تعیین مشخصات باکتری‌های ریزوبیا جدا شده از خاک‌های آلوده به آرسنیک در مناطق جنوب شرقی استان کردستان و تأثیر آنها بر روی رشد گیاه

رحیمه سعادتی، بهمن بهرام نژاد و بهروز حریقی[1]

دانشجوی سابق کارشناسی ارشد دانشگاه کردستان؛ rahimeh_saadati@yahoo.com

دانشیار دانشگاه کردستان؛ bbahramnejad@uok.ac.ir

دانشیار دانشگاه کردستان؛ BHarighi@uok.ac.ir

دریافت: 95/2/6 و پذیرش: 95/7/12

چکیده

باکتری‌های همزیست با ریشه بقولات از ریشه گیاهان یونجه (*Medicago sativa* L.)، نخود (*Cicer arietinum* L.) و یونجه زرد (*Melilotus officinalis* L.) رشد کرده در خاک‌های آلوده به آرسنیک در جنوب شرقی استان کردستان جداسازی گردید. جدایه‌ها براساس خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی متعلق به جنس *Rhizobium* و *Ensifer* تشخیص داده شد. وجود سیستم مقاومتی به آرسنیک، سیستم *ars* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *arsC* بررسی و به اثبات رسید. نرخ رشد جدایه‌ها در محیط کشت YEMB به اضافه غلظت‌های 400 – 100 میلی مولار آرسنات بررسی گردید. سویه‌های جدا شده از یونجه (AB1، AB3)، نخود (PA2، PC2) و یونجه زرد (YA1) توانائی تحمل 350 میلی مولار آرسنات را داشتند. همچنین سویه‌های AB1، PA2 و YA1 توانائی تحمل غلظت 400 میلی مولار آرسنات را داشتند. به منظور بررسی تأثیر آلودگی به آرسنیک بر روی رابطه همزیستی یونجه و نخود با باکتری‌های ریزوبیا و میزان رشد گیاهان، آزمونی در قالب بلوک‌های کاملاً تصادفی در سه تکرار و در پنج غلظت آرسنیک (100، 75، 50، 10 و صفر میلیگرم بر کیلوگرم خاک) و با تلقیح یا بدون تلقیح دو سویه باکتری، AB1 و PA2 انجام گردید. وزن خشک و وزن تر ریشه و اندام‌های هوائی یونجه و نخود با افزایش غلظت آرسنیک در خاک کاهش یافت. نتایج نشان داد که وزن خشک و وزن تر ریشه و اندام‌های هوائی هر دو گیاه در بوته‌های تیمار شده توسط سویه‌های باکتری بصورت معناداری بالاتر از فاکتورهای مشابه در گیاهان تلقیح نشده با باکتری بود. براساس نتایج بدست آمده سویه‌های AB1 و PA2 با توانائی مقاومت به غلظت‌های بالای آرسنیک به همراه گیاهان همزیست می‌توانند جهت پالایش خاک‌های آلوده به آرسنیک مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: بقولات، ریزوبیوم، مقاومت به آرسنیک

[1]. نویسنده مسئول، آدرس: سنندج، دانشگاه کردستان، دانشکده کشاورزی، گروه گیاهپزشکی

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

آلودگی به آرسنیک یکی از مشکلات زیست محیطی مهم در برخی مناطق جنوب شرقی کردستان است. غلظت آرسنیک در این مناطق در حدود 300 – 100 قسمت در میلیون خاک می‌باشد. بعلاوه غلظت های بالای آرسنیک در آب و گیاهان رشد یافته در این مناطق قبلاً نیز گزارش شده است (مسافری و همکاران، 2003 ؛ زندسلیمی و همکاران، 2011). آلودگی محیط به آرسنیک یکی از مشکلات مهم زیست محیطی در بسیاری از کشورهای جهان است (جک و همکاران، 2003). تعداد زیادی از مردم جهان به دلیل استفاده از آب آلوده به آرسنیک از بین رفته‌اند و میلیون ها نفر از بیماری‌های پوستی و انواع مختلف سرطان‌های ناشی از آلودگی آرسنیک رنج می‌برند (چادوری و همکاران، 1999). بعلاوه جذب و تجمع این عنصر در گیاهان رشد یافته در مناطق آلوده موجب کاهش شدید رشد این گیاهان و کاهش محصول می‌گردد. آرسنیک به عنوان یکی از فلزات سنگین دارای سمیت نسبتاً بالائی است که بصورت طبیعی از بین نمی‌رود. بنابراین کاهش آلودگی خاک به این فلز از طریق تبدیل آن به فرم دارای سمیت کمتر امکان پذیر است. بقولات و باکتری‌های همزیست با آنها بصورت معمول در خاکهای آلوده به آرسنیک یافت می‌شوند و این آلودگی ممکن است بر روی رابطه همزیستی آنها با گیاهان تأثیر گذارد (کاراسکو و همکاران، 2005). برخی مطالعات نشان می‌دهد که آلودگی خاک‌ها به آرسنیک موجب کاهش میزان گره زائی و راندمان تثبیت نیتروژن در این گیاهان می‌گردد (واسکوئز و همکاران، 2008؛ تالانو و همکاران، 2012).

مطالعات ژنتیکی رابطه همزیستی ریزوبیا- لگوم نشان می‌دهد که در تحت شرایط غلظت بالای آرسنیک، فعالیت چندین ژن دخیل در غده زائی مختل می‌گردد (لافونته و همکاران، 2015). برخی ریزجانداران دارای سیستم ژنتیکی هستند که آنان را قادر می‌سازد تأثیر سمی آرسنیک را خنثی نمایند. این سیستم تحت عنوان اپرون *ars* شناخته می‌شود و شامل ژنهای *arsB*، *arsC* و *arsR* می‌باشد (گیرینگ و همکاران، 2003). سیستم مقاومت به آرسنیک در برخی باکتری‌های ریزوبیا تشخیص داده شده است (ساپریرا و همکاران، 2007؛ مندال و همکاران، 2008). از آبهای زیر زمینی آلوده به آرسنیک نیز سویه-های متعلق به خانواده *Rhizobiacae* و مقاوم به این فلز گزارش شده است. در این سویه‌ها مکانیزم مقاومت توسط سیستم *ars* هدایت می‌شود (سرکار و همکاران، 2013). این سیستم توسط یک مجموعه ژنی موجود بر روی کروموزوم یا پلاسمید باکتری کد می‌شود (جک و همکاران، 2004). در برخی باکتری‌های ریزوبیا از قبیل *Sinorhizobium meliloti* به جای ژن *arsB*، ژن *aqpS* وجود دارد (یانگ و همکاران، 2005). نتیجه وجود این مجموعه ژنی القا فنوتیپ مقاومتی در باکتری نسبت به غلظت‌های بالای آرسنیک است (ماندل و همکاران، 2008؛ ساپریرا و همکاران، 2007). برخی مطالعات نشان می‌دهد که استفاده از گیاهان به همراه ریزوباکترهای تحریک کننده رشد و مقاوم به آرسنیک می‌توانند به عنوان راهکاری مناسب جهت پالایش خاک‌های آلوده به آرسنیک مطرح باشد (وانگ و همکاران، 2011). برخی گیاهان از جمله بقولات و باکتری‌های همزیست با آنها جهت پالایش محیط‌های آلوده به این عناصر مورد استفاده قرار گرفته‌اند (سریپرنگ و همکاران، 2002). این باکتری-ها به فلزات سنگین مقاوم بوده و به دلیل دارا بودن برخی خصوصیات بیوشیمیائی و اکولوژیکی، توانائی تجزیه عناصر آلوده کننده را دارند و کاندیداهای مناسبی جهت پالایش خاک‌های آلوده هستند (تنگ و همکاران، 2015). مطالعات قبلی نشان داده است که میزان تشکیل گره در ریشه، وزن خشک ریشه و اندام‌های هوائی سویا با افزایش غلظت آرسنیک کاهش می‌یابد. اما، مقدار کاهش وزن خشک گیاهان تلقیح شده با باکتری‌های ریزوبیا در مقایسه با گیاهان شاهد کمتر بود (ریچمن، 2007). نتیجه گزارش دیگری نشان می‌دهد که مقدار زیست توده اندام هوایی و راندمان تثبیت نیتروژن یونجه تلقیح شده توسط باکتری مقاوم به آرسنیک *Sinorhizobium meliloti* بیشتر از گیاهان تلقیح نشده بود (پاجلو و همکاران، 2008).

هدف از مطالعه حاضر عبارت بود از: شناسائی و تعیین مشخصات جدایه‌های ریزوبیای مقاوم به آرسنیک، جداسازی شده از خاک و ریشه بقولات رشد کرده در خاک‌های آلوده و احتمال استفاده از رابطه همزیستی بقولات و سویه‌های مقاوم به آرسنیک در پالایش خاک‌های آلوده، همچنین، علاوه بر بررسی اثر غلظت‌های مختلف آرسنیک بر روی سرعت رشد سویه-ها، تلقیح گیاهان یونجه و نخود توسط سویه‌های مقاوم به آرسنیک بر روی افزایش وزن بوته‌ها بررسی گردید.

مواد و روش ها

جداسازی، تعیین مشخصات و شناسائی باکتری‌ها همزیست از مناطق آلوده

باکتری‌ها از نمونه‌های خاک و گره‌های روی ریشه بقولات جمع آوری شده از مناطق آلوده به آرسنیک جداسازی گردید. گره‌ها ابتدا توسط محلول هیپوکلریت 0/5% ضد عفونی سطحی گردید و پس از شستشو توسط

Archive of SID

www.SID.ir

آب مقطر سترون در 3-2 میلی لیتر آب مقطر سترون کاملاً له گردید. پس از نگهداری به مدت 30 دقیقه از محلول حاصل یک یا دو لوپ بر روی ظروف پتری حاوی محیط کشت عصاره مخمر- مانیتول- آگار (YEMA) کشت گردید (ویسنت، 1970). ظروف پتری سپس در درجه حرارت 28 درجه سانتی گراد به مدت 72 ساعت نگهداری و تک پرگنه‌های رشد کرده مجدداً خالص سازی گردید.

خصوصیات بیوشیمیائی و فیزیولوژیکی جدایه‌ها براساس روش‌های معمول در باکتری شناسی تعیین گردید (شاد و همکاران، 2001). این مشخصات شامل NaCl، تولید کتولاکتوز، رشد در 28، 35 و 40 درجه سانتی گراد، تولید سولفید هیدروژن، واکنش در شیر لیتموس، استفاده از بیوتین، دامنه اسیدیتی، توانائی رشد در محیط پایه‌ای نمک حاوی گلوکز و رشد در محیط لوریا برتانی (LB) و توانائی تولید اسید از منابع کربوهیدراتی یا استفاده از منابع آمینواسیدی بود. به منظور بررسی توانائی جدایه‌ها در تولید گره، بذور یونجه و نخود پس از ضدعفونی سطحی توسط اتانول 70% به مدت ده دقیقه و شستشو توسط آب مقطر سترون در گلدان‌های حاوی خاک ضدعفونی شده کشت گردید. سپس 5 میلی لیتر از سوسپانسیون تازه رشد یافته جدایه‌ها (از غلظت 10^{10} 1× پرگنه بر میلی لیتر) به خاک گلدان اضافه گردید و به مدت هشت هفته در گلخانه با درجه حرارت تقریبی 28-26 درجه سانتی گراد نگهداری گردید (پاجلو و همکاران، 2008). در تمامی مراحل آزمایش تیمارکنترل منفی (بدون تلقیح باکتری) اعمال گردید. بعلاوه در بررسی گره زائی جدایه‌ها و همچنین در تعیین خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیائی، سویه‌های استاندارد *Sinorhizobium meliloti* SM117 (SM) و *Rhizobium leguminosarum* 2484 (RL) مورد استفاده و مقایسه قرار گرفت.

بررسی وجود ژن *arsC* در جدایه‌ها

وجود ژن *arsC* در جدایه‌ها در واکنش زنجیره-ای پلی مراز با استفاده از آغازگرهای arsC (F) (5'-ATGACCGTCACCATHTAYCAYAAYC-3') و arsC (R) (5'-ACGACCGCCTCGCCRTCYTCYTT-3') مورد بررسی قرار گرفت. شرایط واکنش بصورت زیر بود: یک چرخه اولیه در 95 درجه سانتی گراد به مدت 3 دقیقه، سپس 35 چرخه بصورت واسرشت در 95 درجه سانتی گراد به مدت 1 دقیقه، اتصال در 48 درجه سانتی گراد به مدت 1 دقیقه، بسط در 72 درجه سانتی گراد به مدت 45 ثانیه و یک مرحله بسط نهائی در 72 درجه سانتی گراد به مدت 10 دقیقه (ساپریرا و همکاران، 2007). جهت الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلی مراز، ژل آگارز به غلظت 1/5 درصد در بافر TAE1× تهیه گردید. سپس 5 میکرولیتر از محصول واکنش به اضافه 2 میکرولیتر بافر بارگذاری درون چاهک ریخته شد. سپس الکتروفورز نمونه‌ها در ولتاژ ثابت 70 ولت انجام شد. پس از الکتروفورز رنگ آمیزی ژل توسط اتیدیوم بروماید انجام و پس از رنگ بری، باندها توسط دستگاه ژل داک مشاهده و ثبت گردید.

بررسی نرخ رشد جدایه ها در محیط حاوی غلظت‌های مختلف آرسنات

جدایه‌ها در محیط کشت مایع YEM و در درجه حرارت 28 درجه سانتی گراد به مدت 24 ساعت کشت داده شدند. بعد از رسوب سلول‌ها با سانتریفوژ کردن، رسوب حاصله در آب مقطر سترون به غلظت نهائی 10^7 کلنی در میلی لیتر حل گردید. 10 میکرولیتر از سوسپانسیون حاصله به 10 میلی لیتر محیط کشت YEM حاوی غلظت های 400- 100 میلی مولار سدیم آرسنات تلقیح شد. لوله های حاوی محیط کشت سپس بر روی دستگاه تکان دهنده با سرعت 150 دور در دقیقه و در 28 در جه سانتی گراد قرار داده شد. رشد سلول‌های باکتریائی در مدت 72 ساعت و براساس دانسیته نوری در طول موج 600 نانومتر اندازه‌گیری شد (کاراسکو و همکاران، 2005).

آزمایشات گلخانه‌ای (تأثیر باکتری‌ها در میزان افزایش زیست توده گیاهی)

گلدان‌های حاوی خاک (سیلیکا: 28/44%، رس: 14/44%، شن: 57/12%، هدایت الکتریکی: 2/7ms/cm و pH:7/24) ضدعفونی شده توسط اتوکلاو کردن به اضافه سدیم آرسنات (100، 75، 50 و 10 میلی گرم بر کیلوگرم خاک) یا بدون آن (شاهد) تهیه و جهت تثبیت آرسنات به مدت چهار هفته نگهداری گردید. پس از آن بذور یونجه (رقم همدانی) و نخود (رقم کابلی) پس از ضدعفونی سطحی در گلدان‌ها کشت گردید. سپس 5 میلی لیتر سوسپاسیون باکتری (از غلظت 10^{10} 1× پرگنه بر میلی لیتر) به گلدان‌ها اضافه گردید و هردو روز یکبار آبیاری انجام شد. هشت هفته پس از تلقیح وزن تر اندام‌های هوائی (FS) و ریشه (FR) محاسبه گردید. سپس نمونه-های گیاهی توسط آب مقطر سترون شستشو و پس از خشک کردن در 70 درجه سانتی‌گراد به مدت 48 ساعت مجدداً وزن خشک اندام‌های هوائی (DS) و ریشه (DR) محاسبه گردید. آزمایشات گلخانه‌ای بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار انجام شد.

Archive of SID

www.SID.ir

تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌های بدست آمده با روش تجزیه واریانس و با استفاده از نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقایسه میانگین با آزمون LSD و در سطح احتمال 1% انجام و نمودارها توسط نرم افزار اکسل رسم گردید.

نتایج

تعیین مشخصه و شناسائی باکتری‌های جدا شده

در مجموع 12 جدایه از خاک مناطق آلوده و گره‌های بقولات مانند یونجه، نخود و یونجه زرد جداسازی گردید. کلیه جدایه‌ها گرم منفی، میله‌ای شکل و دارای یک تاژک قطبی، هوازی و بر روی محیط کشت YEMA پرگنه‌های سفید تا شیری رنگ و کروی تولید کردند. سایر خصوصیات بیوشیمیائی و فیزیولوژیکی جدایه‌ها در جدول 1 آورده شده است. براساس نتایج بدست آمده سویه‌های جداشده از یونجه در بسیاری از خصوصیات *Ensifer meliloti* و سویه‌های جداشده از نخود واجد خصوصیات مشابه *Rhizobium leguminosarum* تشخیص داده شدند.

بررسی وجود احتمالی ژن *arsC* توسط PCR

وجود ژن مقاومت به آرسنیک در جدایه‌ها با استفاده از واکنش زنجیره های پلیمراز مورد بررسی قرار گرفت. پس از انجام واکنش با استفاده از آغازگرهای مربوط به ژن مقاومت *arsC* یک قطعه DNA مورد نظر با اندازه تقریبی 400 جفت باز در ده جدایه تکثیر گردید (شکل 1). فهرست جدایه هائی که قطعه مورد نظر در آنها تکثیر گردید در جدول 2 آمده است. سویه *Sinorhizobium meliloti* RM1021 فاقد ژن مورد نظر بوده و در واکنش بعنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت. لازم به ذکر است که اثبات نهایی ژن مذکور نیاز به توالی یابی دارد که البته در این پژوهش انجام نشد.

مقاومت جدایه‌ها به غلظت‌های مختلف سدیم آرسنات

تمامی جدایه‌ها جهت توانائی رشد در محیط مایع حاوی 400- 100 میلی مولار در لیتر سدیم آرسنات مورد بررسی قرار گرفت. تمامی جدایه مقاوم به غلظت 100 میلی مولار در لیتر، 8 جدایه به 250 میلی مولار در لیتر، 5 جدایه به 350 میلی مولار در لیتر و فقط 3 جدایه توانائی تحمل غلظت 400 میلی مولار در لیتر سدیم آرسنات را داشتند (جدول2). نتایج نشان داد با افزایش غلظت آرسنات در محیط رشد جدایه‌ها کاهش پیدا کرد. جدایه‌هائی که واجد ژن مقاومت *arsC* بودند در محیط حاوی 100 میلی مولار در لیتر سدیم آرسنات رشد بهتری داشتند. تمامی جدایه‌ها در غلظت های 400- 200 میلی مولار بر لیتردارای مرحله رشد ثابت اولیه (Lag phase) طولانی‌تری بودند و رشد لگاریتمی بعد از 18- 12 ساعت شروع شد. سرعت رشد جدایه‌ها در غلظت‌های بالاتر سدیم آرسنات بصورت چشمگیری کاهش یافته است.

تأثیر باکتری‌ها بر روی تولید زیست توده گیاهی

دو سویه باکتری AB1 و PA2، به ترتیب جدا شده از یونجه و نخود با توانائی تحمل غلظت بالای آرسنیک جهت آزمایشات گلخانه‌ای انتخاب شدند. میزان تولید زیست توده اندام‌های هوائی و ریشه در گیاهان تلقیح شده با باکتری با گیاهان تلقیح نشده مقایسه گردیدند. وزن تر (FW) (F=40.22, df= 20, P=<0.0001) و وزن خشک (DW) (F=45.13, df=20, P<0.0001) اندام‌های هوائی یونجه با افزایش غلظت آرسنیک در خاک کاهش پیدا کرد. نتیجه مشابهی برای وزن تر (FR) (F=10.69, df=20, P=0.0001) و وزن خشک (DR) (F=6.73, df=20, P= 0.013) ریشه یونجه بدست آمد (شکل2 الف، ب، ج، د).

در تمامی تیمارهای ذکر شده در بالا گیاهان تلقیح شده توسط سویه باکتری AB1 وزن تر و خشک اندام‌های هوایی و ریشه افزایش معناداری را نسبت به تیمار شاهد نشان دادند. میانگین FW، DW، FR و DR در گیاهان تلقیح شده توسط باکتری به ترتیب 69، 75، 79 و 82% بالاتر از گیاهان تلقیح نشده بود. بعلاوه تأثیر غلظت آرسنیک در DW (P= 0.03) و FR (P=0.0013) معنی‌دار بود اما تأثیر آن در FW (P=0.0523) و DR (P=0.0753) معنی‌دار مشاهده نشد (جدول 3).

وزن تر (FW) (F=26.68, df= 20, P=<0.0001) و وزن خشک (DW) (F=34.3, df=20, P<0.0001) اندام‌های هوائی نخود با افزایش غلظت آرسنیک در خاک کاهش پیدا کرد. نتیجه مشابهی برای وزن تر (FR) (F=13.06, df=20, P=0.0001) و وزن خشک (DR) (F=13.07, df=20, P= 0.0001) ریشه نخود بدست آمد (شکل3 الف، ب، ج، د).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول 1- خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیائی جدایه های مورد مطالعه در این تحقیق

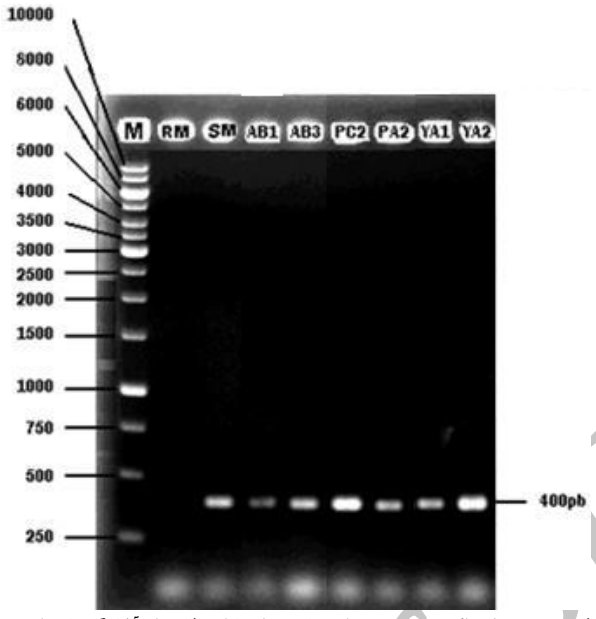
خصوصیت	AB1	AB2	AB3	PA1	PA2	PB1	PB2	PC1	PC2	PC3	YA1	YA2	RL*	SM**
رشد سریع در محیط YEMA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
رشد در 28°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
رشد در 35°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
رشد در 40°C	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
رشد در اسیدیتی:														
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
رشد در نمک طعام 1%	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+
رشد در نمک طعام 2%	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+
رشد در نمک طعام 4%	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+
رشد در محیط لوریا برتانی	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
تولید هیدروژن سولفوره از سیستئین	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+
واکنش اسیدی در شیر لیتموس	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+

خصوصیت	AB1	AB2	AB3	PA1	PA2	PB1	PB2	PC1	PC2	PC3	YA1	YA2	RL	SM
تولید کتولاکتوز	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
واکنش به بیوتین	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
استفاده از:														
دولسیتول	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ال -لاکتات	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
پیرووات	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
دی ال - فنیل آلانین	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
تشکیل گره در یونجه	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
تشکیل گره در نخود	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-

*Rhizobium leguminosarum, **Sinorhizobium meliloti*

Archive of SID

www.SID.ir



شکل 1- الکتروفورز محصول واکنش زنجیره ای پلی مراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *arsC*

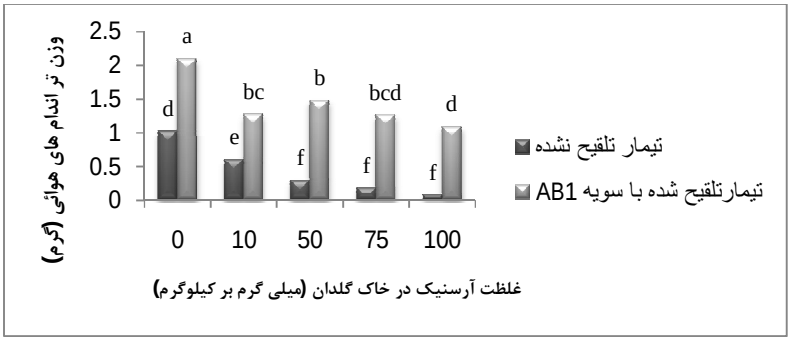
جدول 2- محل جمع آوری، میزبان و میزان مقاومت جدایه ها به سدیم آرسنات

جدایه باکتری	میزبان	مکان جمع آوری	غلظت آرسنیک در خاک (ppm)	تشخیص ژن *arsC*	میزان مقاومت به آرسنات		
					250 mM	350 mM	400 mM
AB1	یونجه	دلبران	300	+	+	+	+
AB2	یونجه	دلبران	300	-	-	-	-
AB3	یونجه	دلبران	300	+	+	+	-
PA1	نخود	بهارلو	261	-	-	-	-
PA2	نخود	بهارلو	261	+	+	+	+
PB1	نخود	بهارلو	261	-	-	-	-
PB2	نخود	بهارلو	261	+	+	-	-
PC1	نخود	بهارلو	261	+	+	-	-
PC2	نخود	بهارلو	261	+	+	+	-
PC3	نخود	بهارلو	261	-	-	-	-
YA1	یونجه زرد	بهارلو	160	+	+	+	+
YA2	یونجه زرد	بهارلو	160	+	+	-	-
RM[a]	-	-	-	-	-	-	-
SM[b]	-	-	-	+	+	+	-
RL[c]	-	-	-	+	+	-	-

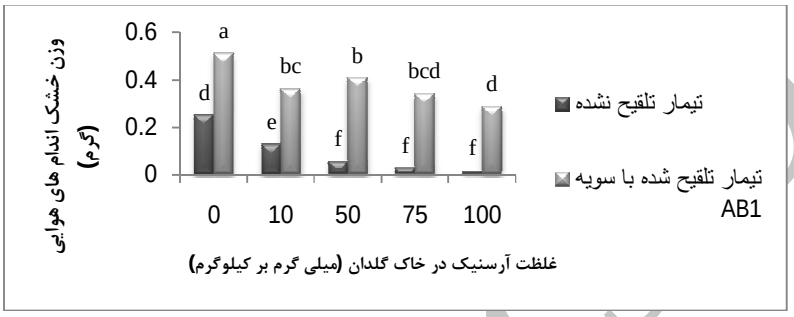
[a]RM: *Sinorhizobium meliloti* RM1021; [b]SM: *S. meliloti* SM117; [c]RL: *Rhizobium legominosarum* bv. *viciae* RM2484

Archive of SID

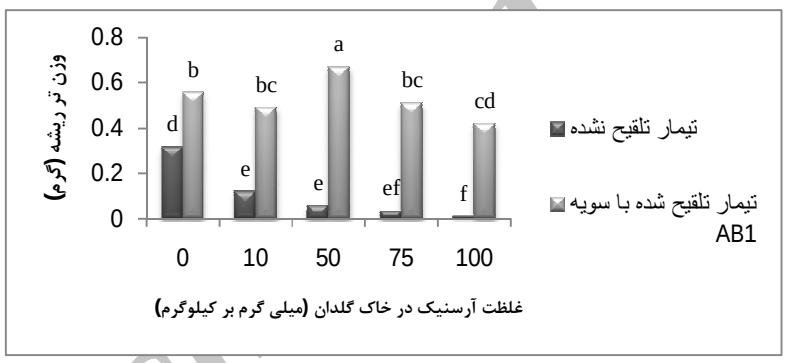
www.SID.ir



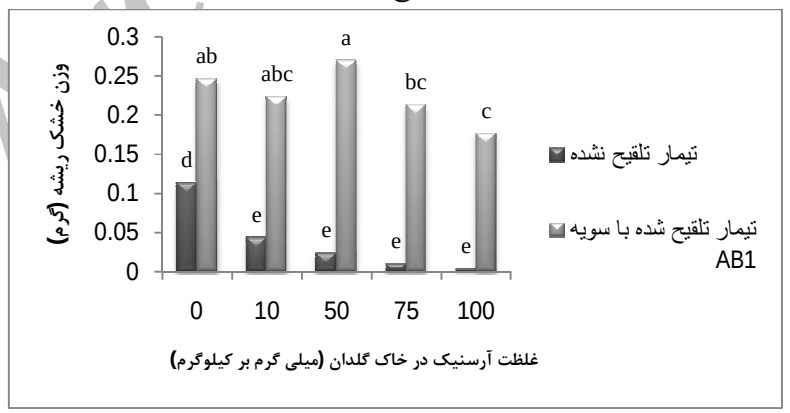
(الف)



(ب)



(ج)



(د)

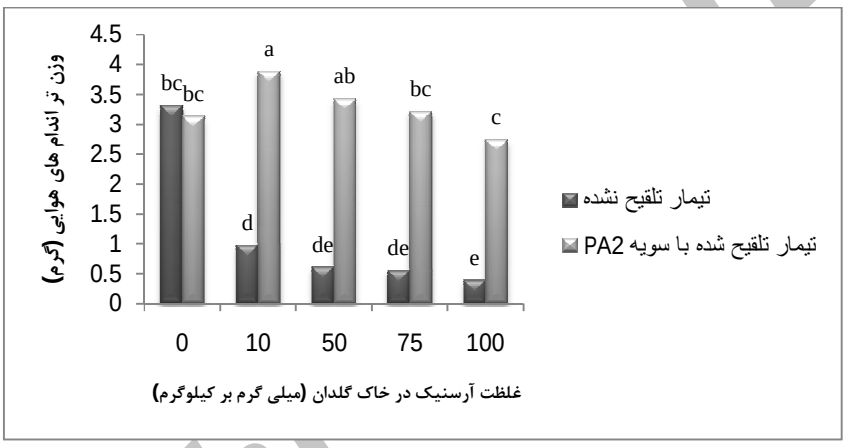
شکل 2- تأثیر غلظت های مختلف آرسنیک در خاک بر روی رشد یونجه تحت تیمار تلقیح شده توسط سویه AB1 در مقایسه با تیمار شاهد. الف) وزن تر اندام های هوائی ب) وزن خشک اندام های هوائی ج) وزن تر ریشه د) وزن خشک ریشه. ستونهای نشان داده شده توسط حروف یکسان فاقد اختلاف معنی‌دار هستند

www.SID.ir

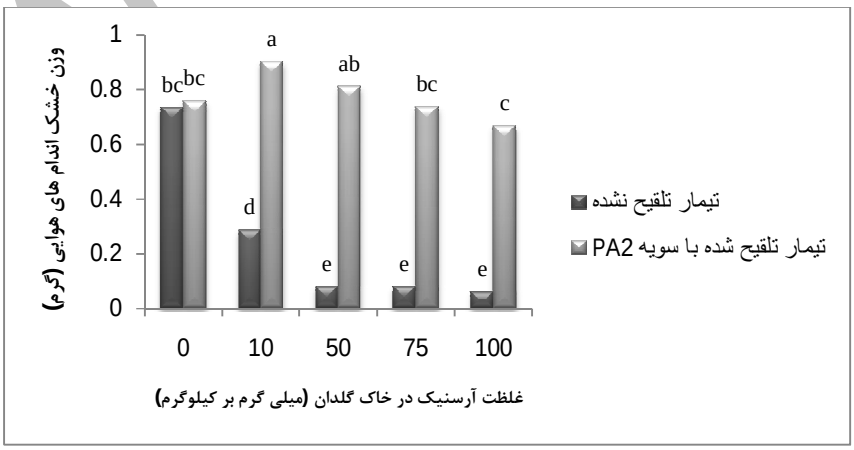
جدول 3- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) تأثیرغلظت های مختلف آرسنیک بر رشد گیاه یونجه با تلقیح و بدون تلقیح باکتری

منابع تغییر	درجه آزادی	وزن تر اندام هوایی (گرم)	وزن خشک اندام هوایی (گرم)	وزن تر ریشه (گرم)	وزن خشک ریشه (گرم)
آرسنیک	4	0/836**	0/046**	0/043**	0/007**
تلقیح	1	7/55**	0/616**	1/33**	0/263**
اثر متقابل	4	0/058ns	0/003*	0/027**	0/002ns
خطا	20	0/020	0/001	0/004	0/001
ضریب تغییرات CV%	-	15/44	13/52	20/09	24/40

**،* به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال 1% و 5%

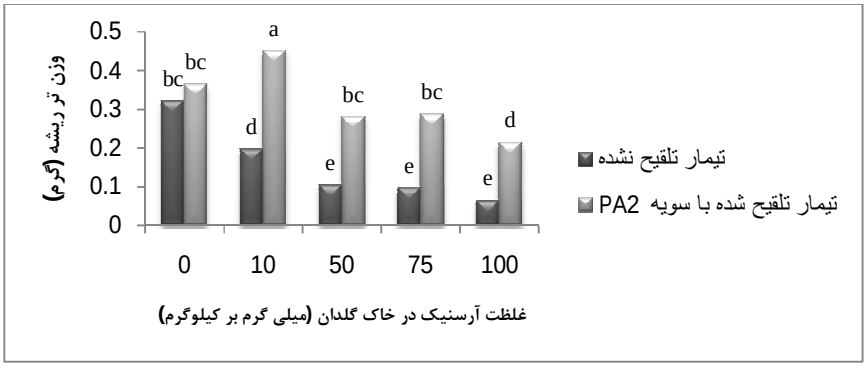


(الف)

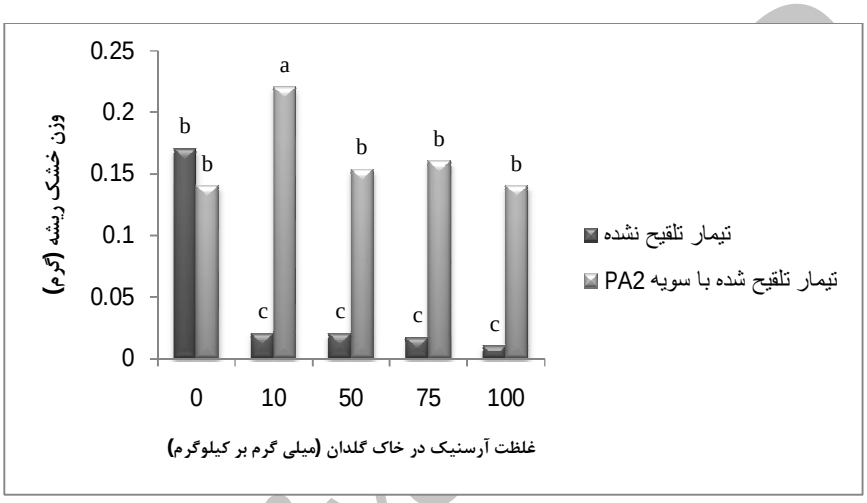


(ب)

www.SID.ir



(ج)



(د)

شکل 3- تأثیر غلظت های مختلف آرسنیک در خاک بر روی رشد نخود تحت تیمار تلقیح شده توسط سویه PA2 در مقایسه با تیمار شاهد. الف) وزن تر اندام های هوائی ب) وزن خشک اندام های هوائی ج) وزن تر ریشه د) وزن خشک ریشه. ستونهای نشان داده شده توسط حروف یکسان فاقد اختلاف معنی دار هستند

در تمامی تیمارهای ذکر شده در بالا گیاهان تلقیح شده توسط سویه باکتری PA2 وزن‌تر و خشک اندام‌های هوایی و ریشه افزایش معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد نشان دادند. میانگین FW، DW، FR و DR در گیاهان تلقیح شده توسط باکتری به ترتیب 64، 68، 50 و 70% بالاتر از گیاهان تلقیح نشده بود. بعلاوه تأثیر غلظت آرسنیک در FW، DW و DR ($P<0.0001$) معنادار بود اما تأثیر آن در FR ($P=0.085$) معنی‌دار مشاهده نشد (جدول 4).

جدول 4- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) تأثیر غلظت های مختلف آرسنیک بر رشد گیاه نخود با تلقیح و بدون تلقیح باکتری

منابع تغییر	درجه آزادی	وزن تر اندام هوایی (گرم)	وزن خشک اندام هوایی (گرم)	وزن تر ریشه (گرم)	وزن خشک ریشه (گرم)
آرسنیک	4	0/147*	2/44**	4	0/006**
تلقیح	1	2/075**	33/32**	1	0/099**
اثر متقابل	4	0/122**	2/54**	4	0/011**
خطا	20	0/004	0/091	20	0/0004
ضریب تغییرات CV%	-	12/82	13/64	-	21/01

**،* به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال 1% و 5%

Archive

www.SID.ir

بحث

آرسنیک یکی از مهمترین عناصر آلوده کننده محیط زیست می‌باشد. این فلز سنگین بصورت طبیعی در غلظت‌های زیاد در برخی مناطق کردستان وجود دارد و تأثیر مستقیمی بر روی سلامت مردم این مناطق گذاشته است. گیاه پالائی یکی از روش‌های نوین در اصلاح خاک ها می باشد که هدف از آن کاهش میزان آلودگی خاک به عناصر سنگین از قبیل آرسنیک با استفاده از گیاهان است (ما و همکاران، 2001). برخی تحقیقات نشان می‌دهد که سویه‌های ریزوبیا نسبت به غلظت‌های بالای آرسنیک موجود در خاک حساس هستند بنابراین شناسائی سویه-های ریزوبیای مقاوم به این فلز سمی می‌تواند تلاشی در جهت استفاده از گیاهان بقولات در پالایش خاک‌های آلوده باشد (چاودوری و همکاران، 1992؛ گیلر و همکاران، 1999). برخی عناصر میکروبی موجود در خاک از قبیل باکتری‌های ریزوبیا واجد سیستم ژنتیکی هستند که آنها را قادر می‌سازد تأثیرات سمی آرسنیک را خنثی نمایند (ساپریرا و همکاران، 2007).

براساس یافته‌های قبلی تعدادی از باکتری‌های *Rhizobium* مقاوم به آرسنیک گزارش شده‌اند (پاجلو و همکاران، 2008؛ کاراسکو و همکاران، 2005). گیاهان دارای توان برقراری رابطه همزیستی با باکتری‌های ریزوبیا دارای پتانسیل استفاده در گیاه پالایی هستند (اسرپیرنگ و همکاران، 2002؛ ایکه و همکاران، 2007؛ کاراسکو و همکاران، 2005). در مطالعه حاضر چندین جدایه ریزوبیا از گیاهان رشد کرده در خاک‌های آلوده به آرسنیک جداسازی گردید و مقاومت به آرسنیک در آنها مورد تأیید قرار گرفت و این اولین گزارش از وجود جدایه‌های مقاوم به آرسنیک از ایران است. گیاهان رشد کرده در مناطق آلوده دارای گره‌های سالم با اندازه معمولی و فعال بودند. توانائی جدایه‌ها برای رشد در محیط حاوی غلظت‌های بالای آرسنیک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که جدایه‌های دارای ژن مقاومت به آرسنیک، ژن *arsC*، به غلظت‌های بالاتر آرسنیک مقاوم تر بودند. میزان مقاومت قابل توجه بوده و مشابه میزان مقاومت در سایر باکتری‌ها بود (جکسون و همکاران، 2005؛ سیلور، 1996). سویه‌های باکتریایی با درجه تحمل حدود 500- 300 میلی مولار غلظت آرسنیک جزو باکتری‌های فوق متحمل طبقه‌بندی می‌شوند (جکسون و همکاران، 2003). از آنجائی که برخی سویه‌های مورد مطالعه در این تحقیق توانایی تحمل غلظت‌های بالای آرسنیک تا حدود 400 میلی مولار را دارا بودند، بنابراین می‌توان آنها را در این گروه قرار داد. ژن *arsC* آنزیم آرسنات ردوکتاز را که یک ژن تقریباً دست نخورده است کد می‌نماید (موخوپادهیای و همکاران، 2002). وجود این ژن موجب ایجاد مقاومت نسبت به آرسنیک می‌شود. ژن *arsC* به همراه سایر ژنهای دخیل در سیستم مقاومت به آرسنیک (سیستم *ars*) در بسیاری از پروکاریوت‌ها گزارش شده‌اند و در مکانیزم تغییر آرسنیک به فرم محلول و نامحلول در طبیعت و تنظیم میزان سمیت آن نقش اساسی دارند (جکسون و همکاران، 2003). باتوجه به اینکه برخی جدایه‌های مورد مطالعه در این تحقیق نیز واجد این سیستم مقاومتی تشخیص داده شدند می‌توان از این جدایه‌ها در فرآیندهای سمیت زدائی آرسنیک از خاک استفاده نمود. اگرچه نیاز است مکانیزم مقاومت سویه‌ها به آرسنیک به صورت دقیق‌تر مورد بررسی قرار گیرد اما براساس میزان مقاومت بدست آمده در این تحقیق می‌توان برخی از سویه‌ها را کاندیدای مناسبی برای استفاده در مکانیزم‌های پالایش خاک یا سمیت زدایی معرفی نمود. در مقایسه، برخی سویه‌ها مانند *Corynebacterium glutamicum* که بصورت تجاری و در جهت پالایش آب‌های آلوده به آرسنیک مورد استفاده قرار می‌گیرند دارای میزان مقاومتی مشابه با سویه‌های گزارش شده در این تحقیق هستند (ماتئوس و همکاران، 2006). جدایه‌هائی که فاقد این ژن بودند توانائی تحمل غلظت های بالاتر سدیم آرسنات را نداشتند. بررسی میزان رشد جدایه‌ها در حضور غلظت‌های مختلف سدیم آرسنات نشان دهنده تفاوت در میزان مقاومت جدایه‌ها بود. به صورت معمول جدایه‌هائی که توانائی رشد در غلظت 4% نمک طعام را نداشتند به غلظت‌های بالای سدیم آرسنات هم حساس بودند. تمامی جدایه‌ها در غلظت‌های بالای سدیم آرسنات دارای مرحله رشد ثابت اولیه طولانی‌تری بودند اما جدایه‌های دارای ژن مقاومت در غلظت‌های بالاتر بهتر قادر به رشد بودند.

نکته مهمی که بایستی مورد توجه قرار گیرد آن است که آلودگی خاک به فلزات سنگین نه تنها بر روی رشد بقولات تأثیر می‌گذارد بلکه موجب کاهش ماندگاری جمعیت میکروبی خصوصاً در شرایط عدم حضور گیاه میزبان می‌شود (بروس و همکاران، 2004). نتایج برخی مطالعات نشان می‌دهد که تأثیر فلزات سمی مانند آرسنیک بر روی رابطه همزیستی بقولات- باکتری درصورت مقاوم بودن سویه باکتری به مراتب کمتر خواهد بود و این سویه‌ها دارای توان رقابتی بالاتری نسبت به سویه‌های حساس خواهند بود. بنابراین استفاده از این سویه‌ها در خاک‌های آلوده می‌تواند مفید باشد (پاجئلو و همکاران،

Archive of SID

www.SID.ir

2008). در این تحقیق میزان مقاومت دو سویه باکتری جدا شده از یونجه و نخود رشد یافته در مناطق آلوده به آرسنیک به این فلز و نقش احتمالی آنان در رابطه گیاه باکتری مورد مطالعه قرار گرفت. براساس نتایج بدست آمده، هردو سویه به غلظت 400 میلی مولار بر لیتر آرسنیک مقاوم بودند و این بالاترین میزان مقاومت گزارش شده به این عنصر سمی تاکنون است (هوانگ و همکاران، 2012). هردو سویه واجد ژن *arsC* یعنی ژن مقاومت به آرسنیک بودند که تأیید کننده فعالیت سیستم مقاومتی *ars* در این دو سویه است. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که وزن تر و خشک ریشه و اندام‌های هوائی یونجه و نخود در گیاهان تلقیح نشده با سویه‌های باکتری با افزایش غلظت آرسنیک در محیط کاهش یافت. این نتایج با یافته‌های قبلی مشابهت دارد (ریچمن، 2007). میزان توسعه ریشه در این گیاهان بصورت معناداری کاهش پیدا کرد. نتایج مشابه این نوع تأثیر قبلاً گزارش شده است (پاجلو و همکاران، 2008). مقایسه میزان افزایش زیست توده گیاهان تلقیح شده با سویه‌های باکتری و گیاهان شاهد (عدم تلقیح) نشان داد که میزان اختلاف وزن خشک (DW) و وزن تر (FW) اندام‌های هوایی و ریشه آنها معنی‌دار بود. افزایش غلظت آرسنیک موجب بروز تفاوت بارزتری بین زیست توده تولیدی گیاهان تلقیح شده و تلقیح نشده شد. این نتایج نشان می‌دهد که با افزایش غلظت آرسنیک باکتری‌ها همچنان فعال بوده و به رشد بهتر گیاه کمک می‌نمایند. نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که تلقیح سویه‌های ریزوبیای مقاوم به آرسنیک می‌تواند موجب افزایش میزان زیست توده اندام‌های هوائی و ریشه گیاهان رشد یافته در خاک-های آلوده به غلظت‌های بالای آرسنیک شود. طبق نتایج بدست آمده، تمامی فاکتورهای رشدی افزایش حداقل 50% زیست توده گیاهان تلقیح شده با سویه‌های باکتری در مقایسه با گیاهان تلقیح نشده مشاهده شد. بنظر می‌رسد باکتری‌های ریزوبیا مقاوم به آرسنات با افزایش میزان در دسترس بودن نیتروژن و فسفر، تولید هورمون‌های گیاهی (مانند اندول استیک اسید، سیتوکینین و جیبرالین) ترشح ترکیبات سیدروفوری و اسیدهای آلی و سنتز آمینو سیکلوپروپان کربوکسیلات دی آمیناز موجب تحریک رشد گیاه شده که نتیجه آن افزایش زیست توده گیاهی است. بعلاوه با استفاده در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین می‌توانند موجب پالایش آنها از خاک و یا تبدیل فلزات به فرم غیر سمی شوند (هاو و همکاران، 2014). اگر چه مطالعات بیشتری در خصوص استفاده از این جدایه‌ها به همراه گیاهان همزیست باید انجام شود تا توانائی آنان در پالایش خاک‌های آلوده به آرسنیک مورد سنجش قرار گیرد.

فهرست منابع:

1. Carrasco, J.A., Armario, P., Pajuelo, E., Burgos, A., Caviedes, M.A., Lopez, R., Chamber, M.A., Palomares, A.J. 2005. Isolation and characterisation 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.
2. Broos, K., Uyttebroek, M., Mertens, J. and Smolders, E. 2004. A survey of symbiotic nitrogen fixation by white clover grown on metal contaminated soils. Soil Biology and Biochemistry 36: 633-640.
3. Chaudri, A.M., McGrath, S.P. and Giller, K.E. 1992. Survival of the indigenous population of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* in soil spiked with Cd, Zn, Cu and Ni salts. Soil Biology and Biochemistry 24:625-632.
4. Chowdhury, T.R., Basu, G.K., Mandal, B.K., Biswas, B.K., Samanta, G., Chowdhury, U.K., Chanda, R.K., Lodh, D., Roy, S.L., Saha, K.C., Roy, S., Kabir, S., Quamruzaman, Q. and Chakraborti, D. 1999. Arsenic poisoning in Gandes Delta. Nature 401:545-546.
5. Giller, K.E., Witter, E. and Mcgrath, S. 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. Soil Biology and Biochemistry 30:1389-1414.
6. Hao, X., Taghavi, S., Xie, P., Orbach, M.J., Alwathnani, H.A., Rensing, C. and Wei, G. 2014. Phytoremediation of heavy and transition metals aided by Legume-Rhizobia symbiosis. International Journal of Phytoremediation 16: 179-202.

Archive of SID

www.SID.ir

7. Huang, A., Teplitski, M., Rathinasabapathi, B. and Ma, L. 2010. Characterization of arsenic-resistant bacteria from the rhizosphere of arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata*. Canadian Journal of Microbiology 56:236-246.
8. Ike, A., Sriprang, R., Ono, H., Murooka, Y. and Yamashita, M. 2007. Bioremediation of cadmium contaminated soil using symbiosis between leguminous plant and recombinant rhizobia with the MTL4 and the PCS genes. Chemosphere 66:1670-1676.
9. Jack, C.N., Wang, J. and Shraim, A.A. 2003. Global health problem caused by arsenic from natural sources. Chemosphere 52:1353-1359.
10. Jackson, C.R., Jackson, E.F., Dugas, S.L., Gamble, K. and Williams, S.E. 2003. Microbial transformations of arsenite and arsenate in natural environments. Recent Research Developments in Microbiology 7: 103-118.
11. Jackson, C.R., Dugas, S.L. and Harrison, K.G. 2005. Enumeration and characterization of arsenate-resistant bacteria in arsenic free soils. Soil Biology and Biochemistry 37:2319-2322.
12. Lafuente, A., Perez-Palacios, P., Doukkali, B., Molina-Sanchez, M.D., Jimenez-Zurdo, J.I., Caviedes, M.A., Rodriguez-Liorente, I.D., Pajuelo, E. 2015. Unraveling the effect of arsenic on the model *Medicago-Ensifer* interaction: a transcriptomic meta-analysis. New Phytologist 205: 255-272.
13. Ma, L.Q., Kumar, K.M., Tu, C., Zhang, W., Cai, Y. and Kennelly, E.D. 2001. A fern that hyperacumulates arsenic. Nature 409:579.
14. Mandal, S.M., Pati, B.R., Das, A.K. and Ghosh, A.K. 2008. Characterization of a symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic: isolated from the root nodules of *Vigna mungo* (L.) Hepper grown in an arsenic-contaminated field. Journal of General and Applied Microbiology 54:93-99.
15. Mateos, L.M., Ordonez, E., Letek, M. and Gil, J.A. 2006. *Corynebacterium glutamicum* as a model bacterium for the bioremediation of arsenic. International Microbiology 9: 207-215.
16. Mosaferi, M., Yunesian, M., Mesdaghinia, A.R., Nadim, A., Naseri, S. and Mahvi, A.H. 2003. Occurrence of arsenic in Kurdistan Province of Iran. In BUET-UNU international symposium, international training network centre. Dhaka. Bangladesh, Tokyou.
17. Mukhopadhyay, R., Rosen, B.P., Phung, L.T. and Silver, S. 2002. Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. FEMS Microbiological Review 26:311-325.
18. Pajuelo, E., Rodrı´guez-Llorente, I.D., Dary, M. and Palomares, A.J. 2008. Toxic effects of arsenic on *Sinorhizobium-Medicago sativa* symbiotic interaction. Environmental Pollution 154:203-211.
19. Reichman, S.M. 2007 The potential use of the legume–rhizobium symbiosis for the remediation of arsenic contaminated sites. Soil Biology and Biochemistry 39:2587–2593.
20. Sa-Pereira, P., Rodrigues, M., Videira e Casatro, I. and Simoes, F. 2007. Identification of an arsenic resistance in mechanism rhizobial strains. World Journal of Microbiology and Biotechnology 23:1351-1356.
21. Sarkar, A, Kazy, S.K. and Sar, P. 2013. Characterization of arsenic resistant bacteria from rich groundwater of West Bengal, India. Ecotoxicology 22:363-376.
22. Schaad, NW, Jones, J.B. and Chun, W. 2001. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. 3nd edition. The American Phytopathological Society, St. Paul. Minnesota, USA.
23. Silver, S. 1996. Bacterial resistances to toxic metal ions: a review. Gene 179:9–19.
24. Sriprang, R., Hayashi, M., Yamashita, M., Ono, H., Saeki, K. and Murooka, Y. 2002. A novel bioremediation system for heavy metals using the symbiosis between leguminous plant and genetically engineered rhizobia. Journal of Biotechnology 99:279-293.

Archive of SID

www.SID.ir

25. Talano, M.A., Cejas, R.B., Gonzalez, P.S. and Agostini, E. 2012. Arsenic effect on the model crop symbiosis Bradyrhizobium-soybean. Plant Physiology and Biochemistry 63:8–14.
26. Teng, Y., Wang, X., Li, L., Li, Z. and Luo, Y. 2015. Rhizobia and their bio-partners as novel drivers for functional remediation in contaminated soils. Frontiers in Plant Science 6:1-11.
27. Vazquez, S., Esteban, E. and Carpena, R.O. 2008. Evolution of arsenate toxicity in nodulated white lupine in a long-term culture. Journal of Agricultural Food Chemistry 56:8580–8587.
28. Vincent, J.M. 1970. A manual for the practical study of the root nodule bacteria. Blackwell Scientific Publication, Oxford.
29. Wang, Q., Xiong, D., Zhao, P., Yu, X., Tu, B. and Wang, G. 2011. Effect of applying an arsenic-resistant and plant growth-promoting rhizobacterium to enhance soil arsenic phytoremediation by *Populus deltoids* LH05-17. Journal of Applied Microbiology 111:1065-1074.
30. Yang, H.C., Cheng, J.J., Finan, T.M., Rosen, B.P. and Bhattacharjee, H. 2005 Novel pathway for arsenic detoxification in the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. Journal of Bacteriology 187: 6991–6997.
31. Zandsalimi, S., Karimi, N. andKohandel, A. 2011. Arsenic in soil, vegetation and water of a contaminated region. International Journal of Environmental Science and Technology 8: 331-33.

Archive of SID

www.SID.ir

Characterization of rhizobial bacteria isolated from arsenic-contaminated site in south-eastern Kurdistan province and their influence on plant growth

R. Saadati, B. Bahramnejad, and B. Harighi[1]
Former MSc. Student of University of Kurdistan; E-mail: rahimeh_saadati@yahoo.com
Associate professor, University of Kurdistan; E-mail: bbahramnejad@uok.ac.ir
Associate Professor, University of Kurdistan; E-mail: BHarighi@uok.ac.ir
Received: April, 2015 & Accepted: October, 2016

Abstract

Symbiotic bacteria associated with the root of legume plants were isolated from soil and the root nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.), chickpea (*Cicer arietinum* L.) and yellows alfalfa (*Melilotus officinalis* L.) grown in arsenic-contaminated areas in south eastern part of Kurdistan province, Iran. According to physiological and biochemical properties, isolates were identified as the members of *Rhizobium* and *Ensifer* genus. The presence of arsenic resistant system known as *ars* system was confirmed by amplification using primers corresponding to *arsC* gene. Growth rate of strains in different concentrations of arsenate was investigated in YEMB medium supplemented with 100-400 mM arsenate. Alfalfa's isolates (AB1, AB3), chickpea's isolates (PA2, PC2), yellow alfalfa's isolate (YA1) and standard strain (*Sinorhizobium meliloti* SM117) were tolerant to 350 mM arsenate and (AB1, PA2 and YA1) isolates were moderately capable to grow at 400 mM arsenate. Among the identified strains, AB1 and PA2, were selected for greenhouse experiments. In order to evaluate the effect of arsenic contamination on legume-rhizobia symbiosis and biomass production of alfalfa and chickpea plants, an experiment was carried out based on a completely randomized design with a factorial arrangement in three replications. Experiment factors consisted of, three levels of rhizobia inoculation (with and without inoculation of AB1 and PA2) and five levels of arsenic concentrations (0. 10, 50, 75 and 100 $mgkg^{-1}$ soil) under greenhouse conditions for 8 weeks. Results obtained in this study indicated that the fresh weight and dry weight of alfalfa and chickpea (shoot and root) were decreased as the arsenic concentration of the soil was increased. The results also showed that fresh and dry shoot and root weight of alfalfa and chickpea were significantly higher in rhizobia-inoculated treatments compared to non-inoculated plants.

Keywords: Arsenic resistance, Legumes, *Rhizobia*

[1]. Corresponding author: Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj.

Archive of SID

www.SID.ir