magiran.com

مطالعه میزان تحمل باکتری های ریزوبیوم لگومینوزارم به عنصر روی در دو محیط کشت متفاوت

امیر لکزیان[1] ، مجید بهادریان[2]*

خلاصه

عناصر سنگین در غلظت های بالا برای تمامی میکروارگانیزم ها سمی می باشد. دفع فاضلاب بر روی اراضی کشاورزی بعنوان یکی از منابع اصلی ورود فلزات سنگین به اراضی کشاورزی مطرح می باشد که اثرات مخرب دراز مدتی را بدنبال خواهد داشت. بنابر این مطالعه توانایی تحمل باکتری های خاک به عناصر سنگین اهمیت زیادی دارد. در این آزمایش توانایی تحمل به عنصر روی ۲۵ جدایه ریزوبیوم لگومینوزارم بیوار ویسیه جدا شده از مناطق آلوده و غیر آلوده به عناصر سنگین به دو روش (محیط کشت جامد و روش رزین) مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصله از آزمایش نشان داد که فقط تعدادی از جدایه های خاک های آلوده دارای توانایی تحمل به عنصر روی در غلظتهای بالا بودند و تعدادی از جدایه ها رفتاری مشابه جدایه های خاک های غیر آلوده داشتند. نتایج این آزمایش همچنین نشان داد که روش رزین در مقایسه با روش محیط کشت جامد برای آزمایش سمیت به فلزات سنگین از حساسیت بیشتری برخوردار است. زمانی که تفاوت بین جدایه ها از نظر میزان تحمل به عنصر روی زیاد نباشد روش رزین برای اینگونه مطالعات توصیه میگردد.

واژه های کلیدی :عناصر سنگین، باکتری های ریزوبیوم، سمیت

مقدمه

عناصر سنگین در غلظت های زیاد برای تمام موجودات سمی هستند. تاثیر عناصر سنگین بر روی زنده ماندن و رشد و نمو میکروب ها بسیار مطالعه شده است (۳، ۵ و ۱۴). با توجه به نقش میکروارگانیزم ها در معدنی کردن مواد آلی، چرخه عناصر غذایی و همچنین با توجه به شکل و اندازه و سطح ویژه زیاد آنها، به جرات می توان گفت که میکروارگانیزم های خاک جزء اولین گروه هایی هستند که در معرض عناصر سمی یا هر آلاینده دیگر خاک قرار می گیرند. گزارشهایی وجود دارد که پروکاریوت ها (باکتری ها و اکتینومیست ها) در مقایسه با یوکاریوت ها به عناصر سنگین حساستر می باشند و در بین پروکاریوت ها باکتری ها حساسیت بیشتری از اکتینومیست ها به عناصر سنگین نشان داده اند. سمیت عناصر سنگین برای باکتری های گرم مثبت بیشتر از باکتری های گرم منفی است (۳، ۸ و ۱۵). بنابر این باکتری های گرم منفی از جمله باکتری های ریزوبیوم از حساسترین باکتری های خاک در برابر غلظت زیاد عناصر سنگین محسوب می شوند.

میکرو ارگانیزم ها مکانیزم های مختلفی برای تحمل غلظت های زیاد عناصر سنگین را در فرآیند تکاملی خودشان

* ۱- استادیار گروه خاکشناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد ، ۲- عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور

magiran.com

کسب کرده اند. از جمله این مکانیزم ها ۱) دارا بودن سیستم دفع فلزات از داخل سلول ۲) داشتن دیواره سلولی غیر تراوا نسبت به فلزات خاص ۳) تشکیل کمپلکس های خارج سلولی با فلزات سنگین و ۴) تولید پلی ساکارید های خارج سلولی را می توان نام برد. همه این مکانیزم ها تا حدودی منجر به سمیت زدایی فلزات سنگین برای میکروارگانیزم ها می شود و تحمل و مقاومت آنها را در برابر فلزات سنگین افزایش می دهد (۴). البته بعضی از میکروارگانیزم ها دارای مکانیزم های تحمل غیر فعال به عناصر سنگین نظیر تشکیل کلات های داخل سلولی نیز می باشند (۱۲). تاثیرسمیت عناصر سنگین بر روی باکتری ها معمولا از طریق اضافه کردن عناصر به محیط های کشت آن ها توسط محققین زیادی مطالعه شده است (۱ و ۲). داکسبری (۷) گزارش کرده است که جیوه، کادمیم، مس، نیکل و روی به ترتیب سمیت بیشتری بر روی باکتری های خاک داشته اند. او همچنین غلظت های خاص برای تفکیک باکتری های مقاوم و حساس را نیز پیشنهاد کرده است. البته ذکر این نکته ضروری است که اعداد و ارقام پیشنهادی ایشان فقط برای شرایط همان آزمایش معتبر و قابل قبول می باشد. همچنین فراهمی عناصر سنگین که در مقایسه با غلظت کل فلزات از اهمیت بیشتری در مطالعات سمیت فلزات سنگین برای باکتری ها برخوردار است با تغییر محیط کشت باکتری ها تغییر خواهد کرد. بنابر این اعداد فوق فقط بعنوان یک ایده کلی برای شروع آزمایشات سمیت فلزات می تواند مفید و مورد استفاده قرار گیرد. عزیز و همکاران (۹) نیز تحمل باکتری های سینوریزوبیوم ملیلوتی را به عنصر روی در محیط کشت جامد مورد مطالعه قرار دادند. نتایج آزمایش آنها نشان داد که هیچکدام از جدایه های منطقه آلوده مقاومتی به عنصر روی نشان ندادند. چاودری و همکاران (۵ و ۶) نیز توانایی تحمل به فلزات سنگین جدایه های ریزوبیوم لگومینوزارم بیوار تریفولی جدا شده از دو منطقه آلوده و غیر آلوده را مطالعه کردند. نتایج آن ها نشان داد که جدایه های مناطق آلوده نسبت به مناطق غیر آلوده غلظت های بالاتری از عناصر سنگین از جمله غلظت های بالای عنصر روی را تحمل می کنند. البته زمانیکه از محیط های کشت جامد برای مطالعات مقاومت باکتری ها در برابر فلزات سنگین استفاده می شود معمولا تکرار آزمایش دقیقا منجر به نتایج یکنواخت نمی‌شود زیرا عوامل محیطی نظیر یکنواخت نبودن اجزاء محیط های کشت از جمله عوامل ایجاد تغییر در نتایج می باشد. در بسیاری از موارد حتی غلظت های کم اجزاء محیط کشت روی خصوصیات شیمیایی یون فلزی تاثیر گذار است . بنابر این امکان مقایسه نتایج آزمایش های انجام شده در زمان های مختلف تا حدودی مشکل بوده و انجام آنها خالی از اشکال نخواهد بود. به همین دلیل بسیاری از محققین بدنبال یافتن محیط کشتی بوده اند تا بتوانند مشکلات ناشی از محیط کشت جامد را تا حدودی بر طرف کنند. ازجمله نایت و مگراس (۱۳) روش جدیدی را برای مطالعه توانایی تحمل باکتری ها به عناصر سنگین پیشنهاد کردند. در این روش غلظت عناصر سنگین در طی مدت آزمایش تقریبا ثابت و پایدار باقی می ماند. از طرفی تولید پلی ساکارید های خارج سلولی نیز نمیتواند مانع تاثیر غلظت فلز بر روی سلول ها شود. نتایج آزمایش این محققین که بر روی باکتری های ریزوبیوم لگومینوزارم بیوار تریفولی انجام شده بود نشان داد که جدایه‌های مناطق آلوده در مقایسه با جدایه های مناطق غیر آلوده تحمل بیشتری نسبت به فلزات سنگین داشتند. آن ها همچنین گزارش کردند که برای مطالعات سمیت عناصر سنگین بر روی باکتری ها باید از غلظت یون آزاد استفاده شود زیرا آزمایشات ساده سمیت می تواند سبب نتیجه گیری های غلط شود بهمین دلیل روش رزین را توصیه کردند.

هدف از انجام این تحقیق مطالعه تحمل جدایه های ریزوبیوم لگومینوزارم بیوار ویسیه به عنصر روی در شرایط آزمایشگاهی و همچنین مقایسه دو روش آزمایشگاهی سمیت فلزات سنگین بر روی باکتری های ریزوبیوم لگومینوزارم بیوار ویسیه در دو محیط کشت جامد و محیط کشت مایع حاوی رزین بوده است.

magiran.com

مواد و روش ها

محیط کشت YEMA[1]، TYA[2] و PA[3] تهیه (۱۸) و پس از اتوکلاو و قبل از سرد شدن مقادیر مناسب سولفات روی به عنوان منبع عنصر روی به محیط های کشت اضافه شد (سولفات روی از میکرو فیلتر ۰/۲ میکرون عبور داده شد). سپس مقدار ۱۵ میلی لیتر از محیط های کشت به هر یک از پتری دیش ها در شرایط استریل توزیع شد (۱۸). پس از سرد شدن محیط های کشت پتری دیش ها برای استفاده بعدی در دمای اتاق نگهداری شدند. غلظت های عنصر روی ۳۵، ۴۰، ۴۵، ۵۰ و ۶۰ میلی گرم در لیتر برای مرحله اول آزمایش انتخاب شد.

تلقیح محیط های کشت

پتری دیش های حاوی محیط کشت به چهار قسمت مساوی تقسیم و هر بخش با یک قطره از سلول های شسته شده باکتری های ریزوبیوم لگومینوزارم بیوار ویسیه تلقیح و سپس نمونه ها در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد بمدت ۵ روز نگهداری و سپس میزان رشد هر یک از سویه ها بررسی و یادداشت برداری شد.

تهیه رزین و محیط کشت بافر

رزین تبادلی آمبرلیت ($IRI20^+$) با مش ۱۰۰- ۲۰۰ از کمپانی شیمی آلمان تهیه گردید. رزین اشباع شده با سدیم برابر دستورالعمل با یون کلسیم اشباع و جایگزین یون سدیم شد و سپس در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد خشک گردید. با توجه به این موضوع که با افزایش غلظت عنصر روی باید از غلظت کلسیم اضافه شده کاسته شود لذا از فرمول زیر برای تعیین غلظت کلسیم در برابر غلظت عنصر روی استفاده شد.

$$[Ca] = 1.25 \times (25-(0.4 \times [Zn])) \quad (۱۳)$$

محیط کشت بافر با اضافه کردن ۰/۵ گرم تریپتون، ۰/۵ گرم ویتامین، ۱۰ میلیگرم سولفات منیزیم، ۵ میلی گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات و ۱/۹۵۲ گرم آمبرلیت در لیتر تهیه شد.

۱/۶ گرم رزین اشباع شده با کلسیم به ۴۰ گرم محلول بافر فوق (پس از اضافه کردن مقادیر صفر، ۱۵، ۲۰، ۳۰ و ۵۰ میلیگرم در لیتر عنصر روی) در هر یک از ظروف پلاستیکی اضافه و اتوکلاو شدند. سپس هر یک از ظروف با مقدار مشخصی از سوسپانسیون باکتری تلقیح و تغییرات جمعیت باکتری در هر نمونه بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بروش شمارش کلنی روی محیط کشت YEMA تعیین گردید.

نتایج و بحث

بمنظور بررسی اولیه توانایی تحمل جدایه های ریزوبیوم لگومینوزارم بیوار ویسیه نسبت به عنصر روی، تمامی جدایه ها بر روی محیط کشت های YEMA، TYA و PA کشت داده شدند. نتایج حاصله نشان داد زمانیکه جدایه ها بر روی محیط کشتYEMA رشد داده شدند پلی ساکارید های خارج سلولی زیادی تولید کردند بنحوی که آثار سمیت احتمالی ناشی از عنصر روی قابل تشخیص نبود. برعکس زمانیکه جدایه ها بر روی محیط کشت PA رشد داده شدند آنها از رشد مطلوبی برخوردار نبودند. نتایج نشان داد که محیط کشت PA برای رشد باکتری های ریزوبیوم مناسب نیست. محیط کشت TYA سبب رشد مناسب در جدایه ها شد و هم پلی ساکارید خارج سلولی زیادی تولید نکرد. بنابراین محیط کشتTYA برای آزمون میزان تحمل جدایه ها به عنصر روی انتخاب شد. نتایج حاصله از تاثیر غلظت های مختلف عنصر روی بر رشد جدایه های ریزوبیوم نشان داد که جدایه های مناطق آلوده و غیر آلوده دارای میزان تحمل متفاوتی در برابر عنصر روی هستند (جدول ۱).

بیشتر جدایه ها توانایی رشد در غلظت های ۵۰ میلیگرم روی در لیتر عنصر را در محیط کشت جامد دارا بودند. ضمنا دو جدایه ریزوبیوم لگومینوزارم بیوار تریفولی (F6, S9) در این آزمون مورد بررسی قرار گرفت. چاودری و همکاران(۶) گزارش کردند که جدایهF6 نسبت به عنصر روی حساس و جدایه S9 دارای تحمل بیشتری است. نتایج حاصل از این آزمایش نیز گزارشات چاودری و همکاران (۶) را تایید کرد. بقیه جدایه های استفاده شده در این

۱Yeast Extract Manitol Agar

۲Trypton Yeast Extract Agar

۳ Pepton Agar

magiran.com

آزمایش نیز دارای گستره تحمل متفاوتی بودند. بنظر می رسد که جدایه های مناطق آلوده (جدایه هایی که با شماره های ۶ و ۷ شروع می شوند) نسبت به جدایه های مناطق غیر آلوده تحمل بیشتری به فلز روی نشان دادند. اما استفاده از محیط کشت جامد برای مطالعه توانایی تحمل جدایه های باکتری ها بویژه باکتری های ریزوبیوم خالی از اشکال نیست. بنظر میرسد که این روش از دقت کافی برای تفکیک جدایه‌های حساس و مقاوم برخوردار نیست.

جدول ۱: رشد جدایه های ریزوبیوم لگومینوزارم بیوار ویسیه بر روی محیط کشت TY حاوی مقادیر متفاوت عنصر روی (سه تکرار برای هر سویه)

شماره	جدایه	غلظت عنصر روی (میلیگرم در لیتر)					
		۰	۳۵	۴۰	۴۵	۵۰	۶۰
۱	۲۴	+++	+++	+++	+++	+++	+==
۲	۲۱۰	+++	+++	+++	+++	+++	+==
۳	۲۱۳	+++	+++	+++	+++	+++	===
۴	۲۸	+++	+++	+++	+++	+++	===
۵	۲۲۷	+++	+++	+==	===	===	===
۶	۴۳	+++	+++	+++	+++	==+	===
۷	۴۱۸	+++	+++	+++	+++	+++	===
۸	۴۳۰	+++	+++	+++	+++	+++	===
۹	۴۵۴	+++	+++	+++	+++	+++	+++
۱۰	۴۵۰	+++	+++	+++	+++	+++	+==
۱۱	۵۵	+++	+++	+++	+++	=++	===
۱۲	۵۱۰	+++	+++	+++	+++	+++	===
۱۳	۵۲۵	+++	+++	+++	+++	+++	===
۱۴	۵۱۵	+++	+++	+++	+++	+++	++=
۱۵	۵۲۱	+++	+++	+++	+==	+++	===
۱۶	۶۱۳	+++	+++	+++	+++	+++	+++
۱۷	۶۴۹	+++	+++	+++	+++	+++	===
۱۸	۶۹	+++	+++	+++	+++	+++	+==
۱۹	۶۲۳	+++	+++	+++	+++	+++	+++
۲۰	۶۳۵	+++	+++	===	===	===	===
۲۱	۷۲	+++	+++	+++	+++	+++	++=
۲۲	۷۶	+++	+++	+++	+++	+++	+++
۲۳	۷۹	+++	+++	+++	+++	+++	++=
۲۴	۷۳۵	+++	+++	+++	+++	+++	+++
۲۵	۷۱۵	+++	+++	+++	+++	+==	===
۲۶	F6	+++	+++	+==	===	===	===
۲۷	S9	+++	+++	+++	+++	+++	+++

+ علامت رشد = علامت عدم رشد

گیلر و همکاران (۱۰) دلایل اختلاف نتایج حاصل از آزمایشات متعدد را وجود عوامل موثر در سمیت فلزات سنگین و اختلاف در حساسیت روش های بکار برده شده دانسته اند. روش استفاده از محیط کشت جامد در این آزمایش قادر نبود که تفاوت در توانایی تحمل سویه ها را به عنصر روی نشان دهد بویژه زمانیکه میزان تحمل جدایه ها به عناصر سنگین خیلی زیاد نباشد. بعضی محققین تشکیل کمپلکس ها و رسوب فلزات را در محیط کشت جامد بویژه تغییر نوع یون ها را در طی مراحل رشد میکرارگانیزم ها گزارش کرده اند (۱۱) که این عوامل نیز از جمله محدودیت های این روش محسوب می شود. اما این روش در بعضی موارد بدلیل سادگی و ارزان بودن آن و همچنین بمنظور آگاه شدن از رفتار میکروارگانیزم، می تواند مورد استفاده قرار گیرد هر چند در تفسیر نتایج حاصله از این روش باید دقت بیشتری صورت گیرد.

نتایج حاصل از روش رزین نشان داد که جدایه های خاک های غیر آلوده (۲۸ و ۲۲۷) هیچگونه تحملی را به عنصر روی نشان ندادند (شکل ۱). غلظت ۱۵ میلیگرم روی در لیتر در محیط کشت تاثیری بر سرعت رشد باکتری نداشتند. البته همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است سرعت رشد این جدایه ها قدری کمتر از غلظت صفر میلیگرم روی در لیتر است اما پس از گذشت دو روز تعداد کل سلول باکتری در میلیلیتر محیط کشت برابر شده است. این روند در هر دو جدایه خاک های غیر آلوده مشاهده شد. کاهش سرعت رشد و نهایتا از بین رفتن سلول ها در غلظت های ۳۰ و ۵۰ میلیگرم روی در لیتر در هر دو جدایه مشاهده شد. در غلظت ۵۰ میلیگرم روی در لیتر پس از ۴۸ ساعت تعداد سلول ها در هر دو جدایه به صفر رسید. البته جدایه ۲۸ تحمل بیشتری نسبت به جدایه ۲۲۷ به عنصر روی نشان داد . تعداد سلول های این جدایه بعد از ۷۲ ساعت به صفر رسید که تاخیر در مرگ سلول ها در شکل ۱ نشان داده شده است.

میزان تحمل به روی دو جدایه ۷۱۵ و ۷۳۵ که از خاک‌های آلوده به عناصر سنگین جدا شده اند، متفاوت بود (شکل ۲). جدایه ۷۱۵ نسبت به ۷۳۵ حساسیت بیشتری به

magiran.com

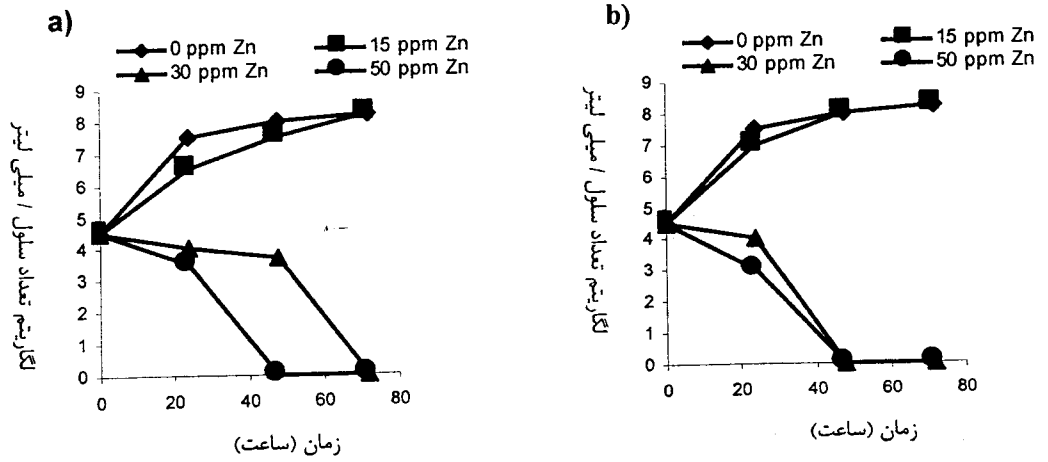
عنصر روی نشان داد. غلظت ۱۵ میلیگرم روی تاثیر منفی در رشد باکتری نداشته و جمعیت باکتری در این تیمار پس از ۷۲ ساعت به میزان جمعیت باکتری در محیط کشت فاقد روی رسید. جدایه ۷۱۵ در غلظت ۳۰ میلیگرم در لیتر عنصر روی پس از ۴۸ ساعت از بین رفت و در غلظت ۵۰ میلیگرم روی تعداد سلول باکتری به صفر رسید.

جدایه ۷۳۵ در غلظت ۳۰ میلیگرم روی در لیتر زنده ماند و جمعیت باکتری تا ۲۴ ساعت ثابت بود و پس از آن تعداد سلول ها با روند بسیار کند افزایش یافت و نهایتا پس از ۷۲ ساعت تعداد سلول ها در هر میلیلیتر محیط کشت به صد هزار رسید. جدایه ۷۳۵ نیز پس از ۴۸ ساعت در غلظت ۵۰ میلیگرم روی در لیتر از بین رفت. دو جدایه F6 و S9 هم بعنوان جدایه های شاهد در این آزمایش مورد مطالعه قرار گرفتند (شکل ۳). همانگونه که قبلا توسط چاودری و همکاران (۶) نشان داده شده بود جدایه F6 نسبت به غلظت ۳۰ میلیگرم روی در لیتر کاملا حساس و رفتاری مشابه جدایه های خاک های غیر آلوده و خاک هایی با آلودگی متوسط داشتند (نتایج نشان داده نشده است). جدایه S9 از میزان تحمل روی بالاتری برخوردار بودکه این نتایج با یافته های چاودری و همکاران (۶) مطابقت داشت. البته اطلاعات موجود در منابع علمی راجع به سمیت فلزات سنگین برای باکتری ها بسیار متغیر است. بات (۲) اعلام کرده است که برآورد سطوح غلظت سمی عناصر سنگین مختلف از منابع علمی عملا غیر ممکن است. تفاوت های بسیار در نتایج ارائه شده در منابع علمی وجود دارد که از عمده ترین این عوامل دگرگونی، تفاوت در حساسیت روش‌های بکار گرفته شده در این آزمایشات را می توان نام برد.

بطور کلی نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که روش استفاده از محیط کشت جامد حاوی عناصر سنگین برای جدایه هایی که از لحاظ میزان تحمل به عناصر سنگین تفاوت کمی را دارا هستند روش مناسبی نمی باشد. استفاده از روش رزین در این آزمایش از حساسیت بیشتری برخوردار بود و تفاوت موجود در میزان تحمل به عنصر روی در بین جدایه های ریزوبیوم لگومینوزارم را کاملا نشان داد. ضمنا از نظر میزان تحمل جدایه های به عناصر سنگین و در این مورد به عنصر روی، تمامی جدایه های باکتری های مناطق آلوده ضرورتا از درجه تحمل بالایی بر خوردار نیستند. احتمالا میکرو ارگانیزمها به زمان بیشتری نیاز دارند تا اینگونه صفات را به شیوه های مختلف از جمله اخذ مواد ژنتیکی از محیط و یا ایجاد موتاسیون کسب در خود نهادینه کنند.

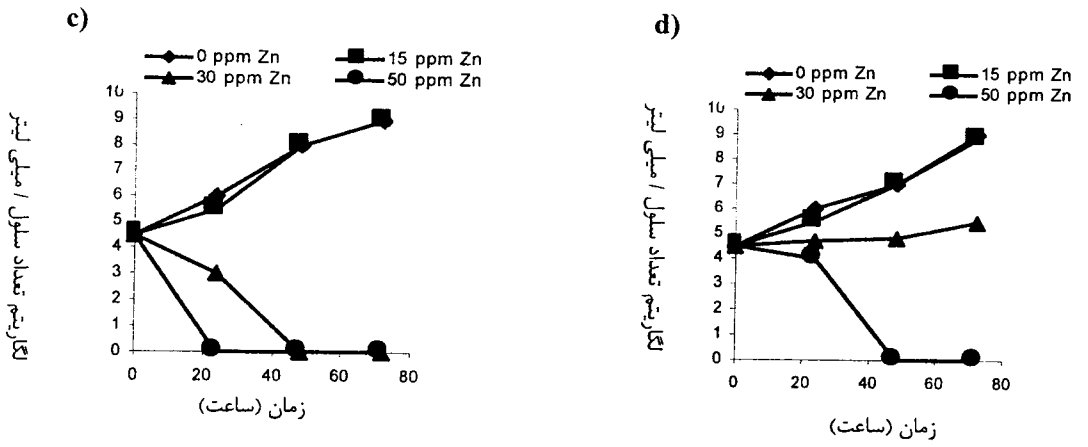
سپاسگزاری

ازکلیه پرسنل بخش میکروبیولوژی دانشگاه لندن بویژه پروفسور گیلر که جدایه های این آزمون را برای این تحقیق فراهم کردند بسیار سپاسگزاریم.

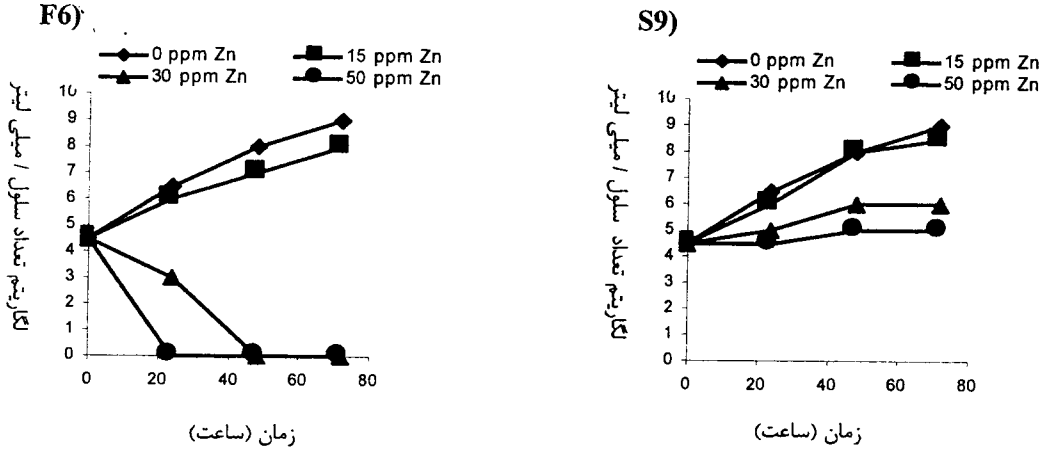


شکل ۱: سرعت رشد جدایه های ۲۸(a) و ۲۲۷(b) ریزوبیوم لگومینوزارم بیوار ویسیه جدا شده از خاک های غیر آلوده به عناصر سنگین در محیط کشت انتخابی حاوی غلظت های متفاوت(Zn) .

magiran.com



شکل ۲: سرعت رشد جدایه های ۷۱۵ (c) و ۷۳۵ (d) ریزوبیوم لگومینوزارم بیوار ویسیه جدا شده از خاک های آلوده به عناصر سنگین در محیط کشت انتخابی حاوی غلظت های متفاوت (Zn) .



شکل ۳: سرعت رشد جدایه ها F6 (جدا شده از خاک های غیر آلوده) و S9 (جدا شده از خاک های آلوده) ریزوبیوم لگومینوزارم بیوار تریفولی در محیط کشت انتخابی حاوی غلظت های متفاوت روی (Zn) . توانایی تحمل به غلظت های بالای عنصر روی در جدایه S9 و حساسیت جدایه F6 به عنصر روی (Zn) که توسط جاودری و همکاران (۶) گزارش شده است.

منابع

1. Angle, j. S., Chaney, R. L., and Rhee, D. (1993). Bacterial resistance to heavy metals related to extractable and total metal concentrations in soil and media. Soil Biology and Biochemistry. 25, 1443-1446.
2. Baath, E. (1989). Effect of heavy metals in soil on microbial processes and populations. Water, Air and Soil pollution. 47,335-379
3. Babich, H., and Stotzky, G. (1985). Heavy metal toxicity to microbe-mediated ecologic processes: A review and potential application to regulatory policies. Environmental Research. 36,111-137.
4. Beveridge, T. J., Hughes, M. N., Lee, H., Leung, K. T., Poole, R. K., Savvaidis I., Silver, S., and Trevors, J. T. (1997).Metal-microbe intractions: Contemporary approaches. Advances in Microbial Physiology. 38, 198-243.

magiran.com

5. Chaudri, A. M., McGrath, S. P., and Giller, K. E. (1992 b). Survival of the indigenous population of Rhizobium *leguminosarum* biovar *trifolii* in soil spicked with Cd, Zn, Cu and Ni salts. Soil Biology and Biochemistry. 24, 625-632.
6. Chaudri, A. M., McGrath, S. P., Giller, K. E., Rietz E., and Sauerbeck, D. R. (1993). Enumeration of indigenous *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* in soil previously treated with metal-contaminated sewage sludge. Soil Biology and Biochemistry. 25, 301-309.
7. Duxbury, T. (1981). Toxicity of heavy metals to soil bacteria. FEMS Microbiology Letters 11, 217-220.
8. Doelman, P., Jansen, E., Michels, M., and van Til, M. (1994). Effects of Heavy metals in soil on microbial diversity and activity as shown by the sensitivity-resistance index, an ecologically relevant parameter. Biology and Fertility of Soil. 17,177-220.
9. El-Aziz, A., Angle, J. S., and Chaney, R. L. (1991). Metal tolerance of *Rhizobium meliloti* isolated from heavy- metal contaminated soils. Soil Biology and Biochemistry 25, 1153-1160.
10. Giller, K. E., and Witter, E., and McGrath, S. P. (1998). Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils. A review. Soil Biology and Biochemistry.
11. Hughus, M. N., and poole, R. K. (1991). Metal speciation and microbial growth the hard (and soft) facts. Journal of General Microbiology 137, 725-734
12. Keasling, J. D., and Hupf, G. A. (1996). Genetic manipulation of polyphosphate metabolism affects cadmium tolerance in *Escherichia coil.* Applied and Environmental microbiology. 62, 743-746.
13. Knight, B. P., and McGrath, S. P. (1995). A method to buffer the concentrations of free Zn and Cd ions using a cation exchange resin in bacterial toxicity studies. Environmental Toxicity and Chemistry. 14, 2033-2039.
14. Kuperman, R. G., and Carreiro, M. M. (1997). Soil heavy metal concentrations, microbial biomass and enzyme in a contaminated grassland ecosystem. Soil Biology and Biochemistry. 29, 179-190.
15. Maliszewska, W., Dec, S., Wierzbicka, H., and Wozniakowska, A, (1985). The influence of various heavy metal compounds on the development and activity of soil micro-organisms. Environmental Pollution. 37, 195-215.
16. McGrath, S. P. (1994). Effects of heavy metals from sewage on soil microbes in agricultural ecosystem. In *Toxic Metals in soil-Plant System* (S. M. Ross, ed.) pp. 242-274. John Wiley and Sons.
17. McGrath, S. P., Chaudri, A. m., and Giller, K. E. (1995). Long term effects of metals in sewage sludge on soils, microorganisms and plants. Journal of Industrial Microbiology. 14, 94-104.
18. Vincent, C. L., (1970). A Manual for the practical study of root-nodule bacteria, Blackwell, Oxford.

magiran.com

Metal tolerance assay of *Rhizobium leguminosarum* to Zinc in two different media.

A. Lakzian , M. Bahadorian[1]

Abstract

Heavy metals are toxic to all microorganisms if present in high concentrations. The disposal of sewage sludge on agricultural land is considered as one of the most important sources of heavy metals contaminations with a long term detrimental effects. Therefore, examination of changes in the zinc tolerance of soil bacteria is an important issue. In this experiment, metal tolerance of 25 isolates of *R. leguminosarum* bv. *Viciae* was investigated with two different (Solid medium and Resin) methods. The results showed that some of isolates originated from contaminated soils had zinc tolerance and some others did not. The results also showed that the Resin method had a better sensitivity compared to solid media for evaluating the metal tolerance. Resin method is recommended when the difference in metal tolerance among isolates is subtle.

Key words: Heavy metals, Rhizobia bacteria, Toxicity

1- Contribution from College of Agriculture , Ferdowsi University of Mashhad and Neishabor Azad University