تأثیرکاربرد سودوموناس‌های فلورسنت حل‌کننده فسفات بر جذب کادمیوم توسط ذرت در یک خاک آلوده

عبدالرضا اخگر[1]، الهام احمدی‌نیا، محسن حمیدپور و حسین شیرانی

دانشیار گروه علوم خاک دانشگاه ولی عصر رفسنجان؛ **arakhgar@yahoo.com**

دانشجوی سابق کارشناسی ارشد دانشگاه ولی عصر رفسنجان؛ **elhami_eh8929@yahoo.com**

دانشیار گروه علوم خاک دانشگاه ولی عصر رفسنجان؛ **mohsen_hamidpour@yahoo.com**

استاد گروه علوم خاک دانشگاه ولی عصر رفسنجان؛ **shirani379@yahoo.com**

دریافت: **98/5/22** پذیرش: **98/9/27**

چکیده

کادمیوم بدلیل سمی بودن و نیمه عمر طولانی در بدن انسان و حیوان از اهمیت ویژه‌ای در کشاورزی برخوردار می‌باشد. امروزه سعی بر آن است تا از باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR) برای افزایش زیست فراهمی و جذب فلزات سنگین در خاک‌های آلوده استفاده شود. هدف این پژوهش بررسی کارایی باکتری‌های سودوموناس فلورسنت مقاوم به کادمیوم با توانایی حل فسفات های معدنی بر جذب کادمیوم توسط ذرت در یک خاک آلوده بود. بدین منظور یک آزمایش گلخانه‌ای به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار انجام گرفت. تیمارها شامل چهار سطح باکتری (بدون باکتری (P0)، تلقیح با سه جدایه P1، P169 و P108) و چهار سطح زمان بعد از کشت (سه، شش، نه و دوازده هفته) بودند. خاک‌ها بطور مصنوعی با 13 میلی‌گرم بر کیلوگرم کادمیوم از منبع نیترات کادمیوم آلوده گردیدند. نتایج نشان داد تلقیح ذرت با جدایه‌های منتخب به طور معنی‌داری وزن خشک بخش هوایی و ریشه و نیز جذب کادمیوم بخش هوایی و ریشه را افزایش داد. بیشترین وزن خشک بخش هوایی مربوط به زمان 12 هفته با تلقیح باکتری P169 بود (31/22 درصد افزایش نسبت به شاهد). باکتری‌های P1 و P108 در هفته 12 اختلاف معنی‌داری با باکتری P169 نداشتند. هم‌چنین این ایزوله‌ها (P1 و P108) وزن خشک بخش هوایی را نسبت به شاهد به‌ترتیب معادل 23/81 و 25/21 درصد افزایش دادند. بیشترین جذب کادمیوم بخش هوایی ذرت در 12 هفته با تلقیح باکتری P169 بدست آمد. در هفته 12، باکتری P169 جذب کادمیوم بخش هوایی را نسبت به شاهد معادل 150 درصد و نسبت به دو جدایه P1 و P108 به ترتیب به میزان13/81 و 37/75 درصد افزایش داد. اگرچه کاربرد تمام جدایه‌های مورد استفاده در آزمون گلخانه‌ای به طور معنی‌داری باعث افزایش جذب کادمیوم توسط ذرت شدند؛ لیکن تأثیر و کارایی جدایه P169 بیشتر از سایر جدایه‌ها بود.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه، فسفر، فلزات سنگین

---

[1] نویسنده مسئول، آدرس: رفسنجان، دانشگاه ولی عصر، دانشکده کشاورزی، گروه مهندسی علوم خاک

مقدمه

خاک به عنوان جزئی از بیوسفر، نقش مهمی در تولید غذا و پایداری محیط زیست دارد. افزایش جمعیت و به همراه آن گسترش صنایع بدون رعایت مسائل و استانداردهای زیست محیطی سبب آلودگی محیط زیست می‌گردد (زارعی و همکاران، 1390). به طور کلی هر نوع تغییر در ویژگی‌های اجزای تشکیل‌دهنده محیط به طوری که عملکرد طبیعی و تعادل زیستی آن مختل گردد و به طور مستقیم یا غیر مستقیم منافع و حیات موجودات زنده را به مخاطره اندازد، آلودگی محیط زیست گفته می‌شود (دبیری، 1375). در یک نوع تقسیم‌بندی، منابع آلاینده را به دو دسته نقطه‌ای (در یک نقطه متمرکز و معمولاً دارای غلظت بالای آلاینده‌ها) و غیرنقطه‌ای (دارای غلظت کمتر و دامنه انتشار وسیع‌تر) تقسیم می‌کنند (عرفان‌منش و افیونی، 1379). در حال حاضر منابع آلاینده‌های غیرنقطه‌ای به عنوان مهم‌ترین عوامل آلوده‌کننده‌ی آب و خاک در مقیاس جهانی به شمار می‌روند و کشاورزی و حمل و نقل، بیشترین سهم را در ایجاد این نوع آلاینده‌ها دارند (وهاب‌زاده، 1372).

یکی از مهم‌ترین آلاینده‌های خاک، فلزات سنگین می‌باشند. فلزات سنگین به فلزاتی گفته می‌شود که وزن مخصوص آن‌ها بیشتر از 5/5 گرم برسانتی‌متر مکعب باشد. فلزات سنگین پایدار، غیر قابل تجزیه و در غلظت بالا سمی هستند (ایجاگبمی و همکاران، 2009). پایداری فلزات سنگین باعث تجمع آنها در مواد غذایی و محیط زیست شده، صدمات مهم و جبران ناپذیری را ایجاد می‌کنند (فو و همکاران، 2008). در بین فلزات سنگین، کادمیوم به علت نیمه‌عمر طولانی در بدن انسان و حیوانات و نیز سمی بودن، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (گوپتا و باتاچاریا، 2008). کودهای فسفاته و لجن فاضلاب از مهم‌ترین منابع کادمیوم در خاک‌ها به‌شمار می‌روند (کاباتا-پندیاس و پندیاس،2001). متوسط جهانی غلظت کادمیم در خاک 0/06- 1/1 میلی‌گرم در کیلوگرم گزارش شده است (کاباتا-پندیاس و پندیاس،2001). متوسط مقایر گزارش شده این عنصر در خاک‌های ایران قابل مقایسه با متوسط جهانی است. امینی و همکاران (2005) متوسط غلظت کادمیوم در خاک‌های مناطق مرکزی ایران را 1/7 میلی‌گرم در کیلوگرم گزارش و مهم-ترین مسیر ورود کادمیوم به خاک‌های زراعی اصفهان را استفاده از کودهای فسفاته ذکر کردند.

غلظت مجاز کادمیوم کل از 1 تا 5 میلی‌گرم در کیلوگرم خاک می‌باشد (کارینی، 1995). همچنین غلظت کادمیوم در گیاه بین 0/03 تا 2 میلی‌گرم بر کیلوگرم و حد بحرانی آن 5 تا 10 میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک است (کلر و همکاران، 2005).

زیست فراهمی و تحرک فلزات سنگین در خاک‌ها و جذب آنها توسط گیاه به عوامل مختلفی مانند غلظت فلزات سنگین در محلول خاک، پی‌اچ خاک، ظرفیت تبادل کانیونی خاک، شوری خاک، توانایی فلز در تشکیل کمپلکس با لیگاندهای آلی موجود در محیط ریشه گیاه (ریزوسفر) و نوع گیاه بستگی دارد (حمیدپور و همکاران، 1391). نتایج پژوهش لیو و همکاران (2015) نشان داد انتقال کادمیوم از خاک به رقم‌های مختلف گندم به شدت به پی‌اچ خاک بستگی دارد.

آلودگی خاک با فلزات سنگین در حال تبدیل شدن به یکی از مسائل بسیار مهم زیست محیطی است (جیانگ و همکاران، 2008). کارآیی گیاهان در جذب فلزات سنگین، تنها به گیاه مورد نظر وابسته نیست، بلکه به روابط متقابل میان ریشه گیاه با میکروارگانیسم‌های خاک و غلظت قابل جذب فلزات سنگین نیز بستگی دارد (ونگ و همکاران، 1989). باکتری‌های ریزوسفری مفید خاک و از جمله باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه (PGPR) می‌توانند از طریق اعمال مکانیسم‌های محرک رشد ضمن افزایش زیست فراهمی فلزات سنگین باعث افزایش تولید زیست‌توده گیاهی و همچنین افزایش تحمل گیاهان به فلزات سنگین شوند (چن و همکاران، 2010).

روابط متقابل میان ریشه گیاه و میکروارگانیسم‌های خاک می‌تواند موجب بهبود قابلیت جذب زیستی فلزات سنگین موجود در ریزوسفر گیاه گردد (ساراوانا و همکاران، 2007). باکتری‌های PGPR، قادرند از طریق تولید کلات‌ها و نیز ترشح اسیدهای آلی باعث افزایش حلالیت فرم‌های غیر قابل دسترس ترکیبات معدنی دارای فلز سنگین شوند (کالینوسکی و همکاران، 2000). گونه‌های سودوموناس فلورسنت نیز به دلیل دارا بودن سازوکارهای مختلفی از جمله تولید هورمون‌های گیاهی، انحلال فسفات‌های نامحلول، تولید سیدروفور و آنزیم ACCدآمیناز که مقدار اتیلن در گیاه را تنظیم می کند، سبب تحریک رشد گیاه شده (عبدل‌جلیل و همکاران، 2007)، زیست توده گیاهی را افزایش می‌دهند. این باکتری‌ها همچنین از طریق ترشح اسیدهای آلی قادرند انحلال پذیری شکل‌های غیر قابل دسترس کانی‌های معدنی حاوی فلز سنگین را بالا برده فراهمی آنها را در خاک افزایش دهند (کالینوسکی و همکاران، 2000).

با عنایت به مطالب فوق و با توجه به نقش باکتری-های PGPR و بخصوص حل‌کننده‌های فسفات‌های معدنی در افزایش زیست توده گیاهی و فراهمی عناصر در

خاک؛ این پژوهش به منظور بررسی اثر برخی باکتری‌های سودوموناس فلورسنت حل کننده فسفات بر جذب کادمیوم توسط ذرت در یک خاک آلوده انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

به منظور جداسازی باکتری‌های سودوموناس فلورسنت مقاوم به کادمیوم از ریزوسفر، تعداد 7 نمونه از خاک ریزسفری گیاهان زراعی و غیرزراعی از اراضی آلوده به کادمیوم اطراف معدن باما واقع در منطقه آب نیل اصفهان با مختصات E″24′34°51 و N″48′30°32 برداشته و به آزمایشگاه بیولوژی خاک دانشگاه ولی عصر رفسنجان منتقل شد.

جداسازی باکتری‌های سودوموناس فلورسنت ریزوسفری

به‌منظور جداسازی باکتری‌های ریزوسفری، ابتدا خاک‌های اضافی اطراف ریشه ذرت با دقت جدا شدند و برای هر نمونه، مقدار 10 گرم از خاک ریزوسفری به‌همراه مقادیری ریشه فرعی به ارلن 250 میلی‌لیتری حاوی 90 میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک (کلرید سدیم 0/85 درصد) منتقل و پس از افزودن یک قطره توئین20 به مدت نیم‌ساعت شیکر گردید. سپس از سوسپانسیون حاصل، رقت‌های مختلف (10^{-3} تا 10^{-7}) تهیه و یک‌دهم میلی‌لیتر از هر رقت بر سطح محیط کشت جامد king B پخش گردید. پس از 48ساعت از رشد باکتری‌ها، مجموعاً 7 کلونی از بالاترین رقت‌های نمونه‌ها که در معرض نور UV دارای تلالؤ فلورسانس بودند انتخاب و خالص‌سازی شدند (برگی، 1984)

ارزیابی مقاومت جدایه‌ها به کادمیوم

به‌منظور ارزیابی مقاومت جدایه‌ها به کادمیوم، هر نمونه باکتریایی در30 میلی‌لیتر محیط کشت king B حاوی سطوح مختلف کادمیوم (0، 15، 30، 45، 60، 75 و 90 میلی‌گرم در لیتراز منبع کادمیوم کلرید) در دو تکرار کشت داده شد. رشد باکتری در محیط کشت حاوی غلظت معین کادمیوم به منزله مقاومت باکتری به کادمیوم در آن غلظت در نظر گرفته شد.

توانایی جدایه‌های مقاوم به کادمیوم در حل تری‌کلسیم فسفات

به‌منظور بررسی توان جدایه‌ها در انحلال فسفات‌های معدنی نامحلول، از محیط کشت اسپربر استفاده گردید (اسپربر، 1958). 100 میکرولیتر از سوسپانسون هر باکتری به 30 میلی‌لیتر محیط اسپربر مایع انتقال یافت. نمونه‌ها به‌مدت 120 ساعت بر روی شیکر با 150 دور در دقیقه و دمای 28 درجه سلسیوس تکان داده شدند. پس از این مدت، pH نمونه‌ها قرائت و بلافاصله سوسپانسون باکتری سانتریفیوژ و یک میلی‌لیتر از محلول رویی با سه میلی‌لیتر آب مقطر و یک میلی‌لیتر معرف آمونیوم مولیبدات-وانادات مخلوط گردید. پس از گذشت 20 دقیقه، میزان جذب نور با استفاده از اسپکتروفتومتر در 470 نانومتر قرائت و مقدار فسفر آزادشده توسط هر جدایه با استفاده از منحنی استاندارد تهیه‌شده از غلظت‌های 0، 5، 10، 15، 20 و 25 میلی‌گرم در لیتر KH_2PO_4 محاسبه گردید.

اندازه‌گیری توانایی تولید اکسین

به منظور اندازه‌گیری میزان تولید اکسین (IAA[1]) جدایه‌ها از روش بنت و همکاران (2001) با کمی تغییرات استفاده شد. 50 میکرولیتر از سوسپانسیون هر یک از جدایه‌ها به 25 میلی‌لیتر محیط NB حاوی 50 میکروگرم در میلی‌لیتر ال- تریپتوفان منتقل و برای 72 ساعت شیکر گردید. پس از گذشت این مدت سوسپانسیون مذکور سانتریفیوژ و یک میلی‌لیتر از محلول رویی با 4 میلی‌لیتر از معرف سالکوفسکی مخلوط و به مدت 20 دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. میزان جذب نور در طول موج 535 نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر قرائت گردید. مقدار تولید اکسین توسط هر جدایه از مقایسه جذب نور با منحنی استاندارد تهیه شده با غلظت-های 0، 5، 10، 15، 20 و 30 میلی‌گرم در لیتر از ایندول استیک اسید محاسبه گردید.

اندازه‌گیری توانایی تولید سیدروفور

به‌منظور ارزیابی توان جدایه‌ها در تولید سیدروفور از محیط Cas Blue Agar استفاده شد (الکساندر و زوبر؛ 1991). در این روش سوسپانسیون جدایه‌ها تهیه و از طریق لکه‌گذاری در محیط Cas- Agar کشت داده شدند. هم‌زمان با تلقیح جدایه‌های مورد آزمایش، از یک سویه واجد توان تولید سیدروفور به عنوان شاهد مثبت و از یک سویه فاقد توان تولید سیدروفور به عنوان شاهد منفی نیز استفاده گردید. توانایی تولید سیدروفور جدایه‌ها از طریق اندازه‌گیری هاله نارنجی رنگ تشکیل شده در اطراف کلنی باکتری‌ها و در فواصل زمانی مختلف ارزیابی گردید.

آزمون گلخانه‌ای

آزمون گلخانه‌ای به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با 4 تکرار انجام گرفت. فاکتورها شامل باکتری در چهار سطح (بدون باکتری(P0)، تلقیح با سه جدایه P1، P169 و P108) و زمان در چهار سطح (3، 6، 9 و 12 هفته) بودند.

---

1. Indole 3-acetic acid

تهیه و آماده‌سازی خاک برای کشت

هر گلدان با مخلوط یک کیلوگرم خاک الک شده و یک کیلوگرم ماسه بادی شسته شده پر شدند. برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک در جدول 1 آمده است. برای آلوده کردن خاک از 13 میلی‌گرم بر کیلوگرم کادمیوم از منبع نیترات کادمیوم ($Cd(NO_3)_2$) استفاده گردید. بدین منظور مقدار معینی از محلول مورد نظر به بخش کوچکی از خاک اضافه و سپس خاک آلوده حاصل با تمام خاک مخلوط شد تا توزیع یکنواختی در خاک ایجاد گردد. به منظور تعادل بین محلول خاک محتوی کادمیوم با فاز جامد خاک، خاک‌ها در کیسه پلاستیکی به مدت سه ماه در رطوبت مناسب و دمای گلخانه خوابانده شدند.

جدول 1- برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد مطالعه

پارامتر	خصوصیت
بافت	لوم شنی
فسفر (میلی‌گرم در کیلوگرم)	10/67
pH گل اشباع	7/90
قابلیت هدایت الکتریکی (dS/m)	1/1
ماده آلی (درصد)	0/4
ظرفیت تبادل کاتیونی (mmol/kg)	8/5

تهیه مایه تلقیح

جدایه‌های منتخب به‌مدت 48 ساعت درون محیط کشت مایع TSB[1] کشت و پس از هم‌سان نمودن تراکم سوسپانسیون‌ها با جمعیت 10^8 cfu/ml به‌عنوان مایه تلقیح مورد استفاده قرار گرفتند.

جوانه‌دار کردن بذرها

در این آزمون از بذرهای ذرت رقم سینگل‌گراس 704 استفاده گردید. بذرها پس از ضدعفونی سطحی به مدت 48 ساعت در دمای 25 درجه سلسیوس بر روی محیط آب-آگار قرار داده شدند تا جوانه‌دار شوند.

کشت در گلدان‌ها

در این آزمون از گلدان های پلاستیکی دو کیلوگرمی استفاده شد. کوددهی خاک گلدان‌ها با عناصر غذایی نیتروژن از منبع اوره (در دو نوبت) و پتاسیم از منبع سولفات پتاسیم و براساس آزمون خاک صورت گرفت. در هر گلدان تعداد 8 بذر ذرت جوانه‌دار شده کشت شد. هنگام کاشت، هر بذر با یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری موردنظر تلقیح گردید و گلدان‌ها با آب مقطر و به روش وزنی در حد 70 درصد ظرفیت زراعی آبیاری شدند. پس از استقرار کامل نهال‌ها (حدود دو هفته پس از کشت)، در هر گلدان تعداد 5 نهال که از نظر اندازه مشابه بودند نگه داشته و بقیه نهال‌ها از گلدان‌ها خارج گردیدند. گلدان‌ها به‌مدت دو ماه و نیم در شرایط گلخانه با نور طبیعی و دمای 1± 25 نگه‌داری شدند.

اندازه‌گیری محتوای کلروفیل

یک روز قبل از برداشت، مقدار کلروفیل به‌روش آرنون (1949) و بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر اندازه‌گیری شد. برای این کار ابتدا، 0/25 گرم از برگ تازه گیاه با 10 میلی‌لیتر استن 80 درصد در هاون چینی سائیده شد. سوسپانسیون حاصل به مدت 10 دقیقه در 3500 دور در دقیقه در دمای 4 درجه سلسیوس سانتریفیوژ و محلول فوقانی صاف گردید. مقدار جذب محلول فوقانی با دستگاه اسپکتروفتومتر مدل T80UV/VIS در طول موج‌های 663/6، 646/6 و 470 نانومتر قرائت گردید در نهایت مقادیر کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها با استفاده از فرمول‌های زیر بدست آمد.

$$\text{Chlorophyll a (mg/g)} = (12.7\,(A_{663}) - 2.69\,(A_{645})) \times (V/1000W)$$

$$\text{Chlorophyll b (mg/g)} = (22.9\,(A_{645}) - 4.68\,(A_{663})) \times (V/1000W)$$

$$\text{Total chlorophyll (mg/g)} = (20.2\,(A_{645}) + 8.02\,(A_{663})) \times (V/1000W)$$

$$\text{Carotenoids (mg/g)} = ((1000\,(A_{470}) - 3.27[\text{chl a}] - 104[\text{chl b}])/227) \times (V/1000W)$$

V = حجم نهایی عصاره (میلی‌لیتر)

W = وزن تر نمونه (گرم)

A = میزان جذب نور

برداشت و اندازه‌گیری عناصر

برای عملیات برداشت، ابتدا بخش هوایی گیاه از محل طوقه قطع شد. ریشه‌ها نیز از خاک خارج و پس از شستشو با آب مقطر مورفولوژیکی آنها بررسی گردید. بخش هوایی و ریشه گیاهان بطور جداگانه درون آون در دمای 65 درجه سلسیوس خشک و سپس توزین شدند. نمونه ها توسط آسیاب برقی پودر گردیدند. نیم‌گرم از هر نمونه پودر شده به داخل بوته چینی منتقل و در دمای

1. Trypton Soya Bean

550 درجه سلسیوس داخل کوره به‌روش خشک سوزانی خاکستر شدند. برای تهیه عصاره، 5 میلی‌لیتر اسیدکلریدریک 2 نرمال به هر یک از نمونه‌ها افزوده و پس از عبور از کاغذ صافی به حجم 50 میلی‌لیتر رسانده شد. کادمیوم بوسیله جذب اتمی Awanta مدل GBC_932 اندازه‌گیری شد (کوتینی، 1980).

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه واریانس تمامی داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS صورت گرفت و مقایسه میانگین‌ها بر مبنای آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. هم چنین نمودارها و جدول‌های مربوطه با استفاده از برنامه‌های Excel و Word رسم گردید.

نتایج و بحث

مقاومت جدایه‌ها به کادمیوم

مقاومت باکتری‌ها به کادمیوم در جدول (2) نشان داده شده است. جدایه P5 بیشترین مقاومت به کادمیوم (75 میلی‌گرم در لیتر) را داشت. دو جدایه P4 و P7 تا سطح 45 میلی‌گرم در لیتر و سایر جدایه ها تا سطح 30 میلی‌گرم در لیتر مقاوم بودند. هم چنین از بین سه باکتری ، باکتری P169 تا سطح 60 میلی‌گرم در میلی‌لیتر و دو باکتری P108 و P11 تا سطح 30 میلی‌گرم در لیتر مقاوم به کادمیوم بودند. گزارش شده است که حدود 50 درصد از باکتری‌های جدا شده از خاک لوم شنی آلوده به فلزات سنگین، مقاوم به کادمیوم هستند (پیوتروسکا و همکاران، 2005).

جدول 2- ارزیابی مقاومت جدایه‌ها به سطوح کادمیوم

جدایه	سطوح کادمیوم (mgl^{-1})						
	0	15	30	45	60	75	90
P_1	+	+	+	-	-	-	-
P_2	+	+	+	-	-	-	-
P_3	+	+	+	-	-	-	-
P_4	+	+	+	+	-	-	-
P_5	+	+	+	+	+	+	-
P_6	+	+	+	-	-	-	-
P_7	+	+	+	+	-	-	-
P_{169}	+	+	+	+	+	-	-
P_{108}	+	+	+	-	-	-	-
P_{11}	+	+	+	-	-	-	-

+ و - : به ترتیب وجود و عدم وجود ویژگی مورد نظر

توانایی جدایه‌ها در حل فسفات‌های معدنی

نتایج تجزیه واریانس تأثیر جدایه ها بر حلالیت تری-کلسیم فسفات در محیط اسپربر مایع و pH محیط کشت در جدول 3 نشان داده شده است. با توجه به نتایج این جدول جدایه ها اثر معنی‌داری در سطح یک درصد بر حلالیت فسفر و pH محیط کشت داشتند.

جدول 3- تجزیه واریانس حلالیت تری کلسیم فسفات و pH در محیط کشت اسپربر

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		غلظت فسفر آزاد شده (mgL^{-1})	pH
جدایه	9	34748/69**	1/64**
خطا	20	208/3	0/016
CV	-	7/47	2/82

** معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

نتایج مقایسه میانگین تأثیر جدایه‌ها بر حلالیت فسفر در محیط مایع (جدول 4) نشان داد که تمامی جدایه ها قادر به انحلال تری‌کلسیم فسفات در این محیط بودند. بیشترین حلالیت فسفر با 401/44 میلی‌گرم در لیتر از

جدایه P1 به‌دست آمد که با هیچ‌کدام از جدایه‌ها در یک سطح آماری قرار نگرفت. همچنین تلقیح محیط اسپربر مایع با دو جدایه P1 و P4 باعث شد که pH محیط از 7/2 به‌ترتیب به 3/38 و 5/45 کاهش یابد. در این پژوهش هم بستگی منفی و معنی‌داری (r =0/50) بین غلظت فسفر و pH محیط کشت حاوی تری‌کلسیم‌فسفات مشاهده گردید. باکتری‌های حل کننده فسفات که در ریزوسفر به وفور یافت می‌شوند با ترشح اسیدهای آلی قادرند ترکیبات فسفات معدنی کم‌محلول را به فرم قابل استفاده برای گیاه در آورند (ناهاس، 1996). در تحقیقی گزارش شده است که سه سویه سودوموناس فلورسنت MCO7، M45 و B16 قادر به آزاد کردن فسفر به ترتیب به مقدار 458/3، 447/6 و 427/7 میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت پیکوسفکایا (PKV) بودند. همچنین این جدایه‌ها pH محیط را از 7 به 4/1، 4/3 و 4/5 کاهش دادند (جون و همکاران، 2003). در تحقیقی دیگر نشان داده شد که باکتری‌های *Bacillus* sp. و *Pseudomonas* sp. جداشده از خاک‌های آلوده به کادمیوم، حلالیت فسفر را به‌ترتیب به‌مقدار 12/23 و 9/72 میلی‌گرم در لیتر افزایش دادند و pH محیط را نیز از 7 به 3/78 و 5/1 کاهش دادند (سوسیلوتی و سیخفانی،2014).

جدول 4- مقایسه میانگین غلظت فسفر و pH محیط کشت اسپربر

شماره جدایه	غلظت فسفر آزاد شده ($\mu g\ ml^{-1}$)	pH
P_1	401/44a	3/38f
P_2	138/07de	3/69e
P_3	121/02ef	5/39a
P_4	94/5g	5/45a
P_5	161/22d	5/07b
P_6	139/03de	5/1b
P_7	158/97d	4/91b
P_{169}	329/73b	4/1d
P_{108}	292/1fc	4/34c
P_{11}	96/5fg	3/94d

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در هر ستون فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد به‌روش دانکن می‌باشند.

انتخاب جدایه‌ها برای آزمون گلخانه‌ای

با توجه به نتایج حاصل از آزمون‌های توانایی جدایه‌ها در مقاومت به کادمیوم و حل تری کلسیم فسفات، جدایه P1 از مزارع آلوده به کادمیوم در اصفهان و دو جدایه P169 و P108 که از مؤسسه تحقیقات خاک و آب تهیه شده بود برای آزمون گلخانه‌ای مورد استفاده قرار گرفتند.

توان تولید اکسین و سیدروفور جدایه‌های منتخب

نتایج نشان داد که میزان اکسین تولیدشده در جدایه P169 و P108 به‌ترتیب 3/98 و 2/15 میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و جدایه P1 نسبت به دو جدایه فوق میزان اکسین کمتری معادل 0/18 میکروگرم بر میلی‌لیتر تولید می‌کرد. هم‌چنین نتایج آزمون تولید سیدروفور نشان داد که نسبت قطر هاله به کلونی جدایه P1، P169 و P108 به ترتیب 2/13، 1/92 و 1/50 بود.

تأثیر جدایه‌های منتخب و سطوح زمان بر برخی شاخص‌های رشدی و فیزیولوژیک ذرت

نتایج تجزیه واریانس تأثیر جدایه‌های منتخب و سطوح زمان بر شاخص‌های رشدی و فیزیولوژیک ذرت در جدول 4 نشان داده شده است. تیمارهای باکتری بر وزن خشک بخش هوایی و ریشه و نیز بر مقدار کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئید در سطح یک درصد اثر معنی‌داری داشتند. هم‌چنین تیمار زمان اثر معنی‌داری در سطح یک درصد بر تمامی پارامترهای رشدی و فیزیولوژیکی اندازه‌گیری‌شده داشت. برهم‌کنش تیمارهای باکتری و سطوح زمان بر وزن خشک بخش هوایی و کلروفیل a در سطح پنج درصد و بر کلروفیل کل و کاروتنوئید در سطح یک درصد معنی‌دار شد.

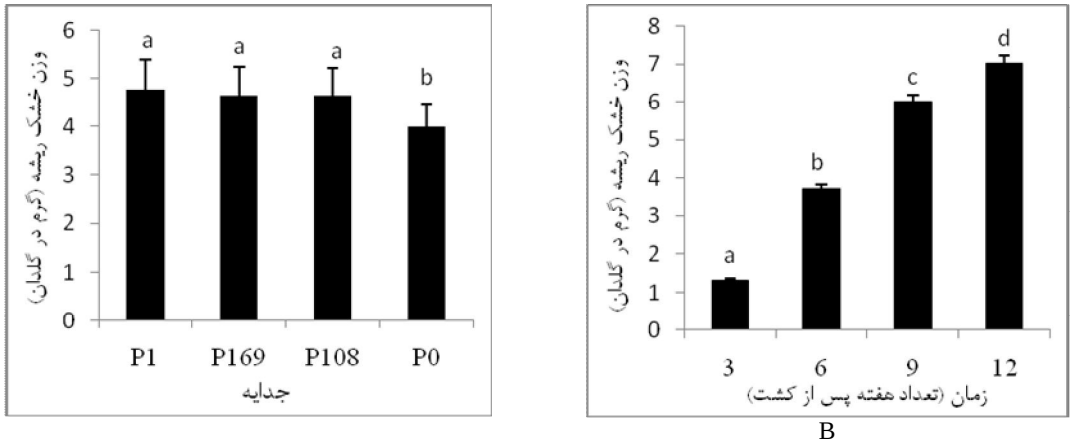
جدول 4- تجزیه واریانس تأثیر جدایه‌های منتخب و سطوح زمان و اثرات متقابل آنها بر شاخص‌های رشدی و فیزیولوژیک ذرت

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین‌مربعات					
		وزن خشک بخش هوایی	وزن خشک ریشه	کلروفیلa	کلروفیل b	کلروفیل کل	کاروتنوئید
جدایه	3	7/8648**	1/97**	0/936**	0/11**	1/83**	57/05**
زمان	3	568/87**	103/12**	1**	0/11**	1/32**	84/84**
جدایه × زمان	9	2/0214*	0/52ns	0/043ns	0/03ns	0/17**	9/93**
خطا	48	0/92	0/26	0/02	0/011	0/04	1/84
CV	_	13/43	11/26	22/22	43/17	24	24

تأثیر جدایه‌های منتخب و سطوح زمان بر شاخص‌های رشد

مقایسه میانگین‌ها نشان داد که کاربرد سه جدایه P1، P169 و P108 باعث افزایش معنی‌دار وزن خشک ریشه به ترتیب معادل 19/55، 16/54 و 16/04 درصد نسبت به شاهد شد؛ لیکن بین این سه جدایه تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید (شکل A-1). همچنین نتایج نشان داد که با افزایش زمان، وزن خشک ریشه افزایش یافت (شکل B-1).

برد و همکاران (2000) گزارش کردند که برخی از باکتری‌های محرک رشد با تولید ترکیبات خاصی می‌توانند رشد گیاه را به‌طور معنی‌داری در حضور فلزات سنگین افزایش دهند. شنگ و زیا (2006) نشان دادندکه در اراضی آلوده به کادمیوم، وزن خشک ریشه کلزا در حضور سه باکتری از جنس‌های *باسیلوس*، *سودوموناس* و *زانتوموناس* به میزان 8 تا 20 درصد افزایش یافت.



A B

شکل 1- تأثیر کاربرد تیمارهای جدایه و زمان بر وزن خشک ریشه ذرت (به ترتیب A و B)

نتایج مقایسه میانگین اثر برهم‌کنش تیمارهای جدایه و زمان بر وزن خشک بخش هوایی ذرت نشان داد که بین تیمارهای جدایه تا هفته ششم اختلاف معنی داری مشاهده نشد و اختلاف از بعد از هفته ششم اتفاق افتاده است بطوری که در هفته نهم جدایه P169 توانست وزن خشک بخش هوایی ذرت را به طور معناداری افزایش دهد. بیشترین وزن خشک بخش هوایی مربوط به زمان 12 هفته با تلقیح جدایه P169 بود که نسبت به شاهد 31/22 درصد افزایش نشان داد. هم‌چنین جدایه‌های P1 و P108 در هفته 12 اختلاف معنی‌داری با جدایه P169 نداشتند و توانستند وزن خشک بخش هوایی را نسبت به شاهد به ترتیب معادل 23/81 و 25/21 درصد افزایش دهند (جدول 5). رسولی صدقیانی و همکاران (1392) گزارش کردند که در گیاهان تلقیح شده با باکتری‌های

سودوموناس فلورسنت با افزایش زمان، وزن خشک بخش هوایی و ارتفاع گیاه افـزایش یافـت. ژوانـگ و همکـاران (2012) افزایش معنـی‌دار وزن خشـک بخـش هـوایی و ریشه *B. juncea* را در خاک آلوده به کادمیوم در حضـور بـاکتری *B. megaterium* در سـطح احتمـال 5 درصـد گزارش کردند. همچنین آنها نشان دادند که بیشـترین وزن خشک در تلقیح با باکتری *B. megaterium* و در زمان 12 هفته رخ داد.

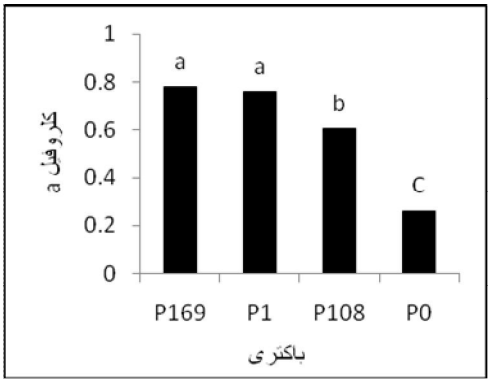
جدول 5- مقایسه میانگین برهم‌کنش جدایه و زمان بر وزن خشک بخش هوایی ذرت

جدایه‌ها	تعداد هفته پس از کشت			
	3	6	9	12
P_0	0/97f	3e	8/60d	12/01b
P_1	1/32f	4/02e	9/19cd	14/87a
P_{169}	1/16f	3/90e	10/32c	15/76a
P_{108}	1/12f	3/48e	9/59cd	15/04a

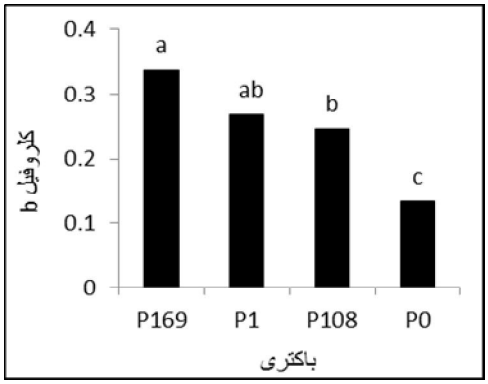
میانگین‌های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک در هر ستون فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد به‌روش دانکن می‌باشند.

کلروفیل a و b

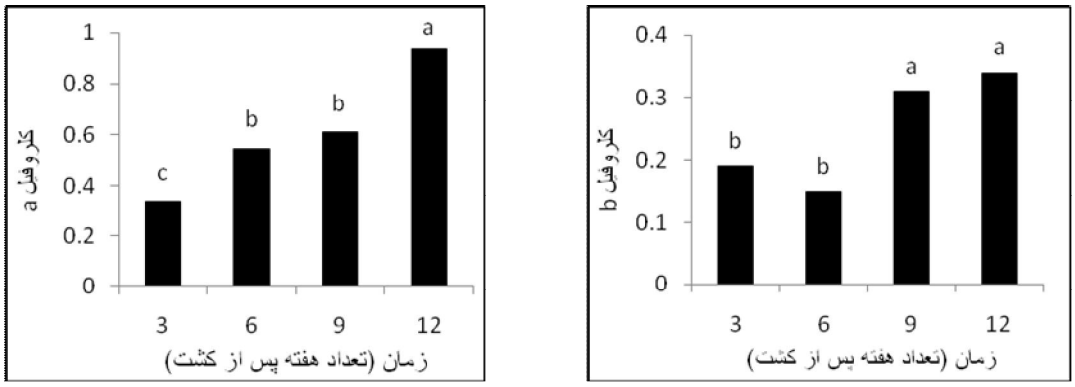
مقایسه میانگین‌ها نشان داد که کاربرد سه جدایـه P1، P169 و P108 باعث افزایش معنی‌دار کلروفیل a به‌ترتیب معادل 200، 192 و 132 درصـد و کلروفیـل b بـه‌ترتیـب معادل 101، 154 و 86 درصد نسبت به شاهد شد (شکل 2Aو 2B). مقایسه میانگین تأثیر سطوح زمان بر کلروفیـل a نیز نشان داد که با افـزایش زمـان، کلروفیـل a افـزایش یافت لیکن بین زمان 6 و 9 هفته از نظـر آمـاری تفـاوت معنی‌داری مشاهده نگردید (شکل 2C). همچنـین مقایسـه میانگین‌ها نشان داد میزان کلروفیل b تـا 6 هفتـه بـدون تغییر و از آن پس افـزایش معنـی‌داری داشـت (شـکل 2D). گزارش شده است که کادمیوم سبب ایجاد حالت کلروز و نکروز در بـرگ شـده (هرنانـدز و همکـاران، 1998؛ زانگ، 2002)، میزان کلروفیل کل، کلروفیل a و b و همچنین کاروتنوئیدها در گیاهان عـالی را کـاهش مـی‌دهـد (سـانیتا دی‌تـاپی و گابریـل، 1999؛ شـوران، 1990). لیکن کاربرد باکتری‌های محرک رشـد میتوانـد اثر منفی کادمیوم بر میزان کلرفیل را تعدیل نماید. ظفر و همکـــاران (2011) گـــزارش نمودنـــد کـــه تلقـــیح باکتری‌های محرک رشد باعث افزایش میزان کلروفیـل برگ گندم و ذرت گردید. مهرورز و همکـاران (2008) نشان دادند که کاربرد بـاکتری *Pseudomonas putida* S41 باعث افزایش 49/5 درصدی کلروفیل بـرگ جـو شد و این افزایش از نظر آماری معنی‌دار بود. استفان و همکاران (2013) افزایش قابل توجه محتوای کلروفیـل برگ لوبیا را در 42 و 59 روز پس از کاشـت و تلقـیح بـا سـویه‌هـای بـاکتری *Bacillus pummilus* (S4) و *Bacillus mycoide* (S7) گزارش کردند.



A



B



C D

شکل 1- کاربرد تیمارهای جدایه و زمان بر میزان کلروفیل a (A و C) و کلروفیل b (B و D) (میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ)

کلروفیل کل و کاروتنوئید

نتایج مقایسه میانگین برهم‌کنش تیمارهای جدایه و زمان بر کلروفیل کل (جدول 6) نشان داد که بیشترین میزان کلروفیل کل در زمان 12 هفته با تلقیح جدایه P_{169} و زمان 9 هفته با تلقیح جدایه P_1 مشاهده شد؛ به‌طوری که بین این دو تیمار تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. کمترین میزان کلروفیل در زمان 6 هفته عدم تلقیح جدایه که با تیمار 3 هفته عدم تلقیح جدایه در یک سطح آماری قرار گرفتند. میانگین کلروفیل کل معادل 0/85 میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ و میانگین کلروفیل a برابر 0/6 میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ بود. بنابراین کلروفیل کل 1/41 برابر کلروفیل a شد. کاهش میزان کلروفیل در گیاهان تحت تنش فلزات سنگین، به علت مهار مراحل مختلف بیوسنتز کلروفیل است (خلیقی و خارا، 1387). مهار بیوسنتز کلروفیل احتمالاً به‌واسطه مهار سنتز دلتا آمینولوولینیک و مهار تشکیل پروتوکلروفیلید ردوکتاز است (واسیلو و یوردانوو 1997). همچنین جایگزین‌شدن یون منیزیم مرکزی کلروفیل به‌وسیله فلزات سنگین صدمه دیگری است که باعث جلوگیری از به‌دام انداختن نور فتوسنتزی و در نتیجه از بین‌رفتن کلروفیل و کاهش فعالیت فتوسنتزی می‌شود (پراسا و استرازالکا، 1999). حقیری (1973) گزارش کرد که غلظت زیاد کادمیوم درمحیط رشد، جذب آهن توسط گیاه را مختل و سمیت کادمیوم بر فرآیندهای اصلی گیاه نظیر فتوسنتز، تکثیر سلولی و جذب آب توسط ریشه‌های گیاهان اثر می‌گذارد.

نتایج مقایسه میانگین برهمکنش تیمارهای جدایه و زمان بر کاروتنوئید (جدول 7) نشان داد که بیشترین میزان کاروتنوئید در زمان 12 هفته با تلقیح جدایه‌ها و کمترین در زمان 6 هفته عدم تلقیح جدایه معادل 1/03 میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ مشاهده شد. هم‌چنین در زمان 9 هفته فقط جدایه P_{169} معادل 7/87 میلی‌گرم در گرم توانست بیشترین تأثیر را بگذارد. با توجه به جدول (7) میانگین میزان کاروتنوئید تحت تأثیر برهم-کنش تیمارهای جدایه و زمان معادل 5/6 میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ بود که 6/59 برابر کلروفیل کل و 6/3 برابر کلروفیل a به‌دست آمد. گزارش شده است که مقدار کاروتنوئیدها در گیاهان تحت تنش کادمیوم کاهش می‌یابد. این کاهش به دلیل فرونشانی غیرفتوشیمیایی کلروفیل‌های برانگیخته است که توسط کاروتنوئیدها انجام و در نتیجه باعث به‌هم ریختن ساختارشان می‌گردد. کاروتنوئیدها در سمیت‌زدایی کلروفیل برانگیخته سه‌تایی نقش دارند. کاروتنوئیدها در چند سطح باعث کاهش اثرات سمی رادیکال‌های آزاد می‌شوند که از جمله واکنش با کلروفیل برانگیخته برای ممانعت از تشکیل رادیکال‌های فعال اکسیژن است (سانیتا دی تاپی و گابریل، 1999).

جدول 6- مقایسه میانگین برهمکنش تأثیر جدایه‌ها و سطوح زمان بر کلروفیل کل (میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ)

زمان (هفته)	جدایه				
	P0	P1	P169	P108	میانگین
3	0/20^{gh}	0/53^{f}	1/065^{cd}	0/70^{ef}	0/63C
6	0/11^{gh}	0/71^{ef}	0/96^{cde}	0/61^{ef}	0/61C
9	0/47^{fg}	1/44^{a}	1/26^{abc}	0/63^{ef}	0/95B
12	0/78^{def}	1/10^{bcd}	1/54^{a}	1/41^{ab}	1/22A
میانگین	0/39C	0/94B	1/21A	0/85B	0/85

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک در هر ستون فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد به‌روش دانکن می‌باشند

جدول 7- مقایسه میانگین برهمکنش تأثیر جدایه‌ها و سطوح زمان بر کاروتنوئید (میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ)

زمان (هفته)	جدایه				
	P0	P1	P169	P108	میانگین
3	1/84^{gh}	3/04^{fgh}	5/78^{b-e}	6/75^{bc}	4/35C
6	1/03^{h}	6/04^{bcd}	4/01^{def}	3/06^{fgh}	3/37D
9	4/83^{c-f}	5/37^{cde}	5/97^{bcd}	7/87^{b}	6/01B
12	3/76^{ef}	9/99^{a}	10/27^{a}	10/74^{a}	8/68A
میانگین	2/86B	6/11A	6/5A	7/11A	5/6

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک در هر ستون فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد به‌روش دانکن می‌باشند.

تأثیر جدایه‌های منتخب و سطوح زمان بر جذب کادمیوم توسط ذرت

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تأثیر تیمارهای جدایه و سطوح زمان و همچنین بر هم‌کنش بین آنها بر جذب کادمیوم بخش هوایی و ریشه ذرت در سطح یک درصد معنی‌دار شد.

نتایج مقایسه میانگین‌ها (جدول 8) نشان داد که سه جدایه P_1، P_{169} و P_{108} جذب کادمیوم بخش هوایی را معادل 111/62، 150/21 و 78/19 درصد نسبت به شاهد افزایش دادند که این افزایش از نظر آماری معنی‌دار بود. بیشترین جذب کادمیوم در تیمار تلقیح با جدایه P_{169} بدست آمد که نسبت به تیمارهای تلقیح با P_1 و P_{108} اختلاف معنی‌داری داشت. همچنین در مورد ریشه بیشترین میزان جذب کادمیوم با کاربرد جدایه P_1 بدست آمد که با 82/4 درصد افزایش، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با شاهد و تیمارهای تلقیح با P_{169} و P_{108} نشان داد. نتایج مقایسه میانگین‌ها (جدول 8) همچنین نشان‌داد که در مجموع جذب کادمیوم توسط بخش هوایی و ریشه ذرت در طول دوره رشد روندی افزایشی داشت.

در تحقیقی نشان داده شد که تلقیح گیاهان با باکتری‌های *باسیلوس مگاتریوم* حل‌کننده فسفات، غلظت کادمیوم را در کلزا و *Abutilon theophrasti* افزایش داد (جونگ و همکاران؛ 2012). بهارلویی و همکاران (2011) گزارش کردند که تلقیح کلزا با باکتری‌های *Pseudomonas fluorescens* strain 169 و *Pseudomonas putida* strain 11 جذب کادمیوم بخش هوایی را به‌طور معنی‌داری افزایش دادند. در تحقیقی گزارش شده است که باکتری *Burkholderia* sp. J62 غلظت کادمیوم ریشه گیاه خردل‌هندی و ذرت را به‌ترتیب از 28 به 68 درصد و از 31 با 170 درصد افزایش داد (جیانگ و همکاران؛ 2008). هم‌چنین در حضور این باکتری جذب کادمیوم بخش هوایی گوجه‌فرنگی و ریشه ذرت نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد به‌طوری که جذب کادمیوم کل گیاه ذرت از 5 به 25 درصد افزایش یافت. شنگ و زیا (2006) نشان دادند که در اراضی آلوده به کادمیوم جذب کادمیوم توسط کلزا در حضور باکتری‌های *Bacilius* sp. RJ16، *Pseudomonas* sp. RJ10 و *Xanthomonas* sp. RJ3 بین 16 تا 74 درصد نسبت به تیمار شاهد بدون باکتری افزایش یافت. استوار و همکاران (1391) گزارش کردند بیشترین میزان غلظت کادمیوم در شاخساره و ریشه کلم زینتی در حضور باکتری *P. putida* strain 4، معادل 58/15 و 135/58 میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک گیاه بدست آمد.

با عنایت به نتایج مندرج در جدول 8 مشخص می‌شود که بخش ریشه ذرت در مقایسه با بخش هوایی مقدار بیشتری از کادمیوم را در خود انباشته کرد به‌طوری که جذب کادمیوم در بخش هوایی 56/26 میکروگرم بر

گلدان و در ریشه 214/50 میکروگرم بر گلدان بود. به عبارتی میانگین جذب کادمیوم در ریشه 3/8 برابر جذب آن در بخش هوایی ذرت شد. شنگ و زیا (2008) گزارش کردند که تجمع بیشتر کادمیوم در ریشه‌ها نسبت به ساقه، معمولاً در غلات، گیاهان نیمه مقاوم از جمله سورگوم و در گیاهان حساس از جمله لوبیا دیده شده است (سالت و همکاران، 1995). کاهش انتقال کادمیوم از ریشه به بخش هوایی می‌تواند ناشی از غیرمتحرک شدن این عنصر در دیواره سلولی یا اتصال کادمیوم به ترکیبات آلی موجود در ریشه باشد (سانیتا دی‌تاپی و گابریل، 1999).

نتایج مربوط به مقایسه میانگین برهم‌کنش جدایه و سطوح زمان در جذب کادمیوم (جدول 8) مشخص کرد که با افزایش زمان در تیمارهای باکتریایی جذب کادمیوم بخش هوایی و ریشه نسبت به شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت. بیشترین جذب کادمیوم بخش هوایی ذرت در زمان 12 هفته با تلقیح جدایه P169 بدست آمد که این نشانگر تأثیر بیشتر این جدایه در افزایش مقاومت ذرت به کادمیوم می‌باشد. هم‌چنین در 12 هفته، جدایه P169 نسبت به دو جدایه P1 و P108 جذب کادمیوم بخش هوایی را به ترتیب به میزان13/81 و 37/75 افزایش داد که این افزایش از نظر آماری معنی‌دار بود.

جدول 8- مقایسه میانگین جذب کادمیوم بخش‌هوایی و ریشه ذرت تحت تأثیر تیمارهای جدایه و زمان

زمان (هفته)	P0	P1	P169	P108	میانگین
	جذب کادمیوم بخش هوایی ($\mu g\ pot^{-1}$)				
3	3/7^{g}	7/92^{g}	9/12^{g}	7/47^{g}	7/05C
6	9/80^{g}	17/67^{g}	25/47^{fg}	20/48^{f}	18/35C
9	44/77^{ef}	68/18^{de}	79/90^{d}	70/61^{d}	65/86B
12	63/40^{de}	163/69^{b}	189/93^{a}	118/23^{c}	133/81A
میانگین	30/42C	54/20B	64/4A	76/10C	56/26
	جذب کادمیوم ریشه ($\mu g\ pot^{-1}$)				
3	40/18^{h}	41/32^{h}	53/33^{h}	48/04^{h}	45/72C
6	108/31^{g}	173/43^{ef}	180/96^{de}	130/44^{fg}	148/28B
9	212/67^{de}	445/93^{a}	332/05^{b}	295/27^{c}	321/48A
12	227/97^{d}	413/87^{a}	363/19^{b}	365/04^{b}	342/51A
میانگین	147/28C	268/64A	232/38B	209/69B	214/50

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک در هر ستون فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد به‌روش دانکن می‌باشند.

به نظر می‌رسد خصوصیات محرک رشد این باکتری منجر به افزایش قابلیت دسترسی عناصر از جمله کادمیوم برای گیاه شده و به این ترتیب جذب و تجمع کادمیوم توسط گیاه را افزایش داده باشد (خان و همکاران، 2008). کمترین میزان جذب کادمیوم در تیمار 3 هفته و عدم تلقیح باکتری مشاهده شد. همچنین بیشترین جذب کادمیوم به میزان 109/7 درصد در تیمار 9 هفته و کاربرد جدایه P_1 بدست آمدکه از نظر آماری تفاوت معنی‌دار با تیمار 12 هفته نداشت. هم‌چنین تیمار 9 هفته و کاربرد جدایه P_1 نسبت به جدایه‌های P_{169} و P_{108} جذب کادمیوم ریشه را به ترتیب معادل 34/32 و 50/9 درصد و به‌طور معنی‌داری افزایش دادند.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد که مقدار زیست-توده و جذب کادمیوم توسط ذرت تا 12 هفته ادامه داشت و کاربرد جدایه‌ها، مقدار زیست‌توده و جذب کادمیوم را به طور معنی‌داری افزایش داد. در بین جدایه‌های مورد آزمون جدایه P169 تأثیر بیشتری بر افزایش جذب کادمیوم توسط ذرت داشت. البته برای اظهار نظر قطعی لازم است کاربرد این جدایه‌ها در شرایط مزرعه نیز بررسی شود

فهرست منابع:

1. استوار، پ، خاوازی، ک. و ملکوتی، م. ج. 1391. نقش باکتری‌های مفید خاکزی در افزایش کارایی پالایش سبز یک خاک آلوده به کادمیوم. مجله‌ی پژوهش خاک (علوم خاک و آب)، جلد 1 (شماره‌ی26)، 183-17.

2. حمیدپور، م.، شیرانی، ح. و اخگر، ع . 1391. جذب سطحی کادمیوم روی کانی مونت‌موریلونیت در حضور سیدروفور دسفرال. مجله آب و خاک دانشگاه فردوسی مشهد، جلد 26 (شماره)1، 42-52.
3. خلیقی جمالآباد، ا .خارا، ج .تأثیر قارچ مایکوریزای آربوسکولار بر روی تنش اکسیداتیو و برخی پارامترهای رشدی و فیزیولوژی در گیاه گندم رقم آذر 1 تحت سمیت کادمیوم .مجله زیست شناسی ایران، جلد 21 (شماره 2)، 230-216
4. دبیری، م. 1375. آلودگی محیطزیست، چاپ اول، نشر اتحاد، 401-399.
5. رسولی صدقیانی، م. ح.، قره‌ملکی، ت. بشارتی، ح. و کریمی، ا. 1392. تأثیر ریزجانداران مفید خاکزی بر رشد و جذب کادمیوم توسط ذرت. مجله‌ی پژوهش‌های خاک، جلد 27 (شماره‌ی 2)، 215-205.
6. زارعی، م.، صالح راستین، ن.، و ثواقبی، غ. 1390. کارآیی قارچهای میکوریز آربوسکولار در گیاه پالایی خاکهای آلوده به روی به وسیله گیاه ذرت. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، علوم آب و خاک، سال 15 (شماره‌ی 55)، 166-151.
7. عرفان‌منش، م. و افیونی، م. 1379. آلودگی محیط زیست: آب، خاک، هوا. چاپ چهارم. نشر ارکان.
8. وهاب‌زاده، ع. 1372. مبانی محیطزیست، چاپ اول، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.
9. Abdul-Jaleel, C., Manivannan, P., Sankar, B., Kishorekumar, A., Gopi, R., Somasundaram, R., and Panneerselvam, R. 2007. Pseudomonas florescence enhances biomass yield and ajmalicine production in Catharanthus roseus under water deficit stress. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 60:7-11.
10. Alexander, D.B. and Zuberer, D.A. 1991. Use of chrome azurol s reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. Biology and Fertility of Soils 12:39-45.
11. Amini, M., Afyuni, M., Khademi, H., Abbaspour, K.C. and Schulin, R. 2005. Mapping risk of cadmium and lead contamination to human health in soils of Central Iran. Science of Total Environment 347:64-77.
12. Arnon, D.I. 1949. copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenoxidase in *beta vulgaris*. plant Physiology 24:1-15.
13. Baharlouei, J., khavazi, K., Pazira, E. and Solhi, M. 2011. Evaluation of inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria on cadmium and lead uptake by canola and barley. African Journal of Microbiology Research 14:1747-1754.
14. Belimov, A.A., Hontzeas, N., Safronova, V.I., Demchinskaya, S.V., Piluzza, G., Bullitta, S. and Glick, B.R. 2005. Cadmium-tolerant plant growth promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). Soil Biology and Biochemistry 37:241–250.
15. Bent, E., Tuzan, S., Chanway, C.P. and Enebak, S. 2001. Alteration in plant growth and in root hormone levels of lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. Canadian Journal of Microbiology 47:793-800.
16. Bergey, D.H. 1984. Bergeys Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins, U.S.A.
17. Burd, G.I., Dixon, D.G. and Glick, B.R. 2000. Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. Canadian Journal of Microbiology 46:237–245.
18. Cariny, T. 1995. The re-use of contaminated land: a handbook of risk assessment. John Wiley and Sons, New York. US.
19. Chen, L., Luo, S., Xiao, X., Guo, H., Chen, J., Wan, Y., Li, B., Xu, T., Xi, Q., Rao, C., Liu, C. and Zeng, G. 2010. Application of plant growth-promoting endophytes (PGPE) isolated from Solanum nigrum L. for phytoextraction of Cd-polluted soils. Applied Soil Ecology 46:383–389.

20. Cottenie, A. 1980. Methods of plant analysis. In: Soil and plant testing. FAO Soils Bulletin 38:64-100.
21. Fu, J., Zhou, Q., Liu, J., Liu, W., Wang, T., Zhang, Q. and Jiang, G. 2008. High levels of heavy metals in rice from a typical E-waste recycling area in southeast China and its Potential risk to human health. Chemosphere 71:1269-1275.
22. Gupta, S.S. and Bhattacharyya, K.G. 2008. Immobilization of Pb(II), Cd(II) and Ni(II) ions on kaolinite and montmorillonite surfaces from aqueous medium. Environmental Management 87:46-58.
23. Haghiri, F. 1973. Cadmium uptake by plants. Journal of Environmental Quality 2:93-96.
24. Hernandez, E.L., Lozano - Ridriguez, E., Garate, A. and Carpena- Ruiz, R. 1998. Influence of cadmium on the uptake, tissue accumulation and subcellular distribution of manganese in *pea* seedlings. Plant Science 132:139-151.
25. Ijagbemi, C.O., Tbeak, M. and Kim, D. 2009. Montmorillonite surface properties and sorption characteristics for heavy metal removal from aqueous solution. Hazardous Materials 166:538-546.
26. Jeon, J.S., Lee, S.S., Kim, H.K., Ahh, T.S. and Song, H.G. 2003. Plant growth promotion in soil by some inoculated microorganisms. Journal Microbiology 41:271-276.
27. Jeong, S., Moon, H.S., Nam, K., Kim, J.Y. and Kim, T.S. 2012. Application of phosphate-solubilizing bacteria for enhancing bioavailability and phytoextraction of cadmium (Cd) from polluted soil. Chemosphere 88:204-210.
28. Jiang, C.Y., Sheng, X.F., Qian, M. and Wang, Q.Y. 2008. Isolation and characterization of a heavy metal resistant *Burkholderia* sp. from heavy metal contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal polluted soil. Chemosphere 72:157–164.
29. Kabata-Pendias, A. and. Pendias, H. 2001. Cadmium. p.143-157. In: Kabata-Pendias, A. and Pendias, H. (eds.) Trace Elements in Soils and Plants. 3rd ed. CRC Press, Boca Raton, FL.
30. Kalinowski, B.E., Liermann, L.J., Brantley, S.L., Barnes, A. and Pantano, C.G. 2000. X-ray photoelectron evidence for bacteria-enhanced dissolution of hornblende. Geochimical et Cosmochimica Acta 107:225–231.
31. Keller, C., Marchettti, M., Rossi, L. and Lugon-Moulin, N. 2005. Reduction of cadmium availability to tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants using soil amendments in low cadmium contaminated agricultural soils: a pot experiment. Plant and soil 276:69-84.
32. Khan, S., Aijun, L., Zhang, S., Hu, Q. and Zhu, Y.G. 2008. Accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals in lettuce grown in the soils contaminated with long-term waste water irrigation. Hazardous Materials 152:506-515.
33. Liu, K., Lv, J., He, W., Zhang, H., Cao, Y. and Dai, Y. 2015. Major factors influencing cadmium uptake from the soil into wheat plants. Ecotoxicology and Environmental Safety 113:207–213.
34. Mehrvarz, S., Chaich, M.R. and Alikhani, H.A. 2008. Effects of phosphate solubilizing microorganisms and phosphorus chemical fertilizer on yield and yield components of Barely (*Hordeum vulgare* L.). American-Eurasian Journal of Agricultural and Environment Sciences 3:822-828.
35. Nahas, E. 1996. Factors determining rock phosphate solubilization by microorganism isolated from soil. World Journal of Microbiology and Biotechnology 12:567-572.
36. Piotrowska-Seget, Z., Cycon, M. and Kozdroj, J. 2005. Metal-tolerant bacteria occurring in heavily polluted soil and mine soil. Applied Soil Ecology 28:237-46.
37. Prasad, M. and Strazalka, K. 1999. Impact of heavy metals on photosynthesis. Journal of Experimental Botany 41:314-320.

38. Salt, D., Price, R., Pickering, I. and Raskin, I. 1995. Mechanisms of Cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. Plant Physiology 109:1427-1433.
39. Sanita di Toppi, L. and Gabbrielli, R. 1999. Response to cadmium in higher plants-review. Environmental and Experimental Botany 41:105-130.
40. Saravanan, V.S., Madhaiyan, M. and Thangaraju, M. 2007. Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Chemosphere 66:1794-1798.
41. Sheng, X.F., Xia, J.J., Jiang, C.Y., He, L.Y. and Qian, M. 2008. Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead
42. accumulation of rape. Environmental Pollution 156:1164-1170.
43. Sheng, X.F. and Xia, J.J., 2006. Improvement of rape (*Brassica napus*) plant growth and cadmium uptake by cadmium-resistant bacteria. Chemosphere 64:1036-1042.
44. Sheoran, I.S., Singal, H.R. and Singh, R. 1990. Effect of cadmium and nickel on photosynthesis and the enzymes of the photosynthetic carbon reduction cycle in pigeon pea (*Cajanus cajan)*. Photosynthetic Research 23:345-351.
45. Sperber, J.I. 1958. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. Australian Journal of Agricultural Research 9:778–781.
46. Stefan, M., Munteanu, N., Stoleru, V., Mihasan, M. 2013. Effects of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria on photosynthesis, antioxidant status and yield of runner bean. Romanian Biotechnological Letters 8:8132-8143.
47. Susilowati, L.E. and Syekhfani, S. 2014. Characterization of Phosphate Solubilizing Bacteria Isolated from Pb Contaminated Soils and Their Potential for Dissolving Tricalcium Phosphate. Journal of Degraded and Mining Lands Management 1:57-62.
48. Vassilev, A. and Yordanov, I. 1997. Reductive analysis of factors limiting growth of cadmium treated plants: A review. Plant Physiology 23:14-133.
49. Wang, P.C., Mori, T., Komori, K., Sasatsu, M., Toda, K. and Ohtake, H. 1989. Isolation and characterization of an *Enterobacter cloacae* strain that reduces hexavalent chromium under anaerobic conditions. Applied and Environmental Microbiology 55:1665-1669.
50. Zafar, M., Rahim, N., Shaheen, A., Khaliq, A., Arjamand, T., Jamil, M., Rehman, Z.U. and Sultan, T. 2011. Effect of combining poultry manure, inorganic phosphorus fertilizers and phosphate solubilizing bacteria on growth, yield, protein content and P uptake in maize. Advances in Agriculture and Botanics 3:46-58.
51. Zhang, G., Fukami, M. and Sekimoto, H. 2002. Influence of cadmium on mineral concentration and yield components in wheat genotypes differing in Cd tolerance at seedling stage. Field Crops Research 77:93-98.

Effect of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads on cadmium uptake by corn in contaminated soil

A. Akhgar[1], E. Ahmadinia, M. Hamidpour, and H. Shirani
Associate professor, Vali-e-Asr University of Rafsanjan; E-mail: arakhgar@yahoo.com
Former MSc. student of Vali-e-Asr University of Rafsanjan; E-mail: elhami_eh8929@yahoo.com
Associate professor, Vali-e-Asr University of Rafsanjan; E-mail: mohsen_hamidpour@yahoo.com
Professor, Vali-e-Asr University of Rafsanjan; E-mail: shirani379@yahoo.com
Received: August, 2019 & Accepted: December, 2019

Abstract

Cadmium, because of the long half a lifetime in the human and animal body and its toxicity, has great importance in agriculture. Today, plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) are used to increase the bioavailability and uptake of heavy metals in polluted soils. The aim of this study was to investigate the effectiveness of cadmium-tolerant fluorescent pseudomonads with inorganic phosphate solubilizing ability on the cadmium uptake by maize in contaminated soil. For this purpose, a greenhouse experiment was conducted in factorial based on a completely randomized design with four replications. Treatments were included four levels of bacteria (without bacteria (P0) and inoculation with three isolates P1, P169, P108) and four levels of time after planting (3, 6, 9, and 12 weeks). The soils were artificially spiked with 13 mg kg^{-1} cadmium as $Cd(NO_3)_2$. The results showed that the inoculation of maize with the selected isolates significantly increased shoot and root dry weights and shoot cadmium uptake in comparison to non-inoculated plants. The maximum shoot dry weight observed in plants inoculated with P169 and 12 weeks (31.22% more compared to non-inoculated plants). In the 12th week after planting, there was not any significant difference between P1 and P108 with P169 in shoot dry weights. This isolates (P1 and P108) also enhanced shoot dry weights by 23.81 and 22.21 percent in comparison to control, respectively. The maximum uptake of cadmium in plant shoot was found in inoculation with P169 and 12th week. In the 12th week, P169 increased cadmium uptake of the shoot by 150 percent in comparison to the control and 13.81 and 37.75 percent in compared to P1 and P108, respectively. Although all of the isolates used in the greenhouse experiment significantly increased cadmium uptake by maize plants but the effectiveness of P169 was more evident than other isolates.

Keywords: Heavy metals, Phosphorus, Plant growth-promoting rhizobacteria

[1.] Corresponding author: Soil Science Department, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan.