

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

Mehrana Koohi Dehkordi¹

Assistant Professor, Department of Agricultural Science, Faculty of Agriculture, Payame Noor University, Iran

Masoumeh Yousefzadeh

MSc, Department of Genetics, Faculty of Basic Science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

Rohollah Hemmati

Assistant Professor, Department of Biology, 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 16S rRNA 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 16S rRNA 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 mg l⁻¹).

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

¹ Corresponding author

Received: May 15, 2019/ **Accepted:** October 3, 2019

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 جداسازی شده از خاک حاوی سرب

مهرآنا کوهی دهکردی*: استادیار گروه علوم کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور، ایران، m.koohi@gmail.com
مصومه یوسفزاده: کارشناس ارشد گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهر کرد، ایران، yosefzadeh1356@gmail.com
روح‌الله همتی: استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهر کرد، ایران، hemmati1359@gmail.com
عبدالرزاق دانش شهرکی: استادیار گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهر کرد، ایران، ar_danesh2000@yahoo.com

چکیده

مقدمه: آلودگی خاک به فلزات سنگین از جمله 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 از جمله سازگاری با محیط زیست، هزینه 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 پیشینه 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. پس از رقیق‌سازی نمونه‌ها روی سطح محیط کشت لوریا-برتانی (LB) آگار اصلاح‌شده، کلنی‌های رشدیافته بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و آزمون‌های بیوشیمیایی مطالعه شدند و در نهایت، تعیین هویت مولکولی بر اساس توالی‌یابی ژن *16S rRNA* انجام شد.

نتایج: در مطالعه 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؛ علاوه بر این، تمام نمونه‌ها توانایی تولید ایندول-۳-استیک‌اسید (۷/۸۸ تا ۳۸/۵۸ میلی‌گرم بر لیتر) 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*

* نویسنده مسئول مکاتبات

مقدمه

آلودگی با فلزات سنگین یکی از مشکلات زیست‌محیطی به شمار می‌آید که سبب آلوده شدن زنجیره غذایی و به خطر افتادن 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 گرم بر سانتی‌مترمکعب بیشتر است (۲ و ۳). با وجود سمی بودن 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، پمپ کردن یون‌های فلزی به فضای خارج از سلول و رسوب آنها در بیرون از سلول، واجذب فلزات، اتصال در سطح سلول، استفاده از این فلزات به عنوان گیرنده نهایی الکترون در تنفس بی‌هوازی، تجزیه زیستی عوامل کلات‌ساز و دگرگونی زیستی به گونه‌های مقاوم با توانایی تحمل در حضور فلزات سمی تبدیل شده‌اند که برای کاهش آلودگی فلزات در محیط زیست 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 مقرون به صرفه نیستند؛ درحالی‌که زیست‌پالایی توسط باکتری‌ها، روشی مقرون به صرفه 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 تسهیل‌شده فلزات سنگین توسط ریزوباکترهای محرک رشد گیاه، درحقیقت استفاده هم‌زمان از گیاهان و ریزموجودات ریزوسفری وابسته به آنهاست که به‌طور طبیعی یا با تلقیح آگاهانه 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 علاوه بر نقشی که در حفاظت گیاهان در برابر سمیت فلزات سنگین بر عهده دارند، می‌توانند از طریق روش‌های مختلف از جمله تولید هورمون‌های رشدی مانند ایندول-۳-استیک اسید (IAA) سبب حاصلخیزی خاک، افزایش بازدهی و رشد گیاه شوند (۱۴). این ریزوباکترهای سودمند به‌علت برخورداری از صفات‌های 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 از نظر انتشار در محیط زیست است و معمولاً جذب زیادی در خاک دارد (۱۵). زیست‌توده میکروبی، اسیدیته خاک، دما و زمان از جمله عوامل مهم در جذب سرب به شمار می‌آیند.

این عنصر از جمله عناصری است که حتی مقدار بسیار کم آن نیز آثار فیزیولوژیکی زیان‌آوری دارد (۱۶). سرب باعث از بین رفتن حاصلخیزی خاک، تغییر رشد گیاه و در نهایت کاهش عملکرد آن می‌شود؛ همچنین به علت تجمع در گیاهان و سمیت زیاد برای دام و انسان، آلاینده‌ای بسیار مهم شناخته می‌شود (۱۷). تاکنون پژوهش‌های گسترده‌ای در زمینه مقاومت به سرب در باکتری‌های جدا شده از محیط‌های طبیعی انجام شده است؛ برای نمونه، در پژوهش چیبوک^۱ و اویبورا^۲ (۱۸)، اشرف^۳ و علی (۱۹) و اسمجک‌وولا^۴ و همکاران (۲۰)، حذف زیستی سرب توسط باکتری‌های مقاوم مطالعه شده است. کرات العین^۵ و همکاران (۷) نیز باکتری‌های مقاوم در برابر غلظت‌های زیاد سرب را شناسایی و گزارش کرده‌اند. مورتی^۶ و همکاران (۲۱) نیز ۶۰ باکتری مقاوم به سرب را جداسازی و شناسایی و بر اساس آزمون کمترین غلظت بازدارنده رشد (MIC)، ۶ جدایه را توانمندترین گونه‌ها در برابر سرب معرفی کرده‌اند.

باتوجه به اهمیت موضوع یادشده، جداسازی و شناسایی ریزوباکترهای بومی مقاوم به سرب و محرک رشد گیاه از خاک ریزوسفری گیاهان حاشیه 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 منطقه ایرانکوه و در فاصله ۲۰ کیلومتری جنوب غربی استان اصفهان واقع شده است. سرب کل و

سرب قابل جذب این معدن به ترتیب ۳۷۵ و ۳۹ میلی گرم بر کیلو گرم و اسیدیته آن نیز ۷/۵ است. به منظور 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 فاصله ۲۰ سانتی متر خالی شد و ریشه‌های آنها از عمق صفر تا ۲۰ سانتی متری خاک خارج شدند. خاک اضافی اطراف ریشه‌ها حذف شد و خاک چسبیده به ریشه گیاهان با قلم موی استریل از سطح ریشه‌ها به پلاستیک فریزر استریل انتقال یافت. نمونه‌ها به کمک فلاسک و در دمای ۵ درجه سانتی گراد به آزمایشگاه منتقل شدند. حدود ۱ گرم از مخلوط خاک جمع‌آوری شده به روش رقت‌های متوالی با سرم فیزیولوژی استریل رقیق شد و بر سطح محیط کشت لوریا- برتانی^۷ (LB) آگار اصلاح شده حاوی ۱ گرم گلوکز، ۵۰ میلی گرم برلیتر نترات سرب و ۵۰۰ میلی گرم برلیتر قارچ کش سیکلوهاگزامید توزیع و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد (۲۲ و ۲۳). کلنی‌های رشد یافته از نظر ماکروسکوپی و میکروسکوپی ارزیابی، بر اساس شکل و رنگ کلنی تفکیک و با انتقال به محیط‌های جداگانه خالص سازی شدند.

شناسایی بیوشیمیایی باکتری‌های جدا شده:

شناسایی اولیه پنج کلنی خالص شده مطابق راهنمای سیستماتیک باکتری‌شناسی برگگی^۸ و بر اساس شکل، رنگ آمیزی گرم، تشکیل اسپور، تحرک، تولید آنزیم کاتالاز، همولیز محیط بلاد آگار، احیای نترات، آزمون متیل رد-وگس پروسکاتور، آزمون سولفید-اینندول-تحرک و هیدرولیز نشاسته انجام شد (۲۴).

شناسایی مولکولی و تحلیل فیلوژنتیک باکترهای

جداسازی شده: باکتری‌های مطالعه شده به طور جداگانه در محیط LB مایع، در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه به مدت ۱۶ تا ۲۰ ساعت در انکوباتور شیکر دار کشت شدند. به منظور رسوب گیری از سانتریفیوژ به مدت ۲ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه استفاده شد. استخراج DNA از رسوب باکتریایی با استفاده از کیت Cell DNA Isolation kit تهیه شده 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 پس از تخلیص، به منظور تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره ارسال شد. توالی آغازگرهای استفاده شده به شرح زیر بود:

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

اجزای واکنش PCR شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$ ، ۰/۲ میلی مولار 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 واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی ثانویه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال در دمای ۵۶ درجه سانتی گراد به مدت ۵۰ ثانیه، سنتز در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه و مرحله طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از دستگاه

گرادیانت ترموسایکلر اپندورف انجام شد. در نهایت، محصول PCR به طول ۱۵۰۰ جفت باز الکتروفورز و پس از خالص سازی، توسط شرکت ماکروژن کره به شکل دوطرفه تعیین توالی شد. توالی‌ها با استفاده از نرم افزار آنالیز BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) با توالی‌های معتبر ثبت شده در پایگاه داده NCBI مقایسه شدند و نزدیک ترین سویه بر اساس توالی ژن *16S rRNA* و نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی انتخاب شد. به منظور بررسی ارتباط فیلوژنی میان سویه‌های جداسازی شده و ترسیم درخت فیلوژنی، هم ردیفی تمام توالی‌های *16S rRNA* با نرم افزار Clustal W انجام شد. درخت فیلوژنی با نرم افزار MEGA4 و الگوریتم Neighbour-Joining (NJ) ترسیم (۲۴) و اعتبار شاخه‌های درخت به کمک الگوریتم Bootstrap با ۵۰۰ تکرار بررسی شد (۲۵). توالی‌های به دست آمده از پژوهش حاضر در بانک ژنی NCBI ثبت شدند.

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی سرب (MIC) در ریزوباکترهای جداسازی شده: حداقل غلظت بازدارندگی سرب به روش افزایش تدریجی غلظت سرب سنجیده شد؛ به این ترتیب که در هر مرتبه، ۵۰ میلی گرم برلیتر (۵۰ ppm) سرب به محیط کشت اضافه شد. آزمون با غلظت ابتدایی ۵۰ میلی گرم برلیتر سرب آغاز شد و کلنی‌های باکتریایی که روی آخرین غلظت فلز سنگین در حال رشد بودند به محیط کشت حاوی غلظت بیشتر سرب منتقل شدند. غلظتی که باکتری‌های جدا شده دیگر قادر به رشد کردن روی محیط کشت جدید نبودند، حداقل غلظت بازدارندگی برای آن باکتری ثبت شد (۲۶).

جداسازی شده، آغازگرهای اختصاصی ژن *16S rRNA* استفاده شدند (شکل ۱). پس از تعیین توالی ژن *16S rRNA* و بررسی توالی‌های به دست آمده در مقایسه با توالی‌های معتبر موجود در بانک اطلاعاتی ژنوم (NCBI) از طریق نرم افزار BLAST، نزدیک ترین سویه‌ها با توجه به ویژگی‌های بیوشیمیایی مطالعه شده به شرح جدول ۲ تعیین شدند و بیشترین و کمترین میزان شباهت به ترتیب ۹۹/۹۳ و ۹۹/۵۶ درصد بود.

نتایج پژوهش‌های انجام شده گویای اینست که میان تاسکون ریزوباکتری، جنس‌های *Azospirillum* و *Pseudomonas* از جمله ریزوموجودات ریزوسفری تجاری به شمار می‌آیند که به طور گسترده بررسی شده‌اند (۳۰). پنج گونه شناسایی شده در پژوهش حاضر نیز به جنس *Bacillus* تعلق دارند که با نتایج مشاهده‌های ریخت‌شناسی همخوانی دارد و این نتایج بیشتر موارد با نتایج شناسایی بیوشیمیایی مشابقت دارند. در پژوهش‌های متعدد، گونه‌های جنس *Bacillus* به عنوان 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 مالیک اسید در ریشه برنج (۳۲) و *Bacillus amyloliquefaciens* در القای تحمل به تنش‌های غیرزیستی در گیاه (۳۳) و بهبود گیاه‌پالایی به منظور رویارویی با تنش مس (۳۴) مؤثر بوده‌اند.

درخت فیلوژنی به منظور بررسی رابطه فیلوژنتیکی میان ریزوباکترهای شناسایی شده ترسیم شد (شکل ۲). همان‌طور که مشاهده می‌شود، ریزوباکترها در دو شاخه اصلی گروه‌بندی شده‌اند: در گروه اول، گونه‌های *B. subtilis*، *B. amyloliquefaciens* و *B. tequilensis* و در گروه دوم، دو سویه مربوط به *B. cereus* قرار گرفته‌اند.

ارزیابی تولید ایندول-۳-استیک اسید (IAA) در سویه‌های جداسازی شده: تولید ایندول-۳-استیک اسید توسط باکتری‌های جداسازی شده بر اساس روش گلیک‌من و دساکس^{۱۱} ارزیابی شد (۲۷). بر اساس این روش، باکتری‌ها به طور جداگانه در ۲۵ میلی لیتر محیط LB مایع در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه کشت شدند؛ سپس نمونه‌ها سانتریفیوژ شدند و مقدار جذب هر نمونه در طول موج ۶۰۰ نانومتر از طریق حل و معلق کردن رسوب‌ها در سرم فیزیولوژی استریل تقریباً تا ۱/۲ تنظیم شد. میزان ۵ میلی لیتر از هر سوسپانسیون باکتریایی به ۲۵ میلی لیتر محیط دورکین و فاستر^{۱۱} (DF) تلقیح شد. کشت‌های باکتریایی به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد و سرعت ۱۷۵ دور در دقیقه قرار داده شدند. رسوب باکتریایی با سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه و با سرعت ۱۱۰۰ دور در دقیقه از محیط کشت جدا و ۲ میلی لیتر از معرف سالکوسکی^{۱۲} به ۱ میلی لیتر از مایع رویی بدون باکتری اضافه و محلول به مدت ۲۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد؛ در نهایت، میزان جذب محلول در طول موج ۵۳۵ نانومتر خوانده شد (۲۸). به منظور تعیین مقدار ایندول-۳-استیک اسید تولید شده، منحنی استاندارد در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۵ و ۱۵۰ پی‌پی‌ام رسم شد (۲۹). این آزمون سه بار تکرار شد.

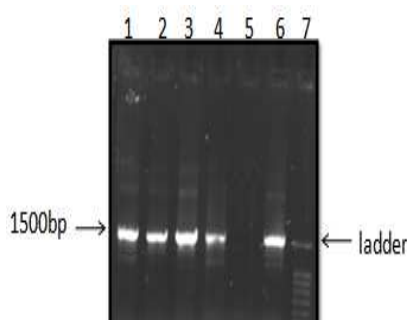
نتایج

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.

به منظور شناسایی مولکولی هریک از ریزوباکترهای

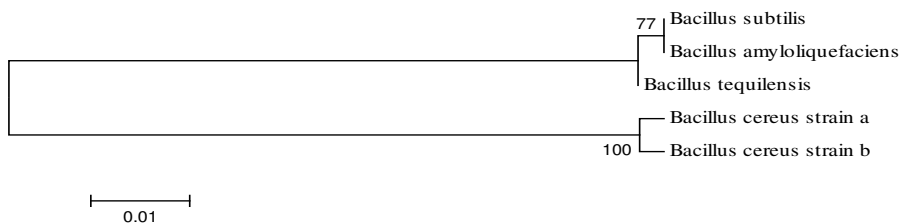
جدول ۱- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی ریزوباکترهای استخراج‌شده از خاک حاوی سرب با پیشینه درازمدت

Colony	Morphology	Gram stain	Catalase test	Spore formation	Motility	Starch hydrolysis	Nitrate reduction	Blood Agar Hemolysis	MR test	VP test	H ₂ S	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. نمونه شاهد، ۷. اندازه‌نماجدول ۲- شناسایی مولکولی ریزوباکترهای جداسازی‌شده بر اساس مقایسه توالی ژن *16S rRNA* با سویه‌های معتبر در بانک اطلاعاتی ژنوم

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

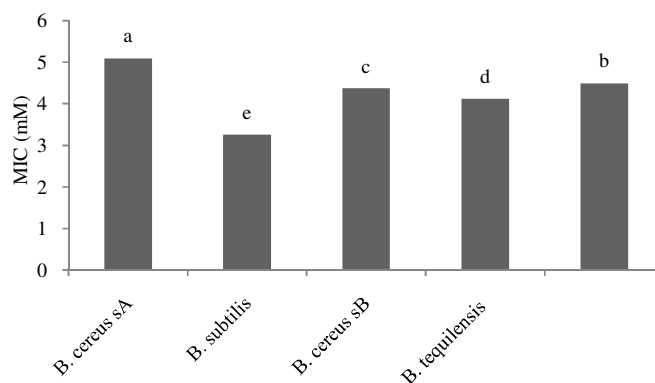
* شماره کلنی‌ها با شماره کلنی‌ها در جدول ۱ منطبق است. ** شماره دسترسی توالی‌های ثبت‌شده در بانک اطلاعات ژنوم NCBI است.



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

زیادی برای مقاومت در برابر بسیاری از تنش‌های زیست محیطی 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 مطالعه خود روی باکتری‌های مقاوم به سرب خاک‌های استان اصفهان اظهار داشتند ۶۰ درصد از گونه‌های باکتریایی مقاوم به سرب استخراج شده دارای MIC بین ۴ تا ۸ میلی مولار هستند. در پژوهش دیگری نیز سطح مقاومت باکتری‌های خاک نسبت به فلز سنگین سرب بین ۲/۵ تا ۵/۶ میلی مولار گزارش شد (۳۸).

آزمون حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) سرب: بر اساس نتایج آزمون حداقل غلظت بازدارندگی سرب، اختلاف معناداری بین ریزوباکترهای بومی استخراج شده مشاهده شد (شکل ۳). سویه *Bacillus cereus strain A* بیشترین میزان مقاومت (با MIC معادل ۵/۰۹ میلی مولار) را نشان داد و پس از آن، *B. cereus strain B* و *amyloliquefaciens* به ترتیب 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 آنتی بیوتیک‌ها در سویه *B. cereus* شناسایی شدند؛ از این رو، آنها گزارش کردند این سویه پتانسیل



شکل ۳- بررسی تحمل به سرب در ریزوباکترهای جداسازی شده از خاک حاوی سرب با پیشینه درازمدت

میانگین ۷/۸۸ میلی گرم بر لیتر به ترتیب بیشترین و کمترین میزان ایندول-۳-استیک اسید را تولید کردند.

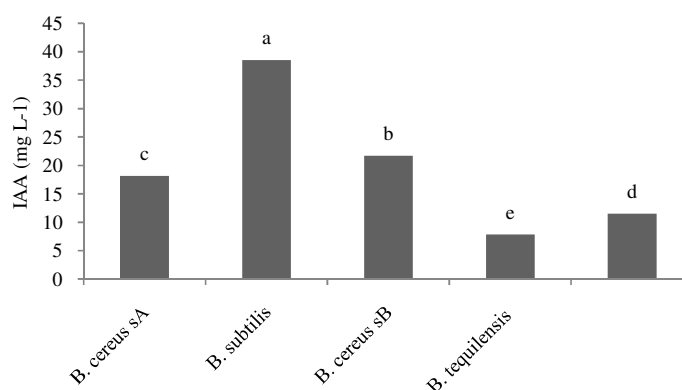
بر اساس نتایج پژوهش‌های انجام شده، بخشی از آثار محرک رشدی ریزوباکترهای گوناگون به تولید هورمون‌های گیاهی نظیر ایندول-۳-استیک اسید توسط آنها وابسته است (۳۹). در پژوهشی، توانایی تولید ایندول-۳-استیک اسید در ریزوباکترهای متحمل به

ارزیابی تولید ایندول-۳-استیک اسید (IAA) توسط سویه‌های باکتریایی: نتایج آزمون ارزیابی تولید ایندول-

۳-استیک اسید توسط ریزوباکترهای مقاوم به سرب جدا شده نشان دادند تمام سویه‌های شناسایی شده توانایی تولید این هورمون گیاهی را دارند (شکل ۴). از میان باکتری‌های مطالعه شده، سویه‌های *B. subtilis* با میانگین ۳۸/۵۸ میلی گرم بر لیتر و *B. tequilensis* با

شاهد شد (۴۰). در پژوهش دیگری که به منظور بررسی مقاومت ریزوباکترهای تولیدکننده ایندول-۳-استیک اسید 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 عدم حضور سرب، ایندول-۳-استیک اسید تولید کنند (۴۱).

سرب بررسی شد و تمام باکتری‌های مطالعه شده توانایی تولید این ترکیب را به میزان متغیری از ۰/۰۸۹ تا ۶۳/۵۵ میکروگرم بر لیتر نشان دادند. تلقیح گیاه *Lathyrus sativus* با ریزوباکترها در غلظت ۰/۵ میلی‌مولار سرب در شرایط هیدروپونیک از یک سو سبب افزایش درخوردگی زیست‌توده 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



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

است (۴۴) مطالعه‌های انجام شده 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 نخستین بار، تعیین هویت ریزوباکترهای بومی جداسازی شده از معدن سرب و روی اصفهان بر اساس شناسایی ژن *16S rRNA* انجام شد. تمام ریزوباکترهای شناسایی شده پتانسیل درخوردگی برای تحمل غلظت‌های زیاد سرب و همچنین تولید

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 زیست‌توده کم گیاهان بسیار انباشتگر محدود

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) Perriguet 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.

ایندول-۳-استیک اسید نشان دادند؛ بنابراین می‌توان گفت این ریزوباکترها علاوه بر پالایش زیستی خاک، به‌علت تولید ایندول-۳-استیک اسید به‌عنوان ریزوباکترهای محرک رشد در همزیستی با گیاهان بسیار انباشتگر مؤثر واقع می‌شوند. در مطالعه‌های آتی، نقش این باکتری‌ها در گیاه پالایی، جذب فلز، حرکت درون گیاه، انباشتگی ساقه و فرایندهای زیستی 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 پیشینه درازمدت بر اساس ژن *16S rRNA*» با شماره قرارداد ۹۴/د/۱۱/۰۹/۷۹۱۱ استخراج شده است که دانشگاه پیام نور آن را از نظر 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

- (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

- 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.

-
- 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