مجله تحقیقات آب و خاک ایران (41) 2، 1389 (263-257)

مقاومت به نیکل و کادمیوم در باکتری های محرک رشد گیاه (PGPR) بومی و غیربومی مناطق آلوده

الهام ملک زاده[1]، حسینعلی علیخانی[2]*، غلامرضا ثواقبی فیروزآبادی[3] و مهدی زارعی[4]

[1] دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و [2،3] دانشیاران گروه مهندسی علوم خاک، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران. [4] استادیار بخش علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز.

(تاریخ دریافت: 1388/6/1 – تاریخ تصویب: 1389/3/22)

چکیده

این پژوهش با هدف ارزیابی مقاومت به عناصر نیکل و کادمیوم در 52 جدایه از باکتری های بومی و غیر بومی مناطق آلوده و بررسی خصوصیات محرک رشد جدایه های مقاوم انجام شده است. آزمون مقاومت در سه سطح کادمیوم (صفر، 100و200میلی گرم در لیتر) و پنج سطح نیکل (صفر، 250، 500، 750 و 1000میلی گرم در لیتر) و سه تکرار در قالب طرح کاملا تصادفی انجام پذیرفت. صفات محرک رشد گیاه، شامل ارزیابی توان تولید اکسین، آنزیم ACC- دآمیناز، سیدروفور و نیز توان انحلال فسفات های آلی و معدنی، مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد از 52 جدایه ی مورد مطالعه، 10 جدایه به سطوح بالای نیکل و کادمیوم مقاوم بوده اند (19/2٪) و از بین این 10 جدایه، دو جدایه شماره 159 و 105، علاوه بر داشتن بیشترین مقاومت به نیکل و کادمیوم دارای برخی ویژگی های محرک رشد گیاه نیز بوده‌اند.

واژه‌های کلیدی: پالایش زیستی ، باکتری های مقاوم، آلودگی خاک

مقدمه

آلودگی خاک ها به عناصر سنگین، مشکل زیست محیطی عمده در سراسر جهان به شمار می آید که به دنبال افزایش فعالیت های صنعتی و معدن کاوی از اواخر قرن 19 تاکنون، میزان این آلودگی ها گسترش یافته است (Rajkumar and Freitas, 2008). کادمیوم و نیکل از آلاینده های مهم محیط زیست به شمار می آیند، این آلاینده ها از منابع متعددی شامل پسماندها و فاضلاب های صنعتی، رواناب شهری، کاربرد لجن فاضلاب، رواناب حاوی سموم دفع آفات، علف کش ها و قارچ کش ها، فعالیت های کشتیرانی، زباله های خانگی و غیره حاصل می شوند (Benavides et al., 2005). کادمیوم کمبود عناصر غذایی ضروری را افزایش داده و از جمله غلظت بسیاری از عناصر کم نیاز را در گیاهان کاهش می دهد (Vassilev et al., 2002)، همچنین در جذب، انتقال و استفاده از عناصر کلسیم، منیزیم، فسفر و پتاسیم و آب توسط گیاهان اختلال ایجاد می کند (Benavides et al., 2005).

انباشتگی نیکل، کادمیوم، کروم، کبالت و روی در برگ‌های گیاهان عالی فتوسنتز را کاهش می دهد. به گونه ای که مشاهده شده در گیاه ذرت، عنصر نیکل از فتوسنتز و تعرق به طور همزمان جلوگیری می‌کند (Clijsters and Assche, 1985). بنابراین آگاهی در مورد آلاینده های خاک و توجه بیشتر به راهکارهای مناسب جهت کاهش آنها ضرورتی انکارناپذیر است.

پالایش خاک های آلوده به فلزات سنگین موضوع بحث برانگیزی است، زیرا فلزات سنگین از پایداری تقریباً نامحدود در محیط برخوردارهستند (Rajkumar and Freitas, 2008) و بوسیله‌ی زنجیره غذایی تغلیظ شده و خطر مهمی برای جانداران موجود در زنجیره غذایی به شمار می روند. پالایش خاک با روش های مرسوم افزون بر هزینه ی زیاد، به دلیل تخریب خاک، کاربرد اراضی را جهت تولید محصول کاهش داده و نیز در سطوح گسترده کاربردی محدود دارند (Alloway and Jackson, 1991). پالایش زیستی برپایه استفاده از ریزموجودات خاکزی که تحت عنوان پالایش زیستی (Bioremediation) و مشخصاً پالایش میکروبی (Microbial remediation) در نظر گرفته می شود در مقایسه با روش های فیزیکی و شیمیایی برتری دارد، زیرا معمولاً خاک را به صورت درجا اصلاح کرده و ضمن عدم دست ورزی خاک باعث احیاء خاک در وضعیت مطمئن از نظر شیمیایی و بیولوژیکی می گردد (Salt et al., 1995).

باکتری های ریزوسفری محرک رشدگیاه (PGPR)، آشیان های اکولوژیک (Ecological niche) ریزوسفر گیاه و سطوح ریشه (Rhizoplane) و یا درون ریشه (Endorhizosphere/ Histoplane) را در مراحل مختلف رشد گیاه اشغال و در آنجا

* پست الکترونیک مکاتبه کننده: halikhan@ut.ac.ir

تکثیر پیدا می کنند و به شکل مستقیم و یا غیر مستقیم کمیت وکیفیت رشد گیاه را بهبود می بخشند (Joseph et al., 2007). مکانیسم های عمل PGPR شامل: 1) توانایی تولید یا تغییر غلظت تنظیم کننده های رشد گیاه مثل ایندول استیک اسید، جیبرلیک اسید، سیتوکینین، اتیلن و غیره ، 2) تثبیت زیستی نیتروژن (BNF)، 3) اثرات آنتاگونیستی با ریزموجودات بیماری زای گیاهی از راه تولید انواع سیدروفور، آنتی بیوتیک ها و سیانید هیدروژن 4) انحلال فسفات های نامحلول و سایر عناصر غذایی (Joseph et al., 2007) و 5) تولید آنزیم ACC- دآمیناز و در پی آن تعدیل سطح اتیلن تنشی در گیاهان در حال توسعه می باشد (Glick et al., 1998). این باکتری ها با روشهای مختلف به بقای گیاه در خاک های شدیداً آلوده و به پالایش زیستی و از جمله گیاه پالایی کمک چشم گیری می کنند (Glick, 2003). ریزموجودات خاک و بویژه باکتری های با توانایی مقاومت نسبت به فلزات سنگین و فعالیت های محرک رشد گیاه، از اهمیت بالایی برای پالایش مناطق آلوده به فلزات سنگین و تحریک رشد گیاهان برخوردارند (Gadd, 2004). افزون بر توانایی های یادشده، افزایش کارآیی استخراج و تثبیت گیاهی فلزات سنگین توسط باکتری ها در مطالعات متعدد گزارش شده است (He et al., 2009).

هدف این مطالعه شناسایی باکتری های مقاوم به عناصر سنگین نیکل و کادمیوم با ویژگی های محرک رشدگیاه (مانند انحلال فسفات های آلی و معدنی، تولید فیتوهورمون ایندول استیک اسید، سیدروفور و آنزیم ACC- دآمیناز) و گزینش جدایه های برتر به عنوان زاد مایه برای استفاده در مطالعات بعدی از جمله اثر مایه زنی زادمایه های آنها بر روی رشد گیاهان زراعی و میزان جذب عناصر سنگین نیکل و کادمیوم، در خاک های آلوده به این فلزات می باشد.

مواد و روش ها

در این پژوهش، 52 جدایه ی مورد آزمایش از بانک ژن ریزموجودات مفید خاکزی گروه مهندسی علوم خاک دانشگاه تهران انتخاب شدند. جدایه ها از جنس های *سودوموناس* (86/54 درصد)، *باسیلوس* (9/61 درصد) و *میکروکوکوس* (3/85 درصد) بوده، که جنس های *سودوموناس* (45جدایه) بومی خاک های زراعی غیر آلوده وجنس های *باسیلوس* و *میکروکوکوس* (7جدایه) بومی خاک های آلوده می باشند، که در آزمایشگاه بیولوژی خاک مراحل جداسازی، خالص سازی و شناسایی آنها انجام شد (Reyhani Tabar, 2000; Moteshare zadeh, 2008).

آزمون مقاومت باکتری ها به عناصر سنگین نیکل و کادمیوم: این آزمون با استفاده از محیط کشت جامد H.M (Angle et al., 1992) در دو آزمایش مستقل برای بررسی مقاومت 52 جدایه به عناصر سنگین کادمیوم و نیکل صورت گرفت. آزمون مقاومت به کادمیوم در مقادیر صفر، 100، 200 میلی گرم در لیتر از نمک کلرید کادمیوم ($CdCl_2.H_2O$) و نیکل در مقادیر صفر، 250، 500، 750، 1000 میلی گرم در لیتر از نمک کلرید نیکل ($NiCl_2.6H_2O$) در سه تکرار انجام گردید. تغییرات قطر کلنی ها پس از 48 ساعت و در فواصل زمانی 4 و 8 روز پس از مایه زنی مورد بررسی و متوسط قطر کلنی ها در پلیت های آلوده با قطر کلنی ها در پلیت شاهد مورد مقایسه قرار گرفت و با توجه به کاهش رشد نسبت به شاهد (Reduced Percent) به شش گروه خیلی حساس، حساس، نیمه حساس، نیمه مقاوم، مقاوم و خیلی مقاوم تفکیک شدند (جدول 1) (Sarcheshmepour , 2009).

ارزیابی ویژگی های محرک رشد گیاه در جدایه های مقاوم

بعد از شناسایی ایزوله های مقاوم به عناصر سنگین نیکل و کادمیوم، ویژگی های محرک رشد گیاه این ایزوله ها به صورت زیر بررسی گردید.

آزمون نیمه کمی توان تولید سیدروفور: آزمون تولید سیدروفور توسط باکتری ها با استفاده از روش پیشنهادی Schwyn و Neilands (1987) و برپایه استفاده از محیط کشت پایه ای به نام کروم آزرول- اس (CAS) انجام شد. هاله ی نارنجی اطراف و زیر کلنی ها نشان دهنده ی تولید و ترشح سیدروفور بوده و ارزیابی توان تولید سیدروفور توسط باکتری ها با محاسبه ی قطر کلنی و هاله و تعیین نسبت قطر هاله به قطر کلنی (Halo Diameter/Colony Diameter: HD/CD) انجام شد.

آزمون کمی توان تولید ایندول استیک اسید IAA: برای انجام آزمون کمی توان تولید اکسین در جدایه های مقاوم، از روش رنگ سنجی با معرف سالکوفسکی (Salkowski) به روش Patten و Glick (2002) استفاده شد، مقدار اکسین تولید شده توسط هر یک از جدایه ها با مقایسه مقدار جذب نوری با منحنی استاندارد که با غلظت های صفر، 2/5، 5، 10، 15، 20 و 30 میلی گرم در لیتر از ایندول استیک اسید تهیه شده بود، محاسبه گردید.

آزمون نیمه کمی توان تولید آنزیم ACC–دآمیناز: این آزمون بر پایه روش پیشنهادی Penrose و Glick (2001) با استفاده از سه محیط کشت: 1) RMM+ACC (RMM: Rhizobia Minimal Medium, ACC: 1-Amino

cyclopropane-1- carboxylic acid)، 2) RMM+NH_4Cl بعنوان شاهد مثبت و 3) RMM بعنوان شاهد منفی انجام گردید. قطر کلنی ها روی محیط های کشت با سه تکرار درون هر ظرف پتری، در سه دوره 3، 6 و 9 روزه اندازه گیری و درجه بندی کلنی های رشد یافته روی محیط RMM+ACC در مقایسه با محیط های شاهد مثبت(RMM+NH_4Cl) و شاهد منفی (RMM)، به شرح جدول 2 انجام گرفت و به توان تولید آنزیم ACC- دآمیناز نسبت داده شد.

آزمون نیمه کمی توان انحلال فسفات معدنی: برای اندازه گیری نیمه کمی توان جدایه ها در انحلال فسفات معدنی از محیط کشت اسپربر (Sperber) استفاده شد (Sperber, 1958). محیط جامد اسپربر دارای نمک تری کلسیم فسفات $Ca_3(PO_4)_2$ می باشد که مشاهده هاله ی شفاف اطراف کلنی درون ظرف پتری نشان دهنده توان انحلال فسفات می باشد. معیار سنجش توان انحلال فسفات توسط ایزوله ها محاسبه نسبت قطر هاله به قطر کلنی بود.

آزمون نیمه کمی توان انحلال فسفات آلی : در این آزمون از محیط کشت اسپربر اصلاح شده دارای اینوزیتول هگزا فسفات (Inositol hexaphosphate sperber: ISP) که فراوان ترین فرم فسفر آلی می باشد، استفاده شد. سایر مراحل آزمون همانند آزمون نیمه کمی انحلال فسفات معدنی بود (Dalal, 1977).

تجزیه و تحلیل داده ها: داده های کلیه آزمون ها در قالب طرح کاملا تصادفی و با سه تکرار بوسیله نرم افزار آماری SPSS تجزیه واریانس شدند. مقایسه میانگین توسط نرم افزار آماری MSTATC و به روش آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح پنج درصد انجام شد. نمودارها با نرم افزار Excel ترسیم گردید.

نتایج و بحث

آزمون مقاومت جدایه ها به عناصر سنگین نیکل و کادمیوم: گروه بندی جدایه ها از نظر میزان مقاومت به کادمیوم و نیکل در جدول یک نشان داده شده است. از 52 جدایه مورد بررسی در آزمون مقاومت به فلزات سنگین کادمیوم و نیکل بعد از 48 ساعت، 88/4 و 78/8 درصد جدایه ها به ترتیب در سطوح 100 و 200 میلی گرم در لیتر کادمیوم و 100، 94/2، 90/3 و 69/2 درصد جدایه ها به ترتیب در سطوح 250، 500، 750 و 1000 میلی گرم در لیتر نیکل قادر به رشد بودند. کاهش قطر کلنی با افزایش سطح فلز سنگین در مقایسه با سطوح پایین به وضوح قابل مشاهده بود. قطر کلنی برخی از جدایه ها با گذشت زمان افزایش یافت. به طوری که در 4 روز بعد از مایه زنی، 96/1 و 84/6 درصد جدایه ها به ترتیب در سطوح 100 و 200 میلی گرم در لیتر کادمیوم و 96/1، 94/2 و 94/2 درصد جدایه ها به ترتیب در سطوح 500، 750 و 1000 میلی گرم در لیتر نیکل رشد کردند. 8 روز بعد از مایه زنی، در سطوح 100 و 200 میلی گرم در لیتر کادمیوم تمام جدایه ها و در سطوح 500، 750 و 1000 میلی گرم در لیتر نیکل به ترتیب 100، 96/1 و 96 درصد جدایه ها رشد کردند.

بیشتر جدایه های مورد بررسی در آزمون مقاومت به نیکل و کادمیوم متعلق به گروههای خیلی حساس، نیمه حساس و حساس بودند (جدول 1). 10 جدایه با شماره کدهای 7(*Pseudomonas fluorscens* B7)، 28(*Pseudomonas fluorscens* B28)، 33(*Pseudomonas fluorscens* B33)، 36(*Pseudomonas fluorscens* B36)، 49(*Pseudomonas fluorscens* B49)، 75(*Pseudomonas fluorscens* B75)، 76(*Pseudomonas fluorscens* B76)، 100(*Pseudomonas fluorscens* B100)، 105(*Bacillus mycoides* M1) و 159(*Micrococcus roseus* M2) که در مقایسه با دیگر جدایه ها از رشد مناسبی در سطوح مختلف فلزات سنگین برخوردار بودند، به عنوان جدایه های مقاوم انتخاب شدند و برخی صفات محرک رشد گیاه این جدایه ها بررسی گردید.

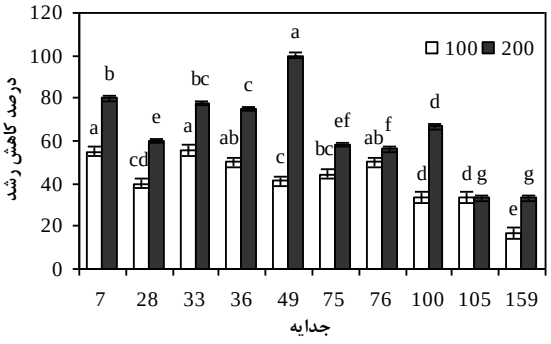
با افزایش سطوح فلزات درصد کاهش رشد جدایه ها نیز به طور معنی داری افزایش یافت. در سطح 100 و 200 میلی گرم در لیتر کادمیوم، میزان رشد جدایه ها به ترتیب از 16/6 تا 55/5 و 33/3 تا 100 درصد نسبت به شاهد کاهش یافت. در سطح 250، 500، 750 و 1000 میلی گرم در لیتر نیکل، میزان رشد جدایه ها به ترتیب از 5/5 تا 52/2، 40/9 تا 57/5، 45/4 تا 72/9 و 45/4 تا 100 درصد نسبت به شاهد کاهش یافت. جدایه 28 در سطح 1000 میلی گرم در لیتر نیکل و نیز جدایه 49 در سطح 200 میلی گرم در لیتر کادمیوم قادر به رشد نبودند. در سطح 200 میلی گرم در لیتر کادمیوم، جدایه های 105 و 159 با کاهش رشد 33/3 درصدی نسبت به شاهد و در سطح 1000 میلی گرم در لیتر نیکل، با کاهش رشد به ترتیب 52/9 و 45/4 درصدی نسبت به شاهد، در مقایسه با سایر جدایه ها از مقاومت بیشتری به فلزات سنگین نیکل و کادمیوم برخوردارند (شکل 1 و 2).

جدول1- گروهبندی جدایه ها از نظر میزان مقاومت به کادمیوم و نیکل (بر اساس گروهبندی انجام شده بوسیله Sarcheshmepour (2009))

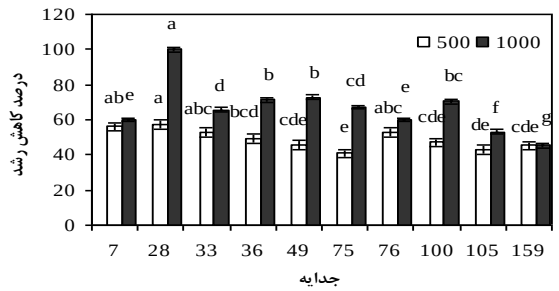
کلاس مقاومت	کاهش رشد نسبت به شاهد	تعداد جدایه ها					
		نیکل ($mg\,l^{-1}$)			کادمیوم ($mg\,l^{-1}$)		
		250	500	750	1000	100	200

خیلی حساس	85<RP≤100	1	3	5	16	9	12
حساس	70<RP≤85	10	19	24	23	16	23
نیمه حساس	55<RP≤70	15	20	18	11	12	15
نیمه مقاوم	40<RP≤55	18	10	5	2	10	0
مقاوم	25<RP≤40	6	0	0	0	4	2
خیلی مقاوم	0≤RP≤25	2	0	0	0	1	0

این پژوهش نشان داد که ازمیان 52 جدایه بررسی شده، 10 جدایه (2 جدایه از 7 جدایه بومی و 8 جدایه از 45 جدایه غیر بومی مناطق آلوده) مقاومت مناسبی به نیکل و کادمیوم داشتند، به گونه ای که در گروههای نیمه مقاوم، مقاوم و خیلی مقاوم قرار گرفتند (جدول 1). جدایه های شماره 105 و 159 بومی مناطق آلوده در مقایسه با سایر جدایه ها در بالاترین غلظت کادمیوم و نیکل کاهش رشد کمتری را نسبت به سایر جدایه‌ها نشان دادند، که بیانگر این نکته می‌باشد که باکتری‌های بومی مناطق آلوده از مقاومت بیشتری نسبت به عناصر سنگین برخوردارند (Pal et al., 2005). Ansari و Malike (2007) گزارش کردند که، باکتری های بومی جداسازی شده از خاک های آلوده متعلق به جنس های *انتروباکتر* و *سودوموناس*، قادر به جذب مقادیر بالایی از فلزات سنگین کادمیوم تا 200، روی تا 400، نیکل تا 800 و سرب تا 1600 میلی گرم در لیتر بودند. باکتری های بومی خاک های آلوده، عناصر سنگین را جذب کرده و غیر پویا می سازند، دیواره سلولی باکتری های گرم مثبت، ویژگی اتصال دهندگی قوی فلزات را دارا می باشد. برخی باکتری ها نیز ترکیبات پلی ساکاریدی برون سلولی که قادر به پیوند با عناصر سنگین می باشند، تولید می کنند (Hu and Boyer, 1996).



شکل1- مقایسه کاهش رشد جدایه های مقاوم در سطوح 100 و 200 میلی گرم در لیترکادمیوم



شکل 2- مقایسه کاهش رشد جدایه های مقاوم در سطوح 500 و 1000 میلی گرم در لیتر نیکل

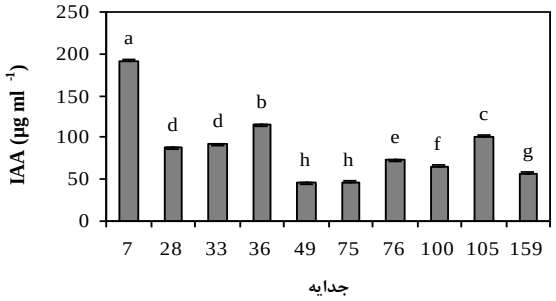
از میان 52 جدایه ی باکتری تنها 2 جدایه (105 و 159) به غلظت 200 میلی گرم در لیتر کادمیوم مقاوم بوده اند، و در سطح 500 و 750 میلی گرم در لیتر نیکل (به ترتیب با غلظت های 2/5 و 3/5 برابر غلظت 200 میلی گرم در لیتر کادمیوم)، 10 و 5 جدایه مقاوم موجود می باشند (جدول 1). این یافته نشان دهنده این موضوع می باشد که اثرات منفی کادمیوم بر این جدایه ها بیشتر از نیکل بوده است.

Motesharezadeh و همکاران (2008) گزارش کردند که فراوانی باکتری های مقاوم به سرب، روی و نیکل بیشتر از باکتری های مقاوم به کادمیوم است، همچنین میزان مقاومت باکتری ها به این عناصر بیشتر از کادمیوم است.

آزمون نیمه کمی توان تولید سیدروفور: بر پایه آزمایش های انجام شده، جدایه شماره 159 متعلق به جنس *میکروکوکوس* با نسبت قطر هاله به کلنی 1/7 و 8 جدایه *سودوموناس* با نسبت قطر هاله به کلنی حدود یک، نه روز پس از مایه زنی روی محیط CAS- آگار توان تولید سیدروفور را داشتند. باکتری های افزاینده رشد گیاه از طریق تولید یونوفورها، حلالیت و زیست فرآهمی عناصر کم نیازی مانند آهن، روی، منگنز و مس و رشد گیاه را افزایش و از این راه سمیت عناصر سنگین را کاهش می دهند، از مهمترین یونوفورها می توان سیدروفورها را نام برد که به طور اختصاصی با آهن فریک پیوند داده و افزون بر تامین و افزایش جذب آهن مورد نیاز گیاه در شرایط کمبود آهن (تنش ناشی از عناصر سنگین)، به صورت رقابتی باعث کنترل بیمارگرهای گیاهی نیز می شود (Hu and Boyer, 1996).

آزمون کمی توان تولید IAA: از بین 10 جدایه ی مقاوم به نیکل و کادمیوم، سه جدایه ی شماره 7، 36 و 105 (30٪) به ترتیب با 191/7، 114/5و101/7 میلی گرم در لیتر، بیشترین مقدار اکسین را در مقایسه با باکتری های دیگر تولید کردند (شکل3). با ترشح فیتو هورمون ایندول استیک اسید رشد گیاه و در پی آن جذب آهن، روی، منیزیم، کلسیم، پتاسیم و فسفر

افزایش می یابد و بواسطه آن اثرات منفی عناصر سمی تخفیف می یابد (Khan et al., 2008).



شکل 3- مقایسه غلظت اکسین تولیدی در جدایه های مقاوم

آزمون کیفی توان تولید آنزیم ACC- دآمیناز: از بین 10 جدایه ی مقاوم به نیکل و کادمیوم، جدایه 7 دارای بیشترین توان تولید و جدایه 28 فاقد توان تولید آنزیم ACC- دآمیناز بودند. جدایه های 33، 36 و 105 قادر به تولید حد مطلوبی از آنزیم ACC- دآمیناز می باشند (جدول 2). این باکتری ها با ترشح آنزیم ACC- دآمیناز که آنزیم مهمی در جلوگیری از تولید اتیلن تنشی در گیاه می باشد می توانند ACC را به آمونیوم و α- کتوبوتیریک اسید تبدیل کند و بدین گونه سطح اتیلن تنشی در گیاه را در شرایط سمیت عناصر سنگین کاهش دهد.

جدول 2- تعیین توان تولید آنزیم ACC- دآمیناز در جدایه های مقاوم به فلزات سنگین کادمیوم و نیکل

جدایه	میانگین قطر کلنی 9 روز پس از مایه زنی (mm)			درصد کاهش یا افزایش قطر کلنی نسبت به شاهد مثبت	درصد کاهش یا افزایش قطر کلنی نسبت به شاهد منفی	توان تولید آنزیم ACC- دآمیناز*	اندازه کلنی در محیط ACC*
	NC	PC	ACC				
7	3ijk	3ijk	4/38de	46/5a	46/5a	خیلی زیاد	افزایش قطر نسبت به PC**
36	2/36lm	2/5klm	2/75jkl	16/4Cd	10/0c		
33	2/12m	2/5klm	2/5klm	18/3cd	0d	زیاد	قطر کلنی برابر PC
105	4/5cd	6b	5/75b	27/8bc	-4/17d	متوسط	کاهش قطر نسبت به PC<30٪
76	3/25hij	4/75cd	4/25def	30/8b	-10/5e		
49	3/25hij	4/25def	3/5ghi	7/71e	-17/7f		
100	2/5klm	3/75fgh	3ijk	20/0bc	-20/0f		
75	3/87efg	6/25b	4/5cd	16/4cd	-28/0g		
159	4/62cd	7a	5c	8/12e	-28/6g		
28	2mn	1/5n	2mn	0e	16/87b	فاقد توان	قطر کلنی برابر NC**

* درجه بندی توان تولید آنزیم ACC- دآمیناز در شش گروه خیلی زیاد، زیاد، متوسط، کم(60 < درصد کاهش قطر نسبت به PC ≤30)، خیلی کم (درصد کاهش قطر نسبت به PC ≤60) و فاقد توان صورت گرفت. ** PC: شاهد مثبت، ** NC: شاهد منفی.

جدول 3- مقایسه قطر هاله به کلنی جدایه‌های مقاوم در محیط اسپربر آلی

جدایه	میانگین قطر هاله به قطر کلنی (HD/CD)		
	3 روز	6 روز	12 روز
7	1c	1/07a	1/00c
28	1c	1/07a	1/00c
33	1/18bc	1/24a	1/17bc
36	1/17bc	1/23a	1/17bc
49	1/13bc	1/2a	1/14bc
75	1/5ab	1/4a	1/33ab
76	1/27bc	1/4a	1/31b
100	1/58a	1/65a	1/58a
105	1c	1/07a	1/00c
159	1c	1/07a	1/00c

جدول 4- مقایسه قطر هاله به کلنی جدایه‌های مقاوم در محیط اسپربر معدنی

جدایه	میانگین قطر هاله به قطر کلنی (HD/CD)		
	3 روز	6 روز	12 روز
7	1/57c	1/64d	1/74d
28	1/67c	1/23e	1/38e
33	1/77c	1/52b	2/39b
36	1/65c	2cd	2/11bc
49	2/23b	2/48b	2/46bc
75	1/71c	1/71d	1/84d
76	1d	2/26bc	1/89c
100	2/58a	2/92a	2/96a
105	1d	1e	1/00e
159	1d	1e	1/00e

آزمون نیمه کمی توان انحلال فسفات های آلی و معدنی: در این آزمون توان انحلال فسفات های آلی و معدنی با مشاهده ی هاله ی شفاف پیرامون کلنی و اندازه گیری نسبت قطر هاله به قطر کلنی بررسی شد . جدایه ها از توان بیشتری در انحلال

فسفات آلی برخوردار بودند (جداول 3 و 4). باکتری های محرک رشد گیاه با تولید اسیدهای آلی بویژه اسید گلوکونیک و نیز ترشح پروتون یا با تولید و ترشح آنزیم های فسفاتاز به ترتیب سبب انحلال فسفات های نامحلول معدنی و آلی می گردند، این امر به بهبود تغذیه فسفر و افزایش رشد گیاه می انجامد (Vassilev et al., 2002).

برخی پژوهشگران جلوگیری از ورود ناقل های مواد سمی، افزایش انتشار برون سلولی مواد سمی، آزادسازی کلات کننده های برون سلولی، رسوب یا پیوند مواد سمی روی سطح سلول و آزادسازی آنزیم های برون سلولی که از جذب مواد سمی جلوگیری می کنند یا آنها را به ترکیب های غیر سمی تبدیل می کنند را مکانیسم های مقاومت به عناصر سنگین در باکتری ها ی محرک رشد گیاه معرفی کرده اند (Hall, 2002). همچنین این باکتری ها با تامین عناصر غذایی برای گیاهانی که در برابر سمیت عناصر سنگین قرار دارند، برخی پیامدهای منفی این عناصر روی گیاهان را کاهش داده یا از بین خواهند برد (Vassilev et al., 2002).

نتیجه گیری کلی

جدایه های شماره 105 و 159 نسبت به سطوح بالای هر دو عنصر سنگین کادمیوم و نیکل مقاوم اند. به طوری که در غلظت 200 میلی گرم در لیتر کادمیوم، هر دو جدایه کاهش رشد 33/3 درصدی نسبت به شاهد نشان دادند و در غلظت 1000 میلی گرم در لیتر نیکل، به ترتیب کاهش 52/9 و 45/4 درصدی نسبت به شاهد داشتند. این جدایه ها ضمن داشتن مقاومت به تک تک و یا هر دو فلز سنگین دارای برخی ویژگی های محرک رشد گیاه مانند توانایی تولید اکسین، آنزیم ACC- دآمیناز و سیدروفور و به صورت محدودتر انحلال فسفات های نامحلول بوده اند. این یافته ها نشان می دهند که این جدایه ها علاوه بر مقاومت در برابر سمیت عناصر سنگین می توانند با تولید ایندول استیک اسید و آنزیم ACC- دآمیناز رشد گیاه را افزایش داده و بقای گیاه را در شرایط تنش زای بیرونی مثل تنش عناصر سنگین تضمین کنند. کارآیی پالایش گیاهی تنها وابسته به گیاه نیست، بلکه بر هم کنش ریشه های گیاه با باکتری ها و غلظت عناصر سنگین در خاک نیز دخالت دارد و ثابت شده است که سطوح فلزات سنگین در محیط زیست منجر به آسیب فعالیت های متابولیکی و به دنبال آن کاهش رشد گیاه می شود، بنابراین راه حل کاهش سمیت عناصر سنگین مایه زنی گیاه با ریزموجودات ریزوسفری مقاوم می باشد. بنابراین پیشنهاد می شود، اثرات سویه های مقاوم به عناصر سنگین و با توان تحریک رشد گیاه (PGPR) مانند جدایه های شماره 105 و 159 در راستای افزایش کارآیی گیاه پالایی در بررسی های گلخانه ای و مزرعه ای در پژوهش های آینده مورد توجه قرار گیرد و همچنین فاکتورهای محرک رشد گیاه این ایزوله ها در شرایط حضور مستقیم آلودگی با عناصر سنگین در محیط های کشت آزمایشگاهی اندازه گیری گردد.

REFERENCES

Alloway, B.J. and Jackson, A.P. (1991) The behavior of heavy metals in sewage sludge amended soils. *Sci. Total Environ*, 100, 151-176.

Angle, J.S., McGrath, S.P. and Chaudri, A.M.b(1992) Effects of media components on toxicity of Cd to rhizobia. *Water, Air and Soil Pollution*, 64, 627-633.

Ansari, M.I. and Malik, A. (2007) Biosorption of nickel and cadmium by metal resistant bacterial isolates from agricultural soil irrigated with industrial wastewater. *Bioresource Techn*, 98, 3149-3153.

Benavides, M. P., Gallego, S. M. and Tomaro, M. L. (2005) Cadmium toxicity in plants. *Braz. J. Plant Physiol*, 17(1), 21-34.

Clijsters, H. and Van Assche, F. (1985) Inhibition of photosynthesis by heavy metals. *Photosynth. Res*, 7, 31–40.

Dalal, R.C. (1977) Soil organic phosphorous. *Adv. Agron*, 29, 83-117.

Gadd, G.M. (2004) Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma*, 122, 109–119.

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

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.

Hall, J.L. (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53(366), 1-11.

He, L. Y., Chen, Z. J., Ren, G. D., Zhang, Y. F., Qian, M. and X.F. Sheng. (2009) Increased Cadmium and lead uptake of a cadmium hyperaccumulator tomato by cadmium-resistant bacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(5), 1343-1348.

Hu X.C. and Boyer, G. L. (1996) Siderophore-Mediated aluminum uptake by *Bacillus megaterium* ATCC 19213. *Applied and Environmental*, 62(11), 4044–4048.

Khan, M. S., Zaidi, A., Wani, P. A. and Oves, M. (2008) Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. *Environ Chem Lett*, 7, 1-19.

Joseph, B., Ranjan Patra, R. and Lawrence, R. (2007) Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Plant Production*, 2, 141-152.

Motesharezadeh, B. (2008). Study of the possibility of increasing phytoremediation efficiency in heavy metal-contaminated soil by biological factors. Ph.D. dissertation, University College of Agriculture and Natural Resource, University of Tehran.

Pal, A., Dutta, S.P., Mukherjee, K. and Paul, A.K. (2005) Occurrence of heavy metal resistance in microflora from serpentine soil of Andaman. *J. Basic Microbiol*, 45, 207–218.

Patten, C. L. And Glick, B. R. (2002) The role of bacterial indoleacetic acid in the development of the host plant root system. *Appl Environ Microbiol*, 68,3795– 801.

Penrose, D. M. and Glick, B. R. (2001) levels of ACC and related compounds in exudates and extracts of canola seeds treated with ACC-deaminase-containing plant growth promoting bacteria. *Can. J. Microbial*, 47, 368-372.

Rajkumar, M, Ma, Y. and Freitas, H. (2008) Characterization of metal-resistant plant promoting *Bacillus weihenstephanensis* isolated from serpentine soil in Poetugal. *Basic Microbiology*, 48, 500-508.

Reyhani Tabar, A. (2000). The occurrence of fluorescent pseudomonad population in the wheat rhizospher of cultivated soils of Tehran Province and determination of their plant-growth-promoting potential. M.Sc. dissertation, University College of Agriculture and Natural Resource, University of Tehran.

Salt. DE., Blaylock, M., Kumar, P., Dushenkov, V., Ensley, B.D., Chetand, I. and Raskin, I. (1995) Phytoremediation: A novel strategy for the removal of toxic metals from the environmental using plants. *Biotechnol*, 13, 468-475.

Sarcheshmepour, M. (2009). Evaluation of effectiveness of selected plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) of the Pistacho Trees on the nutrition and growth promotion of seedling under salt and drought stress conditions. Ph.D. dissertation, University College of Agriculture and Natural Resource, University of Tehran.

Schwyn, B. and Neilands, J. B. (1987) Universal chemical assay for detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem*, 160, 47-56.

Sperber, J.I. (1958) The incidence of apatite-solublizing organisms in the rhizosphere and soil. *Aust. Agric. Res*, 9, 778.

Vassilev, A., Vangronsveld, J. and Yordanov, I. (2002) Cadmium phytoextraction: Present state, biological backgrounds and research needs. *BULG. J. Plant Physiol*, 28(3–4), 68–95.