Archive of SID

Molecular Identification of Lead-resistant Plant Growth Promoting *Bacillus* Species Isolated from Lead-contaminated Soil

Mehrana Koohi Dehkordi[1]
Assistant Professor, Department of Agricultural Science, Faculty of Agriculture, Payame Noor University, Isfahan, Iran
Masoumeh Yousefzadeh
MSc, Department of Genetics, Faculty of Basic Science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
Rohollah Hemmati
Assistant Professor, Department of Bilology, Faculty of Basic Science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
Abdolrazagh Danesh Shahraki
Assistant Professor, Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

Abstract

Introduction: Soil contamination by heavy metals, including lead, is one of the most important environmental hazards and a major factor in the ecological collapse. Bioremediation by resistant bacteria is one of the suitable methods for the removal of these heavy metals, which has other advantages, including environmental compatibility, low cost, and stimulation of plant growth. The present study was conducted to isolate and identify lead-resistant rhizobacteria from long-term lead-contaminated soil based on morphological characteristics, biochemical tests, and sequencing of 16SrRNA gene.

Materials and Methods: The rhizosphere samples were collected and diluted on the modified LB media. The colonies were studied based on morphological characteristics, biochemical tests, and ultimately molecular identification based on sequencing of the 16SrRNA gene.

Results: Five isolates of lead-resistant Rhizobacteria were identified in this study. All strains showed the ability to tolerate high concentrations of lead (3.26 to 5.9 mM); moreover, all samples have the ability to produce indole acetic acid (88.87 to 38.58 mgl^{-1}).

Keywords: Lead-resistant Rhizobacteria, Plant Growth Regulators, Minimum Inhibitory Concentration, Indole Acetic Acid, 16sRRNA.

[1] Corresponding author
Received: May 15, 2019/ **Accepted:** October 3, 2019

www.SID.ir

Archive of SID

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال هشتم، شماره ۳۰ ،تابستان ۱۳۹۸ ، صفحه ۵۵-۶۷
تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۲۵ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۱۱

شناسایی مولکولی گونه‌های *Bacillus* مقاوم به سرب و محرک رشد گیاه جداسازی‌شده از خاک حاوی سرب

مهرآنا کوهی دهکردی[*]: استادیار گروه علوم کشاورزی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه پیام نور، اصفهان، ایران، m.koohi@gmail.com
معصومه یوسف‌زاده: کارشناس ارشد گروه ژنتیک، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، ایران، yosefzadeh1356@gmail.com
روح‌الله همتی: استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، ایران، hemmati1359@gmail.com
عبدالرزاق دانش شهرکی: استادیار گروه زراعت، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، ایران، ar_danesh2000@yahoo.com

چکیده

مقدمه: آلودگی خاک به فلزات سنگین ازجمله سرب، یکی از مهم‌ترین مخاطرات زیست‌محیطی و عامل مهمی در به‌هم‌خوردن تعادل و توازن طبیعت است. زیست‌پالایی توسط باکتری‌های مقاوم یکی از روش‌های مناسب برای حذف فلزات سنگین است که از مزایای دیگری ازجمله سازگاری با محیط‌زیست، هزینهٔ اندک و تحریک رشد گیاه نیز برخوردار است. پژوهش حاضر با هدف جداسازی و شناسایی ریزوباکترهای مقاوم به سرب از خاک ریزوسفری حاوی سرب با پیشینهٔ درازمدت بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی، آزمون‌های بیوشیمیایی و توالی ژن *16S rRNA* انجام شد.

مواد و روش‌ها: نمونه‌برداری از ریزوسفر گیاهان در خاک مدنظر انجام شد. پس‌از رقیق‌سازی نمونه‌ها روی سطح محیط کشت لوریا- برتانی (LB) آگار اصلاح‌شده، کلنی‌های رشدیافته بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و آزمون‌های بیوشیمیایی مطالعه شدند و درنهایت، تعیین هویت مولکولی بر اساس توالی‌یابی ژن *16S rRNA* انجام شد.

نتایج: در مطالعهٔ حاضر، پنج سویه از ریزوباکترهای مقاوم به سرب جداسازی و شناسایی شدند. تمام سویه‌ها قابلیت تحمل غلظت‌های زیاد فلز سرب (۳/۲۶ تا ۵/۰۹ میلی‌مولار) را نشان دادند؛ علاوه‌براین، تمام نمونه‌ها توانایی تولید ایندول-۳-استیک‌اسید (۷/۸۸ تا ۳۸/۵۸ میلی‌گرم‌برلیتر) را داشتند.

بحث و نتیجه‌گیری: استفاده از سویه‌های متحمل به سرب در تلقیح گیاهان بسیار انباشتگر در بهبود گیاه‌پالایی خاک‌های آلوده به سرب مؤثر واقع می‌شود.

واژه‌های کلیدی: ریزوباکترهای مقاوم به سرب، محرک رشد گیاه، حداقل غلظت بازدارندگی، ایندول-۳-استیک‌اسید، *16S rRNA*

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2019, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

آلودگی با فلزات سنگین یکی از مشکلات زیست‌محیطی به شمار می‌آید که سبب آلوده‌شدن زنجیرهٔ غذایی و به‌خطرافتادن سلامت جوامع انسانی می‌شود (۱). فلزات سنگین به عناصری مانند سرب، کادمیم،کروم، مس، جیوه، نیکل و روی اطلاق می‌شود که جرم اتمی آنها از ۴۰ گرم و جرم حجمی مخصوص آنها از ۵ گرم‌برسانتی‌مترمکعب بیشتر است (۲ و ۳). باوجود سمی‌بودن درخور توجه این فلزات، بسیاری از ریزموجودات مقاوم به این آلاینده‌ها سازوکارهای مقاومتی متنوعی را برای کاهش شدت تنش فلزات سنگین توسعه داده‌اند. آنها با سازوکارهایی نظیر تجمع یون‌های فلزی در سلول، تبدیل فلزات سنگین به شکل‌های دارای سمیت کمتر، پمپ‌کردن یون‌های فلزی به فضای خارج از سلول و رسوب آنها در بیرون از سلول، واجذب فلزات، اتصال در سطح سلول، استفاده از این فلزات به‌عنوان گیرندهٔ نهایی الکترون در تنفس بی‌هوازی، تجزیهٔ زیستی عوامل کلات‌ساز و دگرگونی زیستی به گونه‌های مقاوم با توانایی تحمل در حضور فلزات سمی تبدیل شده‌اند که برای کاهش آلودگی فلزات در محیط‌زیست استفاده می‌شوند (۴ و ۵).

روش‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی برای پالایش فلزات سنگین از مکان‌های آلوده استفاده شده‌اند که در این میان، روش‌های فیزیکی و شیمیایی پرهزینه‌اند و مقرون‌به‌صرفه نیستند؛ درحالی‌که زیست‌پالایی توسط باکتری‌ها، روشی مقرون‌به‌صرفه و ساده و فناوری نوینی به شمار می‌آید که برای پالایش آلودگی‌ها از خاک مدنظر قرار گرفته و مطالعه شده است (۶-۸). باکتری‌های ریزوسفری که بر سطح یا درون ریشه‌های گیاه کلنی تشکیل می‌دهند و رشد گیاه میزبان را ارتقا می‌بخشند، ریزوباکترهای محرک رشد گیاه نامیده می‌شوند (۹). پالایش تسهیل‌شدهٔ فلزات سنگین توسط ریزوباکترهای محرک رشد گیاه، درحقیقت استفادهٔ هم‌زمان از گیاهان و ریزموجودات ریزوسفری وابسته به آنهاست که به‌طور طبیعی یا با تلقیح آگاهانهٔ ریزموجودات ویژه رخ می‌دهد (۱۰-۱۲). مطالعه‌های انجام‌شده نشان می‌دهند این ریزموجودات ریزوسفری سمیت زیستی فلزات سنگین را از طریق سازوکارهای مختلف به حداقل می‌رسانند یا رشد گیاهان را در شرایط بروز تنش‌های محیطی نظیر غرقاب، بیماری‌زاهای گیاهی، خشکی، شوری و غیره ارتقا می‌دهند (۱۳). باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد علاوه‌بر نقشی که در حفاظت گیاهان در برابر سمیت فلزات سنگین بر عهده دارند، می‌توانند از طریق روش‌های مختلف ازجمله تولید هورمون‌های رشدی مانند ایندول-۳-استیک‌اسید (IAA) سبب حاصلخیزی خاک، افزایش بازدهی و رشد گیاه شوند (۱۴). این ریزوباکترهای سودمند به‌علت برخورداری از صفت‌های چندگانه نظیر مقاومت به فلزات سنگین، تبدیل آنها به شکل‌های دارای سمیت کمتر و همچنین توانایی ارتقای رشد گیاهان از طریق سازوکارهای مختلف، یکی از مناسب‌ترین گزینه‌ها برای مطالعه‌های مربوط به زیست‌پالایی خاک‌های آلوده به فلزات سنگین محسوب می‌شوند (۱۴).

سرب یکی از پایدارترین عناصر و گسترده‌ترین عنصر سنگین و سمی ازنظر انتشار در محیط‌زیست است و معمولاً جذب زیادی در خاک دارد (۱۵). زیست‌تودهٔ میکروبی، اسیدیتهٔ خاک، دما و زمان ازجمله عوامل مهم در جذب سرب به شمار می‌آیند.

www.SID.ir

Archive of SID

این عنصر ازجمله عناصری است که حتی مقدار بسیار کم آن نیز آثار فیزیولوژیکی زیان‌آوری دارد (۱۶). سرب باعث ازبین‌رفتن حاصلخیزی خاک، تغییر رشد گیاه و درنهایت کاهش عملکرد آن می‌شود؛ همچنین به‌علت تجمع در گیاهان و سمیت زیاد برای دام و انسان، آلاینده‌ای بسیار مهم شناخته می‌شود (۱۷). تاکنون پژوهش‌های گسترده‌ای در زمینهٔ مقاومت به سرب در باکتری‌های جداشده از محیط‌های طبیعی انجام شده است؛ برای نمونه، در پژوهش چیبوک[۱] و اوبیورا[۲] (۱۸)، اشرف[۳] و علی (۱۹) و اسمجکاوولا[۴] و همکاران (۲۰)، حذف زیستی سرب توسط باکتری‌های مقاوم مطالعه شده است. کرات العین[۵] و همکاران (۷) نیز باکتری های مقاوم در برابر غلظت های زیاد سرب را شناسایی و گزارش کرده‌اند. موروتی[۶] و همکاران (۲۱) نیز ۶۰ باکتری مقاوم به سرب را جداسازی و شناسایی و بر اساس آزمون کمترین غلظت بازدارندهٔ رشد (MIC)، ۶ جدایه را توانمندترین گونه‌ها در برابر سرب معرفی کرده‌اند.

باتوجه‌به اهمیت موضوع یادشده، جداسازی و شناسایی ریزوباکترهای بومی مقاوم به سرب و محرک رشد گیاه از خاک ریزوسفری گیاهان حاشیهٔ معدن سرب و روی باما بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی، آزمون‌های بیوشیمیایی و تعیین توالی ژن *16S rRNA* در پژوهش حاضر انجام شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی ریزوباکترهای مقاوم به سرب: معدن سرب و روی باما، سومین معدن بزرگ سرب و روی ایران، در منطقهٔ ایرانکوه و در فاصلهٔ ۲۰ کیلومتری جنوب‌غربی استان اصفهان واقع شده است. سرب کل و سرب قابل‌جذب این معدن به‌ترتیب ۳۷۵ و ۳۹ میلی‌گرم‌برکیلوگرم و اسیدیتهٔ آن نیز ۷/۵ است. به‌منظور جداسازی باکتری‌های بومی از خاک ریزوسفری گیاهان غالب این منطقه، ۳ تا ۵ گیاه انتخاب و ۳ نمونه از هر گیاه در نظر گرفته شد. اطراف بوته‌های مدنظر به فاصلهٔ ۲۰ سانتی‌متر خالی شد و ریشه‌های آنها از عمق صفر تا ۲۰ سانتی‌متری خاک خارج شدند. خاک اضافی اطراف ریشه‌ها حذف شد و خاک چسبیده به ریشهٔ گیاهان با قلم‌موی استریل از سطح ریشه‌ها به پلاستیک فریزر استریل انتقال یافت. نمونه‌ها به کمک فلاسک و در دمای ۵ درجهٔ سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل شدند. حدود ۱ گرم از مخلوط خاک جمع‌آوری‌شده به روش رقت‌های متوالی با سرم فیزیولوژی استریل رقیق شد و بر سطح محیط‌کشت لوریا- برتانی[۷] (LB) آگار اصلاح‌شده حاوی ۱ گرم گلوکز، ۵۰ میلی‌گرم‌برلیتر نیترات‌سرب و ۵۰۰ میلی‌گرم‌برلیتر قارچ‌کش سیکلوهگزامید توزیع و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری شد (۲۲ و ۲۳). کلنی‌های رشدیافته ازنظر ماکروسکوپی و میکروسکوپی ارزیابی، بر اساس شکل و رنگ کلنی تفکیک و با انتقال به محیط‌های جداگانه خالص‌سازی شدند.

شناسایی بیوشیمیایی باکتری‌های جداشده: شناسایی اولیهٔ پنج کلنی خالص‌شده مطابق راهنمای سیستماتیک باکتری‌شناسی برگی[۸] و بر اساس شکل، رنگ‌آمیزی گرم، تشکیل اسپور، تحرک، تولید آنزیم کاتالاز، همولیز محیط بلادآگار، احیای نیترات، آزمون متیل رِد-وگس پروسکائور، آزمون سولفید- ایندول- تحرک و هیدرولیز نشاسته انجام شد (۲۴).

www.SID.ir

Archive of SID

شناسایی مولکولی و تحلیل فیلوژنتیک باکتری‌های جداسازی‌شده: باکتری‌های مطالعه‌شده به‌طور جداگانه در محیط LB مایع، در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و سرعت ۱۸۰ دوردردقیقه به‌مدت ۱۶ تا ۲۰ ساعت در انکوباتور شیکردار کشت شدند. به‌منظور رسوب‌گیری از سانتریفیوژ به‌مدت ۲ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دوردردقیقه استفاده شد. استخراج DNA از رسوب باکتریایی با استفاده از کیت Cell DNA Isolation kit تهیه‌شده از شرکت Gene All انجام شد. تکثیر ژن *16S rRNA* به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[۹] (PCR) و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی پیشرو و معکوس ۲۷F و ۱۴۹۲R انجام و محصول PCR پس‌از تخلیص، به‌منظور تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره ارسال شد. توالی آغازگرهای استفاده‌شده به شرح زیر بود:

Primer 27F	5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG -3'
Primer 1492R	5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3'

اجزای واکنش PCR شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۱/۵ میلی‌مولار $Mgcl_2$، ۰/۲ میلی‌مولار dNTPs، ۱۰ پیکومول از هریک از آغازگرهای پیشرو و معکوس، ۰/۷۵ میکرولیتر DNA ژنومی و ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase بود که با آب مقطر استریل به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسید. واکنش در شرایط واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی ثانویه در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه، اتصال در دمای ۵۶ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۵۰ ثانیه، سنتز در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۹۰ ثانیه و مرحلهٔ طویل‌شدن نهایی در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از دستگاه گرادیانت ترموسایکلر اپندورف انجام شد. درنهایت، محصول PCR به طول ۱۵۰۰ جفت باز الکتروفورز و پس‌از خالص‌سازی، توسط شرکت ماکروژن کره به‌شکل دوطرفه تعیین توالی شد. توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار آنلاین BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov) با توالی‌های معتبر ثبت‌شده در پایگاه دادهٔ NCBI مقایسه شدند و نزدیک‌ترین سویه بر اساس توالی ژن *16S rRNA* و نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی انتخاب شد. به‌منظور بررسی ارتباط فیلوژنی میان سویه‌های جداسازی‌شده و ترسیم درخت فیلوژنی، هم‌ردیفی تمام توالی‌های *16S rRNA* با نرم‌افزار Clustal W انجام شد. درخت فیلوژنی با نرم‌افزار MEGA4 و الگوریتم Neibour-Joining (NJ) ترسیم (۲۴) و اعتبار شاخه‌های درخت به کمک الگوریتم Bootstrap با ۵۰۰ تکرار بررسی شد (۲۵). توالی‌های به‌دست‌آمده از پژوهش حاضر در بانک ژنی NCBI ثبت شدند.

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی سرب (MIC) در ریزوباکترهای جداسازی‌شده: حداقل غلظت بازدارندگی سرب به روش افزایش تدریجی غلظت سرب سنجیده شد؛ به‌این‌ترتیب که در هر مرتبه، ۵۰ میلی‌گرم‌برلیتر (۵۰ppm) سرب به محیط‌کشت اضافه شد. آزمون با غلظت ابتدایی ۵۰ میلی‌گرم‌برلیتر سرب آغاز شد و کلنی‌های باکتریایی که روی آخرین غلظت فلز سنگین درحال رشد بودند به محیط‌کشت حاوی غلظت بیشتر سرب منتقل شدند. غلظتی که باکتری‌های جداشده دیگر قادر به رشدکردن روی محیط‌کشت جدید نبودند، حداقل غلظت بازدارندگی برای آن باکتری ثبت شد (۲۶).

www.SID.ir

Archive of SID

ارزیابی تولید ایندول-۳-استیک‌اسید (IAA) در سویه‌های جداسازی‌شده: تولید ایندول-۳-استیک‌اسید توسط باکتری‌های جداشده بر اساس روش گلیک‌من و دساکس[10] ارزیابی شد (۲۷). بر اساس این روش، باکتری‌ها به‌طور جداگانه در ۲۵ میلی‌لیتر محیط LB مایع در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد و با سرعت ۱۵۰ دوردردقیقه کشت شدند؛ سپس نمونه‌ها سانتریفیوژ شدند و مقدار جذب هر نمونه در طول موج ۶۰۰ نانومتر از طریق حل و معلق‌کردن رسوب‌ها در سرم فیزیولوژی استریل تقریباً تا ۱/۲ تنظیم شد. میزان ۵ میلی‌لیتر از هر سوسپانسیون باکتریایی به ۲۵ میلی‌لیتر محیط دورکین و فاستر[11] (DF) تلقیح شد. کشت‌های باکتریایی به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجهٔ سانتی‌گراد و سرعت ۱۷۵ دوردردقیقه قرار داده شدند. رسوب باکتریایی با سانتریفیوژ در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه و با سرعت ۱۱۰۰۰ دوردردقیقه از محیط کشت جدا و ۲ میلی‌لیتر از معرف سالکووسکی[12] به ۱ میلی‌لیتر از مایع رویی بدون باکتری اضافه و محلول به‌مدت ۲۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد؛ درنهایت، میزان جذب محلول در طول موج ۵۳۵ نانومتر خوانده شد (۲۸). به‌منظور تعیین مقدار ایندول-۳-استیک‌اسید تولیدشده، منحنی استانداردی در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۵ و ۱۵۰ پی‌پی‌ام رسم شد (۲۹). این آزمون سه بار تکرار شد.

نتایج

پنج ریزوباکتری بومی از ریزوسفر گیاهان موجود در معدن سرب و روی باما با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی جداسازی شدند. ویژگی‌های هریک از این ریزوباکتری‌ها در جدول ۱ ارائه شده است.

به‌منظور شناسایی مولکولی هریک از ریزوباکترهای جداسازی‌شده، آغازگرهای اختصاصی ژن *16S rRNA* استفاده شدند (شکل ۱). پس‌از تعیین توالی ژن *16S rRNA* و بررسی توالی‌های به‌دست‌آمده در مقایسه با توالی‌های معتبر موجود در بانک اطلاعاتی ژنوم (NCBI) از طریق نرم‌افزار BLAST، نزدیک‌ترین سویه‌ها باتوجه‌به ویژگی‌های بیوشیمیایی مطالعه‌شده به شرح جدول ۲ تعیین شدند و بیشترین و کمترین میزان شباهت به‌ترتیب ۹۹/۹۳ و ۹۹/۵۶ درصد بود.

نتایج پژوهش‌های انجام‌شده گویای اینست که میان تاکسون ریزوباکتری، جنس‌های *Azospirillum*، *Pseudomonas* و *Bacillus* ازجمله ریزموجودات ریزوسفری تجاری به شمار می‌آیند که به‌طور گسترده بررسی شده‌اند (۳۰). پنج گونهٔ شناسایی‌شده در پژوهش حاضر نیز به جنس *Bacillus* تعلق دارند که با نتایج مشاهده‌های ریخت‌شناسی همخوانی دارد و این نتایج در بیشتر موارد با نتایج شناسایی بیوشیمیایی مشابهت دارند. در پژوهش‌های متعدد، گونه‌های جنس *Bacillus* به‌عنوان ریزوباکترهای محرک رشد گزارش و نقش‌های دیگری نیز برای آنها مطرح شده‌اند؛ برای نمونه، *Bacillus cereus* در تحرک فسفر در تلقیح با گیاه (۳۱)، *Bacillus subtilis* در القای بیوسنتز مالیک‌اسید در ریشهٔ برنج (۳۲) و *Bacillus amyloliquefaciens* در القای تحمل به تنش‌های غیرزیستی در گیاه (۳۳) و بهبود گیاه‌پالایی به‌منظور رویارویی با تنش مس (۳۴) مؤثر بوده‌اند.

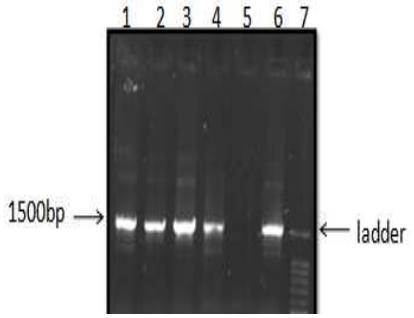
درخت فیلوژنی به‌منظور بررسی رابطهٔ فیلوژنتیکی میان ریزوباکترهای شناسایی‌شده ترسیم شد (شکل ۲). همان‌طور که مشاهده می‌شود، ریزوباکترها در دو شاخهٔ اصلی گروه‌بندی شده‌اند: در گروه اول، گونه‌های *B. subtilis*، *B. amyloliquefaciens* و *B. tequilensis* و در گروه دوم، دو سویهٔ مربوط به *B. cereus* قرار گرفته‌اند.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی ریزوباکترهای استخراج‌شده از خاک حاوی سرب با پیشینهٔ درازمدت

Colony	Morphology	Gram stain	Catalase test	Spore formation	Motility	Starch hydrolysis	Nitrate reduction	Blood Agar Hemolysis	MR test	VP test	H_2S	Indole
1	Bacilli Cream	+	+	+	+	+	+	B	-	+	-	-
2	Bacilli Dark cream	+	+	+	+	+	-	Γ	-	+	-	-
3	Bacilli Cream	+	+	+	+	+	+	B	-	+	-	-
4	Bacilli Light cream	+	+	+	+	+	+	Γ	-	+	-	-
5	Bacilli	+	+	+	+	+	-	A	-	+	-	-

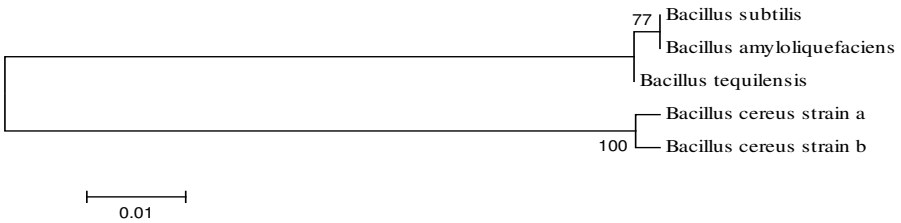


شکل ۱- محصول PCR ژن *16S rRNA* در باکتری‌های جداسازی‌شده؛ ۱، ۲، ۳، ۴ و ۶. نمونه‌های جداسازی‌شده، ۵. نمونهٔ شاهد، ۷. اندازه‌نما

جدول ۲- شناسایی مولکولی ریزوباکترهای جداسازی‌شده بر اساس مقایسهٔ توالی ژن *16S rRNA* با سویه‌های معتبر در بانک اطلاعاتی ژنوم

شمارهٔ کلنی*	شمارهٔ دسترسی**	نام سویه	درصد شباهت
۱	MK910207	*Bacillus cereus strain* A	۹۹/۷
۲	MK910208	*Bacillus subtilis*	۹۹/۹۳
۳	MK910209	*Bacillus cereus strain* B	۹۹/۷۸
۴	MK910210	*Bacillus tequilensis*	۹۹/۹۳
۵	MK910211	*Bacillus amyloliquefaciens*	۹۹/۵۷

* شمارهٔ کلنی‌ها با شمارهٔ کلنی‌ها در جدول ۱ منطبق است. ** شمارهٔ دسترسی توالی‌های ثبت‌شده در بانک اطلاعات ژنوم NCBI است.

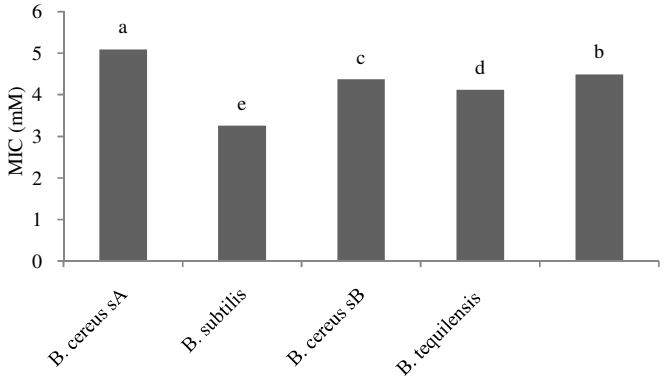


شکل ۲- درخت فیلوژنی ریزوباکترهای شناسایی‌شده به روش Neibour-Joining (NJ) و ضریب Bootstrap ۵۰۰

www.SID.ir

Archive of SID

آزمون حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) سرب: بر اساس نتایج آزمون حداقل غلظت بازدارندگی سرب، اختلاف معناداری بین ریزوباکترهای بومی استخراج‌شده مشاهده شد (شکل ۳). سویهٔ *Bacillus cereus strain* A بیشترین میزان مقاومت (با MIC معادل ۵/۰۹ میلی‌مولار) را نشان داد و پس‌ازآن، *B. amyloliquefaciens* و *B. cereus strain* B به‌ترتیب در مقام دوم و سوم قرار گرفتند. در پژوهش ایجیدی[۱۳] و همکاران (۳۵)، چندین ژن مربوط به مقاومت نسبت به فلزات سنگین شامل کروم، کادمیم، آرسنیک و مس و همچنین آنتی‌بیوتیک‌ها در سویهٔ *B. cereus* شناسایی شدند؛ ازاین‌رو، آنها گزارش کردند این سویه پتانسیل زیادی برای مقاومت در برابر بسیاری از تنش‌های زیست‌محیطی دارد. در پژوهش سید[۱۴] و همکاران (۳۶)، سویه‌ای از *Bacillus cereus* شناسایی شد که توانایی زیستی چشمگیری در جذب سرب (حدود ۸۷ تا ۹۰ درصد) دارد. کسری کرمانشاهی و همکاران (۳۷) طی مطالعهٔ خود روی باکتری‌های مقاوم به سرب خاک‌های استان اصفهان اظهار داشتند ۶۰ درصد از گونه های باکتریایی مقاوم به سرب استخراج‌شده دارای MIC بین ۴ تا ۸ میلی‌مولار هستند. در پژوهش دیگری نیز سطح مقاومت باکتری‌های خاک نسبت به فلز سنگین سرب بین ۲/۵ تا ۵/۶ میلی‌مولار گزارش شد (۳۸).



شکل ۳- بررسی تحمل به سرب در ریزوباکترهای جداسازی‌شده از خاک حاوی سرب با پیشینهٔ درازمدت

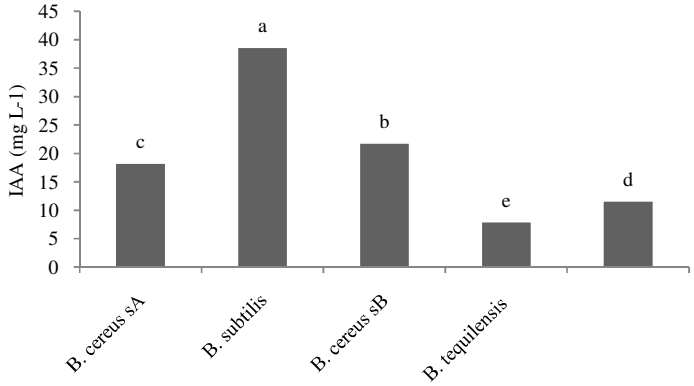
ارزیابی تولید ایندول-۳-استیک‌اسید (IAA) توسط سویه‌های باکتریایی: نتایج آزمون ارزیابی تولید ایندول-۳-استیک‌اسید توسط ریزوباکترهای مقاوم به سرب جداشده نشان دادند تمام سویه‌های شناسایی‌شده توانایی تولید این هورمون گیاهی را دارند (شکل ۴). از میان باکتری‌های مطالعه‌شده، سویه‌های *B. subtillis* با میانگین ۳۸/۵۸ میلی‌گرم‌برلیتر و *B. tequilensis* با میانگین ۷/۸۸ میلی‌گرم‌برلیتر به‌ترتیب بیشترین و کمترین میزان ایندول-۳-استیک‌اسید را تولید کردند.

بر اساس نتایج پژوهش‌های انجام‌شده، بخشی از آثار محرک رشدی ریزوباکترهای گوناگون به تولید هورمون‌های گیاهی نظیر ایندول-۳-استیک‌اسید توسط آنها وابسته است (۳۹). در پژوهشی، توانایی تولید ایندول-۳-استیک‌اسید در ریزوباکترهای متحمل به

www.SID.ir

Archive of SID

سرب بررسی شد و تمام باکتری‌های مطالعه‌شده توانایی تولید این ترکیب را به میزان متغیری از ۰/۰۸۹ تا ۶۳/۵۵ میکروگرم‌برلیتر نشان دادند. تلقیح گیاه *Lathyrus sativus* با ریزوباکترها در غلظت ۰/۵ میلی‌مولار سرب در شرایط هیدروپونیک از یک سو سبب افزایش درخور توجه زیست‌تودهٔ ساقه (۵۹ درصد) و ریشه (۵۶ درصد) و از سوی دیگر سبب افزایش میزان جذب سرب در ساقه (۳۹) و ریشه (۴۷ درصد) نسبت به گیاهان شاهد شد (۴۰). در پژوهش دیگری که به‌منظور بررسی مقاومت ریزوباکترهای تولیدکنندهٔ ایندول-۳-استیک‌اسید در برابر سمیت سرب در خاک آلوده انجام شد، گزارش شد ریزوباکترهای *Exiguobacterium aurantiacum* و *Bacillus firmus* به مقدار ۵۰۰ پی‌پی‌ام سرب مقاومت نشان می‌دهند و قادرند در حضور یا عدم‌حضور سرب،ایندول-۳-استیک‌اسید تولید کنند (۴۱).



شکل ۴- ارزیابی تولید ایندول-۳-استیک اسید (IAA) در ریزوباکترهای جداسازی‌شده از خاک حاوی سرب با پیشینهٔ درازمدت

بحث و نتیجه‌گیری

فلزات سنگین به‌ویژه سرب، آلاینده‌های مهم زیست‌محیطی‌اند که تهدیدی جدی برای محیط‌زیست و سلامت انسان و حیوان به شمار می‌آیند (۴۲). طی دهه‌های اخیر، آلودگی با فلزات سنگین به‌علت خطرهایی که برای سلامتی انسان و سایر موجودات هنگام انباشت در سیستم زیستی دارد، مدنظر و مطالعه‌های بسیار قرار گرفته است. گیاه‌پالایی روشی مناسب برای حذف آلودگی فلزات سنگین از خاک است (۴۳)؛ هرچند اثربخشی این روش به‌علت رشد آهسته و زیست‌تودهٔ کم گیاهان بسیار انباشتگر محدود است (۴۴) مطالعه‌های انجام‌شده گویای اینست که باکتری‌های مقاوم به فلزات سنگین می‌توانند جذب فلز توسط گیاهان بسیار انباشتگر را افزایش دهند (۴۵ و ۴۶)؛ در این راستا، جداسازی و شناسایی باکتری‌های متحمل به عناصر سنگین در محیط‌های آلوده نقش مهمی در بهبود زیستگاه‌های آلوده دارد (۴۷).

در پژوهش حاضر برای نخستین‌بار، تعیین هویت ریزوباکترهای بومی جداشده از معدن سرب و روی اصفهان بر اساس شناسایی ژن *16Sr RNA* انجام شد. تمام ریزوباکترهای شناسایی‌شده پتانسیل درخور توجهی برای تحمل غلظت‌های زیاد سرب و همچنین تولید

www.SID.ir

Archive of SID

ایندول-۳-استیک‌اسید نشان دادند؛ بنابراین می‌توان گفت این ریزوباکترها علاوه‌بر پالایش زیستی خاک، به‌علت تولید ایندول-۳-استیک‌اسید به‌عنوان ریزوباکترهای محرک رشد در همزیستی با گیاهان بسیار انباشتگر مؤثر واقع می‌شوند. در مطالعه‌های آتی، نقش این باکتری‌ها در گیاه‌پالایی، جذب فلز، حرکت درون گیاه، انباشتگی ساقه و فرایندهای ریستی که در سم‌زدایی فلزات در گیاهان بسیار انباشتگر نقش دارند، مدنظر قرار خواهد گرفت.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر از طرح پژوهشی «شناسایی ریزوباکترهای بومی متحمل به سرب از خاک حاوی سرب با پیشینهٔ درازمدت بر اساس ژن *16S rRNA*» با شماره قرارداد ۹۴/د/۱۱/۰۹/۷۹۱۱ استخراج شده است که دانشگاه پیام نور آن را ازنظر مالی حمایت کرده است و به این وسیله سپاسگزاری می‌شود.

References

(1) Alloway BJ. *Heavy metals in soils: Trace metals and metalloids in soils and their bioavailability*. 3rd ed. London: Springer; 2012.

(2) Canli M., Atli G. The relationships between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) levels and the size of six Mediterranean fish species. *Environmental pollution* 2003; 121(1): 129-36.

(3) Järup L. Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin* 2003; 68(1) :167-82.

(4) Chen M., Xu P., Zeng G., Yang C., Huang D., Zhang J. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: applications, microbes and future research needs. *Biotechnology Advances*. 2015; 33(6): 745-755.

(5) Vegliò F., Esposito A., Reverberi AP. Standardisation of heavy metal biosorption tests: equilibrium and modelling study. *Process Biochemistry* 2003; 38(6): 953-961.

(6) Gholami M., Etemadifar Z. Isolation and molecular identification of a new strain of Microbacterium resistens, capable of tolerating the extreme conditions. *Biological Journal of Microorganism* 2013; 2(5): 27-42.

(7) Qurat-ul-Ain A., Erum S., Uzma B., Jameela A. Isolation and characterization of bacterial isolates having heavy metal tolerance. *Journal of Basic and Applied Sciences* 2009; 5(2): 55-60.

(8) Perriguey J., Sterckeman T., Morel JL. Effect of rhizosphere and plant-related factors on the cadmium uptake by maize (*Zea mays* L.). *Environmental and Experimental Botany* 2008; 63(1-3): 333-341.

(9) Khan AG. 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* 2005; 18(4): 355-364.

(10) Motesharrei Z., Mahmoodi H., Owlia P., Salimi H. Study of ACC deaminase activity of Rhizobacteria isolated from soils of northern Iran. *Biological Journal of Microorganism* 2014; 3(11): 37-46.

(11) Glick BR. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnology Advances* 2003; 21(5): 383-393.

(12) Glick BR. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnology Advances* 2010; 28(3): 367-374.

(13) Khan MS., Zaidi A. Synergistic effects of the inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria and an arbuscular mycorrhizal fungus on the performance of wheat. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 2007; 31(6): 355-362.

www.SID.ir

Archive of SID

(14) Khan AL., Bilal S., Halo BA., Al-Harrasi A., Khan AR., Waqas M., Al-Thani GS., Al-Amri I., Al-Rawahi A., Lee IJ. *Bacillus amyloliquefaciens* BSL16 improves phytoremediation potential of *Solanum lycopersicum* during copper stress. *Journal of Plant Interactions* 2017; 12(1): 550-559.

(15) Ping L., Boland W. Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis. *Trends in Plant Science* 2004; 9(6): 263-266.

(16) Huang DL., Zeng GM., Jiang XY., Feng CL., Yu HY., Huang GH., Liu HL. Bioremediation of Pb-contaminated soil by incubating with *Phanerochaete chrysosporium* and straw. *Journal of Hazardous Materials* 2006; 134(1-3): 268-276.

(17) Lone MI., He ZL., Stoffella PJ., Yang XE. Phytoremediation of heavy metal polluted soils and water: progresses and perspectives. *Journal of Zhejiang University Science B* 2008; 9(3): 210-220.

(18) Chibuike GU., Obiora SC. Heavy metal polluted soils: effect on plants and bioremediation methods. *Applied and Environmental Soil Science* 2014; 1-12.

(19) Ashraf M., Ahmad MS., Ozturk M. *Plant adaptation and phytoremediation*. New York: Springer; 2010.

(20) Smejkalova M., Mikanova O., Boruvka L. Effects of heavy metal concentrations on biological activity of soil micro-organisms. *Plant Soil and Environment* 2003; 49(7): 321-326.

(21) Murthy S., Sarangi SK. Lead biosorption by a bacterium isolated from industrial effluents. *International Journal of Microbiology Research* 2012; 4(3): 196-200.

(22) Ma Y., Rajkumar M., Freitas H. Inoculation of plant growth promoting bacterium *Achromobacter xylosoxidans* strain Ax10 for the improvement of copper phytoextraction by *Brassica juncea*. *Journal of Environmental Management* 2009; 90(2): 831-937.

(23) Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 1987; 4(4): 406-425.

(24) Sneath PH., Mair NS., Sharpe ME., Holt JG. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkins; 1986.

(25) Tamura K., Dudley J., Nei M. and Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 2007; 24(8): 1596-1599.

(26) Singh V., Chauhan PK., Kanta R., Dhewa T., Kumar V. Isolation and characterization of Pseudomonas resistant to heavy metals contaminants. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 2010; 3(2): 164.

(27) Glickmann E., Dessaux Y. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 1995; 61(2): 793-796.

(28) Dell'Amico E., Cavalca L., Andreoni V. Improvement of *Brassica napus* growth under cadmium stress by cadmium-resistant rhizobacteria. *Soil Biology and Biochemistry* 2008; 40(1): 74-84.

(29) Torres-Rubio MG., Valencia-Plata SA., Bernal-Castillo J., Martínez-Nieto P. Isolation of *Enterobacteria*, *Azotobacter* sp. and *Pseudomonas* sp., producers of indole-3-acetic acid and siderophores, from Colombian rice rhizosphere. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 2000; 42(4): 171-176.

(30) Tabatabaei FS., Saeedizadeh A. Rhizobacteria cooperative effect against Meloidogyne javanica in rhizosphere of legume seedlings. *Hellenic Plant Protection Journal* 2017; 10(1): 25-34.

(31) Arif MS., Muhammad RI., Shahzad SM., Yasmeen T., Shafaqat AL., Akhtar MJ. Phosphorus-mobilizing rhizobacterial strain Bacillus cereus GS6 improves symbiotic

www.SID.ir

Archive of SID

efficiency of soybean on an Aridisol amended with phosphorus-enriched compost. *Pedosphere* 2017; 27(6): 1049-1061.

(32) Rekha K., Baskar B., Srinath S., Usha B. Plant-growth-promoting rhizobacteria Bacillus subtilis RR4 isolated from rice rhizosphere induces malic acid biosynthesis in rice roots. *Canadian Journal of Microbiology* 2017; 64(1): 20-27.

(33) Tiwari S., Prasad V., Chauhan PS., Lata C. Bacillus amyloliquefaciens confers tolerance to various abiotic stresses and modulates plant response to phytohormones through osmoprotection and gene expression regulation in rice. *Frontiers in Plant Science* 2017; 8: 1510.

(34) Khan N., Bano A. Role of plant growth promoting rhizobacteria and Ag-nano particle in the bioremediation of heavy metals and maize growth under municipal wastewater irrigation. *International Journal of Phytoremediation* 2016; 18(3): 211-221.

(35) Egidi E., Wood JL., Mathews E., Fox E., Liu W., Franks AE. Draft genome sequence of Bacillus cereus LCR12, a plant growth–promoting rhizobacterium isolated from a heavy metal–contaminated environment. *Genome Announcements* 2016; 4(5): e01041-16.

(36) Syed S., Chinthala, P. Heavy metal detoxification by different *Bacillus* species isolated from solar salterns. *Scientifica* 2015; 1-15.

(37) Kasra Kermanshahi R., Ghazifard A., Tavakoli A. Identification of bacteria resistant to heavy metals in the soils of Isfahan Province. *Iranian Journal of Science and Technology* (Sciences). 2007; 31(1): 7-16.

(38) Sabry SA., Ghozlan HA., Abou-Zeid DM. Metal tolerance and antibiotic resistance patterns of a bacterial population isolated from sea water. *Journal of Applied Microbiology* 1997; 82(2): 245-252.

(39) Esitken A., Pirlak L., Ipek M., Donmez MF., Cakmakci R., Sahin F. Fruit bio-thinning by plant growth promoting bacteria (PGPB) in apple cvs. Golden Delicious and Braeburn. *Biological Agriculture and Horticulture* 2009; 26(4): 379-390.

(40) Abdelkrim S., Jebara SH., Saadani O., Chiboub M., Abid G., Jebara M. Effect of Pb-resistant plant growth-promoting rhizobacteria inoculation on growth and lead uptake by *Lathyrus sativus*. *Journal of basic microbiology* 2018; 58(7): 579-589.

(41) Rehman B., Hassan TU., Bano A. Potential of indole-3-acetic acid-producing rhizobacteria to resist Pb toxicity in polluted soil. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal* 2019; 28(1): 101-21.

(42) Yuan W., Yang N., Li X. Advances in understanding how heavy metal pollution triggers gastric cancer. *BioMed Research International*. 2016; 2016.

(43) Sekhar KC., Kamala CT., Chary NS., Balaram V., Garcia G. Potential of *Hemidesmus indicus* for phytoextraction of lead from industrially contaminated soils. *Chemosphere* 2005; 58(4): 507-514.

(44) Burd GI., Dixon DG., Glick BR. Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Canadian Journal of Microbiology*. 2000; 46(3): 237-245.

(45) Rajkumar M., Freitas H. Effects of inoculation of plant-growth promoting bacteria on Ni uptake by Indian mustard. *Bioresource Technology* 2008; 99(9): 3491-3498.

(46) Sheng XF., Xia JJ. Improvement of rape (*Brassica napus*) plant growth and cadmium uptake by cadmium-resistant bacteria. *Chemosphere* 2006; 64(6): 1036-1042.

(47) Piotrowska-Seget Z., Cycoń M., Kozdroj J. Metal-tolerant bacteria occurring in heavily polluted soil and mine spoil. *Applied Soil Ecology* 2005; 28(3): 237-246.

www.SID.ir

Archive of SID

[1]- Chibuike
[2]- Obiora
[3]- Ashraf
[4]- Smejkalova
[5]- Qurat-ul-Ain
[6]- Murthy
[7]- Luria–Bertani
[8]- Bergy
[9]- Polymerase Chain Reaction
[10]- Glickmann and Dessaux
[11]- Dworkin and Foster
[12]- Salkovski
[13]- Egidi
[14]- Syed

www.SID.ir