

## تأثیر سودوموناس‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه بر گیاه‌پالایی مس توسط برخی گیاهان زراعی و بومی منطقه

پیمان عباس‌زاده دهجی<sup>۱\*</sup>، زهرا کریمی<sup>۲</sup>، محسن حمیدپور<sup>۳</sup>، عبدالرضا اخگر<sup>۳</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۶/۳)

### چکیده

پالایش خاک‌های آلوده به عناصر سنگین به وسیله گیاهان یکی از روش‌های مقرون به صرفه و دوست‌دار محیط‌زیست است. در مواردی برای افزایش کارایی گیاهان در استخراج فلز سنگین از ریزموجودهای مفید خاکزی استفاده می‌شود. این پژوهش با هدف بررسی تأثیر سودوموناس‌ها ریزوسفری بر افزایش پاکسازی مس از خاک با فرآیند گیاه‌پالایی توسط گیاهان مختلف انجام شد. مرحله اول کشت در یک طرح کاملاً تصادفی با ۱۱ تیمار گیاهی (ذرت، سورگوم، گندم، کلزا، زنیان، قیچ، مریم‌گلی، تاج‌خروس، رازیانه، یونجه و کدو) و در سه تکرار انجام گرفت. بیش‌ترین غلظت و جذب مس به ترتیب در قیچ با ۱۷۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم و کدوی پوست کاغذی با ۲۲۲ میکروگرم بر گلدان بود. پنج گیاه انتخابی کدو، ذرت، گندم، کلزا و قیچ براساس بیش‌ترین غلظت و جذب مس برای کشت دوم انتخاب شد. کشت دوم گلخانه‌ای به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور شامل نوع گیاه در پنج سطح (کدو، ذرت، کلزا، گندم و قیچ) و باکتری شامل سه سطح (عدم تلقیح باکتری، تلقیح سویه *Pseudomonas putida* PA2 و تلقیح سویه *Pseudomonas fluorescence* PA3) در سه تکرار اجرا شد. در این آزمایش وزن خشک اندام هوایی و ریشه، غلظت و جذب عنصر مس در اندام هوایی و ریشه و همچنین تغییرات شیمیایی مس در ریزوسفر بررسی شد. کاربرد هر دو سویه باکتری باعث افزایش معنی‌دار وزن خشک، غلظت و جذب مس در اندام هوایی و ریشه در مقایسه با شاهد شد. از بین گیاهان نیز گیاه کدو به دلیل زیست‌توده‌ی بالا، بیش‌ترین جذب مس در اندام هوایی (۹۰/۲ میکروگرم بر گلدان) (مؤثرمؤثرترین در گیاه‌استخراجی) و گیاه ذرت به دلیل وزن خشک ریشه‌ی بالا بیش‌ترین جذب مس در ریشه (۴۲۸ میکروگرم بر گلدان) (مؤثر در گیاه‌تثبیتی) را دارا بود. بررسی شکل‌های شیمیایی مس در خاک ریزوسفری نشان داد که تلقیح باکتری‌های محرک رشد PA2 و PA3 به ترتیب باعث افزایش ۴۱/۹ و ۳۷ درصدی شکل‌های محلول و قابل تبادل مس و کاهش ۷/۰۵ و ۶/۴۱ درصدی شکل باقی‌مانده شدند. نتایج کلی نشان داد که باکتری‌های محرک رشد گیاه می‌توانند نقش مؤثری در افزایش کارایی گیاه‌پالایی به‌ویژه در فرآیند گیاه‌استخراجی داشته باشند و گیاه کدو با بیش‌ترین مقدار جذب مس کاراترین گیاه در فرآیند گیاه‌پالایی مس در این پژوهش بود.

**واژه‌های کلیدی:** ذرت، کدو، گیاه‌پالایی، فلزات سنگین، عصاره‌گیری دنباله‌ای

عباس‌زاده. ۱۴۰۰. تأثیر سودوموناس‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه بر گیاه‌پالایی مس توسط برخی گیاهان زراعی و بومی منطقه. تحقیقات کاربردی خاک. جلد ۹، شماره ۱. صفحه: ۴۱-۵۶.

۱- استادیار گروه خاکشناسی، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان، ایران

۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه خاکشناسی، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان، ایران

۳- دانشیار گروه خاکشناسی، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان، ایران

\*پست الکترونیک: [p.abbaszadeh@vru.ac.ir](mailto:p.abbaszadeh@vru.ac.ir)

## مقدمه

خاک و انتقال آن‌ها به اندام‌های هوایی باعث پاکسازی خاک می‌شوند (Pilon-Smith, 2005). به‌تازگی برای انجام اصلاح مؤثر عملی از سیستم گیاه‌پالایی چند فرآیندی یا<sup>۴</sup> MPPS استفاده می‌کنند. اساس این سیستم ترکیب فرآیندهای مکانیکی، میکروبی و رشد گیاه برای افزایش زیست‌توده به‌ویژه ریشه گیاهان در خاک و افزایش سرعت اصلاح می‌باشد. تلقیح خاک و گیاهان با باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه<sup>۵</sup> یکی از فرآیندهایی بوده که در سیستم MPPS استفاده می‌شود (Huang et al., 2005). باکتری‌های ریزوسفری (رایزوباکتری‌ها) را که به‌طور مستقیم و غیرمستقیم اثرات مفیدی روی گیاهان دارند باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد می‌نامند (Abbaszadeh-Dahaji et al., 2018). باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد می‌توانند با استفاده از فرآیندهای مختلفی به‌طور مستقیم در افزایش رشد و عملکرد گیاه ایفای نقش کنند. افزایش انحلال عناصر غذایی کم محلول مانند فسفر، تولید آنزیم ACC-دآمیناز، تولید هورمون‌های رشد گیاهی مانند اکسین، تثبیت نیتروژن و تولید سیدروفور از اهم فرآیندهای مورد استفاده در این روش می‌باشند (Ping & Boland, 2004). گزارش شده است که باکتری‌های تولیدکننده آنزیم ACC-دآمیناز می‌توانند رشد گیاه و حفاظت گیاه در برابر سمیت فلزات سنگین در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین را افزایش دهند (Belimov et al., 2005; Madhaiyan et al., 2007). چندین مطالعه، اثر افزایشی تلقیح باکتری‌های محرک رشد گیاه بر رشد گیاه و جذب عناصر سنگین توسط گیاه را نشان دادند (Guo & Chi, 2014). تأثیر تلقیح ریزوموجودهای محرک رشد گیاه بر افزایش کارایی گیاه‌پالایی در گیاهان تجمع‌کننده<sup>۶</sup> گزارش شده است (Rizvi & Khan, 2018). کاربرد باکتری‌های محرک رشد گیاه مقاوم به کادمیوم میزان جذب کادمیوم اندام هوایی و هم‌چنین انتقال کادمیوم از ریشه به اندام هوایی گیاهان را افزایش داد (Khan et al., 2018). تلقیح گیاهان با باکتری‌های ریزوسفری *Pseudomonas aeruginosa* و *Pseudomonas fluorescens* محرک رشد و مقاوم به کادمیم باعث افزایش ۱۱۳ درصدی سرب قابل تبادل شد

فلزات سنگین می‌توانند از طریق فعالیت‌های انسانی مثل احتراق ناقص سوخت‌های فسیلی، استخراج معدن، پالایش سنگ حاوی فلزات، فاضلاب شهری، سموم کشاورزی و فرسایش طبیعی سنگ‌ها وارد بیوسفر شوند (Samani Majd et al., 2008). آلودگی خاک به فلزات سنگین اثرات زیان‌آوری بر ویژگی‌های میکروبی خاک، تنوع تاکسونومیک و کاربردی خاک، محیط زیست و در نهایت سلامت انسان دارد (Yang et al., 2012). فلزات سنگین به راحتی تجزیه نمی‌شوند و در محیط ماندگارند، به‌همین دلیل اصلاح و حذف فلزات سنگین از محیط آلوده یک فرآیند ساده نیست (Rajkumar et al., 2008). مس پس‌ماند حاصل از استخراج و فرآوری سنگ معدن مس، می‌تواند برای سلامت گیاهان، حیوانات، ریزوموجودها و انسان مضر باشد (Haque et al., 2008). غلظت خیلی کم از مس در بافت انسان سبب بروز کم‌خونی و غلظت بیش از حد بالا باعث آسیب کبدی می‌شود. تجمع شدید مس در کبد باعث بیماری هپاتیت و نارسایی کبدی و دیگر مشکلات کبدی شده و نهایتاً منجر به مرگ می‌شود (García-Niño & Pedraza-Chaverri, 2014).

زیست‌پالایی<sup>۱</sup> بر پایه‌ی ریزوموجودها، گیاهان و یا دیگر سیستم‌های زیستی، یک روش مقرون به صرفه و دوست‌دار محیط‌زیست برای پالایش خاک از فلزات سنگین می‌باشد. امروزه فناوری گیاه‌پالایی<sup>۲</sup> یک رویکرد امیدوارکننده برای پاک‌سازی و اصلاح خاک، آب و هوای آلوده از فلزات سنگین می‌باشد (Pulford & Watson, 2003). این فناوری، یک روش جایگزین یا مکمل بوده که همراه و یا به‌جای روش‌های مکانیکی برای پاک‌سازی با نیاز به سرمایه‌ی بالا، نیروی کار و انرژی متمرکز، به‌کار برده می‌شود. این فرآیند درجا<sup>۳</sup> بوده با بهره‌گیری از ویژگی‌های گیاهان برای اصلاح محیط زیست استفاده می‌شود (Prasad & Freitas, 2003). استفاده از گیاهان و ریزوموجودات مربوط به آن‌ها برای پاک‌سازی محیط زیست را گیاه‌پالایی می‌نامند. در این فرآیند گیاهان و ریزوموجودهای ریزوسفری موجود در ریشه آن‌ها با تجزیه آلاینده‌های آلی و هم‌چنین جذب آلاینده‌های معدنی از

5. Root Growth Promoting Bacteria, PGPR  
6. Accumulator Plants

1. Bioremediation  
2. Phytoremediation  
3. In situ  
4. Multi-process phytoremediation system

تیمار گیاه با ۱۱ نوع گیاه ذرت، سورگم، گندم، کلزا، زنیان، قیچ، مریم گلی، تاج خروس، رازیانه، یونجه زرد و کدو پوست کاغذی در سه تکرار تحت شرایط گلخانه‌ای انجام شد. برای این منظور، ابتدا بذور گیاهان مذکور به مدت ۳۰ ثانیه در الکل اتانول ۹۶ درصد قرار داده و سپس با وایتکس ۳۰ درصد به مدت ۹۰ ثانیه و بذر ذرت و کدو به مدت ۶۰ ثانیه در الکل اتانول ۹۶ درصد قرار داده و سپس با وایتکس ۳۰ درصد به مدت سه دقیقه ضدعفونی سطحی شدند. برای حذف وایتکس، بذرها چندین مرتبه با آب مقطر استریل شست‌وشو شدند. بذرها ضدعفونی شده در دمای ۲۸ درجه سلسیوس انکوباتور بر روی محیط آب-آگار جوانه‌دار شدند.

در این آزمون به‌منظور تراکم حداکثر ریشه در گلدان و تعامل بیش‌تر با خاک، گلدان‌های پلاستیکی یک کیلوگرمی با یک کیلوگرم خاک الک شده مورد نظر پر شد. در موقع کشت، تعداد هفت بذور جوانه‌دار کدو پوست کاغذی و ذرت رقم کرج ۷۰۳ در عمق سه سانتی‌متری خاک و سورگوم رقم اسپیدفید، زنیان، کلزا رقم Hyola401، ناز، مریم‌گلی، یونجه زرد، تاج خروس هرمی (Pyramidalis)، قیچ و گندم رقم دوروم در عمق دو سانتی‌متری خاک کشت شدند. بیست روز بعد از استقرار کامل گیاهچه‌ها، در هر گلدان چهار عدد گیاهچه که از نظر اندازه مشابه بودند، نگهداری شدند و سایر نهال‌ها از گلدان خارج شدند. ده روز پس از کشت کود نیترات آمونیم به میزان ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک بر اساس آزمون خاک به گلدان‌ها اضافه شد. در طول دوره رشد گلدان‌ها به روش وزنی و در حد ۸۰ درصد ظرفیت زراعی آبیاری شدند. مجموعاً ۳۳ گلدان به مدت ۶۰ روز در گلخانه با ۱۴ ساعت روشنایی و دمای روز (۲۵±۲) و شب (۱۹±۲) درجه سلسیوس نگهداری شدند.

پس از پایان دوره رشد، بخش هوایی گیاهان از محل طوقه قطع شد. پس از شست‌وشوی اندام هوایی با آب معمولی و آب مقطر در آون در دمای ۷۰ درجه سلسیوس خشک شدند تا وزن آن‌ها به حد ثابتی برسد. بعد از ۴۸ ساعت، نمونه‌ها از آون خارج و پس از توزین توسط آسیاب برقی پودر شدند (Abbaszadeh-Dahaji et al., 2020). به‌منظور تهیه عصاره، یک گرم از نمونه‌های پودر شده در دمای ۵۵۰ درجه سلسیوس به روش خشک‌سوزانی

(Braud et al., 2006). هم‌چنین عباس‌زاده دهجی و همکاران (Abbaszadeh-Dahaji et al., 2019) تأثیر باکتری‌های محرک رشد مقاوم به مس بر گیاه‌پالایی مس از خاک آلوده توسط سه گیاه ذرت، کدو و آفتابگردان را بررسی کردند. نتایج ایشان نشان داد که تلقیح این گیاهان با دو سویه *Pseudomonas cedrina* K4 و *Stenotrophomonas* sp. A22 باعث افزایش معنی‌دار غلظت و جذب مس در گیاهان مذکور شد.

علی‌رغم گسترش مناطق آلوده به مس ناشی از کارخانه‌های مختلف مس، پژوهش‌های محدودی در زمینه کاربرد باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد مقاوم به مس بر افزایش کارایی گیاه‌پالایی مس توسط گیاهان مختلف وحشی و زراعی هم‌چنین انجام شده است. از این‌رو، پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر سودوموناس‌های دارای توان بالای محرک رشدی گیاه بر تغییرات شیمیایی فلز مس در خاک، افزایش فراهمی این عنصر، افزایش رشد گیاهان و هم‌چنین جذب فلز سنگین مس از خاک توسط گیاهان مختلف زراعی و بومی در راستای پاکسازی خاک با فرآیندهای گیاه‌پالایی (به‌خصوص فرآیند گیاه‌استخراجی) برنامه‌ریزی شد.

## مواد و روش‌ها

### آزمون گلخانه‌ای اول

برای این منظور، خاک آلوده به مس جمع‌آوری شده از منطقه خاتون‌آباد شهر بآبک (32.1° 20' 22" N 55.4° 50' E) 32" بعد از هواخشک شدن از الک دو میلی‌متری گذرانده شد. برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک به روش‌های استاندارد اندازه‌گیری شد (Estefan et al., 2013) و نتایج آن در جدول ۱ گزارش شده است. بیش‌ترین غلظت مجاز مس در خاک‌های کشاورزی بین ۵۰ تا ۱۴۰ قسمت در میلیون می‌باشد که خاک مورد آزمایش با میزان ۳۲۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم مس (جدول ۱)، آلوده محسوب می‌شود (Kabata-Pendias & Pendias, 1992). به‌منظور انجام آزمون گلخانه‌ای اول برای شناسایی گیاهانی با توان بالاتر در استخراج و جذب مس از خاک تعدادی گیاهان دارویی، گیاهانی با زیست‌توده بالا، گیاهان بومی منطقه و گیاهان زراعی انتخاب شدند. این آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی با

گیاهان برداشت شده و با توجه به میزان جذب مس توسط هر گیاه، گیاهان با جذب بیش‌تر مس برای کشت دوم انتخاب شدند.

خاکستر شده و با استفاده از اسید کلریدریک دو نرمال به‌صورت محلول در آورده شدند. سپس غلظت عنصر مس در اندام هوایی بعد از عصاره‌گیری با استفاده از دستگاه جذب اتمی قرائت شد. پس از قرائت غلظت عنصر مس در

جدول ۱- برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده

Table 1. Some physicochemical properties of the investigated soil

Texture	pH	OM	N	EC	P	K	Fe	Mn	Zn	Cu	Zn	Mn	Cd	Pb	Cu	CCE
		%		dS m <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>		DTPA extractable (mg kg <sup>-1</sup> )				Total (mg kg <sup>-1</sup> )					%
Loam	8.35	0.55	0.042	3.20	12	280	5.00	9.00	2.00	42.0	29.1	350	0.22	5.20	327	12.1

EC: Electrical conductivity; CCE: Calcium carbonate equivalent; OM; Organic matter

اسپکتروفوتومتري) تنظیم شد، تلقیح گردید. پس از استقرار کامل گیاهچه‌ها، به تعداد چهار گیاهچه در هر گلدان کاهش یافت. ده روز پس از کشت، کود نیترا آمونیم به میزان ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک بر اساس آزمون خاک به گلدان‌ها اضافه شد. در طول دوره رشد گلدان‌ها به روش وزنی و در حد ۸۰ درصد ظرفیت زراعی آبیاری شدند. پس از پایان دوره رشد (بعد از ۶۰ روز)، ابتدا بخش هوایی گیاهان از محل طوقه قطع شد. پس از شست‌وشوی اندام هوایی با آب معمولی و آب مقطر در آون در دمای ۷۰ درجه سلسیوس خشک شدند تا وزن آن‌ها به حد ثابتی برسد. بعد از ۴۸ ساعت، نمونه‌ها از آون خارج و پس از توزین توسط آسیاب برقی پودر شدند. به‌منظور تهیه عصاره، یک گرم از نمونه‌های پودر شده در دمای ۵۵۰ درجه سلسیوس به روش خشک‌سوزانی خاکستر شده و با استفاده از اسید کلریدریک دو نرمال به‌صورت محلول در آورده شدند (Chapman, 1965). غلظت مس اندام هوایی و ریشه به‌وسیله دستگاه جذب اتمی قرائت شد. فاکتور انتقال<sup>۲</sup> (TF) نسبت غلظت فلز سنگین در ساقه به غلظت فلز سنگین در ریشه همان گیاه (Khairia, 2012). نیز برای عنصر مس در گیاهان کشت شده محاسبه شد.

عصاره‌گیری شکل‌های مختلف مس در خاک ریزوسفری در روش عصاره‌گیری تک‌مرحله‌ای به‌وسیله نیترا آمونیوم و DTPA طبق جدول ۳ استفاده شد.

## آزمون گلخانه‌ای دوم

به‌منظور بررسی تأثیر کاربرد باکتری‌های محرک رشدی مقاوم به مس و گیاهان انتخابی از کشت اول گلخانه‌ای و اثرات متقابل آن‌ها بر رشد گیاه و جذب مس از خاک آلوده، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. به‌منظور انتخاب باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه مقاوم به فلز مس، تعداد دو سویه PGPR با ویژگی‌های محرک رشدی بالا و حداقل غلظت بازدارنده مس ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (Abbaszadeh-Dahaji et al., 2018) از کلکسیون میکروبی موجود در بانک ژن گروه مهندسی علوم خاک دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان انتخاب شدند. این آزمایش با دو فاکتور گیاه و باکتری که به‌ترتیب گیاه شامل پنج نوع گیاه ذرت، قیچ، کلزا، کدو و گندم و باکتری‌های محرک رشد در سه سطح *P. putida* PA2، *Pseudomonas* sp PA3 و بدون باکتری، هر کدام با سه تکرار به اجرا درآمد. برخی صفات محرک رشدی سویه‌ها شامل اکسین، سیدروفور، حل‌کنندگی فسفات و آنزیم ACC-دآمیناز در جدول ۲ گزارش شده است. آماده‌سازی خاک و بذرها و کشت مطابق آزمون گلخانه‌ای اول انجام شد.

مطابق کشت قبلی به‌منظور تعامل بیش‌تر ریشه، خاک و باکتری در گلدان، گیاهان در سه تکرار در گلدان‌های یک کیلویی کشت شدند. سپس در هر گلدان تعداد هفت عدد بذر جوانه‌زنی شده گیاهان مختلف کشت و هر بذر با ۱۰۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری مورد نظر با جمعیت ۱۰<sup>۸</sup> واحد سلول که به روش OD<sup>۱</sup> (تهیه منحنی رشد بر اساس جمعیت و کدورت‌سنجی با دستگاه

جدول ۲- برخی صفات محرک رشدی سویه‌های مورد مطالعه

Table 2. Some of plant growth promoting characteristics of the studied case strains

Strains	Auxin	P solubilization	Siderophore	ACC-deaminase
	mg L <sup>-1</sup>		Halo colony <sup>-1</sup>	*
<i>P. putida</i> PA2	4.72	415	1.73	+
<i>P. fluorescence</i> PA3	10.2	374	2.21	+

\*: + بیانگر توانایی باکتری در تولید آنزیم ACC-دآمیناز می‌باشد ACC-deaminase می‌تواند تولید آنزیم ACC-دآمیناز می‌باشد  
enzyme

مرحله ۳: جداسازی شکل همراه با مواد آلی: ۱۰ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن (۳۰ درصد) به باقی‌مانده مرحله دو افزوده شد و هضم در اتاق (دمای ۲۲ تا ۲۵ درجه سلسیوس) به مدت یک ساعت صورت پذیرفت. سپس به مدت یک ساعت در حمام بخار (۸۵ درجه سلسیوس) قرار داده شد و کمی تکان داده شد و پس از خنک شدن ۲۵ میلی‌لیتر استات آمونیم یک مولار به آن اضافه شد. مرحله ۴: جداسازی شکل باقیمانده: ۷/۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۱۲ مولار + ۲/۵ میلی‌لیتر اسید نیتریک ۱۶ مولار در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۶ ساعت نگهداری و سپس به مدت دو ساعت تبخیر و تقطیر ملایم و در نهایت سرد و صاف شد (بدون سانتریفیوژ).

عصاره‌گیری دنباله‌ای نیز طبق روش یوری و همکاران (Ure et al., 1993) انجام شد. مراحل انجام آزمایش به صورت زیر انجام شد. مرحله ۱: جداسازی شکل محلول در آب و تبادل، پیوندهای ضعیف با مواد آلی و کربنات‌ها و فلزات (محلول در اسید استیک): افزودن ۲۰ میلی‌لیتر استیک اسید ۰/۱۱ مولار به یک گرم خاک ریزوسفری افزوده شد و به مدت ۱۶ ساعت تکان داده شد و ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مرحله ۲: جداسازی شکل اکسیدهای آهن و منگنز: ۲۰ میلی‌لیتر از هیدروکسیل‌آمین هیدروکلراید ۰/۱ مولار pH=۲ به باقی‌مانده مرحله یک افزوده و به مدت ۱۶ ساعت تکان داده شد.

جدول ۳- عصاره‌گیرهای استفاده شده در روش عصاره‌گیری تک مرحله‌ای

Table 3. Extractants used for single extraction

Extraction procedure	Soil:Solution	Shaking time (h)	Reference
1 M Ammonium nitrate	1:2.5	1(3000 rpm)	Gupta & Sinha, 2006
0.005 DTPA	1:2	1(3000rpm)	Lindsay & Norvell, 1978

مس در گیاه قیچ با میانگین ۱۷۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک گیاه و کمترین میزان با میانگین ۲۶/۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک گیاه در گیاه سورگوم مشاهده شد. از بین گیاهان مورد بررسی بیشترین جذب مربوط به کدوی پوست کاغذی با میانگین ۲۲۲ میکروگرم بر گلدان بوده و گیاهان سورگوم و تاج خروس به ترتیب با میانگین ۳۶ و ۴۶/۳ میکروگرم بر گلدان کمترین میزان جذب را به خود اختصاص دادند. ژانگ و همکاران (Zhang et al., 2009) در بررسی گیاه استخراجی کادمیم به وسیله ذرت نشان دادند که با افزایش جذب کادمیم توسط این گیاه درصد کادمیم قابل تبادل در خاک کشت شده کاهش یافت. به طور مشابه کاهش در سطح کادمیم در خاکی که ذرت کشت شده بود توسط مجیری (Mojiri, 2011) گزارش شد. گیاه پالایی مؤثر نیازمند به انتخاب یک گونه گیاهی مناسب، مقاوم به فلز، با

### تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

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

### نتایج و بحث

جدول تجزیه واریانس (جدول ۴) نشان داد، تمامی گیاهان مورد آزمایش تأثیر معنی‌داری در سطح یک درصد بر غلظت و جذب مس داشتند. هم‌چنین نتایج جدول مقایسه میانگین (جدول ۵) نشان داد کدوی پوست کاغذی با میانگین ۲/۴۵ گرم بر گلدان بیشترین میزان وزن خشک را دارا بود که با گیاه ذرت اختلاف معنی‌داری از نظر آماری نداشت. بر اساس نتایج، بیشترین غلظت

با دارا بودن بالاترین زیست‌توده گیاهی و هم‌چنین گیاهان کلزا و قیچ به‌دلیل دارا بودن بیش‌ترین غلظت مس اندام هوایی مجموعاً پنج گیاهی بودند که برای کشت دوم گلخانه‌ای انتخاب شدند.

زیست‌توده بالا و تکنیک‌های زراعی مشخص است. در رابطه با زیست‌توده گیاهان، به گیاهانی چون *Miscanthus giganteus* خانواده بید، خانواده پوپولوس، ذرت و خانواده سورگوم با زیست‌توده بالا توجه شده است (Soudek *et al.*, 2014). کدو پوست کاغذی، ذرت و گندم

جدول ۴- تجزیه واریانس اثرات گیاهان مختلف بر پالایش مس از خاک

Table 4. Analysis of variance for the effect different plants on remediation of Cu from soil

Source of variation	df	Mean square		
		Dry matter	Concentration of Cu	Uptake
Plant	10	1.12**	6379**	10805**
Error	22	0.01	60.9	96.8
CV (%)		8.98	9.38	10.0

\*\* نشان دهنده معنی‌داری در سطح احتمال  $p < 0.01$  بر اساس آزمون دانکن Duncan's test

جدول ۵- مقایسه میانگین وزن خشک، غلظت مس و جذب مس اندام‌هوایی گیاهان مختلف

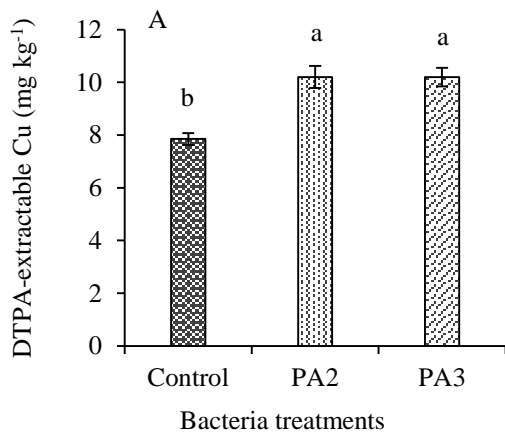
Table 5. Mean comparison of shoot dry weight, Cu concentration and Cu uptake in different type of plants

Treatment	Plant type	Shoot		
		dry weight $g\ pot^{-1}$	Cu concentration $mg\ kg^{-1}$	Cu uptake $\mu g\ pot^{-1}$
Maize	Crop plants	2.32a	48.5f	111c
Sorghum	Crop plants	1.37bc	26.1g	36.0f
Wheat	Crop plants	1.39b	110c	154b
Canola	Crop plants	1.08d	150b	161b
Ajwain	Medicinal Plants	1.01d	48.0f	49.0def
Zygophyllum	Indigenous plants	0.66e	172a	115c
Salvia	Medicinal Plants	1.17cd	47.6f	56.0de
Amaranth	Indigenous plants	0.62e	74.3e	46.3ef
Fennel	Medicinal Plants	1.22bcd	54.0f	66.0d
Yellow sweet clover	Indigenous plants	0.69e	91.9d	63.3de
Field pumpkin	Crop plants	2.45a	91.3d	222a

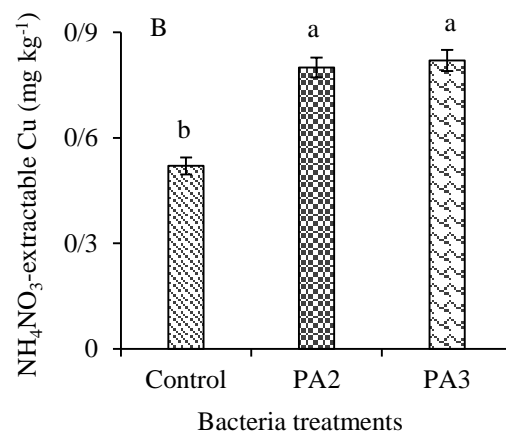
در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشند.

In each column means followed by the same letters are not significant different according to Duncan's multiple range test at  $p < 0.05$

به‌طور قابل توجهی استخراج فلزات سنگین توسط چهار عصاره‌گیر به‌ویژه DTPA را افزایش داد. کاربرد سویه باکتری PA2 باعث افزایش ۵۴ درصدی و کاربرد سویه باکتری PA3 باعث افزایش ۵۷ درصدی مس عصاره‌گیری شده به‌وسیله نیترات آمونیوم نسبت به شاهد گردید (شکل b1). اغلب فلزات سنگین موجود در خاک از تحرک کمی برخوردار هستند و به آسانی توسط ریشه گیاهان جذب نمی‌شوند. روابط متقابل میان ریشه گیاه و ریزموجودهای مفید خاکزی می‌تواند با افزایش زیست‌فراهمی عنصر مورد نظر در ریزوسفر گیاهان موجب بهبود قابلیت جذب زیستی فلزات سنگین موجود در ریزوسفر گیاه گردد (Saravanan *et al.*, 2007). در تمامی تیمارها مس عصاره‌گیری شده به‌وسیله DTPA بیش‌تر از مس عصاره‌گیری شده به‌وسیله نیترات آمونیوم بود. DTPA عامل کلات‌کننده مس بوده در حالی که مس عصاره‌گیری شده توسط نیترات آمونیوم تقریباً نشان-دهنده بخش مس تبدالی می‌باشد (Qasim *et al.*, 2015).



نتایج بررسی اثر کاربرد باکتری و گیاه بر گیاه‌پالایی مس از خاک آلوده اثر باکتری بر تغییرات شیمیایی بخش‌های مختلف روی در ریزوسفر مس استخراج شده توسط عصاره‌گیرهای تک مرحله‌ای اثر تیمار باکتری بر غلظت مس قابل عصاره‌گیری با DTPA و  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  از خاک ریزوسفری در سطح یک درصد معنی‌دار شد. تیمار باکتری باعث افزایش مس عصاره‌گیری شده نسبت به شاهد به‌وسیله عصاره‌گیر DTPA شد و بین تیمارهای باکتری PA2 و PA3 با میانگین ۱۰/۲ میلی‌گرم مس بر کیلوگرم خاک تفاوتی وجود نداشت (شکل a1). اثر باکتری بر غلظت مس عصاره‌گیری شده به‌وسیله نیترات آمونیوم نشان داد که دو تیمار باکتری PA2 و PA3 به‌ترتیب با میانگین‌های ۰/۸۰ و ۰/۸۲ میلی‌گرم مس بر کیلوگرم خاک تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشته و اما تفاوت معنی‌داری با شاهد داشتند (شکل b1). در بررسی توسط لی و ونگ (Li & Wong, 2010) در بیش‌تر موارد حضور باکتری



شکل ۱- تأثیر باکتری‌های محرک رشد بر مس قابل عصاره‌گیری با DTPA و  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  در خاک ریزوسفری

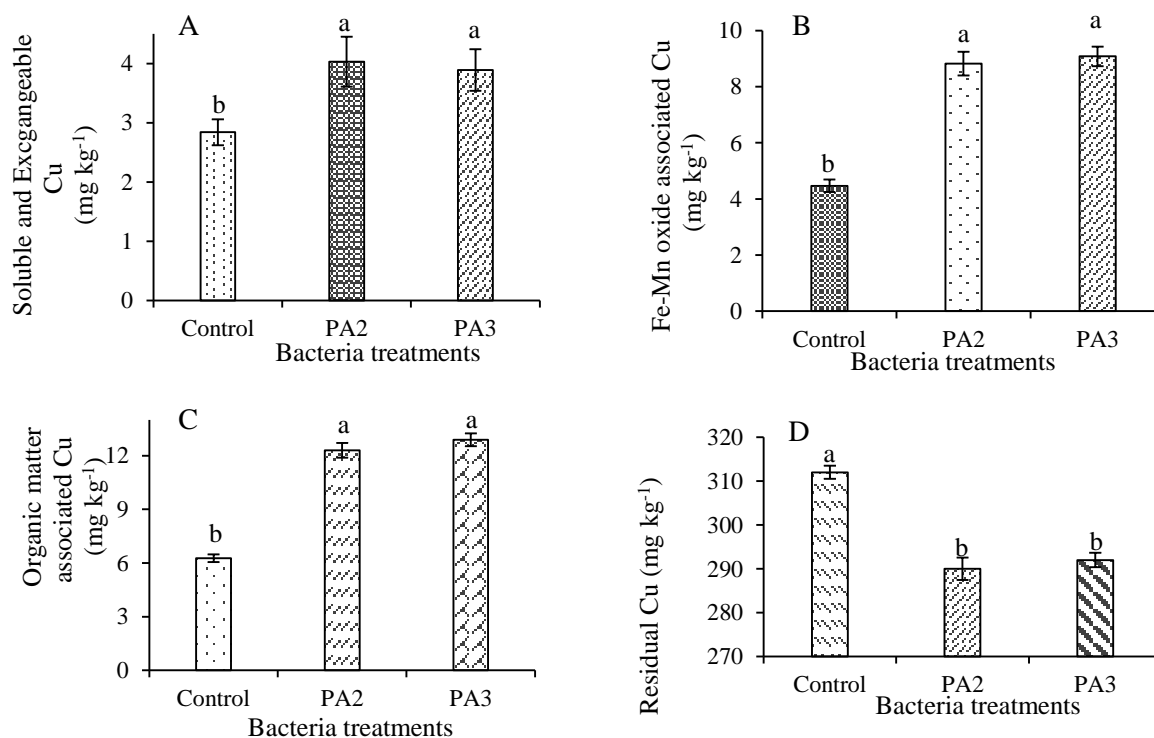
Figure 1. The effect of plant growth promoting rhizobacteria on DTPA and  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  extractable Cu from rhizosphere

محلول در آب کادمیم، مس و روی را در خاک افزایش داد (Li & Wong, 2010). اثر باکتری بر غلظت مس پیوند شده با اکسیدهای آهن و منگنز در سطح یک درصد معنی‌دار شد تلفیح دو سویه باکتری PA2 و PA3 با میانگین‌های ۸/۸۲ و ۹/۰۸ میلی‌گرم مس پیوند شده با اکسیدهای آهن و منگنز بر کیلوگرم خاک تفاوت معنی-داری با عدم کاربرد باکتری با میانگین ۴/۴۷ میلی‌گرم مس پیوند شده با اکسیدهای آهن و منگنز بر کیلوگرم

مس استخراج شده توسط عصاره‌گیرهای چند مرحله‌ای نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر باکتری بر مس محلول، تبدالی و کربناتی در سطح یک درصد معنی‌دار شد. با توجه به شکل (a2) کاربرد باکتری PA2 و PA3 به‌ترتیب با میانگین ۴/۰۳ و ۳/۸۹ میلی‌گرم مس بر کیلوگرم خاک تفاوت معنی‌داری نسبت به شاهد با میانگین ۲/۸۴ میلی-گرم مس بر کیلوگرم خاک داشتند. نتایج یک پژوهش نشان داد تلفیح باکتری به‌طور واضحی استخراج شکل

نتایج بیانگر نقش بسیار مهم باکتری‌های ریزوسفری در کاهش مقدار مس در جزء باقی‌مانده با فراهمی کم و اضافه کردن مس به بخش‌های دیگر با فراهمی بیش‌تر بود. ریز-جانداران خاک به عنوان کلوئیدهای آلی فعال خاک، ترکیبات آلی متنوعی، مانند اسیدهای آلی با وزن مولکولی کم، کربوهیدرات‌ها و آنزیم‌ها را ترشح می‌کنند (Huang *et al.*, 2004) که این امر موجب می‌شود تا pH ریزوسفر یک تا دو واحد با توده خاک متفاوت باشد. ریزموجودهای خاک‌زی تحرک فلز سنگین را به‌وسیله تغییرات اسیدیته و پتانسل رداکس یا به‌وسیله تولید عوامل کلات‌کننده و سیدروفورها افزایش می‌دهند (Handsa *et al.*, 2014). عباس‌زاده دهجی و همکاران (Abbaszadeh-Dahaji *et al.*, 2019) نقش باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد در کاهش شکل باقی‌مانده با فراهمی کم و افزایش شکل‌های محلول و تبدالی با فراهمی بسیار زیاد گزارش کردند.

خاک داشتند (b۲). تلقیح باکتری‌های محرک رشد گیاه باعث افزایش معنی‌دار مس پیوند شده با ماده آلی شد. تیمار دو سویه باکتری PA2 و PA3 با مقادیر میانگین ۱۲/۳ و ۱۲/۹ میلی‌گرم مس پیوند شده با ماده آلی بر کیلوگرم خاک اثر افزایشی و معنی‌دار بر غلظت مس پیوند شده با ماده آلی نسبت به عدم تلقیح باکتری با میانگین ۶/۲۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک داشتند (شکل c۲). یودام و همکاران (Udom *et al.*, 2004) نشان دادند که ترشحات ریشه و هم‌چنین مولکول‌های زیستی حاصل از متابولیسم ریزموجودهای ریزوسفر شامل ترکیبات محلول و غیرمحلولی هستند که تمایل زیادی به تشکیل کمپلکس پایدار با فلزات سنگین دارند. اثر باکتری بر مس باقی‌مانده در سطح یک درصد معنی‌دار شد. تلقیح دو سویه باکتری PA2 و PA3 باعث کاهش معنی‌دار مقدار مس باقی‌مانده در مقایسه با شاهد گردید (شکل d۲).



شکل ۲- تأثیر باکتری‌های محرک رشد بر مس محلول و تبدالی (a)، همراه با اکسیدهای آهن و منگنز (b)، همراه با مواد آلی (c) و باقیمانده (d) در خاک ریزوسفری

Figure 2. The effect of plant growth promoting rhizobacteria on soluble and exchangeable (a), Fe-Mn associated (b), organic matter associated (c) and residual (d) form of Cu from rhizosphere

در سطح یک درصد آماری معنی‌دار شد (جدول ۶). طبق جدول مقایسه میانگین (۷) گیاه کلزا با میانگین غلظت مس ۶۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک گیاه بیش‌ترین میزان غلظت مس را در بین گیاهان مورد آزمایش داشت.

اثر باکتری و گیاه بر غلظت مس در اندام‌هوایی و ریشه و فاکتور انتقال (TF) طبق نتایج تجزیه واریانس اثرات اصلی و هم‌چنین اثرات متقابل گیاه و باکتری بر غلظت مس در اندام‌هوایی گیاه



*sativa* تأثیرگذار بوده و به رشد این گیاه در شرایط تنش غلظت بالای کادمیم کمک کرد. نتایج تجزیه واریانس جدول ۶ نشان می‌دهد که اثرات اصلی گیاه بر روی فاکتور انتقال، در سطح یک درصد معنی‌دار بوده ولی اثر اصلی باکتری روی فاکتور انتقال معنی‌دار نبود. هم‌چنین اثرات متقابل گیاه و باکتری در سطح پنج درصد بر فاکتور انتقال معنی‌دار بود. طبق جدول مقایسه میانگین گیاه کلزا با میانگین ۰/۵۸۳ بیش‌ترین میزان فاکتور انتقال را داشت. کاربرد دو باکتری PA2 و PA3 و عدم تلقیح باکتری با میانگین ۰/۲۳۷، ۰/۲۲۰ و ۰/۲۰۸ تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند. بررسی اثر متقابل گیاه و باکتری نشان می‌دهد که بیش‌ترین میانگین فاکتور انتقال مربوط به اثر متقابل گیاه کلزا با دو جدایه باکتری PA2 و PA3 با مقادیر ۰/۶۹۶ و ۰/۶۳۰ بود و تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (جدول ۷). گزارش شده است که تلقیح باکتری محرک رشد فاکتور انتقال مس و روی از ریشه به برگ‌های گیاه *Salix coprea* در خاک آلوده را افزایش داد (De Maria et al., 2011). فاکتور انتقال نسبت غلظت فلز در ساقه به ریشه می‌باشد که به‌منظور گیاه‌استخراجی مقادیر ترجیحاً باید بیش‌تر از یک باشد. این پارامتر در گیاهان بیش‌اندوز معمولاً بیش‌تر از یک می‌باشد. (Mendez & Maier, 2008).

**اثر باکتری و گیاه بر وزن خشک اندام هوایی و ریشه**  
بر اساس نتایج، اثرات اصلی گیاهان منتخب و باکتری‌های محرک رشد مقاوم به مس و هم‌چنین اثرات متقابل گیاه و باکتری بر روی وزن خشک اندام هوایی گیاه در سطح یک درصد آماری معنی‌دار شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر اصلی باکتری بر وزن خشک ریشه در سطح یک درصد و اثرات متقابل گیاه و باکتری بر وزن خشک ریشه در سطح پنج درصد معنی‌دار شد (جدول ۶). بر اساس نتایج مقایسه میانگین گیاه کدو با میانگین ۴/۳۶ بیش‌ترین وزن خشک را به خود اختصاص داد و از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با دیگر گیاهان داشت. پس از کدو گیاه ذرت با ۲/۹۵ گرم بر گلدان وزن خشک اندام‌هوایی بهترین گیاه بود (جدول ۸). آندرازا و همکاران (Andrezza et al., 2013) عنوان کردند که گیاه *Brachiaria decumbens* پس از طی دوره رشد ۴۷ روزه،

اثرات اصلی کاربرد دو باکتری PA2 و PA3 باعث افزایش معنی‌دار و ۶۳/۰ و ۴۷/۶ درصدی غلظت مس در اندام‌هوایی گیاهان در مقایسه با شاهد شد. بررسی‌ها نشان داد که اثر متقابل گیاه کلزا و جدایه باکتری PA2 با میانگین ۹۰/۶ میلی‌گرم مس بر کیلوگرم وزن خشک گیاه بیش‌ترین غلظت مس در اندام هوایی را داشت و بعد از آن اثر متقابل گیاه کلزا با جدایه باکتری PA3 با میانگین ۷۱/۹ میلی‌گرم مس بر کیلوگرم وزن خشک گیاه قرار گرفت که تفاوت معنی‌داری با یکدیگر داشتند. طبق نتایج تجزیه واریانس اثرات اصلی و هم‌چنین اثرات متقابل گیاه و باکتری بر غلظت مس در ریشه گیاه در سطح یک درصد آماری معنی‌دار شد (جدول ۶). گیاه ذرت با میانگین ۱۸۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم بیش‌ترین میزان غلظت مس در ریشه را به خود اختصاص داد و تفاوت معنی‌داری با دیگر گیاهان داشت. کاربرد دو باکتری PA2 و PA3 با میانگین ۱۶۴ و ۱۷۰ میلی‌گرم مس بر کیلوگرم با بیش‌ترین میزان غلظت مس در ریشه تفاوت معنی‌داری با شاهد (عدم کاربرد باکتری) داشتند. در یک گزارش توسط وو و همکاران (Wu et al., 2006) غلظت مس و کادمیم در اندام هوایی گیاه *Brassica juncea* در حالی که با باکتری محرک رشد تلقیح شده بود افزایش یافت. با این حال به نظر می‌آید، باکتری بیش‌تر وظیفه حفاظت از گیاه در برابر شرایط تنش ایفا می‌کند که به وضوح در تولید زیست‌توده قابل مشاهده بود. با توجه به جدول ۷ بیش‌ترین میانگین غلظت مس در ریشه غلظت مس ریشه در تیمار گیاه کدو و باکتری PA3 با ۲۲۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم مس بود. افزایش غلظت مس در شرایط تلقیح گیاهان به این سوئه-ها را می‌توان به توانایی این سوئه در تولید آنزیم ACC-دآمیناز نسبت داد. هم‌چنین تولید اکسین، سیدروفور و هم‌چنین توان انحلال فسفات‌های نامحلول همراه با کاهش pH نیز می‌تواند نقش مؤثری بر افزایش غلظت مس در گیاهان داشته باشد. تلقیح *B. juncea* با باکتری-های محرک رشد مقاوم به نیکل شامل *Psychrobacter sp.* و *Bacillus cereus* باعث افزایش تجمع نیکل در ساقه و ریشه گیاه مورد نظر شد (Ma et al., 2009). بررسی کامران و سیاد (Kamran & Syed, 2015) نشان داد که تلقیح بذری با *P. putida* بر جذب کادمیم توسط گیاه *E.*

شاهد شدند. با توجه به جدول ۸ بیش‌ترین میانگین وزن خشک اندام‌هوایی مربوط به اثر متقابل گیاه کدو به ترتیب با دو باکتری PA2 با میانگین ۴/۹۶ و PA3 با میانگین ۴/۶۸ گرم بر گلدان بود که تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. با توجه به اینکه سویه‌های مورد استفاده توانایی تولید اکسین را دارا هستند (جدول ۲)، یکی از دلایل افزایش زیست‌توده گیاهی را می‌توان به تولید اکسین نسبت داد.

در خاک آلوده به مس، توانست میزان زیادی زیست‌توده تولید کند و در نتیجه جذب مس بالایی از خود نشان داد. به‌طوری‌که یک گیاه مناسب برای پالایش مس از خاک آلوده به مس گزارش شد. نتایج نشان داد که تلقیح گیاهان با سویه‌های مقاوم به مس باعث افزایش معنی‌دار وزن خشک اندام‌هوایی در مقایسه با شاهد شد. تیمارهای دو سویه PA2 و PA3 به ترتیب باعث افزایش معنی‌دار و ۳۰ و ۲۳/۷ درصدی وزن خشک اندام‌هوایی در مقایسه با

جدول ۶- تجزیه واریانس تأثیر تیمار گیاه و باکتری بر وزن خشک، غلظت، جذب مس و فاکتور انتقال (TF) در اندام‌هوایی و ریشه  
Table 6. Analysis of variance for the effect different plants and bacteria on dry matter, Cu concentration, Cu uptake and translocation factor (TF) in shoot and root

Source of variation	df	Mean Square						
		Shoot dry weight	Root dry weight	Shoot Cu concentration	Root Cu concentration	Shoot Cu uptake	Root Cu uptake	TF
Plant	4	**26.1	**5.67	**4671	6039**	9221**	225496**	0.402**
Bacteria	2	**1.31	**0.270	**703	17113**	3073**	43725**	0.003 <sup>ns</sup>
Plant*Bacteria	8	0.305**	*0.024	369**	1929**	623**	8046**	0.017**
Error	30	0.030	0.008	14.4	288	66.6	597	0.002
CV (%)	-	9.28	10.0	13.3	11.4	19.9	15.7	12.8

ns, \* and \*\*: not significant, significant at  $p < 0.05$ , and significant at  $p < 0.01$ , respectively based on Duncan's test.

جدول ۷- مقایسه میانگین برهمکنش گیاه و باکتری بر غلظت مس در اندام‌هوایی و ریشه (میلی‌گرم بر کیلوگرم) و فاکتور انتقال (TF)  
Table 7- Mean comparison of the effect of plant and bacteria on shoot and root Cu concentration ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) and Translocation factor (TF)

Plant	Shoot data		
	Bacteria		
	Control	PA2	PA3
Maize	28.9h	11.3h	12.0h
Wheat	13.4h	14.6gh	14.3gh
Canola	38.6c	90.6a	71.9b
Zygophyllum	26.7ef	29.5de	34.4cd
Field pumpkin	16.0gh	23.8ef	20.6fg
Plant	Root data		
	Bacteria		
	Control	PA2	PA3
Maize	142b-d	211a	198a
Wheat	125de	169b	159bc
Canola	92.0fg	133c-e	116d-f
Zygophyllum	110ef	142b-d	157bc
Field pumpkin	78.9g	168b	224a
Plant	TF data		
	Bacteria		
	Control	PA2	PA3
Maize	0.063e	0.053e	0.063e
Wheat	0.106e	0.086e	0.093e
Canola	0.423b	0.696a	0.630a
Zygophyllum	0.246c	0.206cd	0.223cd
Field pumpkin	0.203cd	0.146de	0.093e

تیمارهای دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشند.  
Means followed by the same letters are not significant different according to Duncan's multiple range test at  $p < 0.05$ .

دو باکتری PA2 و PA3 به ترتیب با میانگین وزن خشک ریشه ۱/۰۱ و یک گرم بر گلدان باعث افزایش معنی دار این ویژگی در مقایسه با شاهد (عدم کاربرد باکتری) شدند (جدول ۸). همان طور که مشاهده می شود بیشترین میانگین وزن خشک ریشه مربوط به اثر متقابل گیاه ذرت با دو باکتری PA3 با میانگین ۲/۴۷ و PA2 با میانگین ۲/۴۳ گرم بر گلدان وزن خشک ریشه بود که تفاوت معنی داری با یکدیگر نداشتند. با توجه به توانایی این سویه ها در تولید آنزیم ACC-دآمیناز افزایش وزن خشک ریشه را می توان به کاهش اتیلن تنشی در این گیاهان نسبت داد. همچنین در پژوهشی افزایش وزن ساقه و وزن تر ریشه در بوته های تلقیح شده به وسیله باکتری های ریزوسفری محرک رشد گیاه *Pseudomonas aeuroginos* و *P. julifora* با هدف حذف آلودگی فلوراید از محیط آلوده مشاهده شد (Chaudhary & Khan, 2014)

بکرا- کسترو و همکاران (Becerra-Castro *et al.*, 2012) اثر ۱۴ سویه باکتری ریزوسفری مقاوم به روی و کادمیم بر رشد و تجمع فلز روی و کادمیم در گیاه *Festuca pratensis* و *Salix viminalis* را بررسی کردند. نتایج نشان داد که تقریباً همه سویه ها باعث تحریک رشد گیاهان و در نتیجه افزایش تجمع روی و کادمیم در بافت گیاه شدند. هر دو سویه توان تولید آنزیم ACC-دآمیناز را دارا هستند (جدول ۲). باکتری های تولید کننده آنزیم ACC-دآمیناز با کاهش سطح اتیلن گیاهان به ویژه در شرایط تنش می توانند باعث افزایش رشد و زیست توده گیاهی شود (Glick, 2004).

در بین گیاهان مورد آزمایش، گیاه ذرت با ۲/۳۰ گرم بر گلدان بیشترین میانگین وزن خشک ریشه را به خود اختصاص داد و با گیاه کدو با میانگین ۰/۹۶۶ گرم بر گلدان وزن خشک ریشه تفاوت معنی داری داشت. کاربرد

جدول ۸- مقایسه میانگین برهم کنش گیاه و باکتری بر وزن خشک اندام هوایی و ریشه (گرم بر گلدان)

Table 8. Mean comparison of the effect of plant and bacteria on shoot and root dry weight (g pot<sup>-1</sup>)

Plant	Shoot data		
	Control	PA2	PA3
Maize	2.50c	3.22b	3.14b
Wheat	0.580d	0.745d	0.700d
Canola	0.610d	0.825d	0.845d
Zygophyllum	0.560d	0.671d	0.646
Field pumpkin	3.44b	4.96a	4.68a
Plant	Root data		
	Control	PA2	PA3
Maize	2.00b	2.43a	2.47a
Wheat	0.323i	0.386hi	0.405g-i
Canola	0.420f-i	0.601e	0.583ef
Zygophyllum	0.410f-i	0.573e-g	0.553e-h
Field pumpkin	0.770d	1.10c	1.03c

تیمارهای دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی دار در سطح پنج درصد بر اساس آزمون دانکن می باشند.

Means followed by the same letters are not significant different according to Duncan's multiple range test at p<0.05.

نشان داد که کاربرد دو باکتری PA2 و PA3 باعث افزایش معنی دار جذب مس و با میانگین ۵۲/۴ و ۴۵/۵ میکروگرم در گلدان اختلاف معنی داری با شاهد ایجاد کردند. کاربرد باکتری های محرک رشد گیاه مقاوم به کادمیم نقش مؤثری در افزایش جذب کادمیم توسط گیاهان در یک خاک آلوده داشت (Khan *et al.*, 2018). اثر متقابل کدو و سویه باکتری PA2 با میانگین ۱۱۹ میکروگرم در گلدان بیشترین جذب مس را به خود اختصاص داد (جدول ۹).

اثر باکتری و گیاه بر جذب مس در اندام هوایی و ریشه طبق نتایج تجزیه واریانس اثرات اصلی و هم چنین اثرات متقابل گیاه و باکتری بر جذب مس توسط اندام هوایی گیاه در سطح ۱ درصد آماری معنی دار شد (جدول ۶). گیاه کدو با میانگین ۹۰/۲ بیشترین میزان جذب را داشت و گیاهان کلزا، ذرت، قیچ و گندم به ترتیب با میانگین ۵۳/۳، ۳۲/۵، ۱۹/۰ و ۹/۶۱ در رده های بعدی و با اختلاف معنی داری از یکدیگر قرار گرفتند. اثرات اصلی

دهند. بسیاری از مطالعات، افزایش در رشد گیاه و افزایش زیست‌توده آن را به تولید فیتوهورمون‌ها (از جمله ایندول استیک اسید IAA) نسبت می‌دهند. جلوگیری از تولید اتیلن در شرایط استرسی (به دلیل فعالیت دامیناز) یا بهبود تغذیه گیاه به دلیل حضور تثبیت‌کننده‌های  $N_2$  یا حل‌کننده‌های فسفات یا تولیدکنندگان سیدروفور، رشد گیاه را تحریک کرده و در استخراج فلزات سنگین نقش مهمی ایفا می‌کند (Sessitsch et al., 2013). عدم کاربرد باکتری با میانگین ۹۳/۴ میکروگرم در گلدان کم‌ترین میزان جذب مس توسط ریشه را داشت. اثر متقابل گیاه ذرت با جدایه‌های PA2 و PA3 به ترتیب با میانگین ۵۱۴ و ۴۸۹ بیش‌ترین میانگین جذب مس توسط ریشه را داشتند که تفاوت معنی‌داری نیز با یکدیگر نداشتند. گیاه *Brachiaria decumbens* کشت شده در خاک آلوده به مس، توانست با تولید میزان بالایی ریشه جذب مس بالایی توسط ریشه از خود نشان دهد و نقش کارآمدی در استخراج فلز سنگین مس در خاک از خود نشان دهد (Andreazza et al., 2013).

تلقیح گوجه‌فرنگی و کلم با جدایه *Pantoea agglomerans* موجب افزایش جذب مس گردید (Dursun et al., 2010). تلقیح سویه‌های باکتری ریزوسفری بر غلظت روی و کادمیم در برگ‌های گیاه *Salix viminalis* تأثیر معنی‌داری نداشت اما تولید زیست‌توده و در نتیجه استخراج روی و کادمیم را توسط گیاه افزایش داد (Bacerra-Castro, 2012). طبق نتایج تجزیه واریانس اثرات اصلی و هم‌چنین اثرات متقابل گیاه و باکتری بر جذب مس توسط ریشه گیاه در سطح ۱ درصد آماری معنی‌دار شد (جدول ۶). همانطور که در جدول (۸) مشاهده می‌شود، گیاه ذرت با میانگین جذب ۴۲۸ میکروگرم در گلدان بیش‌ترین میزان جذب مس در ریشه را داشت و پس از آن گیاه کدو با میانگین ۱۶۰ میکروگرم در گلدان با تفاوت معنی‌داری قرار داشت. کاربرد دو باکتری PA2 و PA3 با میانگین ۱۸۴ و ۱۸۸ میکروگرم در گلدان با بیش‌ترین میزان جذب مس توسط ریشه، تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند. میکروارگانیسم‌های مقاوم به عناصر کم‌یاب می‌توانند استقرار و رشد گیاه را در شرایط استرسی غلظت بالای عناصر کم‌یاب افزایش

جدول ۹- مقایسه میانگین برهمکنش گیاه و باکتری بر جذب مس در اندام‌هوایی و ریشه (میکروگرم در گلدان)  
Table 9. Mean comparison of the effect of plant and bacteria on shoot and root Cu uptake ( $\mu\text{g pot}^{-1}$ )

Plant	Shoot data		
	Bacteria		
	Control	PA2	PA3
Maize	23.2e-g	36.7ef	37.8e
Wheat	7.83g	10.8g	10.2g
Canola	23.3e-g	75.9c	60.7d
Zygophyllum	14.9g	19.8g	22.3fg
Field pumpkin	55.1d	119a	96.4b
Plant	Root data		
	Bacteria		
	Control	PA2	PA3
Maize	283b	514a	489a
Wheat	40.3ef	64.6ef	64.6ef
Canola	38.3f	79.0ef	68.0ef
Zygophyllum	44.7ef	81.6ef	87.0e
Field pumpkin	61.0ef	186d	234c

تیمارهای دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشند.

Means followed by the same letters are not significant different according to Duncan's multiple range test at  $p < 0.05$ .

البته گیاهانی با زیست‌توده بیش‌تر مانند ذرت و کدو به دلیل جذب بیش‌تری از مس، نسبت به گیاهی چون قیچ که غلظت بالاتری نسبت به آن‌ها داشت، در اولویت قرار گرفتند. کاربرد باکتری‌های محرک رشد مقاوم به

### نتیجه‌گیری کلی

نتایج پژوهش نشان داد که بعضی از گیاهان با توانایی تحمل شرایط تنش فلزات سنگین، راهکار موفقیت‌آمیزی در اصلاح خاک آلوده به فلزات سنگین به شمار می‌آیند.

اجزای زیست‌فراهم‌تر در خاک ریزوسفری گردید و به موجب این افزایش زیست‌فراهمی، افزایش جذب و به دنبال آن افزایش مس استخراجی توسط گیاه مشاهده شد. در این مطالعه اثر متقابل هر دو سویه باکتری با گیاه کدو جذب مس معنی‌داری نسبت به دیگر تیمارها به دنبال داشت.

مس با ویژگی‌های محرک رشدی مناسب چون تولید اکسین و سیدروفور، حل‌کنندگی فسفات و هم‌چنین تولید ACC- دآمیناز با اثر مثبت بر افزایش رشد و فراهمی مس در ریزوسفر گیاهان باعث افزایش جذب مس و استخراج مس توسط گیاه از خاک آلوده شد. تلقیح گیاهان با باکتری‌های محرک رشد مقاوم باعث افزایش

## Reference

- Abbaszadeh-Dahaji P., Baniasad-Asgari A., and Hamidpour M. 2019. The effect of Cu-resistant plant growth-promoting rhizobacteria and EDTA on phytoremediation efficiency of plants in a Cu-contaminated soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 26: 31822-31833.
- Abbaszadeh-Dahaji P., Masalehi F., and Akhgar A. 2020. Improved growth and nutrition of Sorghum (*Sorghum bicolor*) plants in a low-fertility calcareous soil treated with plant growth-promoting rhizobacteria and Fe-EDTA. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 20: 31-42
- Abbaszadeh-Dahaji P., Saleh-Rastin N., Asadi-Rahmani H., Khavazi K., Soltani A., Shoary-Nejati A.R., and Miransari M. 2018. Correction to: plant growth-promoting activities of fluorescent pseudomonads, isolated from the Iranian soils. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40:26
- Andreazza R., Bortolon L., Pieniz S., and Camargo F.A.O. 2013. Use of high-yielding bioenergy plant castor bean (*Ricinus communis* L.) as a potential phytoremediator for copper-contaminated soils. *Pedosphere*, 23: 651-661.
- Becerra-Castro C., Monterroso C., Prieto-Fernández A., Rodríguez-Lamas L., Loureiro-Viñas M., Acea M.J. and Kidd P.S. 2012. Pseudometallophytes colonizing Pb/Zn mine tailings: a description of the plant-microorganism-rhizosphere soil system and isolation of metal-tolerant bacteria. *Journal of Hazardous Materials*, 217-218: 350-359.
- 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.
- Braud A., Jezequel K., Vieille E., Tritter A., and Lebeau T. 2006. Changes in extractability of Cr and Pb in a polycontaminated soil after bioaugmentation with microbial producers of biosurfactants organic acids and siderophores. *Water Air and Soil Pollution: Focus*, 6: 261-279.
- Chapman H.D. 1965. Cation exchange capacity. In: *Methods of Soil Analysis* (Edited by Black, C. A.) (2): 891-901.
- Chaudhary K., and Khan S. 2014. Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on plant growth and fluoride (F) uptake by F hyperaccumulator plant *Prosopis juliflora*. *International Journal of Recent Scientific Research*, 5: 1995-1999.
- De Maria S., Rivelli A.R., Kuffner M., Sessitsch A., Wenzel W.W., Gorfer M., Strauss J., and Puschenreiter M. 2011. Interactions between accumulation of trace elements and major nutrients in *Salix caprea* after inoculation with rhizosphere microorganisms. *Chemosphere*, 84: 1256-1261.
- Dursun A., Kinci M.E., and Donmez M.F. 2010. Effects of foliar application of plantgrowth promoting bacterium on chemical contents, yield and growth of tomato (*Lycopersicon esculent* L.) and cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Pakistan Journal Botany*, 42(5): 3349-3356.
- Estefan G., Sommer R., and Ryan J. 2013. Methods of soil, plant and water analysis: a manual for the West Asia and North Africa region. ICARDA, Beirut, Lebanon.
- García-Niño W.R., and Pedraza-Chaverrí J. 2014. Protective effect of curcumin against heavy metals-induced liver damage. *Food and Chemical Toxicology*, 69: 182-201.
- Glick B.R. 2004. Teamwork in phytoremediation. *Nature Biotechnology*, 22: 526-527.
- Guo J., and Chi J. 2014. Effect of Cd-tolerant plant growth-promoting rhizobium on plant growth and Cd uptake by *Lolium multiflorum* Lam. and *Glycine max* (L.) Merr. in Cd-contaminated soil. *Plant and Soil*, 375(1): 205-214.
- Gupta A.K., and Sinha S. 2006. Chemical fractionation and heavy metal accumulation in the plant of *Sesamum indicum* (L.) var. T55 grown on soil amended with tannery sludge, selection of single extractants. *Chemosphere*, 64: 161-173.

- Handsa A., Kumar V., Anshumali 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.
- Haque N., Peralta-Videa J.R., Jones G.L., Gill T.E., and Gardea-Torresdey J.L. 2008. Screening the phytoremediation potential of desert broom (*Baccharis sarothroides* Gray) growing on mine tailings in Arizona, USA. *Environmental Pollution*, 153: 362-368.
- Huang Q., Chen W., and Guo X. 2004. Chemical fractionation of copper, zinc, and cadmium in two Chinese soils as influenced by rhizobia. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 35: 947-960.
- Huang X.D., El-Alawi Y., Gurska J., Glick B.R., and Greenberg B.M. 2005. A multi-process phytoremediation system for decontamination of persistent total petroleum hydrocarbons (TPHs) from soils. *Microchemical Journal*, 81: 139-147.
- Kabata-Pendias A., and Pendias H. 1992. Trace elements in soils and plants. CRC Press, Boca, Ann Arbor London.
- Kamran M.A., and Syad, J.H. 2015. Effect of plant growth-promoting rhizobacteria inoculation on cadmium (Cd) uptake by *Eruca sativa*. *Environmental Science Pollution Research*, 22: 9275-9283.
- Khairia M.A.Q. 2012. Assessment of heavy metals accumulation in native plant species from soils contaminated in Riyadh city, Saudi Arabia. *Life Science Journal*, 9(2): 348-392.
- Khan W.U., Yasin N.A., Ahmad S.R., Ali A., Ahmad A., Akram W., and Faisal M. 2018. Role of *Burkholderia cepacia* CS8 in Cd-stress alleviation and phytoremediation by *Catharanthus roseus*. *International Journal of Phytoremediation*, 20(6): 581-592.
- Li W.C., and Wong M.H. 2010. Effects of bacteria on metal bioavailability, speciation, and mobility in different metal mine soils: a column study. *Journal of Soils Sediments*, 10: 313-325.
- Lindsay W.L., and Norwell W.A. 1978. Department of a DTPA soil test for zinc, iron and manganese and copper. *Soil Science Society of America Journal*, 42: 421-428.
- Ma Y., Rajkumar M., and Freitas, H. 2009. Inoculation of plant growth promoting bacteria *Achromobacter xylosoxidans* strain Ax10 for improvement of copper phytoextraction by *Brassica juncea*. *Journal of Environmental Management*, 90: 831-837.
- Madhaiyan M., Poonguzhali S., and Sa T. 2007. Metal tolerating methylotrophic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Chemosphere*, 69: 220-228.
- Mendez M.O., and Maier R.M. 2008. Phytostabilization of mine tailings in arid and semiarid environments-an emerging remediation technology. *Environmental Health Perspectives*, 116: 278-283.
- Mojiri A. 2011. The potential of Corn (*Zea mays* L.) for phytoremediation of soil contaminated with cadmium and lead. *Journal of Biology and Environmental Science*, 5: 17-22.
- Pilon-Smith E. 2005. Phytoremediation: *Annual Review Plant Biology*, 56: 15-39.
- Ping L., and Boland W. 2004. Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*, 9: 263-266.
- Prasad M.N.V., and Freitas H.M.O. 2003. Metal hyper-accumulation in plants: Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology*, 6(3): 285-305.
- Pulford I.D., and Watson C. 2003. Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees: A review. *Environmental International*, 29: 529-540.
- Qasim B., Motelica-Heino M., Joussein E., Soubrand M., and Gauthier A. 2015. Potentially toxic element phytoavailability assessment in Technosols from former smelting and mining areas. *Environmental Science and Pollution Research*, 22 (8): 5961-5974.
- Rajkumar M., Ma Y., and Freitas H. 2008. Characterization of metalresistant plant-growth promoting *Bacillus weihenstephanensis* isolated from serpentine soil in Portugal. *Journal of Basic Microbiology*, 48: 500-508.
- Rizvi A., and Khan M.S. 2018. Heavy metal induced oxidative damage and root morphology alterations of maize (*Zea mays* L.) plants and stress mitigation by metal tolerant nitrogen fixing *Azotobacter chroococcum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 157: 9-20.
- Samani Majd S., Taebi A., and Ophyoni M. 2008. Contamination of soils to lead and cadmium in urban streets margin. *Journal of Environmental Studies*, 33: 1-10.

- 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.
- Sessitsch A., Kuffner M., Kidd P., Jaco Vangronsveld J., Walter W., Wenzel W.W., Fallmann K., and Puschenreiter, M. 2013. The role of plant-associated bacteria in the mobilization and phytoextraction of trace elements in contaminated soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 60: 182-194.
- Soudek P., Petrova S., Vančková R., Song J., and Vanek T. 2014. Accumulation of heavy metals using *Sorghum Sp.* *Chemosphere*, 104: 15-24.
- Udom B.E., Mbagwu J.S.C., Adesodun J.K., and Agbim, N.N. 2004. Distribution of zinc, copper, cadmium and lead in a tropical ultisol after long-term disposal of sewage sludge. *Environment International*, 30: 467-470.
- Ure A.M., Quevauviller P.H., Muntau H., and Griepink B. 1993. Speciation of heavy metal in soils and sediments. An account of the improvement and harmonisation of extraction techniques undertaken under the auspices of the BCR of the Commission of the European Communities. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 51: 135-151.
- Wu S.C., Cheung K.C., Luo Y.M., and Wong M.H. 2006. Effects of inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria on metal uptake by *Brassica juncea*. *Environmental Pollution*, 140: 124-135.
- Yang D., Zeng D.H., Li L.J., and Mao R. 2012. Chemical and microbial properties in contaminated soils around a magnesite mine in Northeast China. *Land Degradation and Development*, 23: 256-262.
- Zhang H., Dang Z., Zheng L.C., and Yi X.Y. 2009. Remediation of soil co-contaminated with pyrene and cadmium by growing maize (*Zea mays* L.). *International Journal of Environmental Science and Technology*, 6(2): 249-258.

## Effect of Plant Growth Promoting *Pseudomonas* on Copper Phytoremediation by some Indigenous and Crop Plants

Payman Abbaszadeh-Dahaji<sup>1\*</sup>, Zahra Karimi<sup>2</sup>, Mohsen Hamidpour<sup>3</sup>, Abdolreza Akhgar<sup>3</sup>

(Receive: January 2020      Accept: August 2020)

### Abstract

Remediation of heavy metals contaminated soils by plants is one of the most cost-effective and environmentally friendly methods. In some cases, useful soil microorganisms are used to increase the plants efficiency in heavy metal remediation. The aim of this study was to investigate the effect of rhizospheric pseudomonads on increasing the phytoremediation efficiency in copper (Cu)-contaminated soils. The first experiment was carried out in a completely randomized design in three replications with 11 plant treatments (Maize (*Zea mays*), sorghum (*Sorghum bicolor*), wheat (*Triticum aestivum*), canola (*Brassica napus*), Fennel (*Foeniculum vulgare*), Amaranth (*Amaranthus*), Salvia (*Salvia officinalis*), Zygophyllum (*Zygophyllum*), Ajwain (*Trachyspermum ammi*), alfalfa (*Medicago sativa*) and pumpkin (*Cucurbita*)). The highest Cu concentration and uptake were related to Zygophyllum with 173 mg kg<sup>-1</sup> and pumpkin with 222 μg pot<sup>-1</sup>, respectively. Five plants including pumpkin, maize, wheat, canola, and Zygophyllum were selected based on the highest Cu concentration and uptake of for the second experiment. The second experiment was designed in a completely randomized design with two factors including plant types at five levels (pumpkin, maize, canola, wheat and Zygophyllum) and three levels of bacteria (non-bacterial inoculation, *Pseudomonas putida* PA2 strain, *Pseudomonas fluorescence* PA3) in three replications. In this section, the shoots and roots dry weight; Cu concentration and uptake in shoots and roots, as well as the chemical changes of the Cu in the rhizosphere were investigated. The use of both strains of the bacteria significantly increased the dry weight, concentration and uptake of Cu in shoots and roots compared to the control. Among the plants, pumpkin had the highest uptake of Cu in shoots due to high biomass (90.2 μg pot<sup>-1</sup>) (the most effective in phytoextraction) and maize due to its high root weight had the highest Cu uptake (428 μg pot<sup>-1</sup>) (effective in high Phytostabilization). Investigation of the chemical forms of Cu in the rhizosphere showed that inoculation by PA2 and PA3 growth-promoting bacteria increased 41.9 and 37% of soluble and exchangeable forms of Cu respectively, and decreased the residual form of copper up to 7.05 and 6.41%. The overall results showed that the growth-promoting bacteria play an effective role in increasing the phytoremediation, especially the phytoextraction and pumpkin with the highest Cu uptake was the most efficient plant in the Cu phytoremediation in this study.

**Keywords:** Heavy metals, Maize, Pumpkin, Phytoremediation, Sequential extraction

Abbaszadeh-Dahaji P., Karimi Z., Hamidpour M., and Akhgar A. 2021. Effect of plant growth promoting pseudomonas on copper phytoremediation by some indigenous and crop plants. *Applied Soil Research*. 9(1): 41-56.

1. Assistant Professor, Department of Soil Science, College of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran

2. M.Sc. Graduate student, Department of Soil Science, College of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran

3. Associate Professor, Department of Soil Science, College of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran

\* Corresponding Author Email: [p.abbaszadeh@vru.ac.ir](mailto:p.abbaszadeh@vru.ac.ir)