جداسازی، غربالگری و بررسی صفات محرک رشد گیاهی ریزجانداران مقاوم به کادمیوم و سرب

علی اشرف سلطانی طولارود*[۱]، منیژه عیوضی نی[۲]، اکبر قویدل[۳]، پیمان عباس زاده دهجی[۴]، اسماعیل گلی کلانپا[۳]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۱/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۴/۳۱)

چکیده

موفقیت تکنیک گیاه‌پالایی نه تنها به گیاه، بلکه تا حد زیادی به اثرات متقابل ریشه‌های گیاه با ریزجانداران ریزوسفری وابسته است. این ریزجانداران به ویژه باکتری‌های دارای صفات محرک رشد گیاهی می‌توانند با افزایش میزان جذب فلزات سنگین و کمک به استقرار بهتر گیاه، افزایش رشد سیستم ریشه‌ای و در نتیجه افزایش رشد گیاه باعث بهبود کارایی گیاهپالایی شوند. با توجه به نقش مهم جامعه میکروبی خاک در افزایش راندمان پایش خاک‌های آلوده با استفاده از گیاهان، این پژوهش با هدف جداسازی، غربالگری، بررسی صفات محرک رشد گیاهی ریزجانداران مقاوم به کادمیوم و سرب و معرفی جدایه‌های برتر انجام شد. بدین‌منظور، نمونه‌های خاک آلوده به کادمیوم و سرب از نقاط مختلف پالایشگاه نفت شهید تندگویان (واقع در پانزده کیلومتری جنوب شهر تهران) تهیه و پس از اندازه‌گیری برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی، ریزجانداران مقاوم به کادمیوم و سرب از آنها جداسازی گردید. در جدایه‌های جداسازی شده، میزان مقاومت به کادمیوم و سرب تعیین و سپس توانایی جدایه‌های برتر در تولید فیتوهورمون اکسین، ترشح متابولیت‌های محدود کننده‌ی رشد عوامل بیمارگر و همچنین حل‌کنندگی تری‌کلسیم فسفات مورد ارزیابی قرار گرفت. در این پژوهش، ۳۰ ریزجاندار از خاک‌های آلوده جداسازی و پس از بررسی شکل ظاهری کلنی، رنگ و حاشیه آن و همچنین سرعت رشد، در نهایت ۲۰ جدایه متفاوت انتخاب گردید. ۷۰ درصد جدایه‌های مورد مطالعه تا غلظت ۸ میلی‌مولار سرب و کادمیوم رشد خیلی خوبی را در محیط کشت نشان دادند. نتایج حاصل از ارزیابی صفات محرک رشد گیاهی در ۱۰ جدایه برتر از نظر مقاومت به سرب و کادمیوم نشان داد که کلیه این جدایه‌ها توانایی تولید اکسین و حل‌کنندگی فسفات‌های معدنی نامحلول را داشتند. بیشترین (۱۰/۲۰ میلی‌گرم در لیتر) و کمترین (۰/۶۴ میلی‌گرم در لیتر) مقدار تولید اکسین به ترتیب مربوط به جدایه-های C4 و C2 بود. متوسط حل‌کنندگی تری کلسیم فسفات توسط جدایه‌ها ۱۰۶/۹۱ میلی‌گرم در لیتر بود. ۸۰ درصد جدایه‌ها توانایی یکسانی در تولید سیدروفور داشتند. بیشترین میزان تولید این متابولیت در جدایه C1 با نسبت هاله به کلنی ۳/۲۳ مشاهده گردید. از ۱۰ جدایه‌ی مورد مطالعه، سه جدایه‌ی K2، K5 و C8 توانایی بالایی در تولید سیانید هیدروژن، آنزیم پروتئاز و سلولاز داشتند.

واژه‌های کلیدی: آلودگی خاک، ریزجانداران، فلز سنگین، گیاه‌پالایی

سلطانی طولارود ع. ا.، عیوضی نی م.، قویدل ا.، عباس زاده دهجی پ.، گلی کلانپا، ا. ۱۳۹۸. جداسازی، غربالگری و بررسی صفات محرک رشد گیاهی ریزجانداران مقاوم به کادمیوم و سرب. تحقیقات کاربردی خاک. جلد ۷ شماره ۴. صفحه: ۱۲۳-۱۱۱.

۱- دانشیار گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی (مکاتبه کننده)

۲- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی

۳- دانشیار گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی

۴- استادیار گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی عصر رفسنجان

* پست الکترونیک: ali_soltani_t@yahoo.com

مقدمه

تخریب و آلودگی محیط‌زیست یکی از نتایج پیشرفت و توسعه فنآوری و افزایش جمعیت به‌ویژه در مناطق صنعتی و کشاورزی می‌باشد. خاک یکی از اجزای مهم محیط‌زیست بوده و نقشی مهم و کلیدی در رشد و نمو گیاهان، تعیین سرنوشت آب در نظام چرخه‌ی آب در طبیعت و باز چرخ مواد در طبیعت ایفا می‌کند. بنابراین آلودگی خاک یکی از انواع مهم آلودگی‌های محیط‌زیست است (Brady & Weil , 1996).

فلزات سنگین، گروهی از فلزات با چگالی بالای $g\ cm^{-3}$ ۵ می‌باشند. تعدادی از این فلزات (آهن، نیکل، روی، مس) به صورت عناصر کم مصرف برای انجام واکنش-های متابولیکی در موجودات زنده مورد نیاز می‌باشند. دیگر انواع آنها از قبیل جیوه، نقره، کادمیوم و سرب نقش بیولوژیکی نداشته و در مقادیر خیلی پایین برای موجودات زنده سمی می‌باشند. حتی فلزات سنگین دارای نقش زیستی در موجودات زنده هم در مقادیر بالا حالت سمیت پیدا می‌کنند. کادمیوم یک عنصر غیر ضروری موجود در محیط‌زیست با سمیت بالا می‌باشد که به راحتی به وسیله موجودات زنده از محیط جذب می‌شود. امروزه درنتیجه فعالیت‌های انسانی مانند استخراج معادن، دفع نادرست زباله، استفاده از کودهای فسفاته و آبیاری مزارع کشاورزی با فاضلاب، مناطق وسیعی از زمین‌های آلوده به کادمیوم وجود دارد. آلودگی خاک با کادمیوم به دلیل جذب آسان آن توسط گیاهان از محیط‌زیست و در نتیجه انتقال این عنصر سنگین از خاک به زنجیره غذایی انسان یک تهدید بزرگ برای سلامت انسان محسوب می‌گردد (Rahimi & Nejatkhah, 2010).

عنصر سرب یک آلاینده زیست‌محیطی رایج در خاک بوده و بر خلاف دیگر فلزات هیچ نقش زیستی ندارد. این فلز سمی از طریق ضایعات صنایع باطری سازی، سوخت ناقص بنزین، صنایع رنگ سازی و برخی از سموم دفع آفات گیاهی حاوی سرب به خاک و آب و در نهایت به گیاه و انسان منتقل می‌شود (Clarke, 1992). افزایش مقدار آن در نزدیکی نواحی شهری، به علت ترکیب آلکیل سرب در روغن موتور و سوخت بنزین و گازوئیل بوده که به ویژه در کلان شهرها این میزان چند برابر میزان استاندارد اعلام شده است.

روش‌های مختلفی در رابطه با پالایش خاک‌ها و منابع آلوده به فلزات سنگین وجود دارد که در این میان گیاه‌پالایی، یک روش مقرون به‌صرفه، ساده، مؤثر و سازگار با محیط‌زیست است. تکنیک گیاه‌پالایی، شامل استخراج و انتقال آلاینده‌ها به اندام هوایی، تغییر شکل مواد سمی به ترکیبات شیمیایی با سمیت کمتر، تصعید آلاینده‌ها و غیرمتحرک‌سازی ترکیبات سمی در منطقه ریشه و جلوگیری از آبشویی آنها توسط گیاه می‌باشد. این روش با افزودن ماده آلی به خاک و بهبود ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی، افزایش تنوع زیستی و فعالیت ریزجانداران خاک و جلوگیری از فرسایش آن موجب حفظ و ارتقای کیفیت خاک می‌گردد (Hansda *et al.*, 2014).

بیشتر گیاهان در هنگام کشت در مکان‌های آلوده، به دلیل سمیت ناشی از ترکیبات سمی و مواد حاصل از تجزیه آنها، دارای رشد و نمو کمی می‌باشند (Glick, 2003) که این اثرات منفی آلاینده‌ها روی شاخص‌های رشدی گیاهان می‌تواند به وسیله ریزجانداران خاک کاهش پیدا کند. در اکوسیستم خاک تنوع بالایی از باکتری‌ها و قارچ‌ها وجود دارد که این ریزجانداران نقش مهمی در پیدایش خاک، چرخش عناصر غذایی در آن و بهبود شاخص‌های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیک این بستر رشد گیاهی دارند. ریزجانداران موجود در خاک-های آلوده به فلزات سنگین اغلب به غلظت‌های بالای این فلزات مقاومت نشان می‌دهند (Hrynkiewicz *et al.*, 2012). کنش متقابل بین گیاهان و ریزجانداران مقاوم به فلزات سنگین موجود در ریزوسفر و اندوریزوسفر (به ویژه باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه[1]) ، احیای خاک‌های آلوده به فلزات سنگین را تسهیل می‌کند که این موضوع توسط محققین مختلف گزارش شده است (Chen *et al.*, 2014؛ Ma *et al.*, 2015؛ Zloch *et al.*, 2017). این رابطه سینرژیستی نه-تنها باعث تسریع استخراج و تجمع آلاینده‌های فلزی در بافت‌های گیاهی شده، بلکه باعث بهبود رشد و توسعه گیاه در شرایط نامساعد محیطی می‌گردد. به‌طور کلی ریزجانداران مقاوم به فلزات سنگین به‌طور مستقیم (با افزایش جذب و انتقال فلزات سنگین[2] و یا کاهش

1. Plant growth promoting rhizobacteria
2. Facilitation of phytoextraction

تحرک و زیست فراهمی فلزات در ریزوسفر[1] و غیر مستقیم (کمک به استقرار بهتر گیاه، افزایش رشد سیستم ریشه‌ای و درنتیجه افزایش رشد گیاه با استفاده از مکانیسم‌های مختلفی از قبیل انحلال ترکیبات کم محلول و نامحلول عناصر غذایی و در نتیجه افزایش زیست فراهمی آن‌ها، تولید هورمون‌های گیاهی مانند ایندول استیک اسید(IAA[2]) ، افزایش تحمل گیاه به تنش‌های محیطی و حذف بیمارگرهای گیاهی) باعث بهبود کارایی گیاه‌پالایی شوند (Hrynkiewicz *et al.*, 2018).

در سال‌های اخیر پژوهش‌های نسبتاً گسترده‌ای در سرتاسر دنیا در زمینه‌ی غربال‌گری و شناسایی ریز موجودات ریزوسفری مقاوم به عناصر سنگین و نقش آن‌ها در گیاه‌پالایی خاک‌های آلوده به این عناصر انجام شده است. اما، بررسی منابع نشان می‌دهد که پژوهشی در رابطه با غربالگری ریزجانداران مقاوم به کادمیوم و سرب و بررسی توانایی آن‌ها در گیاه‌پالایی خاک‌های آلوده به این فلزات پژوهشی به‌خصوص در ایران صورت نگرفته است. بنابراین، با توجه به اثرات سمی این عناصر در طبیعت و گزارشات متعدد مبنی بر وجود آلودگی ناشی از کادمیوم و سرب در خاک‌های ایران، شناسایی ریز موجودات مقاوم به این فلزات و استفاده از آن‌ها در پایش خاک‌های آلوده ضروری به نظر می‌رسد. بر این اساس هدف از این پژوهش جداسازی ریزجانداران مقاوم به کادمیوم و سرب، سنجش مقاومت آنها به غلظت‌های مختلف کادمیوم و سرب و اندازه گیری صفات محرک رشدی جدایه‌های مقاوم بود.

مواد و روش‌ها

۱-تهیه نمونه‌های خاک

به‌منظور انجام این پژوهش، نمونه‌های خاک از عمق ۲۰ - ۰ سانتی‌متری از نقاط مختلف پالایشگاه نفت شهید تندگویان تهیه شد. نمونه‌ها پس از گذراندن از الک دو میلی‌متری و بسته‌بندی در کیسه‌های پلاستیکی در داخل فلاسک یخدار به آزمایشگاه منتقل و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد تا زمان جداسازی ریزجانداران نگه‌داری گردید. بخشی از خاک‌های تهیه شده در دمای آزمایشگاه هوا خشک و برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی نظیر فراوانی نسبی ذرات معدنی خاک به روش هیدرومتر، کربنات کلسیم معادل به روش تیتراسیون با باز، کربن آلی به روش والکلی بلک، هدایت الکتریکی و pH در عصاره گل اشباع اندازه‌گیری شد (Carter & Gregorich, 2008). همچنین، غلظت سرب و کادمیوم کل به روش لیندسی و نورول (Lindsay & Norvell, 1978) در آنها اندازه‌گیری گردید.

۲-جداسازی و غربالگری ریزجانداران مقاوم به کادمیوم و سرب

جداسازی ریزجانداران مقاوم به کادمیوم و سرب

یک گرم از نمونه‌های خاک مورد مطالعه به ۳۰ میلی لیتر محیط نوترینت براث[3] اضافه و نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در شیکر انکوباتور با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد خوابانیده شد. یک میلی‌لیتر از این سوسپانسیون به پلیت‌های حاوی محیط کشت[4] PYE گرم (۱۰ گرم پپتون، ۵ گرم عصاره مخمر، ۱۰ گرم نمک کلرید سدیم، ۱۵ گرم آگار در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر با pH=7.2) غنی شده با محلول‌های ۱، ۳، و ۵ میلی‌مولار سرب $Pb(NO_3)_2$ و کادمیوم Cd $(NO_3)_2$ منتقل و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد خوابانیده شد. کلونی‌های رشد یافته متمایز از نظر ظاهری، واکشت و خالص سازی شده و برای استفاده‌های بعدی در یخچال با دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید (Dinu *et al.*, 2011).

تعیین مقاومت جدایه‌های جداسازی شده نسبت به کادمیوم و سرب

بدین منظور، جدایه‌های جداسازی شده، روی پلیت‌های حاوی محیط کشت PYE با غلظت‌های ۵، ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴ و ۱۶ میلی‌مولار سرب $Pb(NO_3)_2$ و کادمیوم Cd $(NO_3)_2$ کشت و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شدند. پس از گذشت مدت زمان مذکور، رشد یا عدم رشد ریزجانداران بررسی گردید (Dinu *et al.*, 2011).

۳- ارزیابی صفات محرک رشدی گیاهی ریزجانداران غربالگری شده

1. Phytostabilization
2. Indole-3-acetic acid
3. Nutrient broth
4. Peptone yeast extract

از صفات محرک رشد گیاهی تولید اکسین (مواد شبه IAA) به روش پتن و گلیک (Patten & Glick, 2002)، توان حل فسفات‌های معدنی نامحلول در محیط مایع به روش اسپربر (Sperber, 1985)، توان تولید سیدروفور به روش آلکساندر و زوبرر (Alexander & Zuberer, 1991)، توان تولید پروتئاز به روش مورفر و همکاران (Maurhofer *et al*., 1995) و توان تولید سلولاز به روش مجیدی و همکاران (Majidi *et al*., 2011) اندازه‌گیری گردید. تولید سیانید هیدروژن توسط جدایه‌های جداسازی شده به روش دونیت- کورئا و همکاران (Donate-Correa *et al*., 2004) ارزیابی گردید. بدین-منظور ابتدا جدایه‌ها در پلیت‌های حاوی محیط NB غنی شده با گلایسین (۴/۴ گرم در لیتر) کشت داده شدند. سپس یک کاغذ صافی آغشته به محلول معرف شامل کربنات سدیم ۲ درصد و اسید پیکریک ۰/۵ درصد در قسمت داخلی درب پلیت قرار داده شد. پلیت-های درز بندی شده با استفاده از پارافیلم، به مدت ۵ روز در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری و براساس تغییر رنگ کاغذ صافی از رنگ زرد اولیه (عدم تولید) به کرم (کم)، نارنجی (نسبتا کم)، قهوه‌ای روشن (نسبتا زیاد) و آجری (زیاد) که به‌ترتیب از ۱ تا ۵ درجه‌بندی شدند میزان تولید سیانید هیدروژن تعیین گردید.

تجزیه‌های آماری

آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد. تجزیه‌های آماری داده‌ها توسط نرم افزار SAS و رسم نمودارها به وسیله نرم افزارExcel انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده گردید.

نتایج و بحث

برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی نمونه‌های خاک

در این پژوهش ۲ نمونه خاک برای جداسازی باکتری-های مقاوم به کادمیوم و سرب مورد استفاده قرار گرفت که برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آنها در جدول ۱ نشان داده شده است. بر اساس این جدول، خاک‌های مورد مطالعه آهکی بوده و pH آنها در محدوده خنثی قرار دارد. میزان کادمیوم و سرب خاک‌ها نزدیک هم بوده که بالاتر از حد مجاز پیشنهاد شده (به‌ترتیب ۱ و ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک) برای این عناصر می-باشد (Gandomkar *et al*., 2012؛ Pais & Jones, 1997).

جدول۱- برخی خواص فیزیکی و شیمیایی خاک‌های مورد استفاده

Table 1. Some physical and chemical properties of the used soil

Soil No.	Clay	Silt	Sand	OC	CCE	pH	Cd	Pb	EC
	%						mg kg^{-1}		dS m^{-1}
1	26	14	60	3.08	23.5	6.9	1.3	40.1	6.82
2	18	40	42	1.87	31.5	7.1	1.1	36.1	3.62

CCE: کربنات کلسیم معادل، OC: کربن آلی، Cd: کادمیوم کل، Pb: سرب کل، EC: هدایت الکتریکی

CCE: Calcium Carbonate Equivalent, OC: Organic Carbon, Cd: Cadmium, Pb: Lead, EC: Electrical Conductivity

جداسازی و بررسی رشد یا عدم رشد جدایه‌های جداسازی شده در غلظت‌های مختلف سرب و کادمیوم

جداسازی

در مجموع، ۳۰ جدایه از نمونه های خاک آلوده جداسازی، و پس از بررسی شکل ظاهری کلنی، رنگ و حاشیه آن و همچنین سرعت رشد، در نهایت ۲۰ جدایه متفاوت (از پلیت‌های حاوی محیط کشت PYE غنی شده با غلظت‌های 1mM، 3mM و 5 mM $Pb(NO_3)_2$ و $Cd(NO_3)_2$ هر کدام ۱۰ کلنی متفاوت) انتخاب گردید. جدایه‌های انتخابی پس از کشت مجدد روی محیط کشت اختصاصی آن‌ها، خالص‌سازی و برای استفاده‌های بعدی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

بررسی رشد یا عدم رشد جدایه‌های جداسازی شده در غلظت‌های مختلف سرب و کادمیوم

همه جدایه‌ها توانایی رشد در غلظت ۱ میلی‌مولار سرب و کادمیوم را داشتند. جدایه‌های C1، C2، C3، C6، و K2، K5 توانایی رشد در همه‌ی غلظت‌های کادمیوم و سرب را دارا بودند (جداول ۲ و ۳). نتایج نشان داد که اکثر جدایه‌های مورد مطالعه (۷۰ درصد) تا غلظت ۸ میلی‌گرم در لیتر سرب رشد خیلی خوب در محیط

کشت داشتند. در مقابل، فقط ۴۰ درصد از سویه‌ها در غلظت‌های بالای ۸ میلی‌گرم در لیتر سرب توانایی مقابله با سمیت عنصر مذکور و حیات در حضور آن را نشان دادند (جدول ۲). ۸۰ درصد جدایه‌های مورد مطالعه در غلظت‌های بالای ۸ میلی‌مولارکادمیوم رشد نکردند. همچنین تنها ۳۰ درصد از ریزجانداران جداسازی شده توانایی رشد در غلظت ۸ میلی‌گرم در لیتر این عنصر را داشتند (جدول ۳). این نتایج نشان‌دهنده‌ی سمیت بالای فلز سنگین کادمیم برای ریزجانداران می‌باشد.

سمیت فلزات سنگین در موجودات زنده می‌تواند به دلیل تولید ترکیبات رادیکالی در سلول، تشکیل کمپلکس با ترکیبات سلولی محتوی تیول، رقابت بین عناصر ضروری و این فلزات به دلیل شباهت‌های ساختاری می‌باشد (Rouch *et al*., 1995). برخی از باکتری‌ها در طبیعت با استفاده از مکانیسم‌هایی می‌توانند سمیت ناشی از این فلزات را تحمل نموده و در حضور آنها فعالیت نمایند. تحمل فلزات سمی توسط باکتری‌ها به فاکتورهایی از قبیل نوع یون فلزی منتقل شده به داخل سلول، مکان استقرار ژن‌های مقاومت به فلزات (کروموزوم، پلازمید یا ترانسپوزن) و نقش یون فلزی در متابولیسم داخل سلولی بستگی دارد (Bruins *et al*., 2000). برخی از مهم‌ترین سازوکارهای استفاده شده توسط باکتری‌ها برای مقاومت در برابر فلزات سنگین عبارتند از: استفاده از موانع برون سلولی به‌منظور جلوگیری از ورود فلزات به فضای درونی موجود (مانند دیواره سلولی، غشای سلولی یا کپسول)، انتقال فعال و خارج‌سازی یون‌های فلزی از داخل سلول (در این حالت سلول از سیستم‌های پروتئینی کد شده توسط ژن‌های مستقر در کروموزوم یا پلازمید جهت برون ریزی فلزات سنگین استفاده می‌کند)، کمپلکس یون‌های فلزی در سیتوپلاسم توسط ترکیبات گوناگون (مانند متالوتیونین‌ها و فیتوکلاتین‌ها)، تجمع در خارج سلول و جلوگیری از ورود فلزات سمی به داخل توسط ترکیبات موجود در پری‌پلاسم و غشای بیرونی سلول یا تبدیل فلزات به ترکیبات نامحلول، احیای یون‌های فلزی (Bruins *et al*., 2000؛ Choudhury *et al*., 2001). برخی از باکتری‌های مورد مطالعه در این پژوهش قدرت رشد در غلظت‌های بالای کادمیوم و سرب را داشتند. توانایی رشد و نمو باکتری در چنین شرایطی نشان می‌دهد که این ریزجانداران می‌توانند در صورت وجود آلودگی ناشی از دو فلز مذکور در خاک، با استفاده از مکانیسم‌های مقاومت، سمیت فلز سنگین را تحمل و به فعالیت خود در اکوسیستم خاک ادامه دهد و با تأثیر بر خواص فیزیکی، شیمیایی و زیستی خاک و بهبود آنها و همچنین حمایت از گیاه، باعث افزایش رشد و نمو پوشش گیاهی در خاک آلوده گردد.

جدول۲- مقاومت جدایه‌های جداسازی شده به غلظت‌های مختلف سرب

Table 2. Isolated Isolates resistance to different lead concentrations

Isolate	Lead concentrations (mM)							
	1	3	5	8	10	12	14	16
C1	+	+	+	+	+	+	+	+
C2	+	+	+	+	+	+	+	+
C3	+	+	+	+	+	+	+	+
C4	+	+	+	+	-	-	-	-
C5	+	+	+	-	-	-	-	-
C6	+	+	+	+	+	+	+	+
C7	+	+	+	-	-	-	-	-
C8	+	+	+	+	-	-	-	-
C9	+	+	+	+	-	-	-	-
C10	+	+	-	-	-	-	-	-

+ و – به ترتیب بیانگر رشد و عدم رشد در غلظت مورد نظر می‌باشد.

+ and – are indicating growth and no growth in desired concentration

ارزیابی صفات محرک رشد گیاهی جدایه‌های مقاوم به فلزات سنگین سرب و کادمیوم

از ۲۰ جدایه جداسازی شده از خاک‌های آلوده، ۱۰ جدایه با مقاومت بالا نسبت به فلز سنگین سرب (C1, C2, C3, C4, C6, C8, C9) و کادمیم (K2, K5, K7) انتخاب و میزان تولید فیتوهورمون اکسین، مقدار ترشح متابولیت‌های محدود کننده‌ی رشد عوامل بیمارگر و همچنین میزان حل‌کنندگی فسفات‌های معدنی نامحلول و توانایی این ریزجانداران در افزایش زیست فراهمی این عنصر ضروری برای رشد گیاه بررسی

گردید. تجزیه واریانس داده‌های مربوط به تولید اکسین، ترشح سیدروفور و انحلال تری کلسیم فسفات توسط سویه‌های مذکور در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۴).

جدول۳- رشد یا عدم رشد جدایه‌های جداسازی شده در غلظت‌های مختلف کادمیوم

Table 3. Isolated Isolates resistance to different cadmium concentrations

Isolate	Cadmium concentrations (mM)							
	1	3	5	8	10	12	14	16
K1	+	+	+	–	–	–	–	–
K2	+	+	+	+	+	+	+	+
K3	+	+	+	–	–	–	–	–
K4	+	+	+	–	–	–	–	–
K5	+	+	+	+	+	+	+	+
K6	+	+	+	–	–	–	–	–
K7	+	+	+	+	–	–	–	–
K8	+	+	–	–	–	–	–	–
K9	+	+	–	–	–	–	–	–
K10	+	–	–	–	–	–	–	–

+رشد در غلظت مورد مطالعه ؛ – عدم رشد در غلظت مورد مطالعه

+Growth in studied concentration; - no growth in studied concentration

جدول۴- تجزیه واریانس توانایی جدایه‌های مورد مطالعه در تولید اکسین، سیدروفور، حل‌کنندگی تری کلسیم فسفات و pH

Table 4. Analysis of variance for the ability of studied isolates in auxin and siderophore production, tricalcium phosphate solubilization and pH

Source of variation	Degree of freedom	Mean of squares			
		tricalcium phosphate solubilization	pH	siderophore production	Auxin
Isolate	9	28098**	0.64*	1.61**	92.1**
Error	20	1.86	0.25	0.002	0.66
CV (%)	-	2.28	10.5	5.30	7.80

**: معنی‌دار در سطح ۱ درصد

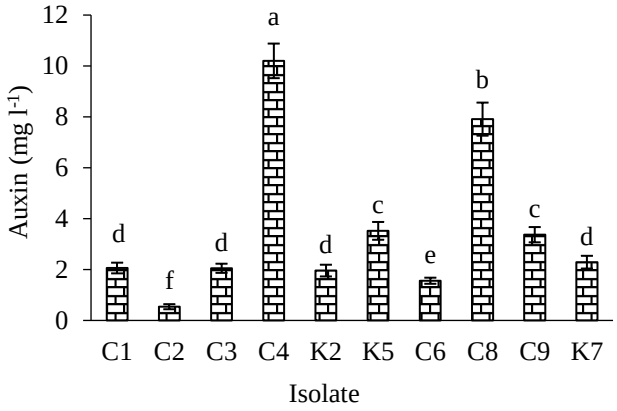
**:probability level significant at 1%

تولید ایندول استیک اسید (IAA)

همه‌ی جدایه‌ها در غلظت ۱۰۰ میلی گرم در کیلوگرم ال - تریپتوفان قادر به تولید ایندول استیک اسید بودند. بیشترین (۱۰/۲۰ میلی‌گرم در لیتر) و کمترین (۰/۶۴ میلی‌گرم در لیتر) مقدار تولید ایندول استیک اسید به ترتیب مربوط به جدایه C4 و C2 بود (شکل ۱). ایندول استیک اسید مهمترین نوع اکسین و یکی از انواع مهم هورمون‌های محرک رشد می‌باشد. در میان موجودات زنده تولید کننده IAA، ریزجانداران خاک به ویژه باکتری‌های موجود در ریزوسفر، باکتری‌های همیار با گیاه و یا آزادزی در خاک توانایی بالایی در تولید این فیتوهورمون دارند (Berendsen *et al*., 2012). برای سال‌های طولانی فرض بر آن بود که تریپتوفان تنها منبع تولید ایندول استیک اسید می‌باشد، اما پژوهش-های انجام شده با موتانت‌های اکسوتروف تریپتوفان[1] و ایزوتوپ‌ها نشان داد که تولید آن می‌تواند در مسیرهای غیر وابسته به اسیدآمینه مذکور نیز اتفاق بیفتد. با این وجود پژوهش‌های مختلف انجام شده نشان می‌دهد که تولید این متابولیت در حضور آمینواسید ال-تریپتوفان به طور چشم‌گیر افزایش پیدا می‌کند (Pattern & Glick, 2002؛ Sridevi & Mallaiah, 2007 ؛ Santi *et al*., 2007). در این پژوهش صد در صد باکتری‌های جداسازی شده از خاک‌های آلوده به کادمیوم و سرب توانایی تولید مقادیر متفاوتی از IAA بودند. این موضوع نشان می‌دهد که برخی از ریزجانداران موجود در خاک غیرریزوسفری نیز می‌توانند مقادیر قابل توجه‌ای از فیتوهورمون اکسین را تولید کنند. تفاوت در تولید اکسین در ریزجانداران مختلف می‌تواند به دلیل میزان در دسترس بودن سوبسترا و توانایی خود ریزجاندار در استفاده از منابع موجود در محیط باشد. ایندول استیک اسید تولیدی توسط باکتری‌ها به عنوان یک هورمون در خود موجود عمل نمی‌کند، اما این پتانسیل را داراست که فرآیندهای فیزیولوژیکی تحت تأثیر اکسین در گیاه

1. Tryptophan-auxotrophic mutants

(تقسیم و توسعه یافتگی سلول، تمایز بافت‌ها و...) را تغییر داده و باعث بهبود رشد گیاه گردد. این عمل اکسین تولیدی توسط باکتری‌ها به مقدار تولید آن توسط این ریزجانداران و همچنین میزان حساسیت گیاه بستگی دارد. ریشه‌های گیاهی حساس‌ترین قسمت گیاه در پاسخ به ترشح اکسین توسط ریزجانداران است، به طوری‌که باکتری‌های دارای توانایی بالا در تولید این فیتوهورمون باعث افزایش چشم‌گیر زیتوده این اندام گیاهی گشته و در نتیجه به رشد بیشتر گیاه در شرایط تنش‌های محیطی کمک می‌کند (Spaepen *et al.*, 2007؛ Pattern & Glick, 2002).



شکل ۱- توان تولید اکسین توسط جدایه‌های مقاوم به سرب و کادمیوم

Figure 1. The ability of resistant isolates to lead and cadmium in auxin production

به ترتیب بیانگر جدایه‌های مقاوم به سرب و کادمیوم می‌باشد.K و C حروف بیانگر تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد.

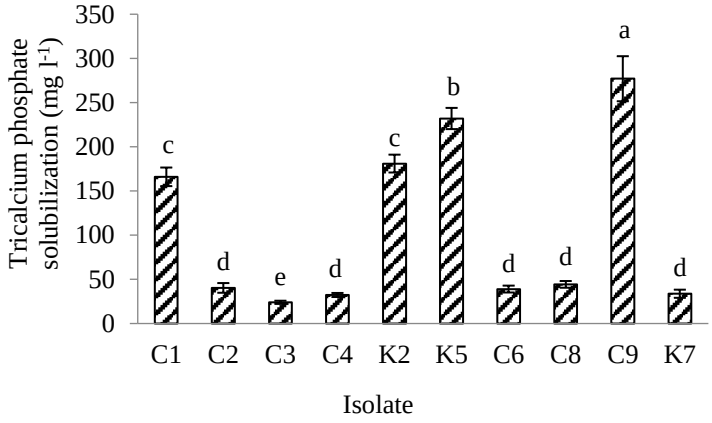
Letters refer to significantly difference at 1 % probability level. C and K stands for Pb and Cd resistant isolates, respectively.

میزان حل کنندگی فسفات‌های معدنی کم و نامحلول

داده‌های حاصل از بررسی میزان انحلال تری کلسیم فسفات در محیط مایع نشان داد که جدایه‌های C9 و C3 به ترتیب با میزان انحلال ۲۷۶/۷۶ میلی‌گرم در لیتر و ۲۴ میلی‌گرم در لیتر بالاترین و کمترین توانایی را در انحلال این ترکیب داشتند (شکل ۲). مقایسه pH مربوط به محیط کشت حاوی جدایه‌های مورد مطالعه با تیمار شاهد بدون ریزجاندار نشان داد که رشد و نمو تمامی جدایه‌ها موجب کاهش معنی‌دار این پارامتر شدند. کمترین و بیشترین مقدار pH در محیط کشت حاوی جدایه‌های C9 (با بیشترین حل کنندگی نمک نامحلول مورد مطالعه) و C4 (جزء جدایه‌های با انحلال خیلی کم نمک نامحلول مورد مطالعه) مشاهده شد.

فسفر بعد از نیتروژن محدودکننده‌ترین عنصر برای رشد گیاه می‌باشد. این عنصر برای رشد و نمو گیاه ضروری بوده و حدود ۰/۲ درصد وزن خشک گیاه را تشکیل می‌دهد. گیاهان فسفر مورد نیاز خود را به شکل یون فسفات از محلول خاک جذب می‌نمایند. آنیون‌های فسفات موجود در فاز محلول خاک به دلیل واکنش‌پذیری خیلی بالا، بسته به ویژگی خاک، با کاتیون‌های Ca^{2+}, Mg^{2+} Fe^{3+} و Al^{3+} واکنش داده و رسوب تشکیل می‌دهند. در نتیجه مقادیر جزئی از فسفر کل خاک به فرم محلول و قابل جذب توسط گیاه می‌باشد. توانایی گونه‌های مختلف باکتریایی در انحلال فسفات‌های معدنی نامحلول از قبیل تری کلسیم فسفات، دی کلسیم فسفات، هیدروکسی آپاتیت و سنگ فسفات توسط محققین مختلف گزارش شده است (Goldstein, 1986). ریزجانداران با تولید ترکیبات با وزن مولکولی پایین و اسیدی نمودن سلول و محیط اطرافشان باعث افزایش انحلال ترکیبات نامحلول فسفر معدنی می‌گردند. اسیدهای آلی (گلوکونیک اسید و کتوگلوکونیک اسید) از مهم‌ترین ترکیبات تولیدی توسط این موجودات بوده که گروه کربوکسیل و هیدروکسیل این اسیدها کاتیون‌های متصل به فسفات (کلسیم، منیزیم و آهن) را کلات نموده و با کاهش pH در خاک‌های بازی باعث افزایش انحلال یون فسفات می‌شوند (Whitelaw, 2000؛ Duff & Webley, 1959؛ Salih *et al.*, 1989). گزارشات علمی نشان می‌دهد که برخی از موجودات حل‌کننده

ترکیبات معدنی نامحلول فسفر توانایی تولید مقادیر زیادی از اسیدهای آلی به منظور افزایش انحلال را ندارند (Illmer, 1992). پژوهش‌های به عمل آمده در این زمینه نشان می‌دهد که علاوه بر تولید اسیدهای آلی مکانیسم‌های دیگری نیز برای افزایش انحلال ترکیبات نامحلول فسفر معدنی وجود دارد که از آن جمله می‌توان ترشح یون پروتون اشاره نمود. از دیگر مکانیسم‌های مورد استفاده توسط ریزجانداران به منظور افزایش حلالیت می‌توان به تولید ترکیبات کلات کننده و اسیدهای معدنی از قبیل سولفیدریک اسید، نیتریک اسید و کربونیک اسید توسط آنها اشاره نمود (Rudolfs, 1922؛ Hopkins, 1916). البته نتایج پژوهشگران حاکی از آن است که مکانیسم‌های اخیر در افزایش انحلال ترکیبات نامحلول فسفر معدنی جزئی و ناچیز می‌باشد (Rudolfs, 1922 ؛Vázquez & México, 1996). توانایی ریزجانداران حل‌کننده ترکیبات نامحلول فسفر معدنی همبستگی مستقیمی با pH محیط‌کشت دارد. در این پژوهش نیز مقدار این پارامتر در محیط‌کشت باکتری-هایی که توانایی بالایی در انحلال داشتند کمترین مقدار بود.



شکل۲- توان حل کنندگی تری کلسیم فسفات جدایه‌های مقاوم به سرب و کادمیوم

Figure 2. Tricalcium phosphate solubilization ability of resistant isolates to lead and cadmium.

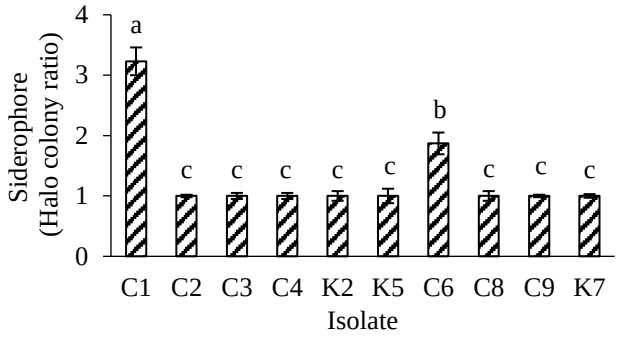
حروف بیانگر تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد. C و K به ترتیب بیانگر جدایه‌های مقاوم به سرب و کادمیوم می‌باشد.

Letters refer to significantly difference at 1 % probability level. C and K stands for Pb and Cd resistant isolates, respectively.

تولید سیدروفور

میزان تولید سیدروفور با اندازه‌گیری قطر هاله نارنجی رنگ اطراف کلنی باکتری‌ها و محاسبه نسبت قطر هاله به کلنی ارزیابی شد. همه جدایه‌های مورد مطالعه توانایی رشد در محیط CAS و تولید سیدروفور را داشتند. نتایج نشان داد که مقدار تولید این متابولیت در جدایه‌ها متفاوت بوده و بیشترین میزان تولید در جدایه C1 با نسبت هاله به کلنی ۳/۲۳ مشاهده گردید که با دیگر جدایه‌ها تفاوت معنی‌داری داشت. در این پژوهش ۸۰ درصد جدایه‌ها توانایی یکسانی در تولید سیدروفور داشتند (شکل۳).

تولید سیدروفور سازوکاری است که توسط ریزجانداران مختلف خاک به منظور مقابله با تنش کمبود فرم قابل جذب آهن استفاده می‌شود. متابولیت ترشحی این عنصر را به فرم کلات محلول در می‌آورده و برای سلول‌هایی که دارای پذیرنده‌ی غشایی اختصاصی باشند، قابل‌دسترس می‌نماید. ریزجانداران محرک رشد با این سازوکار آهن را از دسترس عوامل بیمارگر گیاهی خارج نموده و با سرکوب این عوامل باعث افزایش رشد گیاه می‌شوند (Yu *et al*., 2011 ؛ Katiyar *et al*., 2018). همچنین گزارشات علمی حاکی از آن است که کمپلکس سیدروفور-آهن تولیدی توسط ریزجانداران برای برخی از گیاهان نیز قابل استفاده می‌باشد که بدین طریق ریزجاندار می‌تواند به تأمین بخشی از آهن موردنیاز گیاه نیز کمک نماید (Gouda *et al*., ؛ Kumara *et al*., 2018 2018). تولید سیدروفور توسط ریزجانداران ریزوسفری و غیرریزوسفری توسط محققین مختلف گزارش شده است (Heidarpour *et al*., 2017؛ Soltani Toolarood *et al*., 2008؛ Tashakori *et al*., 2016).



شکل۳- توان تولید سیدروفور توسط جدایه‌های مقاوم به سرب و کادمیوم

Figure 1. The ability of resistant isolates to lead and cadmium in siderophore production.

حروف بیانگر تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد. C و K به ترتیب بیانگر جدایه‌های مقاوم به سرب و کادمیوم می‌باشد.

Letters refer to significantly difference at 1 % probability level. C and K stands for Pb and Cd resistant isolates, respectively.

تولید سیانید هیدروژن، آنزیم پروتئاز و سلولاز

نتایج مطالعه توانایی جدایه‌های مورد مطالعه در این پژوهش در تولید سیانید هیدروژن، آنزیم پروتئاز و سلولاز نشان داد که از بین جدایه‌ها، سه جدایه K2، K5 و C8 توانایی بالایی در تولید هر سه متابولیت مذکور داشتند (جدول ۵). ۴۰ درصد از جدایه‌ها توانایی تولید سیانید هیدروژن با درجه زیاد (۵) داشته و جدایه‌های C3 و C9 قادر به تولید این متابولیت (۱) نبودند. توانایی سایر جدایه‌ها در تولید سیانید هیدروژن در حد متوسط (۴) بود. تولید آنزیم پروتئاز در نصف جدایه‌ها مشاهده گردید و تعداد کمی از ریزجانداران جداسازی شده و مقاوم به کادمیوم و سرب، قادر به تولید آنزیم سلولاز بودند. از جمله مکانیسم‌هایی که توسط ریزجانداران محرک رشد برای حمایت از گیاه مورد استفاده قرار می‌گیرد، تولید متابولیت‌های ضد عوامل بیمارگر گیاهی می‌باشد. متابولیت‌های تولیدی می‌توانند به طور مستقیم با تأثیر بر یک یا چند مرحله از چرخه زندگی پاتوژن و حذف آن و غیرمستقیم از طریق فعال کردن سازوکارهای القاء مقاومت گیاه میزبان در مقابل عامل بیماری‌زا باعث بهبود رشد گیاه گردند (Kremer, 2001). از مهم‌ترین مواد ضد پاتوژن تولیدی توسط ریزجانداران محرک رشد می‌توان به ترکیبات آنتی بیوتیک، آنزیم‌های لیزکننده‌ی دیواره سلولی قارچ‌ها و باکتری‌های بیماری‌زا (از قبیل آنزیم کیتیناز، پروتئاز و سلولاز) و سیانید هیدروژن اشاره نمود (Mueller, 1988).

جدول ۵- توانایی جدایه‌های مقاوم به کادمیوم و سرب در تولید سیانید هیدروژن، آنزیم پروتئاز و سلولاز

Table 5. The ability of resistant isolates to lead and cadmium in Hydrogen cyanide, Protease and Cellulase enzyme production

Isolate	Hydrogen cyanide	Protease enzyme	Cellulase enzyme
C1	5	+	-
C2	4	-	-
C3	1	-	-
C4	4	-	-
K2	5	+	+
K5	5	+	+
C6	4	+	-
C8	5	+	+
C9	1	-	-
K7	4	-	-

+ HCN Production; - No HCN production

+ تولید سیانید هیدروژن ؛ – عدم تولید سیانید هیدروژن

نتیجه‌گیری کلی

براساس یافته‌های این پژوهش می‌توان اظهار نمود که برخی از ریزجانداران جداسازی شده از خاک آلوده به سرب و کادمیوم، توانایی بقاء و رشد مطلوب تحت تنش ناشی از کادمیوم و سرب را دارا بودند. تعدادی از ریزجانداران مقاوم به این فلزات سنگین توانایی قابل ملاحظه‌ای در تولید ایندول استیک اسید داشتند و می‌توانند به عنوان یک افزایش دهنده‌ی رشد زیستی برای گیاهان در خاک‌های آلوده به دلیل سازگاری با شرایط عمل کنند. برخی از جدایه‌ها توانایی بالایی در حل کنندگی تری کلسیم فسفات داشتند که می‌توانند در افزایش زیست فراهمی فسفر در خاک‌های با مقادیر اندک شکل قابل جذب این عنصر نقش موثری را ایفا نمایند. همچنین نتایج نشان داد که تعدادی از باکتری‌های جداسازی شده توانایی بالایی در تولید سیانید هیدروژن، آنزیم‌های پروتئاز و سلولاز داشته و می‌توانند در کنترل زیستی عوامل بیمارگر گیاهی نقش مهمی را ایفا نمایند. بر اساس مجموع یافته‌های این پژوهش، پیشنهاد می‌گردد که تأثیر جدایه‌های برتر روی رشد و نمو گیاهان مختلف در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین در شرایط گلخانه‌ای و مزرعه‌ای مورد بررسی قرار گیرد.

References

Alexander D. B., and Zuberer D. A. 1991. Use of cgrome azural S reagents to evaluate sidrophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 12: 39-45.

Berendsen R.L., Pieterse C.M. and Bakker P.A. 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 17(8):478-486.

Brady N.C., and Weil R.R. 1996. The Nature and Properties of Soils. Prentice-Hall, Inc. 980p.

Bruins M.R., Kapil S. and Oehme F.W. 2000. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 45(2): 198-207.

Carter M.R., and Gregorich E.G. 2008. Soil Sampling and Methods of Analysis (2nd Ed.), CRC Press.Boca Raton, FL. P.1204.

Chen L., Luo S., Li X., Wan Y., Chen J. and Liu C., 2014. Interaction of Cd hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and functional endophyte *Pseudomonas* sp. Lk9 on soil heavy metals uptake. *Soil Biology and Biochemistry*, 68:300–308.

Choudhury R., and Srivastava S. 2001. Zinc resistance mechanisms in bacteria. *Current Science*, 81(7): 768-775.

Clarke R. B. Marin pollution.1992. Clarendon Press. Oxford, 20: 172-175.

Dinu L.D., Anghel L. and Jurcoane S. 2011. Isolation of heavy metal resistant bacterial strains from the battery manufactured polluted environment. *Romanian Biotechnological Letters*, 16(6): 102-106.

Donate-Correa J., Leon-Barrios M. and Perez-Galdona R. 2004. Screening for plant growth promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proligerus*, a forage tree-shrub legume endemic to the Canary Island. *Plant and Soil*, 266: 261-272.

Duff R.B., and Webley D.M. 1959. 2-Ketogluconic acid as a natural chelator produced by soil bacteria. *Chemistry and Industry*, 13:76–77.

Gandomkar A., Rahmani H.R. and Hadi M. 2012. Investigation of Lead and Cadmium distribution in Borkhar region soils. *Journal of Physical Geography*, 17: 75-81. (In Persian)

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

Goldstein A. H. 1986. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspectives and future prospects. *American Journal of Alternative Agriculture*, 1:57–65.

Gouda S., Kerry R.G., Das G., Paramithiotis S., Shin H.S. and Patra P.J., 2018. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological Research*, 206: 131–140.

Hansda A., Kumar V., Usmani A., and Usmani Z. 2014. Phytoremediation of heavy metals contaminated soil using plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A current perspective. *Recent Research in Science and Technology*, 6(1): 131-134.

Heidarpour L., Soltani Toularoud A.A., and Goli Kalanpa E. 2017. Isolation, screening and evaluation of plant growth promoting characteristics of arsenic (III) & (V) resistant

microorganisms and assessment the effect of superior isolates on morphological properties of Oregano in a arsenic-polluted soil. *Journal of Soil Biology*, 4:135-151. (In Persian)

Hopkins C.G., and Whiting A.L. 1916. Soil bacteria and phosphates. III. *Science*; 190: 395-406.

Hrynkiewicz K, Baum C. 2012. The potential of rhizosphere microorganisms to promote the plant growth in disturbed soils. *In:* Environmental Protection Strategies for Sustainable Development. *Springer*, pp. 35-64.

Hrynkiewicz K., Złoch M., Kowalkowski T., Baum C. and Buszewski B. 2018. Efficiency of microbially assisted phytoremediation 1 of heavy-metal2 contaminated soils. *Environmental Reviews*, 26(3): 316-332.

Illmer P., and Schinner F. 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 24:389–95.

Katiyar D., Hemantaranjan A., and Dwivedi P. 2018. Plant growth promoting rhizobacteria and their roles as fungal biocontrol agents: An overview. *Journal of Plant Science and Research*, 34: 127–136.

Kremer R.J., and Souissi T. 2001. Cyanide production by rhizobacteria and potential for suppression of weed seedling growth. *Current Microbiology*, 43: 182-186.

Kumara P., Thakura S., Dhingrac G.K., Singhd A., Kumar Pale M., Harshvardhanf K., Dubeyg R.C. and Maheshwarig D.K. 2018. Inoculation of siderophore producing rhizobacteria and their consortium for growth enhancement of wheat plant. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 15:264-269.

Lindsay W. L., and Norvell W.A. 1978. Development of a DTPA Soil Test for Zn, Fe, Mn, and Cu. *Soil Science Society of American Journal*, 42: 421–428.

Ma Y., Oliviera R.S., Nai F., Rajkumar M., Luo Y., Rocha I. and Freitas H. 2015. The hyperaccumulator *Sedum plumbizincicola* harbors metal-resistant endophytic bacteria that improve its phytoextraction capacity in multi-metal contaminated soil. *Journal of Environmental Management*, 156:62–69.

Majidi S., Roayaei M. and Ghezelbash G. 2011. Carboxymethyl cellulase and filter paperase activity of new strains isolated from Persian Gulf. *Journal of Microbiology*, 1: 8-16.

Maurhofer M., Keel C., Haas D., and Defago G. 1995. Influence of Plant Species on Disease Suppression by *Pseudomonas fluorescens* Strain CHA0 with Enhanced Antibiotic Production. *Plant Pathology*, 44: 40-50.

Mueller J.G., Skipper E.R., Shipe E.R., Grimes L.W., and Wagne S.C. 1988. Intrinsic antibiotic resistance in *Bradyrhizobium japonicum*. *Soil Biology and Biochemistry*, 20: 6. 879-882.

Pais I., and Jones J.B. 1997. The handbook of trace elements, St. Lucie Press, Boca Raton, Florida.

Patten C.L. and Glick B.R. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indole acetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:3795–3801.

Patten C.L., and Glick B.R. 2002. Regulation of indole acetic acid production in *Pseudomonas putida* GR12-2 by tryptophan and the stationary phase sigma factor RpoS. *Canadian Journal of Microbiology*, 48:635–642.

Rahimi B., Nejatkhah M P. 2010. Availability, accumulation and elimination of cadmium by *Artemia urmiana* in different salinities. *Journal of Biological and Environmental Sciences*, 4(12):149-157.

Rouch D.A., Lee B.T.O., and Morby A.P. 1995. Understanding cellular responses to toxic agents: a model for mechanism-choice in bacterial metal resistance. *Journal of Industrial Microbiology*, 14(2): 132-141.

Rudolfs W. 1922. Influence of sulfur oxidation upon growth of soy beans and its effect on bacterial flora of soil. *Soil Science*; 14:247–62.

Salih H.M., Yahya A.Y., Abdul-Rahem A.M. and Munam B.H. 1989. Availability of phosphorus in a calcareus soil treated with rock phosphate or superphosphate as affected by phosphate dissolving fungi. *Plant and Soil*, 120:181–5.

Santi M., Keshab C., Dey S. and Pati B.R. 2007. Optimization of cultural and nutritional conditions for indole acetic acid production by a *Rhizobium* sp. isolated from root nodules of *Vigna mungo* (L.) Hepper. *Research Journal of Microbiology*, 2:239–246.

Soltani Toolarood A.A., Saleh-Rastin N., Khavazi K., Asadi Rahmani H. and Abbaszadeh Dehaji P. 2008. Isolation and investigation of plant growth promoting traits in some native fluorescent pseudomonads of Iranian soils. *Journal of Soil Research*, 21:277-289. (In Persian)

Spaepen S., Vanderleyden J., and Remans R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31:425-448.

Sperber J. I. 1985. The incidence of apatite soulbilizing organisms in the rhizospher. *Australian Journal of Agricultural Research*, 9: 778-781.

Sridevi M., and Mallaiah K.V. 2007. Bioproduction of indole acetic acid by *Rhizobium* strains isolated from root nodules of green manure crop, *Sesbania sesban* L. *Iranian Journal of Biotechnology*, 5: 178–182. (In Persian)

Tashakori F., Ghorbani Nasrabadi R., Barani Motlagh M. and Movahedi Naeeni S.A.R. 2016. Evaluation of phenotypic and growth promotion characteristics of rhizobia isolated from soybean root nodules. *Journal of Soil Management and Sustainable Production*, 6:45-64. (In Persian)

Vazquez P. 1996. Mexico Bacterias solubilizadoras de fosfatos inorgánicos asociadas a la rhizosfera de los mangles: *Avicennia germinans* L. L y *Laguncularia racemosa* L. Gerth. Tesis para el título de Biologo Marino. Univ. Autónoma de Baja California Sur. La Paz, B.C.S.

Whitelaw M.A. 2000. Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. *Advances in Agronomy*, 69: 99-151.

Yu X., Ai C., Xin L. and Zhou, G. 2011. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *European Journal of Soil Biology*, 47: 138–145.

Złoch M., Kowalkowski T., Tyburski J. and Hrynkiewicz K. 2017. Modelling of phytoextraction efficiency of microbially stimulated *Salix dasyclados* L. *International Journal of Phytoremediation*, 19(12): 1150-1164.

Isolation, Screening and Evaluation of Plant Growth Stimulating Traits of Cd and Pb Resistant Microorganisms

Ali-Ashraf Soltani Toolarood[1*], Manizheh Eivazi Nay[2], Akbar Ghavidel[3], Payman Abbaszadeh Dehaji[4], Esmaiel Goli Kalanpa[3]

(Received: April 2019 Accepted: July 2019)

Abstract

Success of the phytoremediation technique depends not only on plant species, but also largely on the interactions of plant roots with the rhizosphere microorganisms. These microorganisms, especially bacteria with plant growth promoting traits, can improve efficiency of phytoremediation by helping to proper plant establishment, increasing root system growth and, consequently, increasing plant growth and enhancing heavy metal uptake. Considering the important role of soil microbial community in increasing the remediation of polluted soil with plants, this research was conducted with the aim of isolating, screening, investigating the traits of cadmium and lead-resistant bacteria and introducing superior isolates. Soil samples were taken from Cd and Pb contaminated soils of the Shahid Tondguyan oil refinery and after measuring some physical and chemical properties, heavy metals resistant microorganisms were isolated from them. Resistance to cadmium and lead was determined in the isolates, and then the ability of the superior isolates to produce phytohormones of auxin, secretion of growth inhibitor metabolites and solubilization of insoluble inorganic phosphate were evaluated. In this study, thirty microorganisms were isolated from contaminated soils. After examining the appearance of the colony, its color and margin, as well as the growth rate, at the end, 20 different isolates were selected. 70% of the studied isolates showed a very good growth in culture medium up to a concentration of 8 mM l^{-1} of lead and cadmium. The results of evaluation of plant growth promoting traits in the top 10 isolates in terms of resistance to heavy metals of lead and cadmium showed that all of these isolates had the ability to produce auxins and dissolve insoluble inorganic phosphates. The highest (10.20 mg l^{-1}) and the lowest (0.64 mg l^{-1}) auxin production were observed for C4 and C2 isolates, respectively. The average solubility of tricalcium phosphate by isolates was 106.91 mg l^{-1}. 80% of isolates had the same ability to produce siderophore. The highest rate of production of this metabolite was observed in the isolate C1 with a halo to colony ratio of 23.3. Among 10 studied isolates, three isolates, K2, K5 and C8, were able to produce hydrogen cyanide, protease and cellulase enzymes.

Keywords: Heavy metals, Microorganisms, Soil contamination, Phytoremediation

Soltani Toolarood A.A, Eivazi Nay M., Ghavidel A., Abbaszadeh Dehaji P. and Goli Kalanpa E. 2019. Isolation, screening and evaluation of plant growth stimulating traits of Cd and Pb resistant microorganisms. *Applied Soil Research*, 7(3): 111-123.

1. Associate Professor, Department of Soil Science and Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili
2. Former MSc Student, Department of Soil Science and Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili.
3. Associate Professor, Department of Soil Science and Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili.
4. Assistant Professor, Department of Soil Science and Engineering, Faculty of Agricultur, Vali-E-Asr University of Rafsanjani
* Corresponding Author Email: ali_soltani_t@yahoo.com