شناسایی فیلوژنیک باکتری های تثبیت کننده نیتروژن جدا شده از ریزوسفر گیاه مارچوبه با استفاده از 16s rRNA و بررسی اثر فلز روی بر سویه جدا شده

محمد دادوک[1]، محسن بیگلریان[2*]، صدیقه مهرابیان[1]، حکیمه زالی[2]، مونازمانیان عضدی[2]، میترا صالحی[1]، محمد حسین ملکی[3]، محسن زرگر[4]

1)گروه میکروبیولوژی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی
2)مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران
3)گروه میکروب شناسی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام
4)گروه میکروبشناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم

تاریخ دریافت: **تاریخ پذیرش:**

چکیده

مقدمه: با توجه به نقش میکروارگانیسم های تثبیت کننده نیتروژن در حاصلخیزی خاک و رشد و نمو گیاهان، استفاده از کود شیمیای سولفات روی (ZnSo4) به عنوان شاخصی ریز مغذی در کشاورزی مطرح می باشد. با توجه به اثرات سمی فلز روی، هدف این تحقیق جداسازی و شناسایی میکروارگانیسم های آزادزی تثبیت کننده نیتروژن از ریزوسفر گیاه مارچوبه و بررسی اثر سمی فلز روی بر رشد باکتری می باشد.

مواد و روش ها: به منظور جداسازی میکروارگانیسم های تثبیت کننده نیتروژن، نمونه های خاک از ریزوسفر گیاه مارچوبه تهیه و در محیط کشت فاقد نیتروژن با شرایط دمای 30 درجه سانتی گراد به مدت 48 ساعت کشت داده شد، شناسایی فیلوژنیک آن با استفاده از 16s rRNA انجام پذیرفت و MIC سویه جدا شده در غلظت های مختلف فلز روی تعیین گردید.

یافته های پژوهش: از میان نمونه های خاک ریزوسفر گیاه مارچوبه یک سویه باکتری جدا شد، که بررسی فیلوژنیک آن با استفاده از 16s rRNA گونه Acinetobacter calcoaceticus شناسایی شد و MIC گونه جدا شده در غلظت 52/32 ppm فلز روی ارزیابی گردید.

بحث و نتیجه گیری: یکی از سویه های تثبیت کننده نیتروژن در ریزوسفر گیاه مارچوبه باکتری Acinetobacter calcoaceticus می باشد، افزایش مصرف فلز روی باعث آسیب میکروارگانیسم شده و حداکثر میزان مجاز فلز روی در این بررسی، غلظت کمتر از 52/32 ppm می باشد.

واژه های کلیدی: تثبیت نیتروژن، گیاه مارچوبه، 16s rRNA، فلز روی(ZnSo4)

***نویسنده مسئول:** مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

Email: biglaryan@yahoo.com

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]

مقدمه

فلزات سنگین به گروهی از عناصر می گویند که دارای جرم اتمی بیش از 40 گرم و وزن مخصوص بیش از 5gr/cm3 می باشند (1) این ترکیب ها اغلب در قالب آلاینده های محیطی از جمله آلودگی های جوی مراکز صنعتی، استفاده افراطی از کود های کشاورزی و فاضلاب های شهری و صنعتی به صورت برگشت ناپذیر وارد خاک می شوند(2) بر خلاف آلاینده های آلی که می توانند به مواد غیر سمی تبدیل شوند، فلزات به طور ذاتی در طبیعت پایدار هستند(3).

برخی از این فلزات از جمله فلز روی (zn+2) در مقدار کم به عنوان ریز مغذی یک عنصر ضروری برای رشد و نمو گیاهان محسوب می شوند، در حالی که مقدار اضافی آنها در خاک موجب اختلالات متابولیکی و در نهایت بازدارندگی رشد در بیشتر گونه های گیاهی و میکروارگانیسم ها می شوند(4) یکی از مهمترین مکانیسم های سمیت فلزات سنگین از جمله فلز روی به عنوان عامل تنش زای محیطی از طریق تولید رادیکال های آزاد و ایجاد تنش اکسیداتیو می باشد(5).

به طور کلی تنوع و پراکنش میکروارگانیسم ها منعکس کننده حاصلخیزی خاک است. با توجه به این که نیتروژن یکی از عناصر مورد نیاز گیاهان می باشد میکروارگانیسم های تثبیت کننده نیتروژن با فرآیند تثبیت نیتروژن مولکولی، نیتروژن مورد نیاز را به صورت قابل مصرف در اختیار گیاه قرار می دهند و نقش مهمی در حاصلخیزی خاک دارند(6) این باکتری ها با تثبیت نیتروژن و تولید تیامین، ریبوفلاوین، نیکوتین، اندول استیک اسید (IAA) و جیبرلین در رشد سلولی گیاه موثر می باشند.(7) گونه های ازتوباکتر از میکروارگانیسم های آزادزی تثبیت کننده نیتروژن می باشد، متعلق به خانواده ازتوباکتریاسه، گرم منفی، پلی مرفیسم و قادر به تشکیل کپسول و میکروکیست هستند(8). تعداد زیادی از گونه های میکروارگانیسم های تثبیت کننده نیتروژن به نام تثبیت کننده های نیتروژن اندوفیت (endophyte) و آزادزی در دو سطح ریشه و ساقه گیاهان غیر تیره نخود، مانند گونه های Gluconacetobacter Azospirillum diazotrophicus، Herbaspirillum، Azoarcus، Enterobacter, Klebsiella Pseudomonas , Azorhizobium , Beijerinckia , Azotobacter, شناسایی شده اند(9).

در فرآیند تثبیت نیتروژن، نیتروژن مولکولی توسط سیستم آنزیمی نیترژناز به آمونیوم تبدیل می شود. این کمپلکس آنزیمی توسط فرآورده های ژن nif بیوسنتز می شود. ژن nif H یکی از مهمترین ژن های nif می باشد که در تشکیل کمپلکس Fe-protein نقش دارد(10). با تعیین توالی ژن nif H با PCR از طریق اثبات وجود nif DNA در باکتری ها می توان تشخیص داد که دارای سیستم آنزیمی نیتروژناز می باشند(11).

از این رو به علت نقش مهم میکروارگانیسم های تثبیت کننده نیتروژن در خاک های زراعی و اهمیت فلز روی به عنوان یک ریز مغذی در چرخه زیستی، استفاده از کود سولفات روی در زمین های زراعی و اثرات سمی فلز روی در محیط، در این بررسی یک سویه آزادزی تثبیت کننده نیتروژن از ریزوسفر گیاه مارچوبه جداسازی شده و میزان حساسیت آن به غلظت های مختلف فلز روی با استفاده از نمک سولفات روی (ZnSo4) در شرایط آزمایشگاهی بررسی می شود.

مواد و روش ها

نمونه برداری: نمونه خاک از عمق 30-0 سانتی متری ریزوسفر گیاه مارچوبه واقع در روستای ازنوا شهر بهنمیر استان مازندران در فصل اردیبهشت سال 1390 در ظروف سترون تهیه و به آزمایشگاه انتقال داده شد.

جداسازی میکروارگانیسم های تثبیت کننده نیتروژن از خاک های زراعی: به منظور جداسازی میکروارگانیسم های تثبیت کننده نیتروژن از نمونه های خاک رقت سریال 10-10-1-10 تهیه و به روش پورپلیت در محیط کشت مانیتول آگار فاقد منبع ازت حاوی ترکیبات مانیتول 10 گرم، فسفات دی پتاسیم 0/75 گرم، فسفات منوپتاسیم 0/25 گرم، سولفات منیزیم 0/5 گرم، کربنات کلسیم 3 گرم، مولیبدینات سدیم 0/02گرم، آگار 18گرم، آب مقطر 1000 میلی لیتر پور پلیت گردید. نمونه ها در دمای30 درجه سانتی گراد به مدت 48 ساعت گرم خانه گزاری شد و از نظر ماکروسکوپی و میکروسکوپی مورد ارزیابی قرار گرفتند. به منظور جداسازی بهتر، کشت باکتری ها در سه

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]

مرحله تکرار شد. جهت شناسایی سویه ها از روش متداول میکروبیولوژی شامل تست های بیوشیمیایی و 16s rRNA استفاده گردید(12، 13).

تهیه کشت تلقیح: کلنی های ایزوله شده در محیط کشت BHI آگار کشت داده شد و پس از گرم خانه گذاری در دمای 30 درجه سانتی گراد به مدت 24 ساعت کلنی باکتری در سرم فیزیولوژی سترون حل شده و در طول موج 600 نانومتر بر روی 1-0/8 تنظیم گردید که معادل 5x10-8 cfu/ml می باشد.

شناسایی ژن 16s rRNA: برای این منظور باکتری های ایزوله شده در محیط LB براث در شرایط هوازی و در دمای 30 درجه سانتی گراد کشت داده شد و بعد از 18 ساعت گرم خانه گذاری جهت رسوب گیری در دور 12000rpm به مدت 2 دقیقه سانتریفیوژ گردید. جهت تخلیص DNA ژنومیک از کیت استخراج MBSA DNA Extraction ساخت شرکت رشد استفاده گردید.

واکنش PCR: واکنش PCR در حجم نهایی 25 میکرولیتر (18 میکرولیتر آب PCR، 2/5 میکرولیتر بافر PCR، 1 میکرولیتر dNTPs، 1 میکرولیتر پرایمر Forward، 1 میکرولیتر پرایمر Reverse، 1 میکرولیتر DNA ژنومی، 0/5 میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymeraze) انجام گرفت. توالی پرایمر استفاده شده برای ژن 16s rRNA به ترتیب زیر بوده است:

16s F: GAGTTGGATCCTGGCTCAG
16s R: AGGAGGTGATCCAGCCGCA

واکنش به صورت دناتوراسیون DNA به مدت 1 دقیقه در دمای 95 درجه سانتی گراد، دناتوراسیون ثانویه با قرار دادن در دمای 95 درجه سانتی گراد به مدت 1 دقیقه الحاق پرایمرها به DNA هدف در دمای 50 درجه سانتی گراد به مدت 30 ثانیه و توسعه پرایمر در 72 درجه سانتی گراد به مدت 1 دقیقه در 30 چرخه تکرار و سرانجام 10 دقیقه واکنش در 72 درجه سانتی گراد صورت گرفت.

مشاهده محصول PCR: محصول PCR توسط ژل الکتروفورز 1% آگارز در بافر 1x TAE ارزیابی و تایید گردید(شکل1).

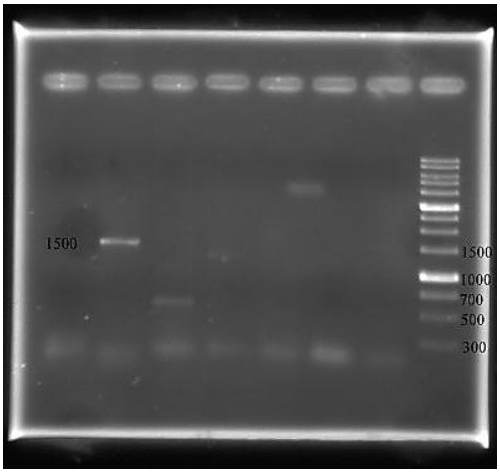
تعیین حساسیت سویه های ایزوله شده به غلظت های مختلف نمک سولفات روی: برای این منظور غلظت های بین 0/1 تا 10 میلی مول از نمک سولفات روی[ZnSo4.7H2o و جرم مولی 287/34] معادل 6/53 ppm تا 653 ppm در محیط LB براث استریل تهیه گردید و از مایع تلقیح باکتری به میزان یک میلی لیتر به رقت های مختلف نمک سولفات روی اضافه شد. پس از گرمخانه گذاری در دمای 30 درجه سانتی گراد به مدت 24 ساعت رشد و عدم رشد نمونه ها مشاهده و میزان کدورت رشد باکتری ها با دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج 600nm تعیین گردید.

توالی یابی (Sequencing): محصول PCR به منظور توالی یابی با واسطه شرکت فضا پژوه به کشور کانادا برای توالی یابی ارسال گردید.

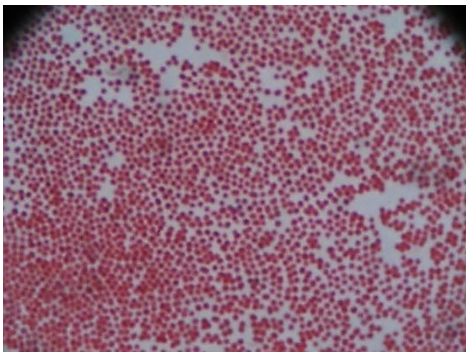
یافته های پژوهش

یک سویه از ریزوسفر گیاه مارچوبه جداسازی و شناسایی شد. در بررسی میکروسکوپی و ماکروسکوپی یک کوکسی گرم منفی با ایجاد کلنی های سفید، شفاف، برجسته، لزج و نمناک بر روی محیط کشت مانیتول آگار فاقد منبع نیتروژن مشاهده گردید (شکل 2 و 3) و نتایج توالی یابی 16s rRNA سویه جدا شده از ریزوسفر گیاه مارچوبه، گونه Acinetobacter calcoaceticus با تشابه 99% شناسایی شد و در این بررسی MIC گونه Acinetobacter calcoaceticus به فلز روی در غلظت 52/32 ppm گزارش شد.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]



شکل1. باند ژن 16s rRNA **(1500** bp**)**



شکل 2. کوکسی گرم منفی در زیر میکروسوپ نوری



شکل 3. کلنی رشد کرده در محیط مانیتول آگار فاقد منبع نیتروژن

بحث و نتیجه گیری

در این تحقیق جداسازی میکروارگانیسم های تثبیت کننده نیترژن از ریزوسفر گیاه مارچوبه در محیط مانیتول آگار فاقد منبع نیتروژن و شناسایی باکتری با روش تعیین توالی 16s rRNA انجام شد و حساسیت سویه های باکتری جدا شده از خاک زراعی به فلز روی بررسی شد. سویه جدا شده دارای توانایی رشد در محیط فاقد منبع نیتروژن بوده و تنها منبع نیترون آنها نیتروژن

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]

مولکولی موجود در هوا می باشد. و در بررسی میزان حساسیت به فلز روی، رشد میکروارگانیسم Acinetobacter calcoaceticus در غلظت ppm 52/32 متوقف شد.

در مطالعاتی که توسط Chengqun Lu و همکاران در سال 2010 برای جداسازس ازوتوباکتر انجام شد. در بررسی آنها از محیط بدون ازت حاوی منبع کربن مانیتول استفاده شده بود که بررسی حاضر با بررسی آنها مطابقت داشت (14).

Babich و همکارانش در سال 1984 تحقیقاتی در زمینه فلز روی بر باکتری های خاک انجام دادند و بررسی آنها نشان داد که فلز روی در حدود 2 میلی مول فعالیت باکتری های خاک را کاهش می دهد (15). در مطالعاتی که توسط Nilufer Cevik و همکاران در سال 2003 در مورد حساسیت باکتری های خاک به فلز روی طی یک آزمایش گلدانی انجام شد، باکتری ها در غلظت ppm 50 فلز روی حساسیت نشان داده بودند. (16). در تحقیق حاضر نیز با انجام آزمایش های مختلف و تغییر غلظت های فلز روی (Zn) به میزان ppm 20 حد مجاز آن مشخص گردید و مشاهده شد که با افزایش فلز روی رشد سویه های باکتری گونه ازتوباکتر کروکوکوم کاهش یافت و در غلظت ppm 50 متوقف شد که تحقیق حاضر با بررسی های سایر محققین مطابقت دارد.

در مطالعات انجام شده توسط Shakibaie و همکاران در سال 2008 در بررسی فلز روی (Zn) بر مقاومت و جهش باکتری ها مشاهده شده که باکتری های غیر مقاوم در غلظت بیش از ppm 30 فلز روی حساس می باشند که نتیجه بررسی حاضر با نتیجه بررسی آنها مطابقت داشت (17).

در مطالعاتی که محمد ملکوتیان و همکاران در سال 1389 در مورد حساسیت باکتری های فاضلاب شهری به نانوذره روی (ZnO) انجام دادند، نشان داده شده که باکتری ها در غلظت ppm 80 حساسیتی را نشان ندادند و میزان ppm 100 از نانوذره روی باعث حذف 36% و ppm 1000 از نانوذره روی باعث حذف 84% از باکتری ها شده است. نتیجه بررسی حاضر با نتایج آنها تفاوت داشت. این تفاوت در حساسیت باکتری ها می تواند به دلیل تفاوت در محل نمونه گیری و تنوع میکروارگانیسم های مورد بررسی همچنین در نوع ترکیب فلز مورد مصرف باشد. در آزمایش حاضر از ترکیب سولفات روی (ZnSo4) استفاده شده و در بررسی آنها از نانوذره روی (ZnO) استفاده شده و نوع ترکیب فلزی و قطر نانوذره می تواند دلیل تفاوت نتایج حاضر با آنها باشد (18).

در مطالعات انجام شده توسط Rajapaksha و همکاران در سال 2004 در بررسی اثر کوتاه مدت فلز روی بر روی میکروارگانیسم ها نشان داده شده که افزایش میزان فلز روی در خاک به طور خطی باعث کاهش جمعیت باکتری های خاک شده است. نتایج بررسی حاضر با نتایج بررسی آنها مطابقت داشت (19).

در مطالعاتی که توسط N. Tejera و همکاران در سال 2005 و T. Ueda و همکاران در سال 1995 برای جداسازی باکتری های تثبیت کننده نیتروژن انجام شد، از محیط فاقد منبع نیتروژن برای جداسازی باکتری های تثبیت کننده نیتروژن استفاده شده بود که نتیجه بررسی حاضر با نتیجه بررسی آنها مطابقت داشت (6 و 20).

به طور کلی، گونه Acinetobacter calcoaceticus از ریزوسفر گیاه مارچوبه با کشت در محیط مانیتول آگار فاقد منبع نیتروژن جدا شده و با توجه به عدم وجود منبع نیتروژن در محیط کشت و وجود تنها منبع نیتروژن مولکولی هوا، باکتری جدا شده دارای توان تثبیت نیتروژن می باشد، MIC سویه جدا شده به فلز روی در غلظت ppm 52/32 است، همچنین در این بررسی می توان نتیجه گرفت که افزایش مصرف فلز روی در زمین های زراعی باعث کاهش باکتری Acinetobacter calcoaceticus می شود و میزان بهینه مصرف فلز روی در غلظت کمتر از ppm 52/32 می باشد.

References

1- Canli M, Alti G. The relationship between heavy metal (Cd, Cr, Cu , Fe, Pb, Zn) levels and size of six mediterranea Fish species. Environ Pollut 2003;121: 129-36.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]

2- Chen X, Ping S, Shen C, Dou CM. Interaction of Pseudomonas putida CZ1 with clays and ability of the composite to immobilize Copper and Zinc from solution. Bioresource Technol 2008;23: 151-3.
3- Bruins MR, Kapils, Oeheme FW. Microbial resistance to metals in the environment. Ecotoxical Environ Saf 2000;45: 198-207.
4- Ashraf R, Adam T. Effect of heavy metals on soil microbial community and mung beans seed germination. Pak J Bot 2007;39: 626-36.
5- Nies DH. Microbial heavy-metal resistance. Appl Microbial Biotechnol 1999;51: 730-50.
6- Tejera N, Lluch C, Mart´ınez-Toledo MV, Gonz´alez-Lopez J. Isolation and characterization of Azotobacter and Azospirillum strains from the sugarcane rhizosphere. Plant Soil 2005;270: 223-32.
7- Eleiwa ME, Hamed ER, Shehata HS. The role of biofertilizers and/or some micronutrients on wheat plant (Triticum aestivum L.). Growth Reclaimed Soil 2012; 6: 3359-69.
8- Martyniuk S., Martyniuk M. Occurrence of Azotobacter spp in some Polish soils. Polish J Environ Stud 2003;12: 371-4.
9- Cocking EC. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. Plant Soil 2003;252: 169-75.
10- Franche C, Lindström K, Elmerich C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. Plant Soil 2009;321:35–59.
11- Reinhardt EL, Ramos PL. Molecular characterization of nitrogen – fixing bacteria isolated from Brazilian agricultural plants at SAO Paulo state. Brazil J Microbiol 2008;39: 414-22.
12- Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th ed. Williams and Wilkins:Baltimore, USA;1994.
13- Williams ST, Sharpe ME, Holt JG, editors. Bergey's manual of determinative bacteriology.. Williams and Wilkins: Baltimore, USA; 2005.
14- Chengqun L, Huang B. Isolation and characterization of Azotobacteria from pine rhizosphere. African J Microbiol Res 2010; 4: 1299-1306.
15-Babich H., Stotzky G., 1984, Heavy metal toxicity to microbe-mediated ecologic processes: a review and potential application to regulatory policies. Environmental Research 36, 111-137.
16- Cevik N, Karaca A. Effect of cadmium, zinc, copper and fluranthene on soil bacteria. Ankara Depart Soil Sci 2003; 611: 1-14.
17- Shakibaie MR, Khosravan A, Frahmand A, Zare S. Applicayion of metal resistant bacteria by mutational enhamcment technique for bioremediation of copper and zinc from industrial wastes. Iran J Environ Health Sci Eng 2008; 5: 251-6.
18-Malakootian M, Toolabi A. Determining and comparing the effect of nanoparticle CuO, TiO2 and ZnO in removing gram positive and negative bacteria from wastewater Iran. J Yazd Uni Health 2011;29: 1-11.
19- Rajapaksha R. Metal toxicity affects fungal and bacterial activities in soil differently. Appl Environ Microbiol 2004; 2966-73.
20- Ueda T, Suga Y. Remarkable N2-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of nifH gene sequences. J Bacteriol 1995;1414-7.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]

Phylogenetic identification of nitrogen-fixing bacteria isolated from the rhizosphere of asparagus plants using 16s rRNA and the effect of zinc on isolated strains

Dadook M[1], Biglarian M[2], Mehrabian S[1], Zali H[2], AzodiM[2] , Salehi M[1], Maleki M.H[3], Zargar M[4]*

(Received: Accepted:)

Abstract

Introduction: Considering the role of microorganisms in nitrogen stabilizers for the fertility of the soil and growth and development of plants, application of the chemical fertilizers, zinc sulfate (ZnSo4), as micronutrient index in agriculture is taken into account. Due to the toxic effects of zinc metal, the aim of this research was the isolation and identification of nitrogen stabilizer microorganisms of asparagus rhizosphere and to evaluate toxic effect of zinc metal on the growth of bacteria.

Material and Method: In order to isolate microorganisms in nitrogen stabilizer, soil samples were prepared from the asparagus rhizosphere and cultured in medium lacking nitrogen with a temperature of 30 °C for 48 hours. Phylogenetic identification was accomplished using 16s rRNA and MIC of the isolated strain was determined in different concentrations of zinc metal.

Findings: From the rhizosphere soil samples a strain of bacterium was isolated and its phylogenetic was determined as Acinetobacter calcoaceticus species using the 16s rRNA. The MIC of the species was evaluated at the 52.32 ppm concentration of zinc metal.

Discussion & Conclusion: One of the rhizosphere nitrogen stabilizer strains in the asparagus plant is Acinetobacter calcoaceticus bacterium. Elevation of zinc metal causes damage to the microorganism and the maximum allowable amount of zinc metal in this study, was determined to be less than 52.32 ppm.

Key words: Nitrogen fixation, Plant asparagus, 16s rRNA, Zinc sulfate (ZnSo4)

1. Dept of Microbiology, Tehran Shomal Baranch, Islamic Azad University
2. Proteomics research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences
3. Dept of Clinical Microbiology, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran
4. Dept of Microbiology, Ghom Baranch, Islamic Azad University, Ghom, Iran
**(corresponding author)*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]