Archive of SID

جداسازی باکتری‌های متحمل به مس از یک خاک آلوده، شناسایی و بررسی خصوصیات محرک رشدی آنها

زهرا کریمی، پیمان عباس‌زاده دهجی[1]، عبدالرضا اخگر و محسن حمیدپور

دانشجوی کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان؛ zahrakk69@gmail.com

استادیار گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان؛ p.abbaszadeh@vru.ac.ir

دانشیار گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان؛ arakhgar@yahoo.com

دانشیار گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان؛ m.hamidpour@vru.ac.ir

دریافت: 96/3/10 و پذیرش: 96/7/15

چکیده

تلقیح گیاهان با باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد موثر و مقاوم به فلزات سنگین در خاک‌های آلوده به منظور افزایش کارایی گیاه‌پالایی و استخراج فلز سنگین از خاک توسط گیاه امری ضروری می‌باشد. در این جهت این پژوهش به منظور جداسازی، شناسایی و صفات محرک رشدی باکتری‌های مقاوم مس از یک خاک آلوده به مس انجام شد. ابتدا شش نمونه خاک ریزوسفری گیاهان بومی منطقه خاتون‌آباد سرچشمه استان کرمان جمع‌آوری شد و نهایتا شش جدایه باکتری از نمونه‌های خاک ریزوسفری جمع‌آوری و خالص‌سازی شد. نتایج شناسی فنوتیپی، بیوشیمیایی و ژنتیکی نشان داد که پنج جدایه از جنس *سودوموناس* و یک جدایه از جنس *باسیلوس* بودند. سپس حداقل غلظت بازدارنده[2] مس، میزان تولید سیدروفور، تولید اکسین، سیانید هیدروژن، توانایی حل فسفات‌های معدنی، در محیط جامد و مایع، اندازه‌گیری توان حل‌کنندگی ترکیبات کم محلول روی در محیط جامد و مایع و تولید ACC-دآمیناز باکتری‌ها بررسی شد. نتایج نشان داد تمام جدایه‌ها نسبت به غلظت‌های مختلف مس از خود مقاومت نشان دادند. بیشترین مقاومت نسبت به غلظت بازدارنده مس مربوط به سویه‌های K4 و K5 در غلظت 400 میلی‌گرم بر لیتر مس بود. همچنین در رابطه با تولید سیدروفور، بجز سویه‌های K6 که توانایی تولید سیدروفور را در محیط CAS نداشت، پنج سویه دیگر توانایی تولید سیدروفور را در این محیط دارا بودند و سویه ی K5 بیشترین میزان تولید سیدروفور با نسبت هاله به کلنی 1/56 را به خود اختصاص داد. در بین جدایه‌ها، دو جدایه K4 و K6 قادر به تولید اکسین نبودند. تولید اکسین توسط جدایه K1 تفاوت معنی‌داری با دیگر جدایه‌های مورد بررسی داشته و با مقدار 2/07 میلی‌گرم در لیتر بیشترین میزان تولید اکسین در بین جدایه‌ها را دارا بود. نتایج همچنین نشان داد که از بین جدایه‌ها، تنها جدایه K4 توانایی تولید سیانید هیدروژن را با درجه چهار (نسبتا زیاد) دارا بوده و دیگر جدایه ها با اختصاص درجه یک مبنی بر عدم تولید سیانید هیدروژن گزارش شدند. نتایج ارزیابی انحلال تری‌کلسیم فسفات[3] در محیط مایع PKV توسط جدایه‌ها نشان داد که، سویه K1، K2 و K3 به ترتیب با میزان 706، 661 و 588 میلی‌گرم در لیتر بیشترین حل‌کنندگی فسفر را به خود اختصاص داده و با یکدیگر تفاوت معنی داری نداشتند. نتایج بررسی‌ها نشان داد که در محیط جامد حاوی کربنات روی دو سویه K4 و K5 به ترتیب با مقادیر 0/910 و 0/850 نسبت هاله به کلونی تفاوت معنی‌داری با دیگر سویه‌ها داشته و بقیه سویه‌ها شامل K1، K2، و K3 و K6 توانایی انحلال کربنات روی از خود نشان ندادند. همچنین انحلال اکسید روی در محیط جامد توسط سویه K4 با 2/11 نسبت هاله به کلونی بیشترین میزان انحلال اکسید روی و سویه‌های K1، K2، و K3 و K6 قادر به انحلال اکسید روی در محیط جامد نبودند. سویه‌های K1 ، K2، K3 و K6 قادر به انحلال ترکیبات کم محلول اکسید و کربنات روی در محیط مایع نبودند. سویه K4 با 12/5 میلی‌گرم در لیتر با بیشترین میزان انحلال کربنات روی در محیط مایع را داشت و همچنین بیشترین انحلال اکسید روی در محیط مایع به سویه K4 با 9/76 میلی‌گرم در لیتر نسبت داده شد. با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان از این جدایه‌ها در جهت افزایش کارایی گیاه‌پالایی این عنصر در خاک‌های آلوده استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: اکسین، ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه، حداقل غلظت بازدارنده، سیدروفور

---

[1]. نویسنده مسئول، آدرس: گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر (عج)، رفسنجان

[2]. Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

[3]. Tricalcium Phosphate (TCP)

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

فلزات سنگین به طور طبیعی به عناصری که وزن اتمی بالا و چگالی حداقل پنج برابر بیشتر از آب دارند گفته می‌شود (تچونوو و همکاران، 2012). عناصر سنگین یک گروه خطرناک شیمیایی را تشکیل می‌دهند که این گروه عمدتاً شامل: سرب (Pb)، آرسنیک (As)، روی (Zn)، کادمیم (Cd)، مس (Cu)، جیوه (Hg) و نیکل (Ni) می‌باشند (ووآنا و اوکیمن، 2011). آلودگی محیط زیست بوسیله‌ی فلزات سنگین تأثیر منفی بر کیفیت خاک می‌گذارد و این یک تهدید برای سلامت انسان است. منابع انسانی متعددی از آلاینده‌های محیط زیست اعم از: ورود پساب خروجی از معادن، ذخیره‌ی زباله، رواناب سمی از زمین‌های کشاورزی و یا رسوبات جوی، باعث آلودگی محیط زیست به عناصر سنگین می‌شود (سانگ و همکاران، 2010). مس سومین عنصر فلزی مورد استفاده در جهان است (وی‌سی‌آی، 2011). مس پس‌ماند حاصل از استخراج و فرآوری سنگ معدن مس، نه حتماً برای سلامت گیاهان، حیوانات، میکروارگانیسم‌ها و انسان مضر می‌باشد (هاگو و همکاران، 2008).

بطورکلی، سه روش اصلی برای اصلاح و پالایش خاک‌های آلوده به فلزات سنگین وجود دارد که این روش‌ها شامل اصلاح فیزیکی، اصلاح شیمیایی و اصلاح زیستی (زیست‌پالایی)[1] می‌باشند (پراساد، 2003). تکنولوژی گیاه‌پالایی، از لحاظ مالی کم هزینه و از لحاظ زیست محیطی غیرمخرب می‌باشد و موجب افزایش فعالیت و تنوع ریزسازواره‌های خاک و ارتقای سلامت اکوسیستم‌ها می‌گردد. پالایش‌ریزوسفری[2]، نوع خاصی از گیاه‌پالایی است که دربرگیرنده‌ی استفاده‌ی همزمان از گیاهان و ریزسازواره‌های ریزوسفری وابسته به آن‌ها می‌باشد و می‌تواند بطور طبیعی رخ دهد و یا اینکه می‌توان از طریق تلقیح آگاهانه‌ی ریزسازواره‌های ویژه در ریزوسفر گیاه موجب تحریک آن شد. این ریزسازواره‌های ریزوسفری قادر به تجزیه‌ی آلاینده‌ها، افزایش فراهمی آلاینده برای جذب بیشتر توسط گیاه و یا اینکه می‌توانند رشد گیاهان را تحت شرایط بروز تنش ارتقا دهند (Glick, 2003). استخراج گیاهی[3] رایج‌ترین نوع گیاه‌پالایی است، که مستلزم تجمع فلزات سنگین در ریشه و ساقه‌ی گیاهان پالایش‌گر می‌باشد. این گیاهان بعدا برداشت شده و سوزانده می‌شوند (چیبوکی و ابیورا، 2014).

وقتی غلظت آلاینده‌ها در خاک بالا باشد، بسیاری از گیاهان زیست‌توده کافی برای گیاه‌پالایی موفق نخواهند داشت. در خیلی موارد خاک آلوده از نظر مواد غذایی فقیر است که رشد گیاه را محدود کرده و روند اصلاح را کاهش می‌دهد. علاوه بر این خاک‌های آلوده اغلب ریزسازواره‌های مناسب جهت بهبود رشد گیاه به‌منظور افزایش کارایی تکنیک پالایش استفاده شده ندارند. بنابراین مشاهده شد که فرایندهای گیاه‌پالایی به زمان طولانی برای اصلاحی قابل قبول احتیاج دارند (مکاتچئون، 1997). برای حل این مشکل، یک سیستم گیاه‌پالایی چند فرایندی[4] برای حذف آلاینده‌های پایدار و مقاوم خاک تعریف شد. گیاه‌پالایی چند فرایندی ترکیبی از جمله فرایندهای فیزیکی، شیمیایی، زیستی و رشد گیاه می‌باشد که روند اصلاح آلودگی را سرعت می‌بخشد (هوآنگ و همکاران، 2004 الف؛ هوآنگ و همکاران، 2004 ب). همچنین اغلب فلزات سنگین موجود در خاک از تحرک کمی برخوردار هستند و به آسانی توسط ریشه‌ی گیاهان جذب نمی‌شوند. روابط متقابل میان ریشه‌ی گیاه و ریزسازواره‌های خاک می‌تواند موجب بهبود قابلیت جذب زیستی فلزات سنگین موجود در ریزوسفر گیاه گردد (ساواران و همکاران، 2007). بنابراین، استفاده از ریزسازواره‌های که قادر به انحلال فلزات سنگین هستند، یکی از روش‌های نویدبخش به‌منظور افزایش فرم‌های قابل جذب این فلزات توسط گیاهان در خاک، می‌باشد.

ریزوسفر به منطقه محدودی از خاک اطراف ریشه گفته می‌شود (والکر و همکاران، 2003) و باکتری‌های ریزوسفری به گروه باکتری‌هایی که در خاک ریزوسفر تحت تأثیر محیط اطراف ریشه قرار دارند اطلاق می‌شوند (کلوپر و همکاران، 1991). برخی از باکتری‌های موجود در ناحیه ریزوسفر گیاه که از طریق مکانیسم‌های مستقیم و غیرمستقیم تأثیرات مثبتی بر روی رشد و توسعه گیاه می‌گذارند ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه[5] نامیده می‌شوند (اصغر و همکاران، 2002). آن‌ها رشد گیاه را از طریق متحرک ساختن عناصر غذایی در خاک، تولید تنظیم‌کننده‌های رشد متعدد، حفاظت از گیاهان در برابر پاتوژن‌های گیاهی با کنترل یا مهار آنها و بهبود ساختمان

1. Bioremediation
2. Rhizoremediation
3. Phytoextraction
4. Multi-Process Phytoremediation System (MPPS)
5. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)

www.SID.ir

Archive of SID

خاک بهبود می‌بخشند (آحیمد و ملیک، 2011؛ آحیمد و خان، 2012). باکتری‌های محرک رشد گیاه می‌توانند رشد گیاه را بوسیله‌ی تولید سیدروفور، سنتز هورمون‌های گیاهی و آنزیم‌ها یا حل فسفات تحریک کنند (ورما و همکاران، 2001). آنزیم ACC-دآمیناز می‌تواند افزایش سطح اتیلن را در گیاه تنظیم کند و باعث افزایش مقاومت گیاهان نسبت به عناصر سنگین شود (گلیک و همکاران، 1998). گزارش شده است که باکتری‌های تولید کننده آنزیمACC-دآمیناز می‌توانند رشد گیاه و حفاظت گیاه را در برابر سمیت فلزات سنگین در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین افزایش دهند (بلیموو و همکاران، 2005؛ مدحایان و همکاران، 2007).

وقتی باکتری‌های محرک رشد گیاه به خاک آلوده اضافه می‌شوند آن‌ها پتانسل گیاه را برای رشد افزایش می‌دهند. این باکتری‌ها می‌توانند با سم‌زدایی مواد شیمیایی، کنترل بیماری‌ها و آفات همچنین کاهش سمیت فلزات سنگین بوسیله‌ی تغییر فراهمی زیستی آن‌ها در گیاه باعث افزایش رشد گیاه و به‌تبع آن افزایش کارایی گیاه‌پالایی شوند (هان و همکاران، 2005؛ بابالوبا، 2010). یکی از روش‌های افزایش کارایی گیاه‌پالایی به منظور کاهش اثرات زیانبار فلزات سنگین از محیط، استفاده از باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد است (بلیموو و همکاران، 2005). بهبود رشد گیاه تحت شرایط تنش‌زا عاملی بسیار مهم جهت دستیابی به کارآیی بهینه‌ی گیاه‌پالایی فلزات سنگین با استفاده از گونه‌های گیاهی تجمع‌دهنده‌ی این فلزات می‌باشد (گلیک، 2003). این باکتری‌ها می‌توانند با مکانیسم‌های مختلفی باعث افزایش کارایی گیاه‌پالایی شوند.

هدف از این تحقیق جداسازی، شناسایی و بررسی صفات محرک رشدی باکتری‌های محرک رشد مقاوم به مس از مناطق آلوده جهت استفاده در آزمایشات بعدی به منظور افزایش کارایی گیاهان مختلف به منظور گیاه‌پالایی مس از خاک‌های اطراف معادن مس می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتری‌های ریزوسفری مقاوم به مس

به منظور جداسازی باکتری‌های مختلف مقاوم به مس، پنج نمونه خاک ریزوسفری مربوط به گیاهان منطقه خاتون آباد سرچشمه، فراهم شد. 2/5 گرم از هر نمونه خاک ریزوسفری همراه با ریشه به ارلن‌های حاوی 22/5 میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک 0/9% منتقل و به مدت 30 دقیقه با سرعت 150 دور در دقیقه تکان داده شدند. از سوسپانسیون باکتری‌ها رقت‌های مختلف تهیه و به مقدار 0/1 میلی‌لیتر از رقت‌های مناسب به محیط کشت جامد SLP[1] (ساکاروز 10 گرم، $(NH_4)_2SO_4$ یک گرم، K_2HPO_4 0/5 گرم، $MgSO_4$ 0/5 گرم، NaCl 0/1 گرم، عصاره مخمر 0/5 گرم، $CaCO_3$ 0/5 گرم، آگار 17 گرم در لیتر و پ‌هاش 7/2) حاوی 0/8 میلی‌مولار مس (از منبع $CuSO_4.5H_2O$) (معادل 50 میلی‌گرم در لیتر مس) در درون پتری‌دیش منتقل و پخش شدند. پلیت‌ها در دمای 28 درجه سلسیوس و به مدت هفت روز در انکوباتور نگهداری شدند. درنهایت کلنی‌های رشد کرده بر روی پلیت که از نظر ظاهر و رنگ متفاوت بودند به عنوان جدایه‌های مقاوم جداسازی و خالص‌سازی شدند (هی و همکاران، 2010).

خالص‌سازی و نگهداری جدایه‌های باکتری

برای به دست آوردن باکتری خالص، کلونی‌هایی با رنگ و شکل متفاوت، مجددا بر روی محیط کشت مغذی جامد (NA[2]) کشت خطی[3] گردیدند. به منظور نگه‌داری جدایه‌ها، سوسپانسیون غلیظی از کشت جوان هر جدایه در دمای چهار درجه سلسیوس و همچنین برای نگه‌داری طولانی مدت باکتری‌ها در محیط محیط کشت مغذی مایع (NB[4]) حاوی 50 درصد گلیسرول، در دمای 80- درجه سلسیوس قرار گرفت. تمامی جدایه‌ها از لحاظ ویژگی‌های فیزیولوژیکی، مورفولوژیکی و بیوشیمیایی بر اساس روش‌های مرسوم باکتری‌شناسی شامل آزمایش‌های گرم، تولید رنگدانه، اکسیداز، کاتالاز و رشد در شرایط هوازی، مورد بررسی قرار گرفت (اسچاد و همکاران، 2001).

بررسی ویژگی‌های فنوتیپی، بیوشیمیایی و ژنوتیپی

به منظور شناسایی دقیق جدایه‌ها بخشی از ژن 16SrDNA در شش جدایه با استفاده از آغازگرهای موجود در جدول یک تکثیر و تعیین توالی و همچنین برخی از خصوصیات بیوشیمیای باکتری‌ها اندازه‌گیری شد. الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگاروز یک درصد در اختلاف پتانسیل ثابت 70 ولت، همراه با نشانگر وزن مولکولی 1000 جفت بازی از شرکت MWG آلمان انجام شد. ژل، به وسیله رنگ آشکارساز Red Safe رنگ‌آمیزی و به وسیله دستگاه ژل داکیومنت، تصویربرداری گردید.

1. Sucrose-minimal salts Low-Phosphate (SLP) agar
2. Nutrient Agar (NA)
3. Streaking method
4. Nutrient Broth

www.SID.ir

Archive of SID

جدول 1- آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق

Primer name	Sequence	Reference
63f	5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3'	(مارچسی و همکاران، 1998)
1387r	5'-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3'	

اندازه‌گیری حداقل غلظت بازدارنده مس

به منظور بدست آوردن حداقل غلظت بازدارنده (MIC[1]) 50 میکرولیتر باکتری از کشت 48 ساعته باکتری در محیط کشت مغذی مایع به محیط کشت مایع SLP به ترتیب با سری غلظت‌های 0، 0/8، 1/6، 2/4، 3/2، 4، 4/8، 5/6 و 6/4 میلی‌مولار مس (به ترتیب 0، 50، 100، 150، 200، 250، 300، 350 و 400 میلی‌گرم در لیتر مس) انتقال داده شد و پس از پنج روز شیک محیط‌های مایع (دمای 28 درجه سلسیوس و 120 دور در دقیقه)، حداقل میزان تحمل باکتری به مس بر اساس رشد باکتری و ایجاد کدورت در محیط مایع مشخص شد (هی و همکاران، 2010).

اندازه‌گیری میزان تولید سیدروفور به روش نیمه کمی CAS

این آزمون با استفاده از روش اصلاح شده الکساندر و زوبرر (1991) انجام شد. برای تهیه این محیط چهار محلول شامل معرف Fe-CAS ، بافر، محلول غذایی و کازآمینواسید با هم مخلوط شد. ابتدا باکتری‌ها در محیط کشت NB به مدت 48 ساعت کشت داده شد. سپس 5 تا 7 میکرولیتر تعلیق تازه باکتری به روش لکه‌گذاری روی پلیت‌های حاوی محیط CAS[2] کشت داده شد. پلیت‌های تلقیح داده شده به مدت پنج روز در دمای 30 درجه گرماگذاری شدند. تولید هاله نارنجی رنگ در اطراف کلنی، بیانگر توانایی تولید سیدروفور بود. پس از پنج روز، قطر هاله و نسبت قطر هاله به کلنی اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری میزان تولید اکسین

به منظور بررسی توان تولید سیدروفور جدایه‌ها، ابتدا باکتری‌ها به مدت 48 ساعت در محیط کشت NB کشت و سپس 50 میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به 25 میلی‌لیتر محیط NB حاوی 100 میلی‌گرم در لیتر ال-تریپتوفان منتقل شد. بعد از 48 ساعت سوسپانسیون باکتری سانترفیوژ و یک میلی‌لیتر از محلول بالایی با 2 میلی‌لیتر معرف سالکوفسکی (150 میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ، 250 میلی‌لیتر آب مقطر و 7/5 میلی‌لیتر $FeCl_3.6H_2O$ 0/5 مولار) مخلوط شد. سپس به مدت 25 دقیقه در دمای اتاق نگهداری و بلافاصله با دستگاه اسپکتروفتومتر میزان جذب نور در طول موج 535 نانومتر قرائت گردید (بنت و همکاران، 2001). مقدار تولید اکسین با مقایسه این جذب با نمودار استاندارد تهیه شده از ایندول استیک اسید محاسبه شد.

اندازه‌گیری توان تولید سیانید هیدروژن

تعیین توان تولید سیانید هیدروژن بر اساس روش دونیت کوریا و همکاران (2004) انجام شد. برای این منظور ابتدا جدایه‌ها در محیط‌های NA[3] غنی شده با گلایسین (4/4 گرم در لیتر) کشت داده شدند. به این ترتیب که هر پلیت با 100 میکرولیتر سوسپانسیون باکتری که به مدت 48 ساعت انکوبه شده بود تلقیح گردید. سپس یک کاغذ صافی آغشته به محلول معرف شامل کربنات سدیم دو درصد و اسیدپیکریک 0/5 درصد در داخل درب پلیت قرار داده شد. سپس پلیت‌ها با استفاده از پارافیلم درزبندی شده تا از خروج گاز سیانید هیدروزن جلوگیری شود. آنگاه پنج روز در انکوباتور دمای سلسیوس نگهداری و بر اساس تغییر رنگ کاغذ صافی از رنگ زرد اولیه (عدم تولید) به کرم (کم)، نارنجی (متوسط)، قهوه‌ای روشن (نسبتا زیاد) و آجری (زیاد) که به ترتیب از یک تا پنج درجه‌بندی شدند، میزان تولید سیانید هیدروژن تعیین شد.

اندازه‌گیری توان حل فسفات‌های معدنی در محیط مایع

برای این منظور از محیط حل فسفات‌های معدنی[4] که حاوی نمک نامحلول تری‌کلسیم فسفات بود استفاده شد. در این روش ابتدا باکتری‌ها به مدت 48 ساعت، در محیط NB کشت داده شد. سپس 200 میکرولیتر از تعلیق باکتری به 25 میلی‌لیتر محیط حل فسفات‌های معدنی (PKV) (0/5 گرم $(NH_4)_2SO_4$، 0/5 گرم $MgSO_4.7H_2O$، 0/3 گرم NaCl، 0/3 گرم KCl، 0/03 گرم $FeSO_4.7H_2O$، 0/02 گرم $MnSO_4.H_2O$ و 10 گرم گلوکز) که حاوی پنج گرم در لیتر نمک نامحلول تری‌کلسیم فسفات بود منتقل گردید. سپس ارلن‌های تلقیح داده شده همراه با یک شاهد به مدت 120 ساعت شیک و pH آن‌ها قرائت گردید.

1. Minimum Inhibitory Concentrations
2. Chrome Azurol S
3. Nutrient Agar
4. Pikovskaya's (PKV) agar medium

www.SID.ir

Archive of SID

سپس تعلیق باکتری سانترفیوژ (با 8000 دور در دقیقه به مدت 15 دقیقه) و یک میلی‌لیتر محلول رویی با سه میلی‌لیتر آب مقطر و یک میلی‌لیتر معرف آمونیم مولیبدات-وانادات مخلوط شد. پس از بیست دقیقه خواباندن نمونه‌ها در دمای آزمایشگاه، میزان جذب نور بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج 470 قرائت گردید. میزان حلالیت فسفر با مقایسه این جذب با منحنی استاندارد تهیه شده بوسیله‌ی KH_2PO_4 محاسبه شد (جیون و همکاران، 2003).

اندازه‌گیری توان حل‌کنندگی ترکیبات کم محلول روی در محیط جامد

در این روش ابتدا باکتری‌ها به‌مدت 48 ساعت در محیط NB کشت داده شد. سپس 15 میکرولیتر از تعلیق تازه باکتری به روش لکه‌گذاری در سه تکرار روی پلیت‌های حاوی محیط جامد PKV که حاوی 0/1% (یک گرم در لیتر) نمک‌های ZnO و $ZnCO_3$ و 1/5 گرم در لیتر KH_2PO_4 (منبع فسفر محلول) بودند کشت داده شد. پلیت‌های تلقیح شده به مدت پنج روز در دمای 28 درجه سلسیوس نگهداری و هاله شفاف اطراف کلنی به عنوان انحلال ترکیبات کم‌محلول روی درنظر گرفته شد. سپس نسبت قطر هاله به کلنی اندازه-گیری گردید (ساواران، 2004).

اندازه‌گیری توان حل‌کنندگی ترکیبات کم‌محلول روی در محیط مایع

برای این منظور از محیط مایع PKV که حاوی یک گرم در لیتر نمک‌های ZnO و $ZnCO_3$ و 1/5 گرم در لیتر KH_2PO_4 (منبع فسفر محلول) بود، استفاده شد. ابتدا باکتری‌ها به مدت 48 ساعت در محیط NB کشت داده سپس 200 میکرولیتر از تعلیق تازه باکتری به 25 میلی‌لیتر محیط PKV منتقل شد نمونه‌ها برای مدت 120 ساعت شیکر و پس از آن pH آن‌ها قرائت شد. سپس تعلیق باکتری سانتریفوژ (با دور 10000 به مدت 15 دقیقه) و یک میلی‌لیتر از محلول رویی با محیط PKV به نسبت 30:1 رقیق شده و مقدار روی محلول در نمونه‌های تلقیح شده با باکتری و شاهد با استفاده از دستگاه جذب اتمی مورد اندازه‌گیری قرار گرفت (ساواران، 2004).

توانایی تولید آنزیم ACC- دآمیناز

آزمون توان تولید آنزیم ACC د- آمیناز به روش آمیکو و همکاران (2005) با کمی تغیرات انجام گرفت. به منظور بررسی توان جدایه‌های مورد مطالعه در استفاده از ACC به عنوان تنها منبع نیتروژن که می‌تواند نشانه تولید آنزیم ACC- دآمیناز توسط باکتری باشد، جدایه‌ها به مدت 48 ساعت در محیط کشت TSB کشت داده شدند. سپس 50 میکرولیتر از سوسپانسون تازه هر جدایه به 20 میلی‌لیتر از سه محیط: df حاوی سه میلی‌مولار ACC، محیط DF حاوی دو گرم در لیتر سولفات آمونیوم (به عنوان شاهد مثبت) و محیط DF فاقد ACC و سولفات آمونیوم (به عنوان شاهد منفی) تلقیح گردید. بعد از 48 ساعت انکوباسیون در دمای 28 درجه سانتی‌گراد با استفاده از اسپکتروفتومتر میزان جذب نور در 405 نانومتر برای هر سه محیط قرائت شد. توان تولید آنزیم ACC- دآمیناز، بر اساس میزان رشد باکتری در محیط حاوی ACC در مقایسه با رشد (جذب نور) آن در محیط‌های شاهد، قابل ارزیابی خواهد بود.

محیط DF: شامل چهار گرم در لیتر KH_2PO_4، شش گرم در لیتر Na_2HPO_4، 0.2 گرم در لیتر $MgSO_4.7H_2O$، دو گرم در لیتر گلوکز، دو گرم در لیتر گلوکونیک اسید، دو گرم در لیتر سیتریک اسید و همچنین عناصر میکرو شامل: یک میلی‌گرم در لیتر $FeSO_4.7H_2O$، 10 میکروگرم در لیتر H_3BO_3، 10 میکروگرم در لیتر $MnSO_4.7H_2O$، 124/6 میکروگرم در لیتر $ZnSO_4.7H_2O$، 78/22 میکروگرم در لیتر $CuSO_4$ و 10 میکروگرم در لیتر MoO_3 و pH= 7/2).

نتایج و بحث

جداسازی و شناسایی جدایه‌های مقاوم به مس

از پنج نمونه خاک جمع‌آوری شده از منطقه خاتون-آباد سرچشمه در مجموع شش جدایه باکتری جداسازی شد. نمونه‌های خاک‌ها شامل خاک ریزوسفری جدا شده از ریشه گیاهان غالب منطقه شامل هوریشو (*Eremuru* sp)، اسپند (*Peganum harmala*)، شکرتیغال (*Echinops ceratophorus*) و قیچ (*Zygophyllum fabago*) بودند. جدایه‌های K1، K2 و K3 از ریزوسفر گیاه هوریشو، جدایه K4 از ریزوسفر گیاه اسپند، جدایه K5 از ریزوسفر گیاه شکر تیغال و جدایه K6 از ریزوسفر گیاه قیچ جداسازی گردید. برخی خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی جدایه‌ها در جدول 2 گزارش شده است. نتایج نشان داد که پنج جدایه از شش جدایه گرم منفی می‌باشند. نتایج توالی‌یابی بیانگر سودوموناس بودن اکثر جدایه‌ها می‌باشد تنها یک جدایه مربوط به جنس باسیلوس بود (جدول 3). خان و همکاران (2015) موفق به جداسازی تعدادی باکتری مقاوم به مس از ریزوسفر و اندوریزوسفر گیاه *Prosopis juliflora* شدند. باکتری‌های جنس سودوموناس و باسیلوس از جمله باکتری‌های جدا شده مقاوم به مس بودند. گروهی از محقیق 272 سویه *Pseudomonas spp.* و 161 سویه *Bacillus spp.* از خاک اطراف معادن جداسازی کردند. تنها 7/3%

www.SID.ir

Archive of SID

سویه‌های جداسازی شده مقاوم به مس بودند (سوگی و همکاران، 2010).

بررسی حداقل غلظت مس بازدارنده رشد جدایه‌ها

پس از جداسازی و شناسایی، مقاومت باکتری‌ها به غلظت‌های 50، 100، 150، 200، 250، 300، 350 و 400 میلی‌گرم در لیتر سنجیده شد. با توجه به جدول 4 جدایه‌ی K1، K2 و K3 در غلظت 50 میلی‌گرم در لیتر و جدایه K5 در غلظت 100 میلی‌گرم در لیتر و جدایه‌های K4 و K5 در غلظت 400 میلی‌گرم در لیتر مس رشد کرده و از خود مقاومت نشان دادند. گروهی از محققین مقاومت باکتری‌های جنس سودوموناس و باسیلوس تا غلظت 100 میلی‌گرم در لیتر را گزارش کردند (خان و همکاران، 2015). همچنین زکی و فرگ (2010) در تحقیقی پیرامون باکتری‌های مقاوم به مس، موفق به جداسازی هفت سویه باکتری مقاوم به مس از خاک در معرض پساب کارخانه چرم‌سازی شدند. نتایج این محققین نشان داد که پنج سویه توانایی رشد در حداقل غلظت بازدارنده رشد 200 میلی‌گرم بر لیتر مس را داشتند.

بررسی صفات محرک رشدی سویه‌های مقاوم به مس

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که باکتری‌ها دارای خصوصیات محرک رشدی متفاوتی هستند و اثر باکتری بر تمامی صفات محرک رشدی اندازه‌گیری شده معنی‌دار بود.

جدول 2- برخی ویژگی‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی جدایه‌های مقاوم به مس مورد مطالعه

آزمون	جدایه‌ها					
	K1	K2	K3	K4	K5	K6
گرم	+	-	-	-	-	-
رنگدانه در King B	-	+	+	-	-	+
اکسیداز	-	-	+	+	+	-
کاتالاز	+	-	-	+	+	+
رشد در شرایط هوازی	+	+	+	+	+	+
HR	+	-	-	-	+	-

جدول 3- نتایج حاصل از بلاست کردن توالی‌های 16S rRNA در سایت NCBI به منظور شناسایی جدایه‌ها

شماره جدایه	نتایج حاصل از بلاست در NCBI		
	گونه‌ها	شماره دسترسی[2]	تشابه توالی[1]
K1	*Bacillus sp*	KJ190977.1	%98
K2	*Pseudomonas sp*	HG805738.1	%97
K3	*Pseudomonas sp*	FJ652598.1	%98
K4	*Pseudomonas cedrina*	JF460762.1	%99
K5	*Pseudomonas cedrina*	JF460762.1	%98
K6	*Pseudomonas sp*	KP852523.1	%97

جدول 4- بررسی حداقل غلظت مس بازدارنده رشد جدایه‌ها

سویه باکتری	غلظت مس	50	100	150	200	250	300	350	400
	میلی‌گرم در لیتر								
K 1		+	-	-	-	-	-	-	-
K 2		+	-	-	-	-	-	-	-
K 3		+	-	-	-	-	-	-	-
K 4		+	+	+	+	+	+	+	+
K 5		+	+	-	-	-	-	-	-
K 6		+	+	+	+	+	+	+	+

+ و – به‌ترتیب توانایی رشد و عدم رشد در غلظت مس می‌باشد

1. Sequence similarity (%)
2. Accession number

www.SID.ir

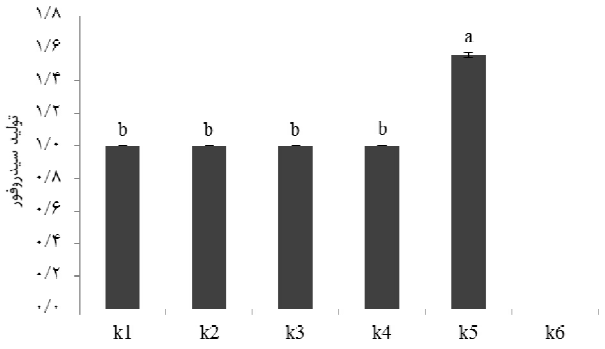
Archive of SID

جدول 5- تجزیه واریانس خصوصیات محرک رشدی باکتری‌های جداسازی شده مقاوم به مس

منابع تغییرات	درجه آزادی	حل کنندگی فسفر	حل‌کنندگی ZnO	حل‌کنندگی $ZnCO_3$	تولید سیدروفور	تولید اکسین	حل‌کنندگی ZnO	حل‌کنندگی $ZnCO_3$	تولید HCN
		محیط مایع			در محیط جامد				
باکتری	5	23270**	49/0**	78/6**	0/773**	1/95**	2/47**	0/625**	4/50**
خطا	12	3730	0/161	0/300	0/000	0/014	0/014	0/003	0/000
ضریب تغییرات	_	10/3	16/9	18/6	1/27	12/5	21/8	20/6	0/000

مقدار تولید سیدروفور با اندازه‌گیری قطر هاله نارنجی رنگ اطراف کلونی جدایه‌ها ارزیابی شد. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که بجز جدایه‌ی K6 که توانایی تولید سیدروفور را در محیط CAS نداشت، جدایه‌های K1، K2، K3 و K4 همگی دارای نسبت هاله به کلونی یک بودند و سویه‌ی K5 بیشترین میزان تولید سیدروفور با نسبت هاله به کلونی 1/56 را به خود اختصاص داد. سویه K5 تفاوت معنی‌داری با دیگر سویه‌های تولید کننده سیدروفور داشت (شکل 1). حجت‌نوقی و همکاران (1392)، گزارش کردند که 48% جدایه‌های ریزوسفری مورد آزمایش قادر به تولید سیدروفور در محیط جامد CAS بودند. طبق یک گزارش توسط بت و ویاس (2014) 40% جدایه‌های که از خاک ریزوسفری گیاهان در حال رشد در منطقه‌ایَ نیمه‌خشک، جدا شده بودند، توانایی تولید سیدروفور را دارا بودند. باکتری‌های جنس سودوموناس از مهمترین باکتری‌های تولید کننده سیدروفور بوده و توانایی بالایی در تولید سیدروفور دارند (عباس‌زاده و همکاران، 2010).

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد تولید اکسین توسط جدایه‌های مختلف دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد بود (جدول 5). طبق بررسی تولید اکسین توسط جدایه‌های مورد آزمایش دو جدایه K4 و K5 قادر به تولید اکسین نبودند. تولید اکسین توسط جدایه K1 تفاوت معنی‌داری با دیگر جدایه‌های مورد بررسی داشته و با مقدار 2/07 میلی‌گرم در لیتر بیشترین میزان تولید اکسین در بین جدایه‌ها را دارا بود. جدایه‌های K3، K6 و K2 به ترتیب با میزان 1/27، 1/20 و 1/09 میلی‌گرم در لیتر در سطح دوم تولید اکسین قرار گرفتند. چهار جدایه توانایی تولید اکسین در محیط کشت حاوی 100 میلی‌گرم در لیتر ال- تریپتوفان را داشتند (شکل 2).



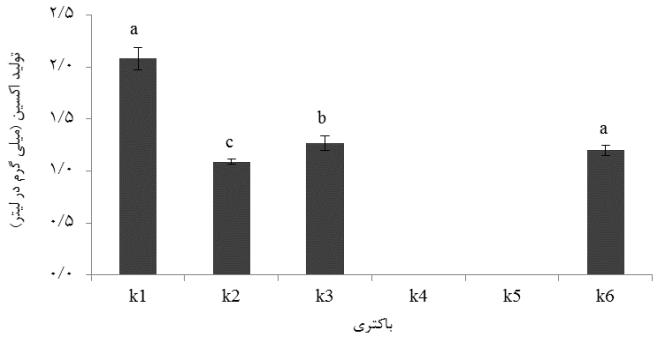
شکل 1- اندازه‌گیری میزان تولید سیدروفور جدایه‌ها (نسبت هاله به کلونی) در محیط CAS

در یک آزمایش توسط حجت‌نوقی و همکاران (1392) گزارش شد که 60% باکتری‌های ریزوسفری مورد مطالعه توانایی تولید IAA را در محیط TSB حاوی 50 میکروگرم بر لیتر ال- تریپتوفان را دارا بودند. هورمون

www.SID.ir

Archive of SID

گیاهی ایندول -3- استیک اسید (IAA) که سنتز زیستی آن نیاز به پیش‌ماده ال-تریپتوفان دارد، مهمترین اکسین است که چندین عمل فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی در گیاه را تنظیم می‌کند (گلیک، 2012). اگرچه شامل تحریک رشد ریشه، کاهش تنش شوری، تعاملات گیاه-پاتوژن نیز می‌باشد اما در درجه اول تحریک رشد ریشه-های جانبی را برعهده دارد که نتیجتاً باعث افزایش سطح تماس ریشه شده و جذب مواد را توسط ریشه افزایش می‌دهد (آحیمد و کیبرت، 2013). در نتیجه استفاده از باکتری‌های مقاوم به فلزات سنگین و تولید کننده اکسین می‌تواند نقش مؤثری بر رشد و توسعه ریشه در خاک آلوده و به‌تبع آن افزایش جذب فلزات سنگین و کارایی گیاه‌پالایی داشته باشد. تولید اکسین توسط باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه می‌تواند باعث افزایش سطح، طول و ترشحات ریشه‌ای شود که در نهایت می‌تواند جذب فلزات سنگین توسط گیاه و فرایند گیاه‌استخراجی را افزایش و بهبود بخشد (ایگامبردیوا، 2009).



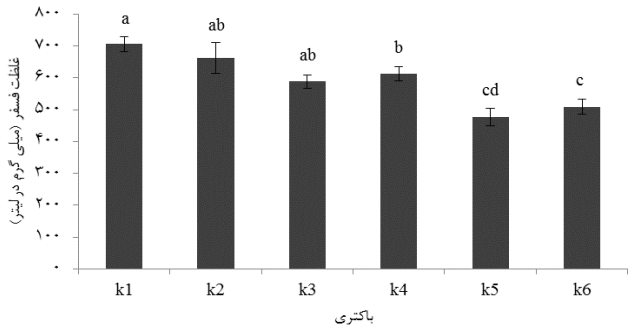
شکل 2- اندازه‌گیری میزان تولید اکسین جدایه‌ها

در بین جدایه‌ها تنها جدایه K4 توانایی تولید سیانید هیدروژن را با درجه چهار (نسبتاً زیاد) دارا بود و دیگر جدایه‌ها توانایی تولید سیانید هیدروژن را نداشتند. برخی مطالعات اخیر بر این باورند که برخی گونه‌های سودوموناس به دلیل ترشح سانید هیدروژن باعث افزایش استقرار بوته شده‌اند (ساهاران و نهرا، 2011).

توان انحلال فسفات‌های معدنی در محیط مایع حاوی تری‌کلسیم فسفات در جدایه‌های مختلف در سطح 1 درصد معنی‌دار بود (جدول 5). نتایج ارزیابی انحلال تری‌کلسیم فسفات در محیط مایع توسط جدایه‌ها نشان داد که بین حل کنندگی فسفر جدایه‌ها اختلاف معنی‌داری وجود دارد. نتایج نشان داد جدایه‌های K1 و K2 به ترتیب با میزان 706 و 661 میلی‌گرم در لیتر فسفر بیشترین حل‌کنندگی فسفر را به خود اختصاص داده و با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند. 100% جدایه‌های مورد مطالعه در این پژوهش (شکل 3) توانایی انحلال ترکیبات نامحلول فسفات را دارا بودند .تمامی جدایه‌های ریزوسفری مورد آزمایش در یک منطقه نیمه خشک توانایی انحلال ترکیبات نامحلول فسفات را دارا بودند (بت و ویاس، 2014). مئوچانگ و همکاران (2006) 168 جدایه باکتری‌های محرک رشد را جداسازی کردند و از نظر حل فسفات‌های معدنی نامحلول مورد ارزیابی قرار دادند. آنها نشان دادند که 37 درصد جدایه‌ها قادر به حل فسفر از ترکیبات غیر محلول فسفر بودند. وجود مقادیر بالای فلزات سنگین می‌تواند باعث کاهش فراهمی فسفر و به‌تبع آن کاهش رشد گیاه گردد. در نتیجه استفاده از باکتری‌های محرک رشد با توانایی بالای انحلال فسفات می‌تواند نقش به‌سزایی در افزایش رشد گیاه و کارایی گیاه‌پالایی در خاک‌های آلوده داشته باشد. بهبود شرایط برای رشد گیاهان با استفاده از باکتری‌های ریزوسفری محرک گیاه تحت شرایط تنش فلزات سنگین جهت افزایش کارآیی گیاه‌پالایی یک امر ضروری می‌باشد (گلیک، 2003). فراهمی کم فسفر در غلظت‌های بالای فلزات سنگین یکی از عوامل محدود کننده رشد می‌باشد که می‌توان این محدودیت را با کاربرد باکتری‌های حل‌کننده فسفر برطرف کرد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل 3- میزان حل‌کنندگی فسفر جدایه‌ها

نتایج بررسی‌ها نشان داد که در محیط جامد حاوی کربنات روی دو جدایه K4 و K5 به ترتیب با قطر هاله به قطر کلونی 0/910 و 0/850 توان انحلال کربنات روی را داشتند و بقیه جدایه‌ها توانایی انحلال کربنات روی از خود نشان ندادند. بررسی‌ها نشان داد جدایه K4 با نسبت قطر هاله به قطر کلونی 2/11 بیشترین میزان انحلال اکسید روی را به خود اختصاص داد و تفاوت معنی‌داری با سویه K5 با نسبت 1/23 داشت. جدایه‌های K1، K2، K3 و K6 قادر به انحلال اکسید روی نبودند. بر این اساس سویه‌های K1، K2، K3 و K6 قادر به انحلال ترکیبات کم محلول اکسید و کربنات روی در محیط مایع نبودند. سویه K4 با 12/5 میلی‌گرم در لیتر روی بیشترین میزان انحلال کربنات روی در محیط مایع به خود اختصاص داد و از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با سویه K5 با میزان 5/18 میلی‌گرم در لیتر روی داشت.و همچنین درمورد انحلال اکسید روی در محیط مایع سویه K4 با 9/76 میلی‌گرم در لیتر روی تفاوت معنی‌داری با سویه K5 با 4/50 میلی‌گرم در لیتر روی داشت. به‌طور کلی تنها دو جدایه توانایی حل‌کنندگی ترکیبات کم محلول روی در محیط جامع و مایع را داشتند (داده‌ها در شکل و جدول گزارش نشده است). در یک پژوهش دیگر توسط گنتی و همکاران (2013) در تمامی سویه‌های حل کننده‌ی نمک‌های روی با کاهش pH همراه بود که این به تولید اسیدهای آلی توسط این سویه‌ها نسبت داده شد. دسای و همکاران (2012) گزارش کردند که فراهمی بالای روی به طور مستقیم با کاهش پ‌هاش متناسب است.

نتایج جدول 6 نشان می‌دهد که سه جدایه از شش جدایه توانایی استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن را دارا بودند. با توجه به اینکه مقدار رشد باکتری K5 در محیط حاوی ACC (در مقایسه با سایر جدایه‌ها) از نظر کدورت سنجی نزدیکتر به کدورت و رشد همین جدایه در محیط حاوی نیترات آمونیوم بود، به نظر می‌رسد. کارایی این جدایه در تولید آنزیم ACC-دآمیناز و مصرف ACC به عنوان منبع نیتروژن بیشتر است. تولید آنزیم ACC-دآمیناز که سطوح اتیلن را در گیاهان تعدیل می‌کند (گلیک و همکاران، 1998) احتمالاً نقش مهمی را در تحمل گیاه نسبت به غلظت بالای فلز سنگین ایفا می‌کند. گزارش شده است که باکتری‌های مصرف‌کننده ACC می‌توانند با کاهش تولید اتیلن تنشی از گیاه در برابر غلظت بالای فلزات سنگین محافظت کنند (بلیموو و همکاران، 2005؛ مدحائیان و همکاران، 2007). با توجه به اینکه غلظت‌های بالای فلزات سنگین در خاک می‌تواند رشد گیاهان را با تولید اتیلن کاهش دهد، کاربرد باکتری‌های تولید کننده آنزیم ACC- دآمیناز می‌تواند نقش مؤثری در بهبود رشد گیاه و افزایش کارایی گیاه‌پالایی داشته باشد. طبق گزارشات محققین کاربرد چندین گونه PSB[1] حاوی آنزیم ACC-دآمیناز[2]، جداسازی شده باعث بهبود رشد گیاه تحت تنش فلز شدند (گانسان، 2008؛ جیانگ و همکاران، 2008؛ سان و همکاران، 2009).

1. Posphate Solubilizing Bacteria
2. ACC- deaminase

www.SID.ir

Archive of SID

جدول 6- بررسی توانایی جدایه‌ها به منظور مصرف ACC به عنوان منبع نیتروژن

جدایه باکتری	DF+N	DF+ACC	DF-N	
	کدورت اندازه‌گیری شده (Optical density)			ACC-دآمیناز
PA3	2/235	1/835	0/537	+
K1	2/332	1/16	0/545	+
K2	2/022	0/247	0/368	-
K3	1/858	1/257	0/412	+
K4	2/036	0/496	0/504	-
K5	2/336	2/035	0/434	+
K6	1/654	0/257	0/190	-

+ و – نشان‌دهنده توانایی و عدم توانایی تولید ACC به عنوان منبع نیتروژن است. PA3 شاهد مثبت می‌باشد

نتیجه‌گیری کلی

یکی از عوامل کاهش دهنده کارایی گیاه‌پالایی در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین، وجود غلظت‌های بالای این فلزات و به‌تبع آن اثر آنها بر کاهش رشد گیاهان است. با کاهش زیست توده گیاهی مقدار عنصر استخراج شده از خاک و انتقال داده شده به گیاه کاهش می‌یابد. یکی از راهکارهای افزایش کارایی سیستم گیاه‌پالایی تلقیح گیاهان با باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد مقاوم به فلزات سنگین است. این باکتری‌ها می‌توانند با کاهش تنش اتیلنی، افزایش فراهمی عناصری مانند آهن، روی و فسفر و همچنین تولید هورمون‌های رشدی مانند اکسین باعث افزایش رشد گیاه و بهبود کارایی گیاه‌پالایی شوند. در بین باکتری‌های مورد بررسی سویه‌های *Pseudomonas cedrina* k5 و *Bacillus sp* k1 مؤثرترین سویه‌ها به منظور استفاده در کشت‌های گلخانه‌ای به منظور بررسی نقش آنها در افزایش کارایی گیاه‌پالایی می‌باشند.

فهرست منابع:

1. حجت نوقی، ف.، اخگر، ع.، اسفندیارپور، ع. و خاوازی، ک. 1392. ارزیابی جمعیت و خواص محرک رشدی باکتری‌های اندوریزوسفری، ریزوسفری و غیر ریزوسفری در نهال‌های پسته. نشریه دانش آب و خاک، جلد 23(4): 234-215.
2. Abbas-Zadeh, P., Saleh-Rastin, N., Asadi-Rahmani, H., Khavazi, K., Soltani, A., Shoary-Nejati, A.R. and Miransari, M. 2010. Plant growth promoting activities of fluorescent pseudomonads, isolated from the Iranian soils. Acta Physiologiae Plantarum. 32: 281- 288.
3. Ahemad, M. and Khan, M.S. 2012. Evaluation of plant growth promoting activities of rhizobacterium *Pseudomonas putida* under herbicide-stress. Annals of Microbiology. 62: 1531–1540.
4. Ahemad, M. and Kibret, M. 2013. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. Journal of King Saud University Science. 26(1): 1-20.
5. Ahemad, M. and Malik, A. 2011. Bioaccumulation of heavy metals by zinc resistant bacteria isolated from agricultural soils irrigated with wastewater. Bacteriology Journal. 2: 12–21.
6. Alexander, D.B. and Zuberer, D.A. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. Biology and Fertility of Soils. 12: 39-45.
7. Amico, E.D., Cavalca, L. and Andreoni, V. 2005. Analysis of rhizobacterial communities in perennial *Graminaceae* from polluted water meadow soil, and screening of metal-risistant, potentially plant growth-promoting bacteria. FEMS Microbiology Ecology. 52: 153-162.

www.SID.ir

Archive of SID

8. Asghar, H.N., Zahir, Z.A., Arshad, M. and Khaliq, A. 2002. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their groth-promoting activities in *Brassica juncea* L. Biology Fertility Soils. 35: 231-237.
9. Babalola, O.O. 2010. Beneficial bacteria of agricultural importance. Biotechnology Letters. 32(11): 1559–1570.
10. 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 Biochemistry. 37: 241–250.
11. Bent, E., Tuzan, S., Chanway, C.P. and Enebak, S. 2001. Alteration in plant growth and in root hormone levels of lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. Canadian Journal of Microbiology. 47: 793-800.
12. Bhatt, P.V. and Vyas, B.R.M. 2014. Screening and Characterization of Plant Growth and Health Promoting Rhizobacteria. International Journal of Current Microbiology Applied Science. 3(6): 139-155.
13. Chibuike, G.U. and Obiora, S.C. 2014. Heavy Metal Polluted Soils: Effect on Plants and Bioremediation Methods. Hindawi Publishing Corporation, Applied and Environmental Soil Science. 2014 (12 pages).
14. Desai, S., Praveen Kumar, G., Sultana, U., Pinisetty, S., Ahmed, M.H., Amalraj, D. and Reddy, G. 2012. Potential microbial candidate strains formanagement of nutrient requirements of crops. African Journal of Microbiology Research. 6 (17): 3924–3931.
15. Donate-Correa, J., Leon-Barrios, M. and Perez-Galdona, R. 2004. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste), a forage tree-shrub legume endemic to the Canary Island. Plant and Soil. 266: 261-272.
16. Egamberdieva, D. 2009. Alleviation of salt stress by plant growth regulators and IAA producing bacteria in wheat. Acta Physiologiae Plantarum. 31: 861–864.
17. Ganesan, V. 2008. Rhizoremediation of cadmium soil using a cadmium-resistant plant growth-promoting rhizopseudomonad. Current Microbiology. 56: 403–407.
18. Glick, B.R., Penrose, D.M. and Li, J. 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. Journal of Theoretical Biology. 190: 63–68.
19. Glick, B.R. 2003. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. Biotechnology. 21: 383–393.
20. Glick, B.R. 2012. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. Hindawi Publishing Corporation. Scientifica. 2015 (15 pages).
21. Glick, B.R., Penrose, D.M. and Li, J. 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. Journal of Theoretical. Biology. 190: 63–68. ##
22. Goteti, P.K., Emmanuel, L.D.A., Desai, S. and Shaik, M.H.A. 2013. Prospective Zinc Solubilising Bacteria for Enhanced Nutrient Uptake and Growth Promotion in Maize (*Zea mays* L.). International Journal of Microbiology. 2013 (7 pages).
23. Han, J., Sun, L., Dong, X., Cai, Z., Sun, X., Yang, H., Wang, Y. and Song, W. 2005. Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensi* s HR_4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens. System Applied Microbiology. 28: 66–76.
24. Haque, N., Peralta-Videa, J. R., Jones, G. L., Gill, T. E. and Gardea-Torresdey, J. L. 2008. Screening the phytoremediation potential of desert broom (*Baccharis sarothroides* Gray) growing on mine tailings in Arizona, USA. Environmental Pollution, 153: 362–368.

www.SID.ir

Archive of SID

25. He, L.Y., Zhang, Y.F., Ma, H.Y., Su, L.N., Chen, Z.J., Wang, Q.Y., Meng, Q. and Fang, S.X. 2010. Characterization of copper resistant bacteria and assessment of bacterial communities in rhizosphere soils of copper-tolerant plants. Applied Soil Ecology. 44: 49–55.
26. Huang, X.D., El-Alawi, Y., Penrose, D.M., Glick, B.R. and Greenberg, B.M. 2004a. A Multi-process Phytoremediation System for Removal of Polycyc lic Aromatic Hydrocarbons from Contaminated Soils. Environmental Pollution. 130: 453-463.
27. Huang, X.D., El-Alawi, Y., Penrose, D.M., Glick, B.R. and Greenberg, B.M. 2004b. Responses of Three Grass Species to Creosote during Phytoremediation. Environmental Pollution. 130: 465-476.
28. Jeon, J.S., Lee, S.S., Kim, H.Y., Ahn, T.S and Song, H.G. 2003. Plant growth promoting in soil by some inoculated microorganism. The Journal of Microbiology. 41(4): 271-276.
29. Jiang, C.Y., Sheng, X.F., Qian, M. and Wang, Q.Y. 2008. Isolation and characterization of a heavy metal resistant *Burkholderia* sp. From heavy metal-contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal polluted soil. Chemosphere. 72: 157–164.
30. Khan, M.U., Sessitsch, A., Harris, M., Fatima, K., Imran, A., Arslan, M., Shabir, G., Khan, Q.M. and Afzal, M. 2015. Cr-resistant rhizo- and endophytic bacteria associated with *Prosopis juliflora* and their potential as phytoremediation enhancing agents in metal-degraded soils. Frontiers in Plant Science. 5: 755.
31. Kloepper, J.W., Zablotowick, R.M., Tipping, E.M. and Lifshitz, R. 1991. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In: Keister, D.L., Cregan, P.B. (Eds.), The Rhizosphere and Plant Growth. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, p: 315–326.
32. Madhaiyan, M., Poonguzhali, S. and Sa, T. 2007. Metal tolerating methylotrophic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). Chemosphere. 69: 220–228.
33. Marchesi, J.R., Sato, T., Weightman, A.J., Martin, T.A., Fry, J.C., Hiom, S.J. and Wade, W.G. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology. 64: 795–799.
34. Meunchang, S., Thongra, P., Sanoh, S., Kaewsuralikhit, S. and Ando, S. 2006. Development of rhizobacteria as a biofertilizer for rice production. International workshop on Sustained Management of the Soi- Rhizosphere System for Efficient Crop Production and Fertilizer Use. Bangkok, Thailand, p: 6-20.
35. Prasad, M.N.V. and Freitas, H.M.O. 2003. Metal hyper-accumulation in plants-Biodiversity prospecting for phytoremedation technology. Electronic Journal of Biotechnology. 6(3): 285-321.
36. Wuana, R.A. and Okieimen, F.E. 2011. HeavyMetals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. International Scholarly Research Network ISRN Ecology. 2011 (20 pages).
37. Saharan, B.S. and Nehra, V. 2011. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. Life Sciences and Medicine Research. 2011 (30 pages).
38. Saravanan, V.S., Madhaiyan, M. and Thangaraju, M. 2007. Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium Gluconacetobacter diazotrophicus. Chemosphere. 66: 1794–1798.
39. Saravanan, V.S., Subramoniam, S.R. and Raj, S.A. 2004. Assessing in vitro solubilization potential of different zinc solubilizing bacteria (ZSB) isolate. Brazilian Journal of Microbiology, 34: 121-125.

www.SID.ir

Archive of SID

40. Schaad N., Jones J.B. and Chun W., 2001: Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
41. Sevgi, E., Coral, G., Gizir, A.M. and Sangun, M.K. 2010. Investigation of heavy metal resistance in some bacterial strains isolated from industrial soils. Turkish Journal of Biology. 34: 423-431.
42. Song Y., Ji, J., Mao, C., Yang, Z., Yuan, X., Ayoko, G.A. and Fros R.L. 2010. Heavy metal contamination in suspended soils of Changjiang River environmental implications. Geoderma. 159: 286–295.
43. Sun, L., He, L., Zhang,. Y, Zhang, W., Wang, Q. and Sheng, X. 2009. Isolation and biodiversity of copper-resistant bacteria from rhizosphere soil of Elsholtzia splendens. Acta Microbiologica Sinica. 49(10): 1360-1366.
44. Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patlolla, A.K. and Sutton, D.J. 2012. Heavy metal toxicity and the environment. Molecular, Clinical and Environmental Toxicology. 101: 133-164.
45. VCI, Copper history/Future, Van Commodities Inc. 2011. http:// trademetalfutures.com /copperhistory.html.
46. Verma, S.C., Ladha, J.K. and Tripathi, A.K. 2001. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. Journal of Biotechnology. 91: 127–141.
47. Walker, T.S., Bais, H.P., Grotewold, E. and Vivanco, J.M. 2003. Root exudation and rhizosphere biology. Plant Physiology. 132: 44–51.
48. Zaki, S. and Farag, S. 2010. Isolation and molecular characterization of some copper biosorped strains. International Journal of Environmental Science and Technology. 7(3): 553-560.

www.SID.ir

Archive of SID

Isolation, identification and plant growth promoting characteristics of Cu-tolerant bacteria in a contaminated soil

Z. Karimi, P. AbbaszadehDahaji[1], A. R. Akhgar and M. Hamidpour
M.Sc. Student, Department of Soil Science, Vali-e-Asr University; E-mail: zahrakk69@gmail.com
Assistant professor, Department of Soil Science, Vali-e-Asr University;
E-mail: p.abbaszadeh@vru.ac.ir
Associate professor, Department of Soil Science, Vali-e-Asr University; E-mail: arakhgar@yahoo.com
Associate professor, Department of Soil Science, Vali-e-Asr University;
E-mail: m.hamidpour@vru.ac.ir
Received: May, 2017 & Accepted: October, 2017

Abstract

Plant inoculation with effective plant growth promoting and heavy metal resistant rhizobacteria is an efficient method to improve the phytoremediation efficiency and extraction of heavy metals from contaminated soils. With respect to this reason, a study was conducted to isolate, identify and evaluate the growth stimulating traits of copper-resistant bacteria from a Cu-contaminated soil. Six rhizospheric soil samples of indigenous plants were collected in Sarcheshmeh Khatoonabad, Kerman province. After screening, six strains were selected. Phenotypic, biochemical and genetic identification data showed that five and one isolates were belong to Pseudomonas and Bacillus genera respectively. Then, the minimum inhibitory concentration of copper, siderophore production, auxin and hydrogen cyanide production, the ability to solubilize mineral phosphate in solid and liquid medium, the ability to solubilize Zn low soluble compounds in solid and liquid medium and production of ACC-deaminase were investigated. The results indicated that all of the isolates were resistant to various concentrations of copper. The maximum resistance to inhibitory concentration of copper was related to K4 and K5 strains at a concentration of 400 mg L^{-1} of copper. All of the strains were able to produce siderophore in CAS medium except for K6 strains and strain K5 was also the superior in siderophore production. Among the strains, K4 and K6 were not able to produce auxin. There was also a significant difference between auxin productions by isolates K1 with the other isolates, with the highest auxin production (2.07 mg L^{-1}). The results also demonstrated that among the strains, only K4 strain was capable of producing hydrogen cyanide (degree: four=relatively high) and the other isolates were reported as non-production of hydrogen cyanide (degree: one). The results of Three Calcium Phosphate (TCP) solubilizing by isolates in PKV broth medium showed that K1, K2, and K3 strains had the most phosphorus solubility (706, 661 and 588 mg L^{-1}) respectively and there wasn't significant difference between them. The results demonstrated that K4 and K5 isolates with 0.910 and 0.850 halos to colony diameter had a significant difference with other isolates in solid medium containing $ZnCO_3$ and the rest of the strains, K1, K2, K3 and K6 did not show the ability to solubilize the zinc carbonate as well. The solubilizing of solid zinc oxide in solid medium by K4 strain (halo:colony, 2.11) was the highest solubility of zinc oxide and K1, K2, K3 and K6 strains were not able to dissolve the zinc oxide in the solid medium. They did not show the ability to dissolve the low soluble zinc oxide nor the zinc carbonate compounds. K4 strain had the highest zinc carbonate solubility in the broth (12.5 mg L^{-1}) and the highest solubility of zinc oxide in the broth was attributed to K4 strain (9.76 mg L^{-1}). According to the results, these isolates can be used for enhancing phytoremediation efficiency of this element in contaminated soils.

Keywords: Auxin, Plant growth promoting rhizobacteria, Minimum inhibitory concentration, Siderophore

[1] Corresponding author: Department of soil science, agriculture faculty, Vali-e-Asr university

www.SID.ir