پلاسمید در تیمار شاهد	تعداد پلاسمید پس از تیمار	درصد پلاسمید حذف‌شده از کل پلاسمیدها
حساس	۵۴	ندارد	۲	۲	٪ ۰
حساس	۸۸	ندارد	۲	۲	٪ ۰
نیمه‌حساس	۸	ندارد	۲	۲	٪ ۰
نیمه‌حساس	۵۳	ندارد	۲	۲	٪ ۰
مقاوم	۳۳	ندارد	۴	۴	٪ ۰
مقاوم	۳۸	۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر	۴	۳	٪ ۲۵
خیلی مقاوم	۵	ندارد	۸	۸	٪ ۰
خیلی مقاوم	۳۶	ندارد	۸	۹	٪ ۰

تیمارهای فلزی مقاومت بسیار بالایی داشتند. چنین انتظار می‌رفت که این سویه‌ها دارای تعداد بالایی باند پلاسمیدی باشند.

سویهٔ ۵ تعداد ۸ باند پلاسمیدی متفاوت با وزن مولکولی ۴۰ Kb، ۲۵ Kb، ۵ Kb، ۳/۶ Kb، ۳/۴ Kb، ۲/۷ Kb، ۲/۵ Kb، ۲ Kb داشت.

سویهٔ ۳۶ نیز از لحاظ تعداد و اندازهٔ باندهای پلاسمیدی دقیقاً مشابه سویهٔ ۵ بود. در بین همهٔ سویه‌های مورد آزمایش، این دو سویه بیشترین تعداد باندهای پلاسمیدی را داشتند و احتمالاً تعداد بیشتر پلاسمید موجب مقاومت بالاتر این سویه‌ها می‌شود.

این سویه‌ها در هر چهار تکرار تیمارهای ۰ و ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر روی ۸ باند پلاسمیدی داشتند. در تیمارهای ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر روی یک باند پلاسمیدی با وزن مولکولی ۴۰ Kb به دو باند با وزن‌های مولکولی ۴۰ Kb و نزدیک به ۳۹/۸ Kb تبدیل شد. این حالت یگانه حالت افزایش تعداد باندهای پلاسمیدی در بین همهٔ سویه‌ها و تیمارهای اعمال‌شده بود (جدول ۴).

همان‌گونه که گفته شد، سویه‌های حساس به کادمیوم (سویه‌های ۱۲ و ۸۶) تعداد کمی پلاسمید داشتند. سویهٔ ۱۲ دارای ۲ پلاسمید و سویهٔ ۸۶ دارای ۱ پلاسمید بود. سویه‌های حساس به روی (سویهٔ ۵۴ و ۸۸) نیز هر یک ۲ پلاسمید داشتند. به‌نظر می‌رسد به‌دلیل تعداد کم و اندازهٔ کوچک پلاسمیدها و درنتیجه وجود ژن‌های کم در این پلاسمیدها احتمال وجود ژن‌های مقاوم‌کنندهٔ این سویه‌ها نسبت به عناصر کادمیوم و روی نیز کم می‌شود و این دو سویه توانایی رشد مناسب در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم و بیشتر و غلظت‌های بالای روی را ندارند.

سویه‌های نیمه‌حساس به کادمیوم (۸ و ۴۸) و روی (۸ و ۵۳) نیز دارای ۲ پلاسمید بودند؛ با این تفاوت که وزن مولکولی تقریبی هر دو پلاسمید بالاتر از سویه‌های حساس بود. احتمالاً تفاوت اندازهٔ تقریبی وزن مولکولی ناشی از ژن‌های مختلف، از جمله مقاومت، است که باعث بروز نوعی مقاومت به مقادیر بالاتر کادمیوم و روی نسبت به سویه‌های حساس می‌شود.

سویه‌های مقاوم به کادمیوم (۴۱ و ۷۷)، به‌ترتیب، ۵ و ۴ پلاسمید و سویه‌های مقاوم به روی (۳۳ و ۳۸) ۴ پلاسمید داشتند و این تعداد بیشتر پلاسمید احتمالاً مقاومت بالاتر این سویه‌ها را به همراه داشت.

Archive of SID

www.SID.ir

ملاحظه شد که سویه‌های مقاوم در مورد هردو عنصر روی و کادمیوم نسبت به دو گروه قبلی تعداد پلاسمید بیشتری داشتند.

سویه‌های خیلی مقاوم به روی و کادمیوم (۵ و ۳۶) هر یک ۸ پلاسمید داشتند که مشخصاً بالاترین تعداد پلاسمید در بین همهٔ سویه‌های مورد بررسی بود. احتمالاً وجود این تعداد بالای پلاسمید باعث ایجاد بالاترین مقاومت می‌شود. ضمناً این سویه‌ها مقاومت چندگانه نشان دادند که ممکن است با تنوع پلاسمیدی آن‌ها مرتبط باشد.

همان‌گونه که مشخص شد، هم در مورد فلز روی و هم در مورد فلز کادمیوم هر چه مقاومت سویه‌ها بیشتر باشد تعداد پلاسمیدهای موجود در سویه‌ها نیز بیشتر است که با نتایج دیگر محققان مطابقت دارد (Shoeb, 2006).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده (جدول‌های ۳ و ۴)، به‌نظر می‌رسد آثار فلز کادمیوم در مقایسه با فلز روی، با اینکه مقدار عنصر روی در تیمارها بیشتر از کادمیوم است، در جهت حذف پلاسمید شدیدتر است. حذف یک پلاسمید در تیمارهای کادمیوم ۱۶/۸۷۵ درصد است؛ در صورتی که در مورد روی ۲/۵ درصد است.

از سوی دیگر اثر کادمیوم در حذف پلاسمید در همهٔ سویه‌ها روی داد؛ درحالی‌که در مورد عنصر روی فقط در سویهٔ ۳۸ و آن هم در بالاترین سطح تیمار روی ($۲۰۰\ mgl^{-1}$) حذف پلاسمید انجام شد. مکانیسم تأثیر فلزات سنگین در حذف پلاسمید در این باکتری‌ها ممکن است در همانندسازی پلاسمید باشد که باید بررسی دقیق‌تری بر آن انجام شود.

افزایش باند پلاسمیدی در اثر حذف‌شدن قسمتی از DNA پلاسمید (پدیدهٔ Deletion) فقط در سویهٔ ۳۶ در تیمار ۱۵۰ و $۲۰۰\ mgl^{-1}$ فلز روی رخ داد؛ درحالی‌که در هیچ‌یک از سویه‌های تحت تیمار کادمیوم افزایش باند پلاسمیدی مشاهده نشد. پدیدهٔ حذف، که نوعی جهش در پلاسمیدهاست، احتمالاً ایجاد نوعی مقاومت در باکتری‌هاست که مثلاً مقاومت آن‌ها را در مقابل فلز سنگین افزایش می‌دهد(Ibid).

سپاس‌گزاری

این پژوهش از محل طرح تحقیقاتی نوع ششم،مصوب حوزهٔ معاونت محترم پژوهش و فناوری پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، انجام شد. از سرکار خانم مهندس لیلا محمدی، برای همکاری‌های صمیمانهٔ ایشان در انجام گرفتن کارهای آزمایشگاهی، و آقای اکبر قویدل، برای همکاری در تدوین مقاله، تشکر و قدردانی می‌شود.

REFERENCES

Alavi, A. and Ahoonmanesh, A. (1997). Biocontrol of soil derived disease factors (Vol. 1). Translated by *Agriculture Instruction publishing* (In Farsi).

Aliasgharzade, N. (1997*). Soil Biochemistry and Microbiology*, translating (Vol. 1), Tabriz University publishing, 425 page (In Farsi).

Alloway, B. J. (1995). *Heavy metals in soils*: Blackie Academic & Professional.

Angle, J. S. McGrath, S. P. and Chaudri, A. M. (1992). Effects of media components on toxicity of Cd to rhizobia, *Water, Air, and Soil Pollution, 64* (3-4), 627-633.

Baath, E. (1989). Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review), *Water, Air, and Soil Pollution, 47* (3-4), 335-379.

Archive of SID

www.SID.ir

Bergey, D. H. and Holt, J. G. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*: Williams & Wilkins.

Bopp, L. H. and Ehrlich, H. L. (1988). Chromate resistance and reduction in Pseudomonas fluorescens strain LB300, *Archives of Microbiology*, 150, 426-431.

Castro, I. V. Ferreira, E. M. and McGrath, S. P. (2003). Survival and plasmid stability of rhizobia introduced into a contaminated soil, *Soil Biology and Biochemistry*, 35, 49-54.

Duffy, B. K. and Défago, G. (1999). Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by Pseudomonas fluorescens biocontrol strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 2429-2438.

Elliott, L. F. and Lynch, J. M. (1984). Pseudomonads as a factor in the growth of winter wheat (Triticum aestivum L.), *Soil Biology and Biochemistry, 16* (1), 69-71.

Erfanmanesh, M. and Afioni, M. (2000). *Contamination of Environment, Water, Soil and Air*, Arkan publishing (In Farsi).

Fergusson, J. E. (1990). The heavy elements: chemistry, environmental impact, and health effects: Pergamon Press.

Glazer, A. N. and Nikaidō, H. (2007). *Microbial biotechnology: fundamentals of applied microbiology*: Cambridge University Press.

Gould, W. D. Hagedorn, C. Bardinelli, T. R. and Zablotowicz, R. M. (1985). New selective media for enumeration and recovery of fluorescent pseudomonads from various habitats, *Applied and Environmental Microbiology, 49* (1), 28-32.

Hayat, R. Ali, S. Amara, U. Khalid, and R. Ahmed, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: A review, *Annals of Microbiology*, 60, 579-598.

Jensen, V. Kjøller, A. Sørensen, L. H. and Societies, F. o. E. M. (1986). *Microbial communities in soil*: Elsevier Applied Science Publishers.

Kabata-Pendias, A. and Pendias, H. (2001). *Trace elements in soils and plants*: CRC Press.

Lakzian, A. Murphy, P. Turner, A. Beynon, J. L. and Giller, K. E. (2002). Rhizobium leguminosarum bv, viciae populations in soils with increasing heavy metal contamination: Abundance, plasmid profiles, diversity and metal tolerance, *Soil Biology and Biochemistry*, 34, 519-529.

McGrath, S. P. (1994). Effects of heavy metals from sewage sludge on soil microbes in: *agricultural ecosystems In Toxic Metals in Soil – Plant Systems*, Ross, S. M. (ed), 242-274, John Wiley, Chichester.

Moënne-Loccoz, Y. Powell, J. Higgins, P. Britton, J. and O'Gara, F. (1998). Effect of the biocontrol agent Pseudomonas fluorescens F113 released as sugarbeet inoculant on the nutrient contents of soil and foliage of a red clover rotation crop, *Biology and Fertility of Soils, 27* (4), 380-385.

Mordvert, J. J. and Osborn, G. (1982). Studies on the chemical form of cadmium and other heavy metals contaminants in phosphate fertilizer, *Soil Sci*, 134, 185-192.

Mulla, D. J. Page, A. L. and Ganje, T. J. (1980). Cadmium accumulations and bioavailability in soils from long term phosphorous fertilizations, *Journal of Environmental Quality*, 9, 408-412.

Rainey, P. B. (1999). Adaptation of Pseudomonas fluorescens to the plant rhizosphere, *Environmental Microbiology*, 1, 243-257.

Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Shoeb, E. (2006). *Genetic basis of heavy metal tolerance in bacteria*, PhD dissertation, University of Karachi.

Smilde, K. W. and Van Luit, B. (1983). The effect of phosphate fertilizer cadmium on cadmium in soils and crops, *INST. BODEMVRUCHTBAARHEID, NO. 6*.

Soheili, M. (1997). Effect of sewage quality on accumolation and transportation of heavy metals in soils of south Tehran area, *Journal of hurticulture*, 74-78 (In Farsi).

Archive of SID

www.SID.ir

Sposito, G. (1989). *The chemistry of soils*: Oxford University Press.
Tiller K. Merry, R. and McLaughlin, M. (1994). Cadmium: a modern day problem, *Rural Research*, 162, 32-35.
Williams, C. H. and David, D. J. (1976). The accumulation in soil of cadmium residues from phosphate fertilizers and their effect on the cadmium content of plant, *Soil Science*, 12, 86-93.
Williams, C. and David, D. (1973). The effect of superphosphate on the cadmium content of soils and plants, *Soil Research, 11* (1), 43-56.
Witter, E. (1992). Heavy metal concentrations in agricultural soils critical to microorganisms, Report, N. 4079, *Swedish Environmental Protection Agency, Solna*.
Wolt, J. (1994). *Soil solution chemistry*, John Willey, New York.

Archive of SID

www.SID.ir