نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۸، شماره ۶، بهمن – اسفند ۱۳۹۳، ص. ۱۲۴۹-۱۲۳۸

Journal of Water and Soil
Vol. 28, No. 6, Jan.-Feb. 2015, p. 1238-1249

جداسازی و ارزیابی ریزوباکترهای متحمل به سربِ محرک رشد گیاه از یک خاک حاوی سرب با سابقه بلند مدت

محمدرضا نادری[۱]- عبدالرزاق دانش‌شهرکی[۲*]- فایز رئیسی[۳]- فرزانه نیکوخواه[۴]

تاریخ دریافت:۱۳۹۲/۱۱/۲۵
تاریخ پذیرش:۱۳۹۳/۷/۹

چکیده

مطالعه‌ی حاضر به منظور جداسازی و ارزیابی ریزوباکترهای متحمل به سرب که قادر به تولید مواد محرک رشد گیاه تحت شرایط تنش فلزات سنگین بوده و توانایی افزایش زیست‌فراهمی فلز سنگین سرب را نیز دارند، به اجرا در آمد. ریزوباکترهای متحمل به سرب جدا شده از خاک آلوده به صورت *Rhodococcus* sp.، *Bacillus stearothermophilus* strain A، *Corynebacterium* sp.، *Bacillus pumilus*، *Mycobacterium* sp.، *Bacillus stearothermophilus* strain B، *Bacillus licheniformis* و *Bacillus* sp. جدا و شناسایی گردیدند. نتایج نشان داد که تمامی باکتری‌های جدا شده قادر به تحمل غلظت‌های بالای فلز سنگین سرب بودند. حداقل غلظت بازدارندگی سرب (MIC) این باکتری‌ها در دامنه‌ی ۱۱۰۰ تا ۱۷۲۰ میلی‌گرم بر لیتر (۳/۳ تا ۵/۱۹ میلی‌مولار) متغیر بود. به علاوه، تمامی سویه‌های باکتریایی جدا شده، از توانایی تولید ایندول استیک اسید (IAA) (از ۳/۵ تا ۴۳/۶ میلی‌گرم بر لیتر) و سیدروفور (از ۵۷/۷ تا ۸۶/۲ درصد) برخوردار بودند. با این وجود، تنها دو باکتری *Mycobacterium* sp. و *Bacillus licheniformis* توانایی تولید آنزیم ACC-دی‌آمیناز را داشتند. تلقیح محیط کشت حاوی کربنات سرب کم‌محلول با سویه‌ی باکتریایی *Corynebacterium* sp. به دلیل کاهش محسوس اسیدیته نیز سبب افزایش معنی‌دار غلظت سرب قابل‌جذب گردید.

واژه‌های کلیدی: ریزوباکترهای متحمل به سرب، حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)، ایندول استیک اسید (IAA)، سیدروفور، ACC-دی‌آمیناز، انحلال کربنات سرب

مقدمه

سرب یکی از فلزات سنگین است که دارای کارکرد زیستی مشخص نمی‌باشد و از پتانسیل ایجاد مسمومیت برای گیاهان و سایر موجودات زنده برخوردار است. این فلز، به دلیل پراکنش گسترده در سرتاسر نقاط جوامع شهری و صنعتی و خطر بالقوه‌ی آن برای محیط زیست و سلامت انسان‌ها و حیوانات، منشأ نگرانی‌های متعددی گردیده است. سرب، نه تنها فعالیت ریزجانداران خاک را تحت تأثیر قرار داده و سبب از دست رفتن حاصل خیزی خاک می‌شود، بلکه باعث بروز تغییر در شاخص‌های فیزیولوژیکی رشد گیاه و در نهایت کاهش عملکرد آن نیز می‌گردد. این فلز به واسطه‌ی ورود به زنجیره‌های غذایی، در بدن انسان و حیوانات تجمع می‌یابد و از این رو سلامتی آن‌ها را به مخاطره می‌اندازد (۱۹).

ریزجانداران ساکن محیط‌های طبیعی آلوده به فلزات سنگین، غالباً به دلیل سازگار شدن به چنین محیط هایی، نسبت به آلاینده‌های فلزی متحمل می‌باشند (۲۲). این ریزجانداران، سازوکارهای ویژه‌ای را به منظور تحمل جذب یون‌های فلزی و کاستن از شدت تنش فلزات سنگین توسعه داده‌اند. این سازوکارها شامل پمپ کردن یون‌های فلزی به فضای خارج از سلول، تجمع و انباشت نمودن یون‌های فلزی در داخل سلول، تبدیل فلزات سمی به شکل‌های با سمیت کمتر و جذب یا واجذب فلزات می‌باشند (۳۲). این میکروب‌های سودمند به دلیل برخورداری از صفات چندگانه‌ای نظیر مقاومت نسبت به فلزات و تبدیل آن‌ها به شکل‌های با سمیت کمتر و همچنین توانایی ارتقای رشد گیاهان از طریق سازوکارهای مختلف نظیر تثبیت نیتروژن اتمسفری، استفاده از ۱-آمینوسیکلوپروپان-۱-کربوکسیلیک اسید (ACC) به عنوان منبع نیتروژن، تولید سیدروفورها و یا ترشح مواد تنظیم‌کننده‌ی رشد گیاه (هورمون‌ها)، یکی از مناسب ترین گزینه‌ها جهت استفاده در مطالعات مربوط به افزایش کارآیی

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد اگرواکولوژی دانشگاه شهرکرد و دانشجوی دکتری گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲- به ترتیب استادیار گروه مهندسی زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد
(*- نویسنده مسئول Email: Danesh-a@agr.sku.ac.ir)
۳- استاد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد
۴- مربی گروه شیلات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

گیاه‌پالایی خاک‌های آلوده به فلزات سنگین می‌باشند (۵).

باکتری‌های ریزوسفری که قادرند فعالانه بر سطح و یا درون ریشه‌های گیاه تشکیل کلنی داده و متعاقباً رشد گیاه میزبان را ارتقا دهند، عموماً تحت عنوان ریزوباکترهای محرک رشد گیاه نامیده می‌شوند (۱۷). این ریزجانداران به سه شیوه‌ی مختلف رشد گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهند: ۱- به وسیله‌ی سنتز و فراهم آوردن ترکیبات ویژه برای گیاهان، ۲- تسهیل فرآیند جذب برخی عناصر غذایی از محیط و ۳- حفاظت از گیاه در مقابل بیماری‌های خاص (۷). به طور کلی، ریزوباکترها به واسطه‌ی سنتز ترکیبات پیش‌ساز هورمون‌های گیاهی، ویتامین‌ها، آنزیم‌ها، سیدروفورها، آنتی‌بیوتیک‌ها و جلوگیری از سنتز اتیلن سبب بهبود رشد گیاه می‌شوند (۲). به علاوه، سویه‌های ریزوباکتریایی قادر به انحلال فسفر غیرآلی، معدنی کردن فسفر آلی و بهبود تحمل گیاه نسبت به تنش‌های خشکی، شوری و فلزات سنگین می‌باشند و بدین طریق رشد گیاه را تحت شرایط تنش‌زا افزایش می‌دهند (۱۸). به علاوه، بسیاری از ریزجانداران خاک قادر به حل کردن شکل‌های غیرقابل‌جذب کانی‌های معدنی فلزدار از طریق ترشح اسیدهای آلی ساده هستند. از طرفی، بسیاری از ریزوباکترهای محرک رشد گیاه نسبت به فلزات سنگین مقاوم بوده و نقش مهمی را به منظور متحرک ساختن این فلزات در خاک از طریق تولید عوامل کلات‌ساز، اسیدی کردن pH ناحیه‌ی ریشه، انحلال فسفات و تغییر پتانسیل اکسایش-کاهش خاک بر عهده دارند (۱۵). این باکتری‌ها به دلیل برخورداری از اندازه‌ی کوچک، دارای فعالیت و نسبت سطح به حجم زیادی می‌باشند و بنابراین سطح تماس وسیعی را مهیا نموده و امکان استفاده از آن‌ها به عنوان کلات‌های میکروبی جهت افزایش کارآیی فن‌آوری گیاه‌پالایی وجود دارد (۱۲).

نتایج مطالعات پیشین حاکی از آن است که تلقیح خاک با ریزوباکترهای مقاوم به فلزات سنگین، می‌تواند منجر به افزایش جذب این فلزات به وسیله‌ی گیاهان در خاک‌های آلوده شود. بنابراین، بهبود روابط متقابل میان گیاهان و میکروب‌های ریزوسفری سودمند می‌تواند موجب افزایش تولید بیوماس و تحمل گیاهان نسبت به فلزات سنگین شده و در نتیجه به عنوان یکی از مهمترین اجزای فن‌آوری گیاه‌پالایی به حساب می‌آید (۱۲). از این رو، مطالعه‌ی حاضر به منظور جداسازی و شناسایی ریزوباکترهای متحمل به سرب از یک خاک حاوی سرب با سابقه‌ی بلند مدت و تعیین صفات محرک رشدی آن‌ها که پیش‌بینی می‌شود در راستای بهبود کارآیی گیاه‌پالایی خاک‌های آلوده به سرب، جهت افزایش زیست‌توده‌ی گیاهان پالایش‌دهنده و همچنین ارتقای جذب آلاینده‌های فلزی توسط آن‌ها سودمند باشند، به اجرا در آمد.

مواد و روش‌ها

استخراج و شناسایی ریزوباکتری‌های مقاوم به سرب

به منظور جداسازی ریزوباکتری‌های مقاوم به سرب، معدن سرب و روی باما (ایرانکوه)، که سومین معدن سرب و روی ایران محسوب می‌شود جهت جداسازی باکتری‌های ریزوسفری متحمل به سربِ محرک رشد گیاه انتخاب گردید. این معدن در ۲۰ کیلومتری جنوب‌غربی شهر اصفهان، با عرض جغرافیایی ۵۰ درجه و ۳۱ دقیقه و ۴۵ ثانیه‌ی شمالی و طول جغرافیایی ۳۲ درجه و ۲۸ دقیقه و ۳۷ ثانیه‌ی غربی و ارتفاع ۱۶۷۰ متر از سطح دریا واقع گردیده است. سرب قابل جذب و سرب کل در خاک مورد استفاده به ترتیب ۴۱ و ۳۷۹ میلی‌گرم بر کیلوگرم و بافت خاک لومی با اسیدیته ۷/۶۲ بود. پس از شناسایی گیاهان غالب منطقه، از خاک ریزوسفری این گیاهان نمونه برداری به عمل آمد. نمونه‌ها با استفاده از یک ظرف حاوی یخ در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و در تاریکی به آزمایشگاه انتقال داده شدند و به منظور جداسازی گونه‌های باکتریایی مقاوم به سرب مورد استفاده قرار گرفتند.

به منظور جداسازی باکتری‌های متحمل به سرب، پس از اختلاط کامل خاک ریزوسفری جمع‌آوری شده، حدود ۱ گرم از نمونه‌ی خاک ریزوسفری با استفاده از سرم فیزیولوژیک استریل به صورت متوالی رقیق شده (روش رقت‌های متوالی) و سپس بر سطح محیط کشت آگار لوریا-برتانی (LB) اصلاح شده (۲۰) محتوی ۱ گرم گلوکز، ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نیترات سرب و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر قارچ‌کش سیکلوهگزامید (۲۸) توزیع و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوباسیون گردید (۲۰). سپس کلنی‌های رشد کرده بر سطح محیط کشت بر اساس شکل و رنگ کلنی تفکیک و با انتقال به محیط‌های جداگانه خالص‌سازی گردیدند. شناسایی باکتری‌ها مطابق راهنمای سیستماتیک باکتری‌شناسی برگی[1] و بر اساس شکل، رنگ‌آمیزی گِرم، تشکیل اسپور، تحرک، تولید آنزیم کاتالاز، همولیز محیط بلاد آگار، احیای نیترات، آزمون متیل‌رِد-وُگِس پروسکائور[2]، آزمون سولفید-ایندول-تحرک[3]، تحمل نمک ۷ درصد، تحمل دمای ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، رنگ‌آمیزی اسیدفَست و هیدرولیز نشاسته صورت گرفت (۴).

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی سرب بر رشد باکتری‌های جدا شده

به منظور تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) سرب بر رشد

1- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology
2- MR-VP test
3- SIM test

باکتری‌های جدا شده، از روش افزایش تدریجی غلظت سرب استفاده گردید. بدین صورت که در هر مرتبه ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر (ppm ۵۰) سرب به محیط کشت اضافه شد. آزمون با غلظت ابتدایی ۵۰ میلی‌گرم سرب بر لیتر آغاز شده و کلونی‌های باکتریایی که بر روی آخرین غلظت فلز سنگین در حال رشد بودند به محیط کشت حاوی غلظت بالاتر سرب انتقال داده شد. زمانی‌که باکتری‌های جدا شده دیگر قادر به رشد کردن بر روی محیط کشت حاوی فلز سنگین نبودند، این غلظت به‌عنوان حداقل غلظت بازدارندگی برای آن باکتری به ثبت رسید (۳۰).

ارزیابی تولید ایندول استیک اسید (IAA) توسط سویه‌های باکتریایی

تولید ایندول استیک توسط باکتری‌های خالص شده، بر اساس روش گلیک‌من و دساکس (۱۳) تعیین گردید. بدین منظور باکتری‌ها به طور جداگانه به داخل ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط مایع LB تلقیح شده و بر روی یک شیکر انکوباتوردار در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتیگراد و با سرعت ۱۵۰ دور بر دقیقه رشد نموده و تکثیر شدند. مقدار جذب تمامی کشت‌ها از طریق سانتریفیوژ نمودن آن‌ها و سپس معلق نمودن سلول‌های باکتریایی در سرم فیزیولوژیک استریل، در طول موج ۶۰۰ نانومتر تقریباً تا ۱/۲ تنظیم شد. ۵ میلی‌لیتر از هر سوسپانسیون باکتریایی به داخل ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری محتوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط دورکین و فاستر (DF) (شامل ۲ گرم $(NH_4)_2SO_4$، ۴ گرم KH_2PO_4، ۶ گرم Na_2HPO_4، ۰/۲ گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۱ میلی‌گرم $FeSO_4.7H_2O$، ۱۰ میکروگرم H_3BO_3، ۱۰ میکروگرم $MnSO_4$، ۷۰ میکروگرم $ZnSO_4$، ۵۰ میکروگرم $CuSO_4$، ۱۰ میکروگرم MoO_3، ۲ گرم گلوکز، ۲ گرم گلوکونیک اسید، ۲ گرم سیتریک اسید، در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر که pH آن با استفاده از بافر تریس بر ۷ تنظیم گردید) که مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر ال-تریپتوفان[1] به آن اضافه گردیده بود، تلقیح شدند. کشت‌های باکتریایی، به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه‌ی سانتیگراد و با سرعت ۱۷۵ دور بر دقیقه به هم زده شدند. پس از گذشت ۷۲ ساعت، سلول‌های باکتریایی از طریق سانتریفیوژ کردن کشت‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتیگراد و با سرعت ۱۱۰۰۰ دور بر دقیقه از محیط کشت جدا شده و ۲ میلی‌لیتر از معرف سالکووسکی (شامل ۱۵۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک (H_2SO_4) غلیظ، ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۷/۵ میلی‌لیتر $FeCl_3.6H_2O$ ۰/۵ مولار) به ۱ میلی‌لیتر از فاز مایع رویی فاقد باکتری اضافه گردید (۱۰) و سپس به مدت ۲۵ دقیقه محلول در دمای اتاق به حال خود رها شد (۲۸). در نهایت میزان جذب محلول در طول موج ۵۳۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (۱۰). جهت تعیین مقدار IAA تولید شده توسط باکتری‌ها محلول‌های استاندارد IAA در غلظت‌های ppm ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۵ و ۱۵۰ تهیه و منحنی کالیبراسیون رسم گردید. برای تهیه محلول‌های استاندارد IAA به جای آب مقطر از محیط کشت دورکین و فاستر (DF) + ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ال-تریپتوفان استفاده گردید تا ماده‌ی زمینه‌ای در نمونه‌های استاندارد و نمونه‌های باکتریایی یکسان باشد (۲۴). این آزمون ۳ بار تکرار شد.

ارزیابی سنتز سیدروفور توسط سویه‌های باکتریایی

به منظور ارزیابی کیفی تولید سیدروفور توسط سویه‌های باکتریایی از آزمون کروم آزورول-سولفونات (CAS) آگار که توسط شوین و نیلاندس (۲۷) توصیف و به وسیله‌ی سیلوا-استنیکو و همکاران (۲۹) اصلاح گردیده بود، استفاده شد. به طور خلاصه، ۶۰/۵ میلی‌گرم از ترکیب کروم آزرول سولفونات در ۵۰ میلی‌لیتر آب دی‌یونیزه حل شده و سپس با ۱۰ میلی‌لیتر از محلول آهن (III) (شامل ۱ میلی‌مول بر لیتر $FeCl_3.6H_2O$ در ۱۰ میلی‌مول بر لیتر HCl) مخلوط گردید. همزمان با تکان دادن، این محلول به آرامی با ۷۲/۹ میلی‌گرم هگزادسیل‌تری‌متیل‌آمونیوم بروماید (HDTMA) که قبلاً در ۴۰ میلی‌لیتر آب دی‌یونیزه حل شده بود، مخلوط شد. محلول حاصل اُتوکلاو شد، پس از آنکه دمای آن به حدود ۵۰ درجه‌ی سانتیگراد کاهش یافت با ۹۰۰ میلی‌لیتر محیط استریل LB محتوی ۱۵ گرم بر لیتر آگار که دمای آن نیز در حدود ۵۰ درجه‌ی سانتیگراد بود، مخلوط گردید (۲۹). ۲۵ میلی‌لیتر از محیط CAS-آگار در کف پتری‌های ۹۰ میلی‌متری توزیع گردید و پس از بسته شدن (ژله‌ای شدن) محیط، ۵۰ میکرولیتر از مایه‌ی تلقیح هر باکتری به روش قطره‌گذاری در مرکز پتری‌دیش تلقیح شد. پتری‌ها به مدت ۵ روز در تاریکی و دمای ۲۸ درجه‌ی سانتیگراد انکوباسیون شدند. تغییر رنگ محیط کشت از آبی تیره به نارنجی روشن (زرد)، نشان‌دهنده‌ی تولید سیدروفور توسط سویه‌های باکتریایی بود (۲۹). این آزمون ۳ بار تکرار شد.

تخمین کمی تولید سیدروفورها با استفاده از آزمون CAS-شاتل[2] صورت پذیرفت. بدین ترتیب که پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون باکتری‌ها در محیط مایع لوریا-برتانی، سلول‌های باکتریایی از طریق سانتریفیوژ کردن به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتیگراد و با سرعت ۱۱۰۰۰ دور بر دقیقه از محیط کشت جدا شده و ۵۰۰ میکرولیتر از محلول CAS-شاتل (۵-سولفوسالیسیلیک اسید ۰/۲ مولار) به ۵۰۰ میکرولیتر از فاز مایع رویی فاقد باکتری اضافه گردید. پس از ۱۵ ساعت انکوباسیون محلول در دمای اتاق و در تاریکی، OD هر محلول در طول موج ۶۳۰ نانومتر تعیین گردید (۶). محلول

1- L-Tryptophan

2- CAS-Shuttle

اولیه به رنگ آبی می‌باشد و در صورت ترشح سیدروفور توسط باکتری به تدریج آهن موجود در محلول به وسیله‌ی سیدروفورها کلات شده و رنگ محلول به نارنجی متمایل می‌گردد (۱۰). از این رو، در نهایت با استفاده از رابطه‌ی ۱ که بر مبنای درصد تغییر رنگ محلول اولیه از آبی به نارنجی استوار است، میزان تولید سیدروفور توسط سویه‌های باکتریایی برآورد گردید (۲۶).

$$\text{میزان تولید سیدروفور (درصد)} = \frac{Ar - As}{Ar} \times 100 \quad (۱)$$

Ar: میزان جذب نمونه‌ی مرجع (محیط LB+ترکیب CAS–شاتل) در طول‌موج ۶۳۰ نانومتر

As: میزان جذب نمونه‌ی آزمایشی در طول‌موج ۶۳۰ نانومتر

ارزیابی توانایی سویه‌های باکتریایی در استفاده از ACC به‌عنوان منبع نیتروژن (تولید آنزیم ACC–دی‌آمیناز)

به منظور ارزیابی توانایی سویه‌های باکتریایی در استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن از روش دل‌آمیکو و همکاران (۹) با اندکی تغییر استفاده شد. بدین منظور سه نوع محیط کشت مایع شامل: ۱- محیط حداقل نمک‌های معدنی دورکین و فاستر (DF) فاقد منبع نیتروژن (شاهد منفی)؛ ۲- محیط حداقل نمک‌های معدنی DF حاوی دو گرم بر لیتر $(NH_4)_2SO_4$ به‌عنوان منبع نیتروژن (شاهد مثبت)؛ ۳- محیط حداقل نمک‌های معدنی DF حاوی ۳ میلی‌مول ACC به عنوان منبع نیتروژن، تهیه گردید. سپس یک لوپ پُر از هر سویه‌ی باکتریایی تحت شرایط استریل به ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع LB استریل انتقال یافت و برای مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه‌ی سانتیگراد و با سرعت ۱۶۰ دور بر دقیقه، انکوباسیون گردید. آنگاه ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر باکتری را به درون ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری محتوی ۵۰ میلی‌لیتر از ۳ محیط حداقل نمک‌های معدنی DF مزبور، تلقیح نموده و مجدداً برای مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد و سرعت ۱۶۰ دور بر دقیقه انکوباسیون شد. در نهایت چگالی نوری (OD) هر محیط کشت در طول موج ۴۰۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، تعیین شد (۱).

ارزیابی توانایی سویه‌های باکتریایی در انحلال ترکیب کم محلول کربنات سرب

به منظور شناسایی باکتری‌های دارای قابلیت انحلال کربنات سرب، مایه‌ی تلقیح باکتری‌های جدا شده با استفاده از سلول‌هایی که در فاز لگاریتمی رشد (OD_{600nm}= 0.4-0.7) قرار داشتند، آماده گردید. محیط مورد استفاده جهت تلقیح، محیط مایع LB بود که مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کربنات سرب به آن اضافه شد. سه ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری محتوی ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت LB استریل محتوی ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کربنات سرب با یک میلی‌لیتر از مایه تلقیح باکتریایی (با جمعیت 5×10^8 سلول باکتری بر میلی‌لیتر) تلقیح گردید. از ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کربنات سرب تلقیح نشده یا ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت بدون سرب تلقیح شده با یک میلی‌لیتر مایه تلقیح باکتریایی، به عنوان تیمارهای شاهد جهت تعیین تأثیرات غیر زیستی بر انحلال‌پذیری سرب یا ارزیابی تأثیر حضور سرب در محیط کشت بر pH آن، استفاده شد. بالن‌های شاهد از قبل به‌مدت ۳۰ دقیقه و در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سانتیگراد اتوکلاو شده و بالن‌های آزمایشی در دمای ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد بر روی یک شیکر انکوباتوردار با سرعت ۲۰۰ دور بر دقیقه انکوباسیون گردیدند. پس از گذشت ۷ روز، نیمی از این سوسپانسیون باکتریایی بی‌رمق شده با استفاده از فیلتر غشایی ۰/۲۲ میکرومتری[1] صاف گردید و از آن برای تعیین pH استفاده شد. نیم دیگری از این کشت بی‌رمق شده نیز جهت تعیین میزان انحلال کربنات سرب مورد استفاده قرار گرفت. بدین ترتیب که سوسپانسیون باکتریایی را به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۶ درجه‌ی سانتیگراد و با سرعت ۴۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ نموده و سپس با استفاده از یک فیلتر غشایی ۰/۲۲ میکرومتری فاز رویی مخلوط صاف شد. غلظت سرب در محلول صاف شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر جذب اتمی تعیین گردید (۲۸).

تجزیه و تحلیل آماری

مقایسه میانگین داده‌های حاصل از آزمایشات حداقل غلظت بازدارندگی سرب و تولید ACC–دی‌آمیناز به وسیله‌ی آزمون t و با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 در سطح احتمال ۵ درصد صورت پذیرفت. مقایسه میانگین سایر داده‌ها نیز با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 (رویه‌ی GLM) به روش LSD در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار Excel 2007 استفاده گردید. برازش منحنی‌ها، محاسبه‌ی ضرایب همبستگی (R^2) و سطوح معنی‌داری (P) نیز با نرم‌افزار Sigma Plot 11.0 صورت گرفت.

نتایج و بحث

شناسایی ریزوباکتری‌های بومی جدا شده

با توجه به نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی صورت گرفته و بر اساس راهنمای سیستماتیک باکتری‌شناسی برگی ریزوباکتری‌های بومی استخراج شده عبارتند از: *Rhodococcus* sp.، *Bacillus stearothermophilus* strain A، *Corynebacterium* sp.، *Bacillus pumilus*، *Mycobacterium* sp.، *Bacillus*

1- 0.22-µm Millipore filter

Bacillus licheniformis، *stearothermophilus* strain B و *Bacillus* sp.

آزمون حداقل غلظت بازدارندگی سرب (MIC)

نتایج آزمون MIC نشان داد که بین ریزوباکتری‌های بومی استخراج شده از لحاظ حداقل غلظت بازدارندگی سرب اختلاف معنی‌داری وجود دارد. با توجه به جدول ۱ سویه‌ی *B. stearothermophilus* strain A که در زمره‌ی باسیل‌های گرمادوست قرار دارد، با تحمل ۱۷۲۰ میلی‌گرم بر لیتر (۵/۱۹ میلی‌مولار) سرب از بالاترین مقاومت نسبت به سرب برخوردار بود. در حالیکه، *B. pumilus* با تحمل ۱۰۹۵ میلی‌گرم بر لیتر (۳/۳ میلی‌مولار) سرب کمترین مقاومت را نسبت به سرب نشان داد. دامنه‌ی تغییر MIC در سویه‌های باکتریایی استخراج شده نیز بین ۳/۳ تا ۵/۱۹ میلی‌مولار (۱۰۹۵ تا ۱۷۲۰ میلی‌گرم بر لیتر) بود. کسرای کرمانشاهی و همکاران (۱۶) نیز طی مطالعه‌ی خود بر روی باکتری‌های مقاوم به سرب خاک‌های استان اصفهان اظهار داشتند که ۶۰ درصد از گونه‌های باکتریایی مقاوم به سرب استخراج شده، دارای MIC بین ۴ تا ۸ میلی‌مولار بوده‌اند. صبری و همکاران (۲۵) نیز ضمن بررسی باکتری‌های ساکن آب مصب رودخانه‌های ناحیه‌ی آلکساندریای کشور مصر، بالاترین میزان MIC باکتری‌های جدا شده را بین ۲/۵ تا ۵ میلی‌مولار گزارش نمودند. روآن و کلوگ (۲۳) سطح مقاومت باکتری‌های خاک نسبت به فلز سنگین سرب را بین ۲/۵ تا ۵/۶ میلی‌مولار گزارش نمودند.

آنچه در مطالعات مربوط به ارتقای گیاه‌پالایی یک آلاینده‌ی خاص توسط ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه دارای اهمیت فراوانی است، مقاوم بودن باکتری نسبت به آلاینده‌ی مورد مطالعه می‌باشد، چرا که تنها در این صورت باکتری ضمن حفظ و تداوم کارکردهای خود خواهد توانست به گیاه در فائق آمدن بر محدودیت‌های رشدی ناشی از سمیت آلاینده نیز کمک نماید. در این راستا، با در نظر گرفتن اصل انتخاب طبیعی، به طور معمول بایستی گونه‌های باکتریایی ساکن مناطق آلوده به فلزات سنگین از طریق توسعه‌ی مکانیسم‌های ویژه‌ای، بتوانند غلظت‌های بالای آلاینده‌های سمی نظیر سرب را تحمل نموده و تحت چنین شرایطی کارکردهای طبیعی خود را حفظ کرده و تداوم بخشند.

آزمون‌های باکتریایی

نتایج کلی آزمون‌های باکتریایی در جدول ۲ ارائه گردیده است.

جدول ۱- حداقل غلظت بازدارندگی سرب (MIC) برای سویه‌های باکتریایی جدا شده از خاک آلوده به سرب

ریزوباکتری	حداقل غلظت بازدارندگی سرب (ppm)	حداقل غلظت بازدارندگی سرب (mM)
Rhodococcus sp.	۱۳۱۴e	۳/۹۶e
B. stearothermophilus strain A	۱۷۲۰a	۵/۱۹a
Corynebacterium sp.	۱۲۵۱f	۳/۷۷f
B. pumilus	۱۰۹۵g	۳/۳g
Mycobacterium sp.	۱۳۱۴e	۳/۹۶e
B. stearothermophilus strain B	۱۴۷۰c	۴/۴۴c
B. licheniformis	۱۳۷۶d	۴/۱۵d
Bacillus sp.	۱۵۰۱b	۴/۵۳b

در هر ستون مقادیر دارای حروف مشابه بر اساس آزمون t در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌دار ندارند.

جدول ۲- خلاصه‌ی نتایج آزمون‌های باکتریایی برای تولید مواد محرک رشد

ریزوباکتری	IAA	سیدروفور	ACC-دی‌آمیناز	انحلال کربنات سرب
Rhodococcus sp.	+	+	−	−
B. stearothermophilus strain A	+	+	−	−
Corynebacterium sp.	+	+	−	+
B. pumilus	+	+	−	−
Mycobacterium sp.	+	+	+	−
B. stearothermophilus strain B	+	+	−	−
B. licheniformis	+	+	+	−
Bacillus sp.	+	+	−	−

ارزیابی تولید ایندول استیک اسید (IAA) توسط سویه‌های باکتریایی

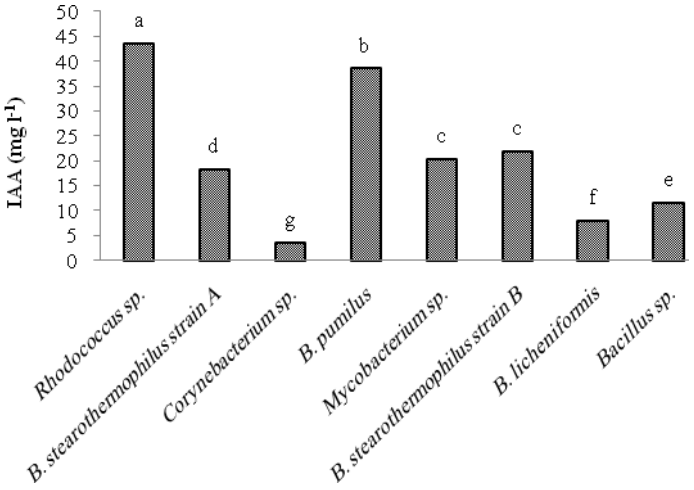
ایندول-۳-استیک اسید، وظایف متنوعی را در رشد و نمو گیاهان بر عهده دارد و به عنوان عامل اصلی شکل‌دهی به ساختمان ریشه‌ی گیاه، سبب تمایز بافت آوندی، تنظیم نمو ریشه‌های جانبی، قرارگیری قطبی تارهای کشنده و جاذبه‌گرایی ریشه می‌گردد (۳). بخشی از اثرات محرک رشدی ریزوباکتری‌های گوناگون وابسته به تولید هورمون‌های گیاهی نظیر ایندول-۳-استیک اسید (IAA)، جیبرلین و سیتوکنین توسط آن‌ها است. ریزوباکتری‌های همزیست با ریشه‌ی گیاهان قادرند تعادل هورمونی گیاه و متعاقباً رشد و نمو آن را تحت تأثیر قرار دهند. بر اساس برآوردهای صورت گرفته حدود ۸۰ درصد از باکتری‌های خاک از توانایی ترشح هورمون گیاهی ایندول-۳-استیک اسید (IAA) برخوردار هستند. نتایج مطالعات مختلف حاکی از بهبود رشد و نمو گیاهان در پاسخ به تلقیح بذر و ریشه‌ی آن‌ها توسط ریزوباکتری‌های تولیدکننده‌ی هورمون‌های گیاهی می‌باشند. از طرفی، هورمون‌های گیاهی نقش مهمی را در واکنش گیاهان نسبت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی بر عهده دارند (۱۱). نتایج آزمون ارزیابی تولید ایندول-۳-استیک اسید (شکل ۱) توسط ریزوباکترهای مقاوم به سرب جدا شده از خاک نشان داد که تمامی آن‌ها از توانایی تولید هورمون گیاهی IAA برخوردارند.

با توجه به شکل ۱، باکتری‌های *Rhodococcus* sp. و *Corynebacterium* sp. به ترتیب با میانگین ۴۳/۶ و ۳/۵۳ میلی‌گرم بر لیتر، بالاترین و کمترین میزان ایندول استیک اسید را تولید نمودند. پس از *Rhodococcus* sp.، ریزوباکتری‌های *B. pumilus*، *B. stearothermophilus* strain B، *Mycobacterium* sp.، *B. stearothermophilus* strain A، *Bacillus* sp. و *B. licheniformis* به ترتیب با تولید ۳۸/۶، ۲۱/۸، ۲۰/۴، ۱۸/۲، ۱۱/۶ و ۷/۹ میلی‌گرم بر لیتر ایندول استیک اسید در رده‌های بعدی سنتز IAA قرار گرفتند. با این وجود، میان دو ریزوباکتری *Mycobacterium* sp. و *B. stearothermophilus* strain B از لحاظ میزان سنتز هورمون گیاهی ایندول استیک اسید، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون LSD مشاهده نشد.

ارزیابی تولید سیدروفور توسط سویه‌های باکتریایی

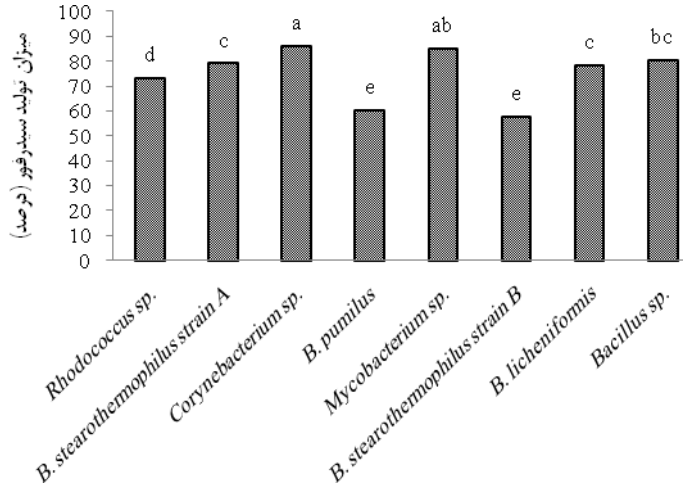
آهن در پوسته‌ی زمین به شکل ترکیب شدیداً نامحلول هیدروکسید آهن (III) وجود دارد و بنابراین، برای ریزجانداران خاک و گیاهان غیرقابل استفاده می‌باشد (۲۱). گیاهان، به منظور جذب آهن مورد نیاز خود تحت شرایط بروز تنش ناشی از کمبود این عنصر اقدام به رهاسازی سیدروفورهای گیاهی یا پروتون‌ها به درون محیط ریزوسفر می‌کنند (۱۴). برخی از باکتری‌ها نیز سیستم‌هایی را که دربرگیرنده‌ی ترشح سیدروفورها است به منظور جذب آهن مورد نیاز خود توسعه داده‌اند (۲۱). سیدروفورها ترکیبات کلات‌کننده‌ی آهنِ با وزن مولکولی پایین هستند که به آهن (III) متصل شده و آن را به سمت سلول انتقال داده و سبب فراهمی آهن برای ریزجانداران خاک می‌گردند. مولکول‌های سیدروفور ترشح شده از میل ترکیبی بسیار بالایی با آهن برخوردار هستند و به بخش اعظم آهن (III) موجود در ناحیه‌ی ریزوسفر متصل شده و به دلیل بروز کمبود آهن، مانع از تکثیر پاتوژن‌های گیاهی می‌شوند. لذا، باکتری‌های آنتاگونیست قادرند از طریق تولید مولکول‌های سیدروفور که با بخش اعظم آهن (III) موجود در ناحیه‌ی ریزوسفر پیوند می‌یابند، مانع از تکثیر قارچ‌های پاتوژن شوند. توانایی سویه‌های باکتریایی دارای قابلیت کنترل زیستی پاتوژن‌های گیاهی تا حدودی وابسته به تولید سیدروفورهای ویژه و یا استفاده از طیف گسترده‌ای از سیدروفورها می‌باشد. به علاوه، سیدروفورهای میکروبی حدواسط جذب آهن توسط ریشه‌های گیاه تحت شرایط کمبود این عنصر نیز می‌باشند (۳۱). لذا، ریزوباکتری‌های تولیدکننده‌ی سیدروفور هم در حفاظت از گیاهان در مقابل پاتوژن‌های گیاهی نقش دارند و هم تحت شرایط بروز کمبود عناصر معدنی محلول سبب افزایش فراهمی این عناصر برای ریشه‌های گیاه شده و بدین طریق، رشد گیاه میزبان را بهبود می‌بخشند.

نتایج آزمون کیفی تولید سیدروفور نشان داد که تمامی سویه‌های باکتریایی جدا شده از خاک آلوده به سرب دارای قابلیت تولید کلات‌های زیستی سیدروفور می‌باشند (جدول ۲). نتایج آزمون کمی تولید سیدروفور توسط سویه‌های باکتریایی استخراج شده از خاک آلوده نیز در شکل ۲ نشان داده شده است. بر این اساس، باکتری‌های *Corynebacterium* sp. و *B. stearothermophilus* strain B به ترتیب با میانگین ۸۶/۲ و ۵۷/۷ درصد، از بالاترین و کمترین میزان توانایی تولید سیدروفور برخوردار بودند. پس از *Corynebacterium* sp.، ریزوباکتری *Mycobacterium* sp. با مقدار میانگین ۸۵/۰۵ درصد بیشترین میزان سیدروفور را سنتز نموده است، اما میان این باکتری و باکتری *Corynebacterium* sp. از لحاظ میزان تولید سیدروفور اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. پس از آن، *Bacillus* sp.، *B. stearothermophilus strain A*، *B. licheniformis*، *Rhodococcus* sp. و *B. pumilus* به ترتیب با تولید ۸۰/۴، ۷۹/۱، ۷۸/۴، ۷۳/۱ و ۶۰/۲ درصد در رده‌های بعدی سنتز سیدروفور قرار گرفتند. با این وجود، میان ریزوباکتری‌های *Mycobacterium* sp. و *B. stearothermophilus* strain A، *Bacillus* sp.، *Bacillus* sp. و *B. licheniformis* و *B. pumilus* و *B. stearothermophilus* strain B از لحاظ میزان تولید کلات زیستی سیدروفور، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون LSD مشاهده نشد.



شکل ۱- میزان تولید ایندول-۳-استیک اسید (IAA) توسط باکتری‌های جدا شده از خاک ریزوسفری

(میانگین‌های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند)



شکل ۲- نتایج آزمون کمی تولید سیدروفور توسط ریزوباکتری‌های استخراج شده

(میانگین‌های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند)

ارزیابی توانایی سویه‌های باکتریایی در استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن (تولید آنزیم ACC-دی‌آمیناز)

بر اساس گزارش‌های موجود، آنزیم باکتریایی ACC-دی‌آمیناز تنها آنزیم غیرگیاهی است که قادر به متابولیسم ترکیب ۱-آمینوسیکلوپروپان-۱-کربوکسیلات می‌باشد. باکتری‌های تولیدکننده‌ی آنزیم ACC-دی‌آمیناز قادر به جذب ACC ترشح شده توسط ریشه‌ی گیاه و تبدیل آن به α-کتوبوتیرات و آمونیاک می‌باشند. این ویژگی موجب کاهش سطوح ACC و متعاقباً کاهش غلظت اتیلن در گیاهان تحت تنش گردیده و بدین طریق از شدت تنش کاسته و سبب حفاظت از گیاهان در مقابل تنش ناشی از غرقاب، شوری، خشکی، فلزات سنگین، ترکیبات آلی سمی و عوامل بیماری‌زا خواهد شد (۵).

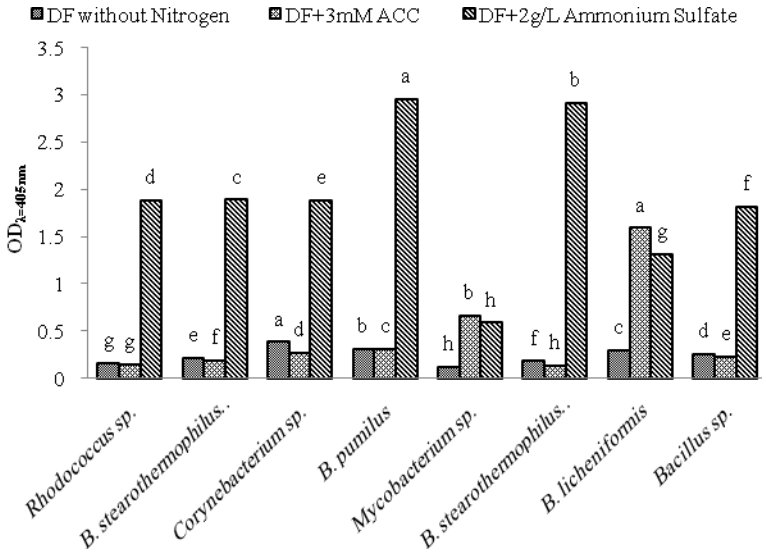
بر اساس اظهارات دل‌آمیکو و همکاران (۹) ساده‌ترین روش به منظور شناسایی باکتری‌های دارای فعالیت آنزیم ACC-دی‌آمیناز، مقایسه‌ی رشد باکتری در سه محیط محتوی منابع معمول نیتروژن معدنی (نظیر سولفات آمونیوم)، ACC و فاقد منبع نیتروژن است. از این رو، در مطالعه‌ی حاضر نیز به منظور غربالگری باکتری‌های دارای فعالیت آنزیم ACC-دی‌آمیناز، میزان رشد آن‌ها در طول‌موج ۴۰۵

نانومتر در سه محیط محتوی سولفات آمونیوم به عنوان منبع معمول نیتروژن، ACC (به عنوان منبع نیتروژن برای باکتری‌های تولیدکننده‌ی آنزیم ACC–دی‌آمیناز) و فاقد منبع نیتروژن مقایسه گردید. نتایج این آزمون نشان داد که تنها دو ریزوباکتری *Mycobacterium* sp. و *B. licheniformis* دارای توانایی تولید آنزیم ACC–دی‌آمیناز می‌باشند (شکل ۳).

ارزیابی توانایی سویه‌های باکتریایی در انحلال ترکیب کم محلول کربنات سرب

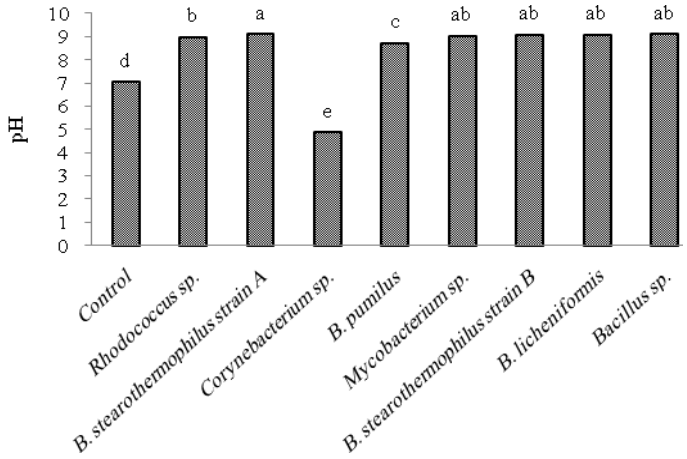
بخش اعظمی از فلزات سنگین موجود در خاک، جذب سطحی کربنات‌ها، مواد آلی، اکسیدهای آهن–منگنز و کانی‌های اولیه یا ثانویه شده‌اند و یا اینکه با آن‌ها پیوند برقرار نموده و لذا، برای سیستم‌های بیولوژیکی غیرقابل استفاده می‌باشند. اندک بودن فراهمی زیستی آلاینده‌های فلزی، یکی از مهمترین موانع موجود بر سر راه پالایش موثر خاک‌های آلوده به فلزات سنگین توسط گیاهان بیش‌اندوز محسوب می‌شود (۸). در این راستا، استفاده از ریزوباکتری‌هایی که به واسطه‌ی سنتز اسیدهای آلی و کاهش pH ناحیه‌ی ریزوسفر قادر به افزایش انحلال‌پذیری و جذب شکل‌های نامحلول و کم‌محلول فلزات سنگین توسط گیاهان پالایش‌دهنده می‌باشند، روشی سودمند جهت بهبود کارآیی فرآیند گیاه‌پالایی و کاهش زمان پاکسازی منطقه‌ی آلوده به حساب می‌آید (۵). نتایج مربوط به تأثیر ریزوباکتری‌های استخراج شده بر pH محیط کشت و غلظت سرب قابل جذب آن، به ترتیب در شکل‌های ۴ و ۵ ارائه گردیده است.

بر این اساس، تنها ریزوباکتری *Corynebacterium* sp. قادر به کاهش pH محیط کشت و افزایش انحلال ترکیب کم‌محلول کربنات سرب بود. غلظت سرب قابل جذب در ارلن‌های تلقیح شده با این باکتری به طور معنی‌داری بیشتر از غلظت سرب قابل جذب ارلن‌های شاهد بود (شکل ۵). به طوری که پس از گذشت ۷ روز از شروع آزمون غلظت سرب قابل جذب در ارلن‌های تلقیح شده با این باکتری به حدود دو برابر (۲۲۱ درصد) غلظت سرب قابل جذب ارلن‌های شاهد رسید. pH ارلن‌های تلقیح شده با این باکتری نیز به طور معنی‌داری کمتر از pH ارلن‌های شاهد تلقیح نشده بود (شکل ۴). این باکتری پس از گذشت ۷ روز، pH محیط کشت را از ۷/۰۵ به ۴/۸۸ کاهش داده (معادل ۲/۱۷ واحد یا ۳۱ درصد کاهش) و سبب اسیدی شدن pH آن گردید. لذا، با توجه به این شواهد واضح است که ریزوباکتری *Corynebacterium* sp. توانسته با ترشح اسیدهای آلی، pH محیط کشت را کاهش و متعاقباً میزان انحلال ترکیب کم‌محلول کربنات سرب را افزایش دهد. این در حالی است که سایر باکتری‌های استخراج شده از چنین توانایی برخوردار نبودند. این باکتری‌ها با افزایش ۲۴ تا ۲۹ درصدی pH (از ۱/۷ تا ۲/۰ واحد) محیط کشت سبب کُند شدن انحلال کربنات سرب گردیدند، به طوری که غلظت سرب قابل جذب ارلن‌های تلقیح شده با این باکتری‌ها به طور معنی‌دار کمتر از غلظت سرب قابل جذب ارلن‌های شاهد تلقیح نشده بود. بررسی رابطه‌ی میان pH محیط کشت و غلظت سرب قابل جذب آن نیز موید وجود همبستگی منفی بسیار معنی‌دار ($P < 0.01$) میان این دو بود (شکل ۶). به طوری که با افزایش pH محیط کشت، غلظت سرب قابل جذب آن به طور معنی‌داری نسبت به ارلن‌های شاهد کاهش یافت.



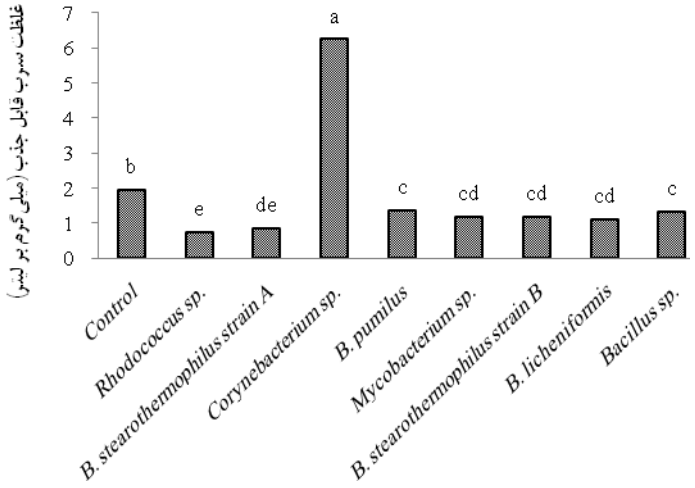
شکل ۳- میزان رشد ریزوباکتری‌های استخراج شده در سه محیط کشت

(در هر محیط کشت، میانگین‌های با حروف مشابه بر اساس آزمون t دارای اختلاف معنی‌داری نیستند)



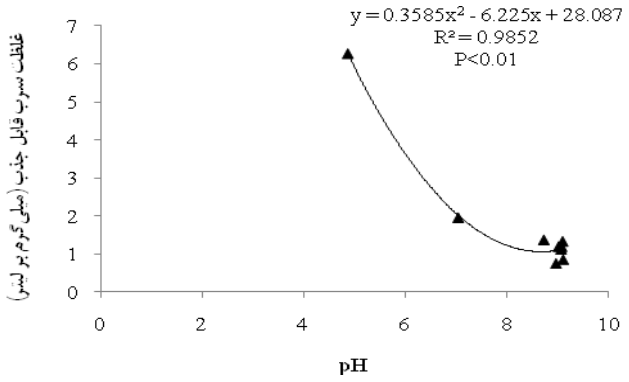
شکل ٤- اثر باکتری‌های استخراج شده از خاک حاوی سرب بر pH محیط کشت

(میانگین‌های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند)



شکل ۵- اثر باکتری‌های استخراج شده از خاک حاوی سرب بر غلظت سرب قابل جذب محیط کشت

(میانگین‌های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند)



شکل ٦- همبستگی میان pH محیط کشت و غلظت سرب قابل جذب آن

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه‌ی حاضر حاکی از آن بود که ریزوباکتری‌های بومی استخراج شده از خاک آلوده به سرب، به جنس‌های مختلفی شامل *Rhodococcus*، *Bacillus*، *Corynebacterium* و *Mycobacterium* تعلق داشته و همگی قادر به تحمل غلظت‌های بالای فلز سمی سرب می‌باشند. با این وجود، فراوانی گونه‌های متعلق به جنس *Bacillus* بیش از سایر جنس‌ها بود که این می‌تواند ناشی از توانایی آن‌ها در تحمل شرایط محیطی سخت از طریق تولید اندواسپور باشد. این در حالی است که تمامی ریزوباکتری‌های بومی جدا شده از خاک آلوده به سرب، با درجات مختلف دارای صفات محرک رشدی نظیر تولید IAA و سیدروفور بودند و از این لحاظ نیز تنوع قابل ملاحظه‌ای میان ریزوباکتری‌ها مشاهده شد. علاوه بر این، برخی از آن‌ها (*Mycobacterium* sp. و *B. licheniformis*) از توانایی تولید آنزیم ACC–دی‌آمیناز که یکی از مهمترین خصوصیات ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه محسوب می‌شود، نیز برخوردار بودند. از طرف دیگر، توانایی انحلال ترکیبات کم‌محلول فلزی از طریق ترشح اسیدهای آلی و در نتیجه کاهش pH محیط کشت نیز در یکی از گونه‌های ریزوباکتریایی (*Corynebacterium* sp.) به اثبات رسید.

منابع

۱- جلیلی ف.، خاوازی ک.، پذیرا ا.، نجاتی ع. و اسدی رحمانی ه. ۱۳۸۸. تأثیر سودوموناس‌های فلورسنت دارای فعالیت آنزیم ACC–دی‌آمیناز در تعدیل اثرات مضر شوری بر کلزا در مرحله جوانه‌زنی، مجله‌ی پژوهش‌های خاک ۲۳: ۴۰-۲۵.

2- Ahmad F., Ahmad I., and Khan M.S. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiology Research, 163: 173-181.

3- Aloni R., Aloni E., Langhans M., and Ullrich C.I. 2006. Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. Annals of Botany, 97: 883-893.

4- Bahig A.E., Aly E.A., Khaled A.A., and Amel K.A. 2008. Isolation, characterization and application of bacterial population from agricultural soil at Sohag Province, Egypt. Malaysian Journal of Microbiology, 4: 42-50.

5- Belimov A.A., Hontzeas N., Safronova V.I., Demchinskaya S.V., Piluzza G., Bullitta S. and Glick B.R. 2005. Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). Soil Biology and Biochemistry, 37: 241-250.

6- Burd G.I., George Dixon D., and Glick B.R. 1998. A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. Journal of Applied and Environmental Microbiology. 64: 3663-3668.

7- Cakmakci R., Donmez F., Aydm A. and Sahin F. 2006. Growth promotion of plants by plant growth promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. Soil Biology and Biochemistry, 38: 1482-1487.

8- Chen Y.X., Shi J.Y., Zhang W.D., Lin Q., and Tian G.M. 2004. EDTA and industrial waste water improving the bioavailability of different Cu forms in contaminated soil. Plant Soil, 261: 117-125.

9- Dell'Amico E., Cavalca L., and Andreoni V. 2005. Analysis of rhizobacterial communities in perennial Graminaceae from polluted water meadow soil, and screening of metal-resistant, potentially plant growth-promoting bacteria. FEMS Microbiol Ecology, 52: 153-162.

10- Dell'Amico E., Cavalca L., and Andreoni V. 2008. Improvement of *Brassica napus* growth under cadmium stress by cadmium-resistant rhizobacteria. Soil Biology and Biochemistry, 40: 74-84.

11- Esitken A., Pirlak L., Ipek M., Donmez M.F., Cakmakci R., and Sahin F. 2009. Fruit bio-thinning by plant growth promoting bacteria (PGPB) in apple cvs. Golden Delicious Braeburn. Biological Agricultur and Horticulture, 26: 379-390.

12- Glick B.R. 2003. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. Biotechnology Advances, 21: 383-393.

13- Glickmann E., and Dessaux Y. 1995. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 61: 793-796.

14- Hartmann A., Schmid M., Van Tuinen D., and Berg G. 2009. Plant-driven selection of microbes. Plant Soil, 321: 235-257.

15- Idris R., Trifonova R., Puschenreiter M., Wenzel W.W. and Sessitsch A. 2004. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thaspi goesingense*, Applied and Environmental Microbiology, 70: 2667-2677.

16- Kasra Kermanshahi R., Ghazifard A., and Tavakoli A. 2007. Identification of bacteria resistant to heavy Metals in the soils of Isfahan province. Iranian Journal of Science and Technology, 31: 7-16.

17- Khan A.G. 2005. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 18: 355-364.
18- Khan M.S. and Zaidi A. 2007. Synergistic effects of the inoculation with plant growth promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungus on the performance of wheat. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 31: 355-362.
19- Lone M.I., Li H., Zhen P.J., Stoffella E., and Yang, X. 2008. Phytoremediation of heavy metal polluted soils and water: Progresses and perspectives. Journal of Zhejiang University Science B, 9: 210-220.
20- Ma Y., Rajkumar M., and Freitas H. 2009. Inoculation of plant growth promoting bacterium *Achromobacter xylosoxidans* strain Ax10 for the improvement of copper phytoextraction by *Brassica juncea*. Journal of Environmental Management, 90: 871-877.
21- Neilands J.B., and Nakamura K. 1991. Detection, determination, isolation, characterization and regulation of microbial iron chelates. In: G. Winkelmann (ed.) CRC handbook of microbial iron chelates. CRC Press, London, pp. 1-14.
22- Pal A., Dutta S., Mukherjee P.K., and Paul A.K. 2005. Occurrence of heavy metal resistance in microflora from serpentine soil of Andaman. Journal of Basic Microbiology, 45: 207-218.
23- Roane T.M., and Kellogg S.T. 1995. Characterization of bacterial communities in heavy metal contaminated soils. Canadian Journal of Microbiology, 42: 593-603.
24- Rubio M.G.T., Plata S.A., Castillo J.B., and Nieto P.M. 2000. Isolation of Enterobacteria, *Azotobacter* sp. and *Pseudomonas* sp. producers of Indole-3-Acetic Acid and Siderphores from Colombian rice rhizospher. Revista Latinoamrican de Microbioloia, 5: 171-176.
25- Sabry S.A., Ghozlan H.A., and Abou-zeid D.M. 1997. Metal tolerance and antibiotic resistance patterns of a bacterial population isolated from sea water. Journal of Applied Microbiology, 82: 245-252.
26- Sayyed R.Z., Badgujar M.D., Sonawane M.M., and Chincholkar S.B. 2005. Production of microbial iron chelators (siderphores) by fluorescent pseudomonas. Indian journal of biotechnology, 4: 484-490.
27- Schwyn B., Neilands J.B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Analytical Biochemistry, 160: 47-56.
28- Sheng X.F., and Xia J.J. 2006. Improvement of rape (*Brassica napus*) plant growth and cadmium uptake by cadmium-resistant bacteria. Chemosphere, 64: 1036-1042.
29- Silva-stenico M.E., Pacheco F.T.H., Rodrigues J.L.M., Carrilho E. and Tsai S.M. 2005. Growth and siderophore production of *Xylella fastidiosa* under iron-limited conditions. Microbiological Research, 160: 429-436.
30- Singh V., Chauhan P.K., Kanta R., Dhewa T., and Kumar V. 2010. Isolation and characterization of *Pseudomonas* resistant to heavy metals contaminants. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 3: 164-167.
31- Wang Y., Brown H.N., Crowley D.E., and Szaniszlo P.J. 1993. Evidence for direct utilization of a siderophore, ferrioxamine B, in axenically grown cucumber. Plant Cell and Environment, 16: 579-585.
32- Wani P.A., Khan M.S. and Zaidi A. 2008. Chromium reducing and plant growth promoting *Mesorhizobium* improves chickpea growth in chromium amended soil. Biotechnology Letters, 30: 159-163.

Journal of Water and Soil
Vol. 28, No. 6, Jan.-Feb. 2015, p. 1238-1249

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۸، شماره ۶، بهمن – اسفند ۱۳۹۳، ص. ۱۲۴۹-۱۲۳۸

Isolation and Evaluation of Lead (Pb)-Tolerant Plant Growth Promoting Rhizobacteria from a Soil Containing Pb for Long Term

M.R. Naderi[1]- A. Danesh Shahraki[2*]- F. Raiesi[3]- F. Nikookhah[4]

Received: 04-02-2014
Accepted: 01-10-2014

Abstract

This study was performed in order to isolate lead (Pb)-tolerant plant growth promoting rhizobacteria in Pb-contaminated soils and to evaluate their potential for production of plant promoting substances. The isolated Pb-tolerant rhizobacteria were identified as *Rhodococcus* sp., *Bacillus stearothermophilus* strain A, *Corynebacterium* sp., *Bacillus pumilus*, *Mycobacterium* sp., *Bacillus stearothermophilus* strain B, *Bacillus licheniformis* and *Bacillus* sp. The results showed that all isolates were able to tolerate high concentrations of Pb. The minimum inhibitory concentration (MIC) of these bacteria was in the range of 1100-1720 mg l^{-1} (3.3-5.19 mM). In addition, all isolates produced IAA (ranging from 3.53 to 43.64 mg l^{-1}) and siderophore (ranging from 57.74 to 86.24%). However, only two isolates (i.e., *Bacillus licheniformis* and *Mycobacterium* sp.) had the ability to produce bacterial enzyme ACC-deaminase. Inoculation of medium containing poorly soluble $PbCO_3$ with bacterial strain *Corynebacterium* sp. significantly increased the available concentration of Pb.

Keywords: Pb-tolerant rhizobacteria, Minimum inhibitory concentration (MIC), Indole acetic acid, Siderophore, ACC-deaminase, Lead carbonate solubilization

1- M.Sc. Graduated of Agroecology, Shahrekord University and PhD Student of Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
2- Assistant Professor of Agronomy Department, Faculty of Agriculture, Shahrekord University
(*- Corresponding Author Email: Danesh-a@agr.sku.ac.ir)
3- Professor of Soil Science Department, Faculty of Agriculture, Shahrekord University
4- Lecture of Aquaculture Department, Faculty of Agriculture, Shahrekord University