تنش‌های محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses in Crop Sciences

مجله تنش‌های‌محیطی در علوم زراعی
جلد هشتم، شماره اول، نیمه‌اول ۹۴
۹۳-۹۹

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

آزاده حداد سبزوار[۱]، محبوبه نخعی مقدم*[۲]، محمدرضا ذوالفقاری[۳]

۱. کارشناس ارشد میکروب شناسی، گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.
۲. استادیار میکروب شناسی، گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.
۳. استادیار، گروه میکروب شناسی، 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 سبزوار نسبت به فلزات سنگین، آنتی‌بیوتیک‌ها و غلظت‌های متفاوت شوری انجام شد. جدایه ها ازنظر 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 ۱۰۰٪ جدایه ها نسبت به پنی‌سیلین مقاوم و نسبت به تتراسیکلین حساس بودند. الگوی مقاومت نسبت به ونکومایسین، نالیدیکسیک اسید و استرپتومایسین متفاوت بود. جدایه ها 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 ازنظر تحمل غلظت‌های مختلف شوری نشان داد که تمامی جدایه ها 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

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 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

نگارنده پاسخگو: محبوبه نخعی مقدم. آدرس: مشهد، خیابان راهنمایی ۲۴، دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی، گروه زیست شناسی.
پست الکترونیک: m.nakhaei@mshdiau.ac.ir

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 به‌ندرت 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 یونجه توانایی بالایی در جذب و نگهداری فلزات سنگین در غلظت های مختلف دارد و استفاده از این گیاه به‌منظور جذب و تصفیه زیستی خاک‌ها از آلودگی کادمیوم نیز موردمطالعه قرارگرفته است (Gardea-Torresdey et al., 1996). تحقیقات نشان می‌دهد که سینوریزوبیوم (انسیفر) ملیلوتی با تولید ترکیبات پلیمری خارج سلولی (EPS) می‌تواند باعث افزایش تحمل این باکتری نسبت به یون مس شود. ترکیبات پلیمری خارج سلولی اتصال یافته به‌طور سست در سطح باکتری نقش مهم‌تری از EPS محلول و EPS اتصال یافته به‌طور 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 سینوریزوبیوم های بومی جدا شده از ریشه یونجه است.

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتری‌ها

ریشه گیاهان یونجه 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 جدایه ها به روش کشت خطی از سوسپانسیون فوق روی محیط[1] (YEMA) انجام شد (Singh *et al.* 2008). به‌منظور بررسی کارایی و تأیید همزیستی جدایه‌ها از آزمون آلودگی گیاه[2] 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 $CuCl_2.2H_2O$، $CdCl_2$، $ZnSO_4.7H_2O$ و $MnSO_4.4H_2O$ به‌عنوان 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 10^8cfu/ml تلقیح شدند و نتایج ازنظر 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 بایر 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 cful/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، پلیت ها در گرمخانه با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد و بعد از گذشت ۷۲ ساعت جدایه ها ازنظر رشد کلنی موردبررسی و مقایسه

[1]. Yeast Extract Mannitol Agar
[2]. Plant infection test

قرار گرفتند. نتایج ازنظر رشد باکتری و ایجاد کلنی به‌صورت $^{+}$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 ٤ 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 باکتری‌ها

در این تحقیق، ۲۳ باکتری سینوریزوبیوم از گره ریشه گیاهان یونجه جدا شد. باکتری‌ها از مزارعی در نواحی دلقند، خسروجرد، نامن، باشتن و شاره از توابع سبزوار، نزل‌آباد، دهبار و دولت‌آباد از توابع مشهد جمع‌آوری شدند.

مقاومت نسبت به فلزات سنگین

نتایج حاصل از میزان مقاومت باکتری‌های بومی سینوریزوبیوم نسبت به فلزات سنگین نشان داد که تمام جدایه‌ها به غلظت‌های ۰/۵ میلی‌مول $CuCl_2$، ۰/۰۶۵ میلی مول $CdCl_2$، غلظت‌های ۰/۱۲۵ و ۰/۲۵۰ میلی مول $ZnSO_4$ و ۰/۷۵ و ۱/۵ میلی‌مول $MnSO_4$ مقاوم بودند (جدول ۱). در میان عناصر سنگین مورد آزمایش مقاومت جدایه‌ها نسبت به منگنز و مس بیشتر بود، طوری که تمامی جدایه‌ها به غلظت ۱/۵ میلی‌مول منگنز و ۴۷/۸۲٪ جدایه ها نسبت به غلظت یک میلی‌مول مس مقاوم بودند. درحالی‌که هیچ‌کدام از جدایه‌ها در این غلظت‌ها (حتی در ۰/۵ mmol) نسبت به روی و کادمیوم مقاوم نبودند. در غلظت ۰/۲۵ میلی‌مول کادمیوم، ۱۳/۰۴٪ جدایه‌ها مقاومت نشان دادند، ولی در غلظت‌های بالاتر قادر به رشد نبودند. با افزایش غلظت فلزات سنگین مقاومت کاهش یافت. به عبارتی غلظت‌های بالاتر باعث سرکوب رشد باکتری‌ها شد. تمامی جدایه ها در غلظت‌های پایین‌تر فلزات سنگین رشد داشتند. رشد در غلظت‌های بالاتر فلزات نشان داد که تنها ۳۰/۴۳٪ جدایه‌ها توانستند در غلظت‌های بالای مس (۲/۵ mmol) مقاومت داشته باشند. مقاومت به فلز مس می‌تواند نتیجه مکانیسم‌های جداسازی و پیوندی یکسری از پلی‌ساکاریدها یا پروتئین‌ها باشد که در محل‌های اتصال هستند. مس در فضای پری‌پلاسمی سودوموناس[1] توسط پروتئین‌های CopA و CopB جمع می‌شود (Silver and Phung, 1996). یک پلاسمید در حدود ۷۰ کیلو جفت باز که مسئول مقاومت به فلزات در ریزوبیوم است، گزارش‌شده 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 و منگنز ۰/۷۵ mmol مقاومت داشتند.

مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها

نتایج سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های سینوریزوبیوم نشان داد که همه جدایه‌ها نسبت به یک یا تعداد بیشتری از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت داشتند (شکل ۱). نتایج این تحقیق نشان داد که ۱۰۰٪ جدایه‌ها نسبت به پنی‌سیلین 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. گزارش‌شده است که سه عامل آب‌گریزی، بار الکتریکی و مقدار آنتی‌بیوتیک در نفوذپذیری پوشش باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک مؤثرند و ریزوبیوم‌ها سطح بالایی از مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها را نشان می‌دهند (Hungria et al., 2001).

می‌توان گفت سینوریزوبیوم ملیلوتی نسبت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم است و الگوی مهاری همیشه برای جدایه‌ها یکسان نیست. نتایج پژوهش حاضر نشان داد تمامی سویه‌های سینوریزوبیوم ملیلوتی 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 پژوهش‌ها مقاومت بالای جدایه‌های سینوریزوبیوم ملیلوتی نسبت به استرپتومایسین و تتراسیکلین نشان داده‌شده است (Thami-Alami et al., 2010).

تحمل به شوری

همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده‌شده است، ۱۰۰٪ جدایه‌ها در محیط حاوی کلرید سدیم با غلظت ۰/۵ و ۱٪

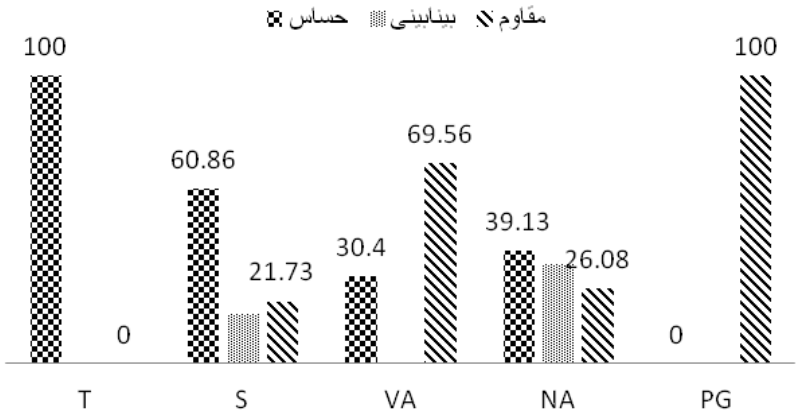
[1]- *Pseudomonas*

رشد داشتند. اما با افزایش غلظت نمک رشد کاهش یافت، به‌طوری‌که 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 ملیلوتی

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: نالیدیکسیک 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 ملیلوتی (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 (%) کلرید سدیم (٪)																		وضعیت Status
	شاهد (۰) Cotrol (0)			0.5			1			2			3			4			
S1K	3^+	3^+	3^+	3^+	3^+	3^+	3^+	3^+	3^+	3^+	3^+	2^+	2^+	2^+	2^+	1^+	1^+	2^+	SS
S4K	3^+	3^+	3^+	3^+	3^+	3^+	2^+	2^+	3^+	1^+	2^+	1^+	1^+	1^+	1^+	1^+	1^+	1^+	S
S5K	3^+	3^+	3^+	3^+	3^+	3^+	2^+	3^+	3^+	1^+	2^+	1^+	1^+	1^+	1^+	1^+	1^+	1^+	S
S6K	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^+	2^+	3^+	3^+	2^+	3^+	3^+	3^+	1^+	R
S10K	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^+	2^+	3^+	3^+	2^+	2^+	3^+	1^+	R
S15K	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^+	2^+	1^+	2^+	1^+	2^+	1^+	1^+	1^+	1^+	S
S20K	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^+	2^+	3^+	3^+	3^+	2^+	2^+	3^+	1^+	R
S23K	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^+	2^+	3^+	2^+	3^+	2^+	2^+	2^+	R
S26K	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^+	2^+	3^+	2^+	2^+	2^+	1^+	1^+	SS
S29K	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^+	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^+	SS
S34K	3^+	3^+	3^+	3^+	3^+	3^+	3^+	2^+	3^+	2^+	3^+	2^+	1^+	2^+	2^+	1^+	1^+	1^+	SS
S35K	3^+	3^+	3^+	3^+	3^+	3^+	3^+	2^+	3^+	3^+	3^+	2^+	3^+	3^+	2^+	2^+	3^+	1^+	R
S36K	3^+	3^+	3^+	3^+	3^+	3^+	3^+	3^+	3^+	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^+	2^+	SS
S38K	3^+	3^+	3^+	3^+	3^+	3^+	3^+	2^+	3^+	3^+	2^+	3^+	2^+	2^+	2^+	2^+	1^+	1^+	SS

SS: نیمه حساس؛ S: حساس؛ R: مقاوم

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

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 جداشده 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 جدایه های 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 قابل‌ذکر است که جدایه‌های متحمل به شوری به علت شرایط اقلیمی، آب و هوایی و همچنین شرایط خاک در عرصه‌های مختلف به‌تدریج مقاومت به نمک در آن‌ها ایجاد شده است و درنتیجه شرایط سخت محیطی در بالا بردن 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 اسیدآمینه 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 موردنیاز است. این مطالعات می‌تواند برای بهره‌وری همزیستی و تلقیح در سیستم کشاورزی مناسب باشند.

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 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.

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, GW., 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-chitooligosaccharide 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 Ranglands 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. Microbioliolgy. 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.