



جداسازی و شناسایی باکتری‌های کاهنده آهن فریک از خاک‌های شالیزاری شمال ایران

*نسرین قربان‌زاده^۱، امیر لکزیان^۲، غلامحسین حق‌نیا^۳ و علیرضا کریمی^۳

^۱ دانش‌آموخته دکتری گروه علوم خاک، دانشگاه فردوسی مشهد، استاد گروه علوم خاک، دانشگاه فردوسی مشهد،

^۲ دانشیار گروه علوم خاک، دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۰/۱۶؛ تاریخ پذیرش: ۹۲/۲/۱۰

چکیده

کاهش زیستی آهن فریک در شرایط بی‌هوازی از دیدگاه زیست‌محیطی و بیولوژیکی فرایندی بسیار دارای اهمیت می‌باشد. این فرایند در خاک‌های شالیزاری بسیار مورد توجه قرار گرفته و غالباً توسط فعالیت‌های میکروبی کنترل می‌شود. آهن فریک یکی از مهم‌ترین پذیرنده‌های الکترون در این خاک‌ها محسوب می‌شود. این پژوهش با هدف جداسازی و شناسایی تعدادی از جدایه‌های باکتریایی کاهنده آهن فریک از خاک‌های شالیزاری شمال ایران انجام گرفت. بررسی توانایی باکتری‌های جداسازی شده در کاهش زیستی آهن فریک در محیط کشت مایع با توجه به مقدار تولید آهن فرو انجام شد و نتایج با باکتری *Shewanella sp* که بیش‌ترین غلظت آهن فرو را نشان داد، مقایسه شدند. سپس سه جدایه برتر انتخاب و DNA ژنومی آن‌ها با استفاده از PCR و آغازگرهای *fd1* و *rd1* از نظر تکثیر توالی ژن 16s rRNA مورد بررسی قرار گرفتند. با استفاده از برنامه BLAST بین جدایه‌های مورد بررسی و جدایه‌های موجود در بانک اطلاعات مشخص شد که سه جدایه انتخابی متعلق به جنس باسیلوس بودند. توالی ایزوله PS11، دارای ۹۹/۴ درصد شباهت با *Geobacillus stearothermophilus* و توالی جدایه PS16 در حدود ۹۸/۴ درصد شباهت با توالی جدایه‌های PS23 و *B. subtilis* را دارا بودند. توالی جدایه PS23 نیز دارای ۹۸ درصد شباهت با توالی جدایه‌های *B. subtilis* و *B. thuringiensis* را دارا بود که این جدایه‌ها توانایی کاهش آهن فریک به فرو را در شرایط آزمایشگاهی دارا بودند.

واژه‌های کلیدی: باکتری باسیلوس، باکتری *Shewanella sp*، کاهش زیستی، خاک‌های شالیزار

* مسئول مکاتبه: nasrin.ghorbanzadeh@gmail.com

مقدمه

آهن پس از اکسیژن، سیلیسیوم و آلومینیوم چهارمین عنصر فراوان در پوسته زمین است (لیو و همکاران، ۲۰۰۲). این عنصر در حدود ۵/۱ درصد از پوسته زمین را در برمی‌گیرد و چرخه آن در طبیعت به دلیل داشتن ظرفیت‌های متفاوت بسیار دارای اهمیت می‌باشد. مهم‌ترین واکنش‌های اکسایش و کاهش در محیط‌های زیرسطحی و تحت شرایط بی‌هوازی شامل اکسایش مواد آلی همراه با کاهش آهن فریک و سولفات و تبدیل مواد آلی به دی‌اکسیدکربن و متان می‌باشد (لیو و همکاران، ۲۰۰۲). کاهش منابع آهن فریک در شرایط بی‌هوازی غالباً به وسیله فرایندهای میکروبی کنترل می‌شود (لاولی، ۱۹۹۵؛ وای و همکاران، ۲۰۱۲). فرایند کاهش زیستی در شرایط بی‌هوازی به شدت بر چرخه بیوژئوشیمیایی اشکال آلی و غیرآلی کربن، نیتروژن، فسفر، سولفور و فلزات کم‌مصرف (وای و همکاران، ۲۰۱۲) و همچنین بر روی آزادسازی مواد غذایی، تغییر شکل عناصر و اصلاح محیط زیست تأثیرگذار است (لاولی و کوتس، ۲۰۰۰؛ لاولی و همکاران، ۲۰۰۴). در اراضی شالیزار، بلافاصله پس از ایجاد شرایط غرقابی، مولکول‌های اکسیژن و نترات ناپدید و به دنبال آن یون‌های آهن فرو و منگنز تشکیل می‌شوند (کنهاسر و همکاران، ۲۰۱۱). پس از اولین نتایج ارایه شده توسط لاولی و کوتس (۲۰۰۰) مبنی بر این‌که باکتری‌های کاهنده آهن قادرند از آهن فریک به‌عنوان ترمینال پذیرنده الکترون استفاده کرده و از اکسایش کامل ترکیبات آلی انرژی بگیرند، توجه بیشتری بر روی فرایند کاهش غیرجذبی آهن در شرایط بی‌هوازی متمرکز شد (لاولی و همکاران، ۲۰۰۴). باکتری‌های کاهنده آهن از گستره‌ای از سیستم‌های بی‌هوازی مانند رسوبات دریایی، خاک‌های غرقابی، بیوفیلم‌ها و آب‌های زیرزمینی جداسازی شده‌اند (وبر و همکاران، ۲۰۰۶؛ وای و همکاران، ۲۰۱۲). باکتری‌های کاهنده آهن که تاکنون شناسایی شده‌اند شامل ۹ شاخه، ۱۵ کلاس، ۲۷ راسته، ۳۷ خانواده و ۶۵ جنس می‌باشند و از آن‌جا که باکتری‌های کاهنده سازوکارهای متفاوتی در کاهش آنزیمی دارا می‌باشند، باکتری‌های نماینده مانند جنوباکتر و شونلا بیش‌تر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (وبر و همکاران، ۲۰۰۶؛ وای و همکاران، ۲۰۱۲). در خاک‌های شالیزار باکتری‌های کاهنده آهن غیرجذبی^۱ از نظر مقدار ۳ برابر کم‌تر از میکروارگانیزم‌های تخمیرکننده (در حدود ۱۰^{۱۰} سلول در وزن خشک خاک) گزارش شده‌اند، اما افزایش معنی‌داری را نسبت به باکتری‌های تولیدکننده متان دارا می‌باشند (فرنزل و همکاران، ۱۹۹۹). در میان باکتری‌هایی که قابلیت و پتانسیل کاهش آهن فریک را به آهن فرو دارند و در تمام پروفیل

1- Dissimilatory Iron Reduction Bacteria

خاک غرقاب توزیع شده‌اند دو گروه بسیار دارای اهمیت هستند که شامل باکتری‌های کلستریدیوم بی‌هوازی اجباری و باکتری‌های بی‌هوازی اختیاری یا هوازی مانند گونه‌هایی از باکتری‌های جنس باسیلوس و سودوموناس می‌باشند (اتو، ۱۹۶۸؛ اتو و گلیس، ۱۹۷۱). گونه‌های باکتری جنوباکتر و شونلا توانایی کاهش آهن فریک را در تنفس بی‌هوازی دارا بوده که منجر به مصرف کربن در فرایندهای چرخه آهن در اکوسیستم‌های طبیعی می‌شود (ویس و همکاران، ۲۰۰۴). دیگر جنس‌های باکتریایی مانند باسیلوس و کلستریدیوم نیز می‌توانند برخی مواد آلی مانند آمینواسیدها و قندها را در طول فرایند کاهش غیرجذب‌ی آهن فریک^۱ مصرف کنند (لاولی، ۱۹۹۳).

از طرفی فرایند کاهش زیستی آهن فریک که توسط این باکتری‌ها انجام می‌شود از نظر کشاورزی و زیست‌محیطی دارای اهمیت بسیار می‌باشد. کاهش آهن فریک در خاک‌های آهنکی توسط میکروارگانیزم‌های کاهنده و تبدیل آن به آهن فرو می‌تواند منجر به افزایش فراهمی آهن در این خاک‌ها و تأمین این عنصر برای گیاهان شود (والنسیا کانترو و همکاران، ۲۰۰۷). همچنین این فرایند در اصلاح آلاینده‌های آلی و غیرآلی در خاک و اکوسیستم‌های آبی نقش اساسی دارد (دانگ و همکاران، ۲۰۰۹). بنابراین شناخت باکتری‌های دخیل در این فرایند می‌تواند بسیار مفید واقع شود.

روش‌های بیولوژی مولکولی برتری بیشتری را در تعیین تنوع میکروبی در مقایسه با روش‌های بیوشیمی نشان داده‌اند. بنابراین مقایسه توالی‌های rRNA ابزاری قوی برای روابط فیلوژنی و تکاملی در بین باکتری‌ها، آرکئا و موجودات یوکاریوت است (فاکس و همکاران، ۱۹۸۰). مطالعات اندکی در رابطه با شناسایی باکتری‌های کاهنده آهن فریک در ایران صورت گرفته است که با توجه به اهمیت این باکتری‌ها در فرایند کاهش زیستی آهن فریک و تأثیر عمده‌ای که این فرایند از نظر کشاورزی و زیست‌محیطی دارا می‌باشد، شناخت این باکتری‌ها امری ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی برخی از باکتری‌های کاهنده آهن با تعیین توالی ژن 16S rRNA و مقایسه توانایی کاهش آهن فریک توسط این باکتری‌ها در مقایسه با باکتری *Shewanella sp* به‌عنوان شاخص در خاک‌های شالیزار شمال ایران انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه و بازکشت باکتری *Shewanella sp*: باکتری *Shewanella sp* به‌عنوان شاهد مثبت در کاهش آهن فریک از بانک میکروبی ایران (مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران - کرج) تهیه و

1- Dissimilatory Ferric Iron Reduction

پس از بازکشت در محیط کشت مایع تریپتیک سوی براث (TSB)^۱ بدون دکستروز با غلظت ۳۰ گرم بر لیتر در گلیسرول ۴۰ درصد در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری و برای انجام مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت (جی‌سی و همکاران، ۲۰۰۵). به‌منظور بازکشت این باکتری از پلیت‌های دارای محیط کشت تریپتیک سوی آگار (TSA) استفاده شد.

نمونه‌برداری از خاک‌های شالیزار: دو نمونه از خاک زمین‌های زیر کشت برنج استان گیلان (۳۷ درجه و ۱۹ دقیقه شمالی و ۴۹ درجه و ۵۷ دقیقه غربی) با بارندگی متوسط سالانه ۱۱۸۶ میلی‌متر و درجه حرارت سالانه ۱۷/۵ درجه سانتی‌گراد از عمق ۱۵-۰ سانتی‌متری نمونه‌برداری و پس از انتقال به آزمایشگاه برخی ویژگی‌های آن‌ها اندازه‌گیری شد.

جداسازی باکتری‌های کاهنده آهن فریک: به‌منظور فعال‌سازی باکتری‌های کاهنده آهن فریک به ۱۰ گرم از هر یک از نمونه‌های خاک به مقدار ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه و در تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱ هفته نگهداری شدند (جی‌آنگ‌ژو و دانگ، ۲۰۰۸). سپس سوسپانسیون‌های خاک به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ (۷۰۰rpm) و محلول رویی آن‌ها به‌منظور تهیه سری‌های رقت (از 10^{-2} تا 10^{-9}) استفاده شدند. پلیت‌های دارای محیط کشت جامد نوترینت آگار^۲ (NA) با ۰/۴ میلی‌لیتر از هر یک از سری‌های رقت تلقیح و به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ هفته نگهداری شدند. سپس با توجه به تفاوت شکل ظاهری پرگنه‌های^۳ به وجود آمده بر روی پلیت‌ها تعداد ۵۰ جدایه متفاوت باکتری انتخاب شدند. لازم به ذکر است که به‌منظور بررسی باکتری‌های کند رشد، پلیت‌های تلقیح شده با سری‌های رقت بالاتر تا ۳ هفته کنترل شدند و جدایه‌های نو ظهور نیز مورد بررسی قرار گرفتند.

به‌منظور غربال نمودن باکتری‌ها از نظر توانایی در کاهش آهن فریک ابتدا هر یک از ۵۰ جدایه انتخابی به محیط کشت مایع نوترینت براث (NB)^۴ تلقیح و به‌مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر (۱۱۰rpm) رشد داده شدند. به‌منظور جداسازی سلول‌های باکتری از محیط کشت مایع نوترینت براث، سوسپانسیون جدایه‌ها در محیط کشت به‌مدت ۴ دقیقه سانتریفوژ (۱۰۰۰۰rpm) شدند و سلول‌های باقی‌مانده از هر یک از جدایه‌های انتخابی دوباره در آب دی‌یونیزه

1- Tryptic Soy Broth

2- Nutrient Agar

3- colony

4- Nutrient Broth

سترون سوسپانسیون مجدد شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر (10^8 سلول در هر میلی‌لیتر، شمارش بر روی پلیت) از سوسپانسیون هر یک از جدایه‌های باکتری به ۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع سترون شده دارای ۲۰ میلی‌مولار بافر HEPES، ۰/۱ میلی‌مولار فروزین، ۳۰۰ میکرومولار استات سدیم و ۴۰۰ میکرومولار سترات فریک (pH ۷/۵) تلقیح شد (اسچیکورا و اسچمیدت، ۲۰۰۱؛ اسچمیدت، ۱۹۹۴). هوای داخل ظروف شیشه‌ای با گاز نیتروژن جایگزین و درب آن‌ها درزگیری شد. ظروف در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ روز در تاریکی نگهداری شدند. برای این آزمایش شاهد منفی (محیط کشت بدون تلقیح باکتری) و شاهد مثبت (محیط کشت با باکتری *Shewanella sp*) نیز در نظر گرفته شد. پس از گذشت ۳ روز، جدایه‌هایی که منجر به تغییر رنگ محیط کشت (تغییر رنگ از زرد قهوه‌ای به ارغوانی) شده بودند به‌عنوان جدایه مثبت تلقی شدند (والنسیا کانترو و همکاران، ۲۰۰۷). غلظت آهن فرو در محیط کشت جدایه‌هایی که توانایی کاهش آهن فریک را داشتند با روش فروزین در طول موج ۵۶۲ نانومتر اندازه‌گیری شد (استوکی، ۱۹۷۰). سپس با توجه به نتایج به‌دست آمده از این مرحله ۳ جدایه که بیش‌ترین غلظت آهن فرو را در محیط کشت نشان دادند انتخاب و وارد مرحله شناسایی شدند.

شناسایی باکتری‌های کاهنده آهن فریک: شناسایی ۳ جدایه انتخابی از مرحله قبل با استفاده از روش‌های ژنتیک مولکولی انجام گرفت. در ابتدا DNA ژنومی جدایه‌های انتخابی به روش چن و کیو (۱۹۹۳) با استفاده از کلروفرم و بافر لیزکننده استخراج شد. سپس بخشی از ژن 16S rRNA با استفاده از تکنیک PCR تکثیر شد. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر DNA الگو (معادل ۱ نانوگرم)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (۱۰۰ میلی‌مولار)، یک میکرولیتر از هر کدام از آغازگرها (هر کدام با غلظت ۱۵ میلی‌مولار)، ۲/۵ میکرولیتر بافر $\times 10$ PCR، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Tag-DNA-polymerase (۲U/MI)، ۱ میکرولیتر $MgCl_2$ (۱۰ میلی‌مولار) و ۱۷/۸ میکرولیتر آب مقطر سترون انجام شد (چن و همکاران، ۲۰۰۰). برای تکثیر بخشی از ژن 16S rRNA از دو آغازگر پیش‌برنده (fd1) و پس‌برنده (rd1) که به‌ترتیب دارای ردیف بازهای آلی (5'-AGA GTT TGA (TCC TGG CTC AG-3' و (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CC-3') بودند، استفاده شد (ویس‌برگ و همکاران، ۱۹۹۱). پروفیل دمایی واکنش‌های PCR شامل ۳ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۳۵ سیکل دمایی شامل ۱ دقیقه ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه ۶۰ درجه سانتی‌گراد و ۲ دقیقه ۷۲ درجه سانتی‌گراد و مرحله نهایی ۳ دقیقه ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود (برنل و همکاران،

(۱۹۹۷). برای اطمینان از تکثیر بخشی از ژن 16S rRNA و مشاهده الگوی بانندی، ۵ میکرولیتر از محصول واکنش PCR روی ژل آگارز ۲ درصد شامل ۰/۵ میکروگرم اتیدیوم بروماید در هر میلی‌لیتر با ولتاژ ۸۰ به مدت ۲ ساعت الکتروفورز شد. پس از آن محصول PCR به منظور تعیین توالی‌ها به شرکت تکاپو زیست (<http://www.takapouzist.com>) ارسال شد. توالی‌های دریافتی در بانک ژن NCBI قرار داده شدند (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) و با استفاده از برنامه BLAST بین جدایه‌های مورد بررسی و جدایه‌های موجود در بانک اطلاعاتی مقایسه انجام گرفت. توالی‌های استرین‌هایی که بالاترین درصد تشابه را با توالی سه جدایه مورد نظر ما در برنامه BLAST نشان دادند به همراه توالی‌های این سه جدایه با استفاده از نرم‌افزار (MEGA ALIGN) مورد آنالیز قرار گرفتند. ترسیم درخت فیلوژنیک با استفاده از نرم‌افزار (MEGA 5) انجام شد. درجه اطمینان برای گره‌ها^۱ با به‌کار بردن خودراه‌انداز^۲ ۱۰۰۰ در نرم‌افزار (MEGA 5) محاسبه و به شکل درصد عنوان شد.

نتایج و بحث

نمونه‌برداری خاک: برخی از ویژگی‌های خاک‌های شالیزار مورد مطالعه پس از انتقال به آزمایشگاه اندازه‌گیری شد (جدول ۱). از آن‌جا که در شرایط بی‌هوازی خاک‌های شالیزار باکتری‌های کاهنده آهن فریک از مواد آلی به‌عنوان منبع دهنده الکترون در فرایند تنفس و تأمین انرژی استفاده می‌کنند (وای و همکاران، ۲۰۱۲) بنابراین وجود مقادیر بالا از مواد آلی در این دو خاک (۳/۵۹ درصد و ۳/۸۲ درصد) می‌تواند در حضور و فعالیت بیش‌تر باکتری‌های کاهنده آهن فریک تأثیرگذار باشد.

جدول ۱- برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک‌های شالیزار.

خصوصیات خاک	ماده آلی	رس	سیلت	شن	آهک	pH _s *	EC _s
			(درصد)				(دسی‌زیمنس بر متر)
خاک ۱	۳/۵۹	۲۵	۴۳/۵	۳۱/۵	۹/۵	۶/۷۹	۰/۷
خاک ۲	۳/۸۲	۱۵	۵۷/۵	۲۷/۵	۱۰/۵	۶/۷۵	۱/۱۲

* نشان‌دهنده حالت اشباع.

1- Nodes

2- Bootstraps

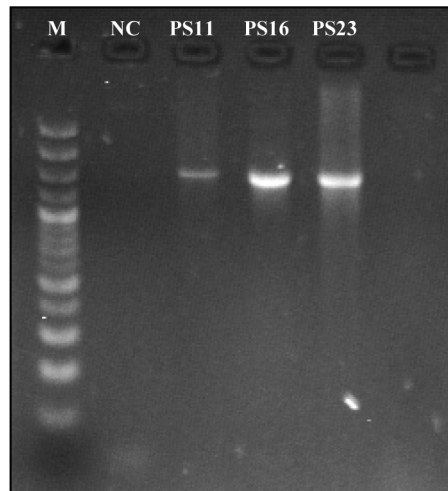
جداسازی باکتری‌های کاهنده آهن فریک: از ۵۰ جدایه باکتری تلقیح شده به محیط کشت مایع شامل سیترات آهن فریک تنها ۲۰ جدایه توانایی کاهش آهن را نشان دادند. توانایی کاهش آهن فریک در این ۲۰ جدایه با تغییر رنگ زرد آهن فریک موجود در محیط کشت مایع به رنگ ارغوانی بر اثر کمپلکس ایجاد شده بین آهن فرو و فروزین مشخص شد. فعالیت کاهندگی بیش‌تر توسط جدایه‌های باکتری منجر به تولید مقدار بیش‌تری از آهن فرو در محیط کشت مایع شد. والنسیا کانتر و همکاران (۲۰۰۷) نیز که به جداسازی باکتری‌های کاهنده آهن از ریزوسفر گیاه ذرت پرداختند به تغییر رنگ محیط کشت مایع دارای منبع آهن فریک بر اثر تلقیح باکتری‌های کاهنده به این محیط اشاره نمودند. غلظت آهن فرو در محیط کشت مایع دارای این ۲۰ جدایه اندازه‌گیری شد (جدول ۲). مقدار آهن فرو در محیط کشت شاهد مثبت با باکتری *Shewanella sp* در حدود ۳۲۰/۵۳ میکرومولار قرائت شد که در حدود ۸/۵ برابر فعالیت کاهندگی بیش‌تری را در مقایسه با جدایه PS24 (۳۷/۸۴) میکرومولار آهن فرو) در محیط کشت مایع نشان داد. جدایه‌های PS11، PS16 و PS23 به ترتیب با ۱۹۸/۱۶، ۲۱۰/۴۶ و ۲۷۵/۸۱ میکرومولار غلظت آهن فرو در محیط کشت بالاترین توانایی را در کاهش آهن فریک در میان دیگر جدایه‌های تست شده نشان دادند (جدول ۲). بنابراین این جدایه‌ها برای شناسایی در مرحله بعد انتخاب شدند. این ۳ جدایه دارای مورفولوژی مشابه بودند و پرگنه‌های رشد یافته این ۳ جدایه کروی، سفید رنگ و با حاشیه‌های منظم مشاهده شدند.

جدول ۲- توانایی باکتری‌های کاهنده آهن فریک جدا شده از خاک‌های شالیزار.

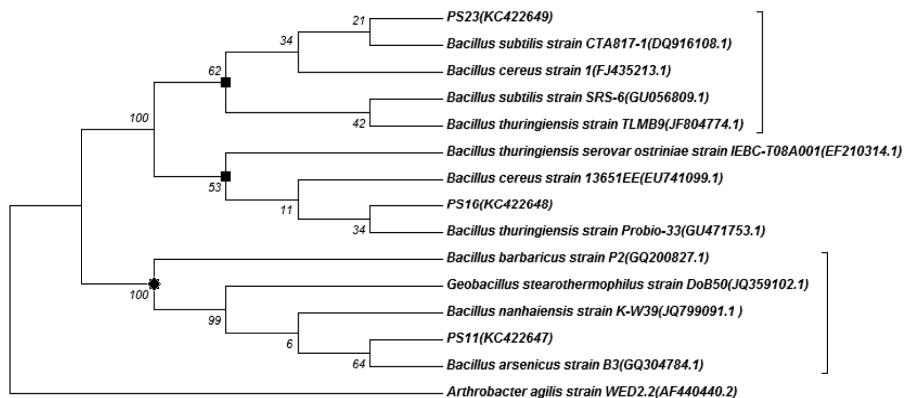
جدایه	Fe ²⁺ (μM)	جدایه	Fe ²⁺ (μM)
PS11	۱۹۸/۱۶	PS21	۶۵/۴۳
PS12	۱۳۴/۴۳	PS22	۱۷۳/۱۳
PS13	۱۰۲/۷۱	PS23	۲۷۵/۸۱
PS14	۱۶۰/۶۸	PS24	۳۷/۸۴
PS15	۱۳۱/۸۵	PS25	۸۶/۸۵
PS16	۲۱۰/۴۶	PS26	۷۷/۷۸
PS17	۱۴۰/۹۱	PS27	۵۹/۹۱
PS18	۱۱۸/۴۹	PS28	۱۶۳/۱۵
PS19	۶۵/۹	PS29	۱۵۰/۵۱
PS20	۱۴۲/۰۴	PS30	۵۰/۲۹

اندازه قطعات به دست آمده از تکثیر ژن 16S rRNA ۱/۸kb بودند. شکل ۱ نتایج الکتروفورز محصول واکنش PCR را با دو آغازگر پیشبرنده (fd1) و پسرنده (rd1) نشان می‌دهد. نتایج به دست آمده از برنامه BLAST بین باکتری‌های مورد بررسی و باکتری‌های موجود در بانک اطلاعاتی نشان داد که هر ۳ جدایه انتخاب شده به جنس باسیلوس تعلق داشتند. درصد شباهت و مقدار واگرایی جدایه‌های مورد نظر با جدایه‌های موجود در درخت فیلوژنیک در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج به دست آمده از آنالیز با نرم‌افزار (MEGA ALIGN) براساس نتایج به دست آمده از تکثیر توالی بازهای آلی ژن 16S rRNA نشان داد که توالی جدایه PS11 دارای ۹۹/۴ درصد شباهت با *Geobacillus stearothermophilus* (JQ359102.1) و توالی جدایه PS16 در حدود ۹۸/۴ درصد شباهت با توالی جدایه‌های (PS23 (KC422648) و *B. subtilis* (DQ916108.1) را دارا بودند. توالی جدایه PS23 نیز دارای ۹۸ درصد شباهت با توالی جدایه‌های *B. subtilis* (DQ916108.1) و *B. thuringiensis* (EF210314.1) را دارا بود (شکل ۳). تشابه مشاهده شده در این نتایج مشابه با نتایج مشاهده شده در برنامه BLAST بود. (بون و همکاران، ۱۹۹۵) نیز گزارش نمودند که میکروارگانیزم‌های متعلق به جنس باسیلوس به مقدار گسترده‌ای در سیستم‌های طبیعی مانند خاک‌ها، آب‌ها و رسوبات آبی توزیع شده‌اند که تعدادی زیادی از آن‌ها کاهش آهن فریک را انجام می‌دهند. جدایه‌های باکتریایی از جنس باسیلوس، آرتروباکتر، کلستریدیوم و سودوموناس به عنوان باکتری‌های کاهنده آهن توسط (اتو و گلیس، ۱۹۷۱؛ لاولی، ۱۹۹۳؛ والنسیا کاترو و همکاران، ۲۰۰۷) گزارش شده‌اند. بون و همکاران (۱۹۹۵) و پلوک و همکاران (۲۰۰۷) نیز بیان نمودند که باکتری‌های باسیلوس توانایی کاهش آهن فریک به شکل تنفسی و تخمیری را دارا می‌باشند. لی و همکاران (۲۰۱۱) همچنین گزارش نمودند که فرمی‌کوتزها^۱ مانند گونه‌های باسیلوس یک گروه مهم از کاهنده‌های آهن فریک در خاک‌های شالیزار می‌باشند که در توافق با شناسایی گونه‌های باسیلوس از خاک‌های شالیزار شمال ایران در این مطالعه می‌باشد. کاهش آهن فریک به وسیله گونه‌های باسیلوس در اراضی شالیزار توسط وای و همکاران (۲۰۱۲) و بون و همکاران (۱۹۹۵) نیز گزارش شده است. این پژوهشگران وجود تنوع بالایی از جمعیت‌های باکتریایی کاهنده آهن فریک و پاسخ آن‌ها به منابع کربن آلی متفاوت در خاک‌های شالیزار را در عمق ۸-۴ میلی‌متری بیان نمودند. از طرفی ترشحات ریشه و بقایای گیاهی نیز منابع کربن آلی در خاک‌های شالیزاری هستند که در این منطقه منجر به فعالیت بیش‌تر باکترهای کاهنده آهن فریک همراه با اکسایش کربن آلی می‌شوند (ردن، ۲۰۰۳).

توالی 16s rRNA ایزوله‌های PS11، PS16 و PS23 به ترتیب با شماره دسترسی^۱ KC422647، KC422648 و KC422649 در بانک ژن NCBI به ثبت رسیدند.



شکل ۱- نتایج الکتروفورز محصول PCR با دو آغازگر پیشبرنده (fd1) و پسبرنده (rd1). چاهک‌ها به ترتیب از چپ به راست: چاهک ۱: مارکر ۱۰۰bp ladder شرکت فرمتاز (M)، چاهک ۲: شاهد (کنترل منفی (NC))، چاهک ۳: استرین PS11، چاهک ۴: استرین PS16، چاهک ۵: استرین PS23.



شکل ۲- درخت فیلوژنیک به دست آمده از توالی ژن 16S rRNA جدایه‌های باسیلوس.

1- Accession Number

		Percent Identity																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
Divergence	1	■	75.5	91.8	90.7	90.4	89.4	85.6	87.8	97.4	93.5	87.1	86.5	88.6	99.4	94.1	1	PS11(KC422647)
	2	23.2	■	76.1	75.7	76.5	74.6	73.7	74.2	76.3	75.3	74.1	73.9	75.0	75.7	76.0	2	Arthrobacteragilis(AF440440.2)
	3	8.4	22.3	■	98.4	98.4	97.5	93.7	95.7	90.6	86.3	95.1	94.6	96.6	91.8	87.1	3	PS16(KC422648)
	4	8.3	22.4	0.1	■	98.8	98.3	94.7	97.0	90.4	87.4	96.2	95.5	97.7	91.1	88.2	4	PS23(KC422649)
	5	8.3	22.7	0.1	0.1	■	97.6	94.8	96.8	90.7	87.4	96.7	95.6	97.7	90.9	88.2	5	Bacillus-subtilis(DQ916108.1)
	6	8.3	22.2	0.1	0.1	0.1	■	96.2	98.2	89.1	88.7	97.0	97.0	99.1	90.0	89.3	6	Bacillus-thuringiensis(EF210314.1)
	7	8.3	23.5	0.1	0.1	0.4	0.0	■	96.7	86.9	89.3	96.5	99.2	97.0	86.2	88.3	7	Bacillus-cereus-(EU741099.1)
	8	8.3	23.0	0.1	0.0	0.6	0.1	0.9	■	88.8	89.3	97.6	97.5	98.7	88.3	88.9	8	Bacillus-cereus(FJ435213.1)
	9	0.4	23.8	8.0	8.2	8.7	8.0	8.9	8.8	■	94.2	88.2	87.8	89.1	97.9	95.0	9	Bacillus-barbaricus(GQ200827.1)
	10	0.0	22.5	8.3	8.2	8.6	8.0	9.3	9.1	1.5	■	88.7	89.5	89.6	93.9	98.8	10	Bacillus-arsenicus(GQ304784.1)
	11	8.4	23.7	0.2	0.1	0.1	0.7	1.8	1.8	9.5	10.5	■	97.3	97.5	87.6	88.4	11	Bacillus-subtilis(GU056809.1)
	12	8.3	23.0	0.1	0.1	0.4	0.0	0.0	0.9	8.9	8.9	1.8	■	97.8	87.1	88.6	12	Bacillus-thuringiensis(GU471753.1)
	13	8.3	22.2	0.1	0.1	0.3	0.1	0.1	0.4	8.4	7.9	1.1	0.1	■	89.2	89.7	13	Bacillus-thuringiensis(JF804774.1)
	14	0.1	23.2	8.3	8.2	8.2	8.2	8.2	8.2	0.4	0.1	8.3	8.2	8.2	■	94.7	14	Geobacillus-stearothermophilus(JQ359102.1)
	15	0.1	22.6	8.2	8.1	8.5	7.9	9.2	8.6	1.5	0.1	9.7	8.7	7.9	0.1	■	15	Bacillus-nanhaiensis(JQ799091.1)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		

شکل ۳- ماتریکس درصد شباهت و مقدار واگرایی ایزوله‌های انتخابی با استفاده از نرم‌افزار (MEGA ALIGN).

در این مطالعه باکتری‌های جنس باسیلوس به‌عنوان باکتری‌های کاهنده در کاهش آهن فریک شناخته شدند. اتو و گلیس (۱۹۷۳) و لیو و همکاران (۲۰۰۲) نیز گزارش نمودند که باکتری‌های باسیلوس به‌عنوان باکتری‌های غالب کاهنده آهن فریک در خاک‌های شالیزار مطرح می‌باشد. لیو و همکاران (۲۰۰۲) نیز بیان نمودند که این باکتری همراه با باکتری‌های جنس سودوموناس نقش مهمی را در کاهش آهن فریک در سیستم‌های کشاورزی بازی می‌کنند و به فراوانی از لایه بالایی خاک و ریزوسفر برنج در اراضی شالیزار جداسازی شده‌اند. والنسیا کانترو و همکاران (۲۰۰۷) حضور باکتری‌های جنس باسیلوس که توانایی کاهش آهن فریک را دارا بودند در منطقه ریزوسفر گیاه ذرت گزارش نمودند. باکتری‌های کاهنده متعلق به جنس باسیلوس مقاوم به نمک و قلیا دوست نیز از رسوبات نمکی جداسازی شده‌اند (پلوک و همکاران، ۲۰۰۷). مطالعات توسط بون و همکاران (۱۹۹۵) همچنین حضور این باکتری‌های کاهنده را در عمق حدود ۲۷۰۰ متری زیر سطح زمین از حوضه آبیگری در ویرجینیا نیز گزارش نموده‌اند. ویلیامز (۲۰۰۷) نیز باکتری‌های باسیلوس و سودوموناس موجود در خاک را به‌عنوان باکتری‌های کاهنده آهن فریک شناسایی نمودند. همچنین مطالعات توسط وای و همکاران (۲۰۱۲) نشان داد که غالب باکتری‌های کاهنده آهن فریک در خاک‌های شالیزار شامل گونه‌هایی از کلستریدیوم، سودوموناس، باسیلوس و ازتوباکتر بودند که باکتری‌های جنس باسیلوس منجر به کاهش ۵۰ درصدی فری‌هیدرات‌ها شدند. در مطالعه‌ای نیز که بر روی کاهش زیستی آهن

فریک در خاک‌های شالیزار انجام گرفت مشخص شد که در خاک‌های با مقادیر زیاد آهن فریک (اکسیدهای آهن آزاد) بر اثر فرایند کاهش زیستی توسط باکتری‌های کاهنده مقادیر زیادی آهن فرو نیز تشکیل می‌شود (سان و همکاران، ۲۰۰۸). این پژوهشگران همچنین گزارش نمودند که باکتری‌های کاهنده آهن مانند کلستریدیوم و باسیلوس از مهم‌ترین گونه‌ها در کاهش آهن فریک در خاک‌های شالیزار پس از غرقاب شدن می‌باشند. نتایج این پژوهش ثابت می‌کند که باکتری‌های معمول در خاک‌های شالیزار شمال ایران نیز متعلق به جنس باسیلوس می‌باشند و نتایج به‌دست آمده از مطالعات قبلی را گسترش می‌دهد.

البته لازم به ذکر است که با وجود استفاده از توالی ژن 16S rRNA در این مطالعه که یک ابزار سریع و دقیق برای شناسایی باکتری‌های است، اما به دلیل درجه حفظ شدگی بالا در ژن 16S نمی‌توان تنها با استفاده از این ژن اقدام به شناسایی باکتری‌ها نمود و با قطعیت کامل گونه باکتری را تعیین نمود و برای تشخیص تا حد گونه علاوه بر روش‌های مولکولی استفاده از روش‌های بیوشیمیایی نیز ضروری می‌باشد.

نتیجه‌گیری

در خاک‌های شالیزار باکتری‌های کاهنده آهن فریک بسیار فراوان هستند که به‌نظر می‌رسد باکتری‌های جنس باسیلوس در مهم‌ترین باکتری‌های شرکت‌کننده در کاهش منابع آهن فریک این خاک‌ها می‌باشند. آهن در خاک بیش‌تر به شکل اکسی‌هیدروکسیدهای آهن فریک نامحلول (هماتیت، گنوتیت و فری‌هیدرات) حضور دارد. بنابراین با وجود این‌که کل آهن موجود در خاک بیش‌تر از مقدار مورد نیاز برای بیش‌تر محصولات می‌باشد ولی غلظت آهن فریک قابل دسترس در بیش‌تر اراضی کشاورزی به‌خصوص در خاک‌های آهکی با اسیدیته بالا بسیار کم‌تر از آن چیزی است که گیاه به آن نیاز دارد. فعالیت این باکتری‌های کاهنده در فرایند کاهش زیستی منجر به کاهش و انحلال اکسی‌هیدروکسیدهای آهن فریک نامحلول و آزادسازی و توزیع آهن فرو در خاک‌های آهکی شده و در نتیجه این فرایند می‌تواند به‌منظور تأمین نیاز آهن گیاهان مفید واقع شود. بنابراین به‌نظر می‌رسد بررسی تأثیر این باکتری‌های کاهنده بر جذب آهن توسط گیاه در خاک‌های آهکی در مطالعات بعدی بسیار دارای اهمیت باشد.

سپاسگزاری

به این وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد که امکان این پژوهش را فراهم کردند تشکر می‌کنیم.

منابع

1. Boone, D.R., Liu, Y., Zhao, Z.J., and Balkwill, D.L. 1995. *Bacillus infernus* sp. nov., an Fe(III)-and Mn(IV)-reducing anaerobe from the deep terrestrial subsurface. *Inter. J. Syst. Bacteriol.* 45: 441-448.
2. Brunel, B., Givaudan, A., Lanois, A., Akhurst, R.J., and Boemare, N. 1997. Fast and accurate identification of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species by restriction analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology.* 63: 574-580.
3. Chen, W., and Kuo, T. 1993. A simple and rapid method for preparation of bacterial genomic DNA. *Nucleic Acid Research.* 21: 2260-2262.
4. Chen, J., Banks, D., Jarret, R.L., Chang, C.J., and Smith, B.J. 2000. Use of 16S rDNA Sequences as Signature Characters to Identify *Xylella fastidiosa*. *Current Microbiology.* 40: 29-33.
5. Dong, H., Deb, P.J., Kim, J., and Zhang, G. 2009. Microbe-clay mineral interactions. *American Mineralogist.* 94: 1505-1519.
6. Fox, G.E., Stackebrandt, E., Hespell, R.B., Gibson, J., Maniloff, J., Dyer, T.A., Wolfe, R.S., Balch, W.E., Tanner, R., Magrum, L., Zablen, L.B., Blakemore, R., Gupta, R., Bonen, L., Lewis, D.B., Stahl, B.J., Luehrsen, K.R., Chen, K.N., and Woese, C.R. 1980. The Phylogeny of Prokaryotes. *Science.* 209: 457-463.
7. Frenzel, P., Bosse, U., and Janssen, P.H. 1999. Rice roots and methanogenesis in a paddy soil: ferric iron as an alternative electron acceptor in the rooted soil. *Soil Biol. Biochem. J.* 31: 421-430.
8. Jiangzhou, H., and Dong, Q. 2008. Dissimilatory Fe(III) reduction characteristics of paddy soil extract cultures treated with glucose or fatty acids. *J. Environ. Sci.* 20: 1103-1108.
9. Jaisi, D.P., Kukkadapu, R.K., Eberl, D.D., and Dong, H. 2005. Control of Fe(III) site occupancy on the rate and extent of microbial reduction of Fe(III) in nontronite. *Geochimica et Cosmochimica Acta.* 69: 5429-5440.
10. Konhauser, K.O., Kappler, A., and Roden, E.E. 2011. Iron in microbial metabolisms. *Elements.* 7: 89-93.
11. Li, H., Peng, J., Weber, K.A., and Zhu, Y. 2011. Phylogenetic diversity of Fe(III)-reducing microorganisms in rice paddy soil: Enrichment cultures with different short-chain fatty acids as electron donors. *Soils and Sediments.* 11: 1234-1242.

12. Lovley, D.R. 1993. Dissimilatory metal reduction. *Annual Review of Microbiology*. 47: 236-290.
13. Lovley, D.R. 1995. Microbial reduction of iron, manganese and other metals. *Advances in Agronomy*. 4: 175-231.
14. Lovley, D.R., and Coates, J.D. 2000. Novel forms of anaerobic respiration of environmental relevance. *Current Opinion in Microbiology*. 3: 252-237.
15. Lovley, D.R., Holmes, D.E., and Nevin, K.P. 2004. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Advances in Microbial Physiology*. 49: 219-286.
16. Lu, W.J., Wang, H.T., Huang, C.Y., and Reichardt, W. 2002. Communities of iron(III)-reducing bacteria in irrigated tropical rice fields. *Microb. Environ. J.* 17: 170-178.
17. Ottow, J.C. 1968. Evaluation of iron-reducing bacteria in soil and the physiological mechanism of iron-reduction in *aerobacter aerogenes*. *Zeitschrift Fur Allgemeine Mikrobiologie*. 8: 441-443.
18. Ottow, J.C., and Glathe, H. 1971. Isolation and identification of iron-reducing bacteria from gley soils. *Soil Biol. Biochem. J.* 3: 43-55.
19. Pollock, J., Weber, K.A., Lack, J., Achenbach, L.A., Mormile, M.R., and Coates, J.D. 2007. Alkaline iron(III) reduction by a novel alkaliphilic, halotolerant, *Bacillus* sp. isolated from salt flat sediments of Soap Lake. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 77: 927-934.
20. Roden, E.E. 2003. Diversion of electron flow from methanogenesis to crystalline Fe(III) oxide reduction in carbon-limited cultures of wetland sediment microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 5702-5706.
21. Schikora, A., and Schmidt, W. 2001. Iron stress-induced changes in root epidermal cell fate are regulated independently from physiological responses to low iron availability. *Plant Physiology*. 125: 1679-1687.
22. Schmidt, W. 1994. Effects of various inhibitors on in vivo iron reduction by *Plantago lanceolata* L. roots. *Plant Soil J.* 165: 207-212.
23. Stookey, L.L. 1970. Ferrozine- a new spectrophotometric reagent for iron. *Analytical Chemistry*. 42: 779-781.
24. Sun, L., Qu, D., and Wei, Y. 2008. Effect of illumination on iron oxide reduction in anaerobic paddy soils. *Acta Pedologica Sinica*. 45: 628-634.
25. Valencia-Cantero, E., Hernández-Calderón, E., Velázquez-Becerra, C., Alfaro-Cuevas, R., and López-Bucio, J. 2007. Role of dissimilatory fermentative iron-reducing bacteria in Fe uptake by common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown in alkaline soil. *Plant Soil J.* 291: 263-273.
26. Weber, K.A., Achenbach, L.A., and Coates, J.D. 2006. Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nature Reviews Microbiology*. 4: 752-764.
27. Weisburg, W., Barns, S.M., Pelletier, D.A., and Lane, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173: 697-703.

28. Weiss, J.V., Emerson, D., and Megonigal, J.P. 2004. Geochemical control of microbial Fe(III) reduction potential in wetlands: comparison of the rhizosphere to non-rhizosphere soil. *FEMS Microbiology Ecology*. 48: 89-100.
29. Williams, M.D. 2007. Characterization of microbial activity in soils nearby landfills in northwest Florid. *Electronic Theses, the Florida State University DigiNole Commons*.
30. Yi, W., Wang, B., and Qu, D. 2012. Diversity of isolates performing Fe (III) reduction from paddy soil fed by different organic carbon sources. *Afric. J. Biotechnol.* 11: 4407-4417.



Isolation and identification of ferric iron reducing bacteria from paddy soils of Northern Iran

***N. Ghorbanzadeh¹, A. Lakzian², Gh.H. Haghnia² and A.R. Karimi³**

¹Ph.D. Graduate, Dept. of Soil Science, Ferdowsi University of Mashhad,

²Professor, Dept. of Soil Science, Ferdowsi University of Mashhad,

³Associate Prof., Dept. of Soil Science, Ferdowsi University of Mashhad

Received: 01/05/2013; Accepted: 04/30/2013

Abstract

Bioreduction of ferric iron in anoxic conditions with respect to biological and environmental aspects is an important process. This process is considered in paddy soils and mostly controlled by microbial activities. Ferric iron is one of the most terminal electron acceptor in these soils. Present study with the aim of isolation and identification of some bacteria with high ability in ferric iron reduction in paddy soils of northern Iran was conducted. Testing of ability of isolated ferric iron reducing bacteria was conducted in nutrient broth according to biogenic Fe (II) produced and the results was compared with *Shewanella* sp that showed the highest concentration of ferrous iron. Then three superior bacteria were chosen and genomic DNA of these bacteria tested by using of PCR and fd1 and rd1 primers for 16S rRNA amplification sequence analysis. By using the BLAST program of these isolates and isolates in data bases, all selective isolates were belonged to *Bacillus* sp. Sequence of PS11 isolate showed 99.4% of homology with *Geobacillus stearothermophilus* and PS23 showed 98.4% homology with PS23 and *B. subtilis*. Sequence of PS23 also showed 98% homology with *B. subtilis* and *B. thuringiensis* that these isolates have ability to reduce ferric to ferrous iron in vitro conditions.

Keywords: *Bacillus* bacteria, *Shewanella* sp bacteria, Bioreduction, Paddy soils

* Corresponding Authors; Email: nasrin.ghorbanzadeh@gmail.com

