

اثر باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه و سیدروفور بر توزیع شکل‌های شیمیایی روی در خاک و جذب آن توسط ذرت

حمیده نعمتی^۱، محسن حمیدپور^{۲*}، پیمان عباس زاده^۳ و حمیدرضا روستا^۴

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۲/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۱۹)

چکیده

موفقیت در امر گیاه پالایی خاک‌های آلوده به فلزات سنگین تا حد زیادی به فراهمی زیستی آن‌ها بستگی دارد. برای بررسی برهمکنش سیدروفور DFOB (۰، ۷۰ و ۱۴۰ میکرومول دسفرواکسامین بر کیلوگرم خاک) و جدایه‌های مقاوم به فلزات باکتری سودوموناس (p19, p18, p15, p0) بر تجمع روی در ذرت و تغییرات گونه‌بندی شیمیایی آن، نمونه‌هایی از یک خاک آلوده به روی به گلدان‌های یک کیلوگرمی منتقل شد. گیاهان بعد از ۶۰ روز برداشت شدند. نتایج نشان داد تلقیح باکتریایی گیاهان، غلظت روی در اندام هوایی گیاه را افزایش داد. همچنین اضافه نمودن ۱۴۰ میکرومول سیدروفور بر کیلوگرم خاک به گیاهان تلقیح شده با جدایه p15، غلظت روی در ریشه گیاه را در مقایسه با شاهد به طور معنی‌داری افزایش داد. جذب روی نیز در گیاهان تلقیح شده با جدایه‌های باکتریایی به طور معنی‌داری افزایش یافت. با کاربرد سیدروفور غلظت روی قابل استخراج توسط DTPA در خاک افزایش یافت. کاربرد سیدروفور و تلقیح جدایه‌های باکتری، غلظت روی پیوند شده با کربنات‌ها را به طور معنی‌داری کاهش و غلظت روی محلول را افزایش داد. براساس نتایج این پژوهش، کاربرد لیگاند سیدروفور به همراه جدایه‌های مقاوم باکتریایی می‌تواند فراهمی زیستی روی را در خاک افزایش دهد که این موضوع از اهمیت زیادی در گیاه پالایی خاک‌های آلوده برخوردار است.

کلمات کلیدی: آلودگی خاک، فلزات سنگین، گیاه پالایی، سیدروفور

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم خاک دانشگاه ولی عصر رفسنجان

۲- دانشیار گروه علوم خاک دانشگاه ولی عصر رفسنجان (مکاتبه کننده)

۳- استادیار گروه علوم خاک دانشگاه ولی عصر رفسنجان

۴- استاد گروه علوم باغبانی دانشگاه ولی عصر رفسنجان

* پست الکترونیک: mohsen_hamidpour@yahoo.com

مقدمه

با استفاده از یک یا چند مکانیسم خاص رشد گیاه را افزایش دهند (Kloepper *et al.*, 1989).

باکتری‌های ریزوسفری از طریق مکانیسم‌های مختلف می‌توانند زیست توده گیاهی و تحمل گیاهان به فلزات را افزایش دهند (Glick, 2003). همچنین باکتری‌های ریزوسفری پویایی و قابلیت دسترسی فلزات کم‌مصرف را از طریق تولید سیدروفورها، کاهش pH خاک و یا انحلال فسفات‌ها تحت تاثیر قرار می‌دهند و باعث افزایش رشد و عملکرد گیاه در خاک‌های آلوده می‌شوند (Sheng & Xia, 2006). همچنین این باکتری‌ها می‌توانند با تولید آنزیم ۱-آمینو-سیکلو پروپان -۱- کربوکسیل دامیناز^۲ اتیلن تنشی را در گیاهان کاهش داده و به تبع آن رشد و زیست‌توده گیاهان را افزایش دهند (Lim *et al.*, 2012). مطالعات نشان داده است که موفقیت در امر گیاه‌پالایی نه تنها به نوع گیاه، بلکه به اثرات متقابل ریشه‌های گیاه با میکروارگانیزم‌های ریزوسفری، گونه و غلظت فلزات سنگین در خاک بستگی دارد.

زیست‌فراهمی آلاینده‌ها یکی از عوامل محدود کننده گیاه‌پالایی است. اگر تنها بخشی از آلاینده زیست دسترسی باشد، با توجه به این‌که استانداردهای پاک‌سازی بر مبنای پاک‌سازی همه‌ی آلاینده از محیط است، روش گیاه‌پالایی به تنهایی کافی و کاربردی نمی‌باشد. امروزه، با اضافه کردن بعضی مواد مانند ترکیب‌های فعال‌کننده سطحی و کلات‌های مصنوعی و طبیعی به خاک، زیست‌فراهمی آلاینده‌ها را افزایش می‌دهند. تاکنون، کلات‌های زیادی برای بهبود و افزایش کارایی روش گیاه‌پالایی فلزات سنگین در خاک‌های آلوده استفاده شده‌اند (Sun *et al.*, 2011). EDTA^۳ یک لیگاند آلی است و از مؤثرترین عوامل کلات‌کننده است که برای گیاه‌پالایی استفاده می‌شود. زیرا توانایی کلاته شدن با فلزات مختلف را دارا می‌باشد و باعث افزایش زیست‌فراهمی و جذب این فلزات توسط گیاه در خاک می‌شود (Norvell, 1991). زمانی که عامل کلات‌کننده EDTA به خاک

آلودگی خاک به فلزات سنگین نتیجه‌ی بسیاری از فعالیت‌های انسانی نظیر معدن‌کاری، ذوب فلزات، کاربرد کودها، سموم و قارچ‌کش‌ها و غیره می‌باشد که سلامتی بشر و زیست بوم را به خطر می‌اندازد (Gavrilescu, 2004). پالایش خاک‌های آلوده به فلزات سنگین یکی از مهمترین سیاست‌های زیست محیطی در کشورهای صنعتی می‌باشد. همچنین این نگرانی در کشورهای در حال توسعه نیز وجود دارد. تاکنون روش‌های مختلفی برای پالایش محیط‌های آلوده به فلزات سنگین ابداع شده است. هیچ یک از این روش‌ها راه حل دائمی برای پالایش محیط‌های آلوده نبوده و اغلب ممکن است بیش از یک روش برای بهینه‌سازی پالایش لازم باشد (Sparks, 2003). تکنیک‌های پالایش خاک‌ها به سه دسته روش‌های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی تقسیم‌بندی می‌شوند. روش‌های فیزیکی و شیمیایی مرسوم که برای پالایش خاک‌های آلوده به فلزات سنگین به کار می‌روند، علاوه بر پرهزینه بودن، در سطوح گسترده نیز کاربرد محدودی دارند (Alloway & Jackson, 1991).

گیاه‌پالایی یکی از روش‌های زیست‌پالایی خاک است که در دهه‌های اخیر به آن توجه زیادی شده است. گیاه‌پالایی به کاربرد گیاهان به تنهایی و یا به همراه میکروب‌های خاک برای تجزیه، نگهداری، استخراج و یا تثبیت آلاینده‌های گوناگون موجود در منطقه آلوده اطلاق می‌شود (Sun *et al.*, 2011). گیاه‌پالایی روشی کارآمد، مقرون به صرفه، سازگار با محیط زیست، قابل کاربرد در محل و فن‌آوری خورشید محور محسوب می‌شود (Vithanage *et al.*, 2012). کارایی گیاهان برای پالایش خاک‌های آلوده در صورت همزیستی با میکروارگانیزم‌های مفید خاکزی می‌تواند تشدید شود (Gohre & Paszkowski, 2006). باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه^۱ به گروه نامتجانسی از باکتری‌های ریزوسفری مفید اطلاق می‌شود که قادرند

^۲-Amino-cyclopropan-1-carboxylate de-aminase (ACC-deaminase)
3-Ethylenediaminetetraacetic acids

1-Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)

مواد و روش‌ها

به منظور انتخاب باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه مقاوم به فلز روی، تعداد ۳۰ سویه سودوموناس فلورسنت که صفات محرک رشدی آنها قبلاً اندازه‌گیری شده بود (Abbaszadeh-Dahaji *et al.*, 2010) از کلکسیون میکروبی موجود در بانک ژن گروه علوم خاک دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان انتخاب شدند. برای بررسی تحمل باکتری‌ها به سطوح مختلف روی، از محیط جامد SLP (ساکاروز ۱ درصد، $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ۰/۱ درصد، K_2HPO_4 ۰/۰۵ درصد، MgSO_4 ۰/۰۵ درصد، NaCl ۰/۰۱ درصد، عصاره مخمر ۰/۰۵ درصد و پ‌هاش ۷/۲) حاوی غلظت‌های مختلف روی (۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد. بعد از انجام کشت باکتری بر روی این محیط‌ها و اینکوبه کردن به مدت ۱۲۰ ساعت، قطر و شکل رشد باکتری‌ها با نمونه‌های شاهد (غلظت ۰ میلی‌گرم در لیتر) مقایسه شد. سویه‌های مختلف به گروه‌های مقاوم (رشد مانند کنترل)، نسبتاً مقاوم (کاهش رشد نسبت به شاهد) و حساس (عدم رشد) تقسیم‌بندی شدند (Jiang *et al.*, 2008). در نهایت سه سویه که دارای بیشترین مقاومت به سطوح مختلف روی و دارای بهترین صفات محرک رشدی بودند، برای تلقیح به گیاهان در شرایط گلخانه‌ای انتخاب شدند (جدول ۱).

اضافه می‌شود، درصد زیادی از فلزات موجود در خاک حل شده و برای گیاه‌پالایی قابل استفاده می‌شوند (Haag-Kerwer *et al.*, 1999). سیدروفور دسفری‌اکسامین بی (DFOB) یکی از لیگاندهای آلی است که در پاسخ به کمبود آهن توسط میکروارگانیسم‌های خاک ترشح می‌شود. مطالعات نشان داده است این لیگاند تحرک فلزات سنگین را در خاک افزایش و با کمپلکس کردن آنها مانع از جذب سطحی برخی فلزات سنگین توسط کانی‌های خاک می‌گردد (Mishra *et al.*, 2010; Neubauer *et al.*, 2002).

با وجود این‌که تحقیقات متعددی در مورد پالایش خاک‌های آلوده به فلزات سنگین توسط گیاهان مختلف و هم‌چنین اثر باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه بر گیاه‌پالایی انجام پذیرفته است، اطلاعات چندانی درباره برهم‌کنش عوامل کلات‌کننده و باکتری‌های محرک رشد گیاه وجود ندارد. هدف از تحقیق حاضر بررسی نقش باکتری‌های محرک رشد گیاه و لیگاند آلی سیدروفور DFOB بر گیاه‌پالایی یک خاک آلوده به فلز روی و تغییرات شکل‌های شیمیایی این فلز بود.

جدول ۱- صفات محرک رشدی سویه‌ها (Abbaszadeh-Dahaji *et al.*, 2010)Table 1: Growth-promoting properties of studied strains (Abbaszadeh-Dahaji *et al.*, 2010)

سویه‌ها (Strains)			صفات محرک رشدی
P.putida 19	P.putida 18	P.putida 15	Promoting properties
10.2	4.83	4.72	اکسین (میلی‌گرم در لیتر) (Auxin mg L ⁻¹)
415	289	374	حل‌کنندگی فسفات‌ها (میلی‌گرم در لیتر) Phosphate solubilization (mg L ⁻¹)
2.21	1.73	1.62	تولید سیدروفور (نسبت هاله به کلونی) Siderophore production (The ratio halo to clone)
+	-	+	*ACC-deaminase

*: + بیانگر توانایی باکتری در تولید آنزیم ACC-دآمیناز می‌باشد.

*: + represents the ability of bacteria to produce ACC-deaminase enzyme

(Bouyoucos, 1951)، قابلیت هدایت الکتریکی عصاره اشباع خاک با استفاده از دستگاه هدایت سنج، pH نمونه‌های خاک با استفاده از الکتروود شیشه‌ای در گل اشباع (Richards, 1954)، کربن آلی به روش والکی و بلک (Walky & Black, 1934) و ظرفیت تبادل کاتیونی به روش جانشیننی کاتیون‌ها با استات سدیم (Chapman, 1965) تعیین گردیدند (جدول ۲). غلظت کل روی بعد از هضم نمونه‌های خاک با استفاده از روش آکورژیا (مخلوط اسید کلریدریک ۳۷ درصد و اسید نیتریک ۶۵ درصد با نسبت سه به یک) و غلظت روی قابل استفاده به روش عصاره‌گیری با DTPA (Lindsay & Norvel, 1978) به وسیله دستگاه جذب اتمی (GBC Avanta) اندازه‌گیری شد.

آزمایش گلخانه‌ای به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار اجرا شد. تیمارها شامل باکتری‌های محرک رشد گیاه در ۴ سطح (عدم تلقیح و تلقیح با سودوموناس‌های فلورسنت سویه‌های P15، P18 و P19) و تیمار لیگاند DFOB در ۳ سطح (۰، ۷۰ و ۱۴۰ میکرومول سیدروفور در کیلوگرم خاک) بودند. یک نمونه خاک آلوده به عنصر روی از مزارع کشاورزی اطراف کارخانه روی زنجان تهیه شد. نمونه خاک پس از هواخشک شدن در گلخانه، از الک دو میلی‌متری عبور داده و به منظور آماده‌سازی گلدان‌ها برای کشت گیاه به گلخانه انتقال داده شد. خاک آماده کشت به داخل گلدان‌های یک کیلوگرمی منتقل گردید. برخی از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک از جمله بافت خاک به روش هیدرومتری

جدول ۲- برخی خصوصیات فیزیکی‌وشیمیایی خاک مورد مطالعه

Table 2: Selected physicochemical properties of studied soil

ویژگی (Characteristic)	میزان (Amount)
بافت (Soil texture)	شنی (Sandy)
pH	7.54
قابلیت هدایت الکتریکی (Electrical conductivity) (dS/m)	0.684
ظرفیت تبادل کاتیونی (Cation exchange capacity) (cmol+ kg ⁻¹ soil)	14.6
کربن آلی (درصد) (Organic carbon)	0.07
روی قابل عصاره‌گیری با DTPA (DTPA extractable Zn) (mg kg ⁻¹ soil)	52
روی کل (Total Zinc) (mg kg ⁻¹ soil)	1100

از جوانه زنی کاشته شد و تلقیح باکتری‌های محرک رشد به گلدان‌ها هنگام کاشت به میزان ۱۰۰۰ میکرولیتر با جمعیت ۱۰^۸ سلول به ازای هر بذر انجام شد. بعد از چند برگی شدن گیاه، بوته‌های اضافی در هر گلدان حذف و ۳ بوته در هر گلدان نگهداری شد. آبیاری گلدان‌ها با آب مقطر به صورت روزانه و بر اساس ۸۰ درصد ظرفیت زراعی انجام گردید. تیمار لیگاند DFOB پس از استقرار کامل گیاه پس از ۴۵ روز از کشت گیاه، به صورت محلول همراه با آب آبیاری به گلدان‌ها اضافه گردید (Ramamurthy & Memarian, 2014). پس از گذشت ۶۰ روز از کشت، گیاهان برداشت شدند.

در این آزمون از بذره‌های ذرت رقم تری‌وی‌کراس ۶۴۵ استفاده گردید. ابتدا بذرها به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۹۶ درصد قرار داده شدند. سپس با هیپوکلرید سدیم ۱۰ درصد ضد عفونی سطحی گردیدند. برای حذف هیپوکلرید سدیم از سطح بذرها، چندین مرحله شست‌وشوی (هشت تا ۱۰ بار) بذرها با آب مقطر استریل انجام گرفت (Salehzade *et al.*, 2009). سپس بذرها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد بر روی محیط آب-آگار قرار داده شدند تا جوانه‌دار شوند. برای انجام این آزمایش در شرایط گلخانه، به ۳۶ گلدان یک کیلوگرمی فاقد زه‌کش نیاز بود. خاک آماده کشت در گلدان‌ها ریخته شد و در هر گلدان تعداد ۵ عدد بذر ذرت تری‌وی‌کراس ۶۴۵ پس

افزافه گردید و سپس به مدت ۲ ساعت در شیکر تکان داده شد و سانتریفیوژ (دور ۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه) گردید و محلول رویی عصاره‌گیری شد. برای استخراج شکل قابل تبادل، بیست میلی‌لیتر محلول یک مولار استات آمونیوم (pH=۷) به نمونه باقی‌مانده از مرحله قبل اضافه گردید و سپس به مدت ۲ ساعت در شیکر تکان داده شد و سانتریفیوژ (دور ۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه) گردید و محلول رویی عصاره‌گیری شد. برای تعیین شکل پیوند شده با کربنات‌ها، بیست میلی‌لیتر استات آمونیوم یک مولار که با اسید استیک تنظیم شده (pH=۵) به نمونه باقی‌مانده از مرحله قبل افزوده و به مدت ۲ ساعت در شیکر تکان داده شد و سپس سانتریفیوژ گردید و محلول رویی عصاره‌گیری شد. برای استخراج شکل پیوند شده با اکسیدهای آهن و منگنز، بیست میلی‌لیتر محلول ۰/۰۴ مولار هیدروکسیل آمین کلرید (NH₂OH-Cl) در اسید استیک ۲۵ درصد به نمونه باقی‌مانده از مرحله قبل افزوده شد و به مدت ۶ ساعت روی حمام بخار در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و مانند مراحل قبل عصاره‌گیری انجام شد. به منظور تعیین شکل پیوند شده با موادآلی، ابتدا ۱۵ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۳۰ درصد که با اسید نیتریک pH آن برابر دو تنظیم گردیده بود به نمونه باقی‌مانده از مرحله قبل اضافه شد و به مدت ۵/۵ ساعت روی حمام بخار در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. بعد از سرد شدن محلول، ۵ میلی‌لیتر استات‌آمونیم ۳/۲ مولار در اسیدنیتریک ۲۰ درصد به آن اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه تکان داده شد و پس از سانتریفیوژ، عصاره‌گیری انجام شد. برای تعیین شکل باقی‌مانده روی، یک گرم از خاک مرحله‌ی قبل، بعد از خشک شدن در فلاسک مخروطی (ارلن)، توزین شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر اسید نیتریک ۷ مولار به آن اضافه گردید و به مدت ۶ ساعت روی صفحه‌ی داغ حرارت دید. بعد از تبخیر، ۱ میلی‌لیتر اسیدنیتریک ۲ مولار به آن اضافه و باقی‌مانده بعد از هضم به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رقیق

در پایان دوره رشد و پس از برداشت گیاه ویژگی‌های رویشی شامل ارتفاع، وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی اندازه‌گیری شد. گیاهان پس از جدا شدن از ناحیه طوقه به دو قسمت ریشه و اندام هوایی تفکیک شدند. ریشه‌ها و اندام هوایی پس از شستشو با آب مقطر، به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی-گراد در آون قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها توزین و به وسیله آسیاب پودر گردیدند. برای اندازه‌گیری غلظت روی در نمونه‌ها، نیم گرم از پودر گیاه (اندام هوایی و ریشه) با ترازو وزن و در بوته چینی که قبلاً با اسید و آب مقطر شسته شده بود، ریخته شد. نمونه‌ها در کوره به مدت نیم ساعت در دمای ۲۵۰ درجه سانتی-گراد قرار گرفتند. بعد از خروج دوده‌های اولیه حاصل از سوختن گیاه، درجه حرارت کوره به ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. نمونه‌ها به صورت خشک سوزانی خاکستر شده و با اسیدکلریدریک ۲ نرمال به-صورت محلول در آمدند (Chapman, 1965). غلظت روی در عصاره، با استفاده از دستگاه جذب اتمی (GBC Avanta) قرائت گردید. لازم به ذکر است، قبل از برداشت گیاهان شاخص سبزیگی برگ (SPAD) با استفاده از دستگاه SPAD-502 اندازه‌گیری شد.

پس از برداشت گیاهان، از خاک تمامی گلدان‌ها نمونه‌برداری شد. سپس تغییرات pH در خمیر اشباع خاک توسط الکتروود شیشه‌ای (Richards 1954)، قابلیت هدایت الکتریکی عصاره‌ی اشباع خاک با استفاده از دستگاه هدایت سنج (Richards 1954)، غلظت روی قابل استفاده به روش عصاره-گیری با (Lindsay & Norvel, 1978) DTPA با استفاده از دستگاه جذب اتمی (GBC Avanta) اندازه‌گیری شد. برای مطالعه‌ی شکل‌های شیمیایی مختلف روی از روش سالبو و همکاران (Salbu et al., 1988) استفاده شد. بدین صورت که ابتدا دو گرم نمونه خاک از هر گلدان را توزین نموده و در لوله‌های پلاستیکی ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد و طی ۶ مرحله عصاره‌گیری انجام گرفت. برای استخراج شکل محلول، بیست میلی‌لیتر محلول یک مولار استات آمونیوم (pH=۷) به نمونه توزین شده

گردید. غلظت روی در عصاره‌های تمامی مراحل با دستگاه جذب اتمی اندازه‌گیری شد. نتایج بدست آمده از این پژوهش توسط نرم افزار SAS.9.1 تجزیه آماری شد و نمودارها و جدول‌های مربوطه با استفاده از برنامه‌های EXCEL و Word رسم و نتایج تفسیر گردید.

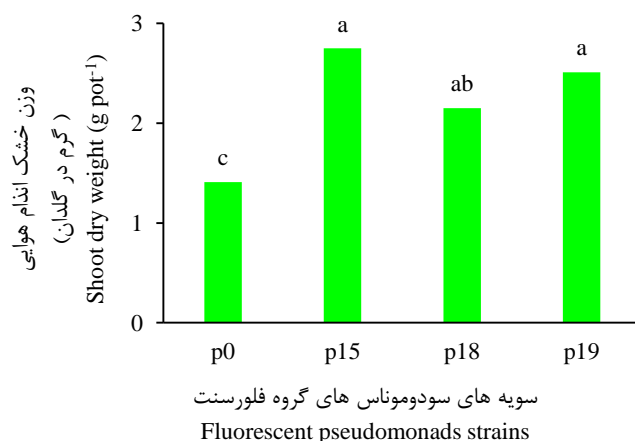
نتایج و بحث

بررسی مقاومت سویه‌های سودوموناس فلورسنت به روی

به‌منظور بررسی تحمل سویه‌ها به سمیت فلز روی، از بین ۳۰ جدایه مورد آزمایش سویه‌های p15، p18 و p19 به ترتیب با تحمل ۷۵، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر روی به عنوان سویه‌های مقاوم و دارای خصوصیات محرک رشدی موثر انتخاب شدند. چلیا و همکاران (Chelliah *et al.*, 2008) در بررسی مقاومت

وزن خشک اندام هوایی و ریشه

نتایج مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن نشان داد تلقیح گیاهان با سویه‌های مختلف باکتری وزن خشک اندام هوایی را نسبت به شاهد (عدم تلقیح باکتری) افزایش داد. به‌طوری‌که در گیاهان تلقیح شده با سویه p15، این پارامتر ۹۵ درصد نسبت به شاهد افزایش یافت (شکل ۱).



شکل ۱- تأثیر سویه‌های سودوموناس گروه فلورسنت بر وزن خشک اندام هوایی گیاه ذرت

(میانگین‌های دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشند)

Figure 1: the effects of fluorescent pseudomonad strains on the shoot dry weight of corn (Means with similar letter(s) are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range tests)

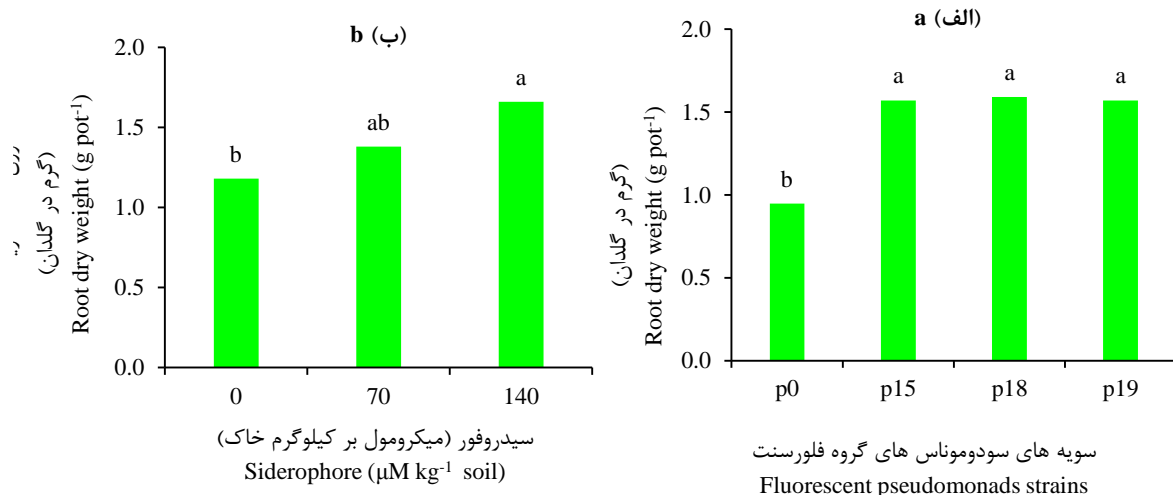
تولید اتیلن در گیاه و به‌تبع آن کاهش رشد ریشه و اندام هوایی گیاه گردند. آنزیم ACC-دآمیناز سطح اتیلن را در گیاهان کاهش می‌دهد و موجب افزایش رشد گیاه می‌گردد (Glick *et al.*; 1994). مطالعات دل آمیکو و همکاران (Dell Amico *et al.*, 2008) نشان داده است تلقیح گیاه *Brassica napus* با چهار سویه دارای فعالیت ACC-دآمیناز روش موثری برای

بیشترین افزایش وزن خشک گیاه مربوط به سویه‌های p15 و p19 می‌باشد که برخلاف سویه p18 قابلیت تولید آنزیم ACC-دآمیناز را دارا بودند. به نظر می‌رسد این باکتری‌ها توانسته‌اند سطح اتیلن تنشی فلزات سنگین را با تولید آنزیم ACC-دآمیناز کاهش و به این ترتیب به رشد و توسعه گیاه کمک کنند. تنش‌های مختلف محیطی می‌توانند باعث افزایش

باکتری‌های سودوموناس، باسیلوس و ایزتوباکتر را گزارش کرده‌اند.

نتایج مقایسه میانگین مرتبط با اثرات اصلی تیمار باکتری و سیدروفور بر وزن خشک ریشه در شکل ۲ نشان داده شده است. براساس این نتایج، تلقیح گیاهان با سویه‌های مختلف باکتری وزن خشک ریشه را حدوداً ۶۵ درصد در مقایسه با شاهد (عدم کاربرد باکتری) افزایش داد (شکل ۲ الف). کاربرد لیگاند سیدروفور دسفروکسامین بی (DFO-B) نیز باعث افزایش وزن خشک ریشه نسبت به شاهد گردید و بیشترین افزایش مربوط به سطح ۱۴۰ میکرومول لیگاند دسفروکسامین در کیلوگرم خاک بود که وزن خشک ریشه را ۴۳ درصد در مقایسه با شاهد افزایش داد (شکل ۲ ب). سطوح مختلف لیگاند و باکتری تفاوت معناداری با یکدیگر نداشتند.

حفاظت گیاه از اثرات بازدارندگی رشد ناشی از غلظت سمی کادمیم بود. توان تولید آنزیم ACC-دآمیناز در سویه *Pseudomonas tolaasii* ACC 23 توانست زیست توده ریشه را از ۴۸ میلی‌گرم بر گیاه به ۱۰۶ میلی‌گرم بر گیاه، و زیست توده اندام هوایی را از ۹۲ میلی‌گرم بر گیاه به ۱۷۹ میلی‌گرم بر گیاه افزایش دهد (Dell Amico et al., 2008). مهناز و همکاران (Mehnaz et al., 2010) با انجام آزمایشی بر روی ذرت بیان کردند کاربرد باکتری‌های سودوموناس منجر به افزایش وزن خشک اندام هوایی گیاه شد. همچنین گزارش شده است که تلقیح ذرت با باکتری سودوموناس باعث افزایش وزن خشک گیاه نسبت به شاهد شده است (Shaharoon et al., 2006). جاراک و همکاران (Jarak et al., 2012) نیز افزایش معنی‌دار وزن خشک اندام هوایی ذرت در نتیجه تلقیح با



شکل ۲- تأثیر (الف) سویه‌های سودوموناس گروه فلورسنت و (ب) لیگاند سیدروفور بر وزن خشک ریشه گیاه ذرت (میانگین‌های داری حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشند)

Fig.2. Comparison of mean of the effects of (a) strains of fluorescent pseudomonads and (b) the siderophore ligand on root dry weight of corn

(Means with similar letter(s) are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range tests)

توانسته میزان وزن خشک ریشه را در حد قابل قبولی بالا ببرد. بارنيس و همکاران (Bar-Ness et al., 1994) گزارش کردند گیاه پنبه قادر به جذب آهن از سیدروفور دسفروکسامین بوده و ذرت نیز به مقدار کمتر آهن را از سیدروفور جذب کرد. گزارش شده است گیاه آفتابگردان قادر به جذب مستقیم آهن

ما و همکاران (Ma et al., 2013) نشان دادند که تلقیح سویه *P. mysinacearum* RC6b باعث افزایش معنی‌دار و ۲۲ درصدی ریشه گل ناز شد. باتوجه به نقش سیدروفور دسفروکسامین در افزایش تحرک و جابجایی عناصر کم مصرف، به نظر می‌رسد این لیگاند بخشی از عناصر مغذی رشد را به گیاه منتقل و

PGPR توسط بسیاری از پژوهشگران تأیید شده است (Ma *et al.*, 2013; Prapagdee *et al.*, 2013). میکروارگانیسم‌های مختلف خاک با تولید لیگاند‌های آلی، ترشح اسیدهای آلی، کاهش pH و با افزایش حلالیت فسفات‌های فلزی می‌توانند باعث افزایش حلالیت و تغییر گونه فلزات شوند (Li *et al.*, 2010). لیو و همکاران (Liu *et al.*, 2015) گزارش کردند تلقیح گیاه گل ناز با باکتری *Phyllobacterium myrsinacearum RC6b* باعث افزایش ۲۶/۴ تا ۳۸/۳ درصدی غلظت روی اندام هوایی شد. در پژوهشی که توسط لانگ و همکاران (Long *et al.*, 2010) انجام گرفت، تلقیح گل ناز با باکتری‌های اندوفیت IV8L2، II8L4 و IV8R2 به‌طور قابل توجهی غلظت روی اندام هوایی این گیاه را در خاک آلوده به روی افزایش داد.

پیوند شده به دیفروکسامین از طریق ترشح ترکیباتی در ریزوسفر برای احیای بیولوژیکی Fe(III)-DFOB به Fe(II)-DFOB بود و توانست بر علائم کلروز غلبه کند (Cline *et al.*, 1984). کریمزاده و همکاران (Karimzadeh *et al.*, 2012) تأثیر سیدروفور دسفروکسامین را بر جذب کادمیم توسط گیاه بیش‌اندوز تلاسی^۱ بررسی کردند و گزارش نمودند که جذب کادمیم توسط ریشه و انتقال آن از ریشه به اندام هوایی با کاربرد این لیگاند آلی افزایش یافت.

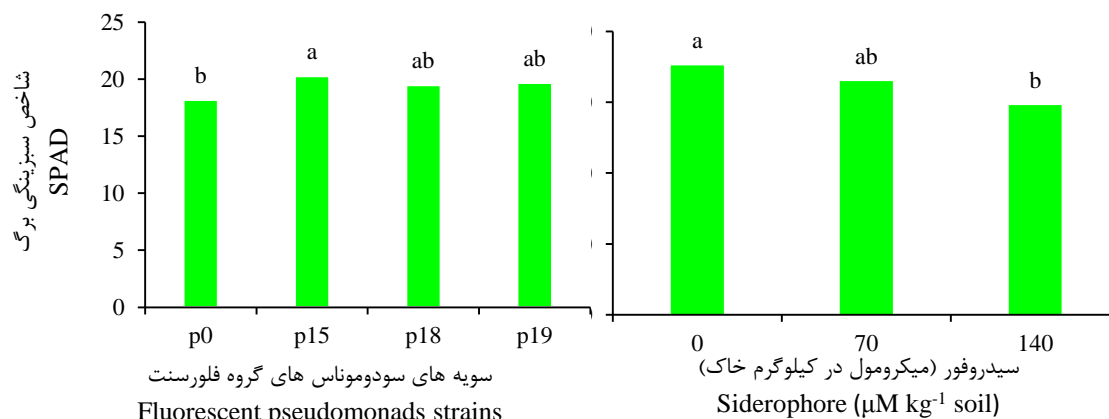
ارتفاع گیاه و شاخص SPAD

همانگونه که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، با افزودن لیگاند سیدروفور به خاک، ارتفاع گیاه ذرت در مقایسه با شاهد کاهش یافت. کاهش ارتفاع گیاه ذرت با کاربرد سیدروفور می‌تواند به دلیل افزایش جذب و سمیت فلزات سنگین ناشی از افزایش زیست‌فراهمی آن‌ها به وسیله این لیگاند باشد. بر اساس نتایج مقایسه میانگین، تلقیح گیاهان با سویه‌های باکتری سودوموناس شاخص سبزیگی را نسبت به شاهد افزایش داد و بیشترین افزایش مربوط به سویه p15 بود (شکل ۴). ظفر و همکاران (Zafar *et al.*, 2011) گزارش نمودند که تلقیح باکتری‌های محرک رشد باعث افزایش میزان کلروفیل برگ گندم و ذرت گردید. مشخص شده است که فسفر نقش مهمی را در انتقال انرژی در طول فتوسنتز ایفا می‌کند. باکتری‌های حل‌کننده فسفات می‌توانند با افزایش فراهمی فسفر باعث افزایش فعالیت فتوسنتزی شوند (Demir, 2004).

غلظت و جذب روی در گیاه

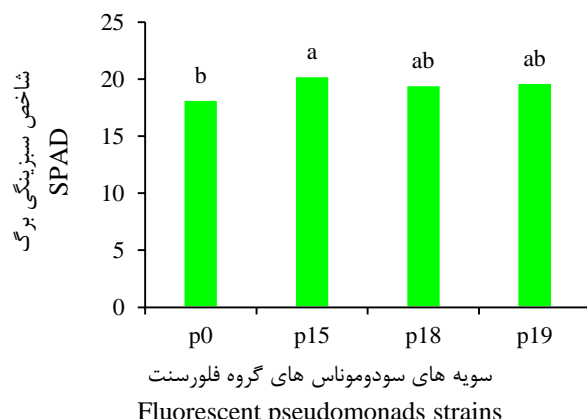
نتایج مقایسه میانگین تأثیر باکتری‌ها بر غلظت روی اندام هوایی نشان داد (شکل ۵) که سه سویه p15، p18 و p19 غلظت روی اندام هوایی را به ترتیب ۳۴، ۵۳ و ۴۶ درصد نسبت به شاهد افزایش دادند و این افزایش از نظر آماری معنی‌دار بود. افزایش جذب فلزات به وسیله گیاهان تلقیح شده با باکتری‌های

^۱-*Thlaspi caerulescens*



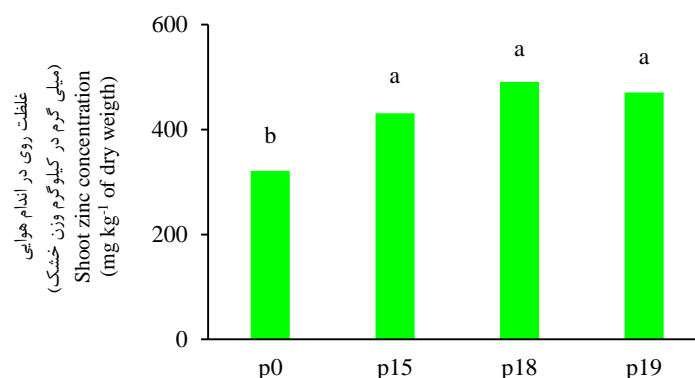
شکل ۳- تأثیر لیگاند سیدروفور بر ارتفاع گیاه (میانگین‌های داری حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشند)

Figure 3: Comparison Of mean of the effects of siderophore ligand on plant height (Means with similar letter(s) are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range tests.)



شکل ۴- تأثیر سویه‌های سودوموناس گروه فلورسنت بر شاخص SPAD (میانگین‌های داری حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشند)

Figure 4: The effects of strains of pseudomonads fluorescent on SPAD index (Means with similar letter(s) are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range tests.)



شکل ۵- تأثیر سویه‌های سودوموناس گروه فلورسنت بر غلظت روی اندام هوایی گیاه ذرت (میانگین‌های داری حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشند)

Figure 5: the effects of fluorescent pseudomonads strains on concentration of Zn in corn (Means with similar letter(s) are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range tests)

p15 و در سطح ۱۴۰ میکرومول سیدروفور در کیلوگرم خاک بود که نسبت به تیمار شاهد افزایش ۵۴ درصدی در غلظت روی ریشه را به همراه داشت (جدول ۳). کاربرد هر دو سطح لیگاند سیدروفور در حضور جدایه p19، نیز غلظت روی ریشه را به ترتیب

تلقیح با سویه‌های p15 و p19، غلظت روی ریشه را افزایش داد (جدول ۳)، اما سویه p18 به صورت معنی‌داری این پارامتر را در مقایسه با شاهد کاهش داد. بیشترین غلظت روی ریشه (۸۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک) در گیاهان تلقیح شده با جدایه

نتایج مقایسه میانگین برهمکنش باکتری و سیدروفور بر جذب روی ریشه نشان داد که کاربرد ۱۴۰ میکرومول سیدروفور در کیلوگرم خاک ۲۹ درصد جذب روی ریشه را در مقایسه با شاهد افزایش داد (جدول ۴). تمامی سویه‌ها جذب روی ریشه را در گیاه ذرت افزایش دادند و این افزایش تنها با کاربرد سویه p15 و با افزایش ۵۶ درصدی جذب معنی‌دار بود (جدول ۴). بیشترین جذب روی در ریشه (۱۹۶۷ میکروگرم در گلدان) در گیاهان تلقیح شده با سویه p15 همراه با کاربرد ۱۴۰ میکرومول سیدروفور در کیلوگرم خاک مشاهده گردید.

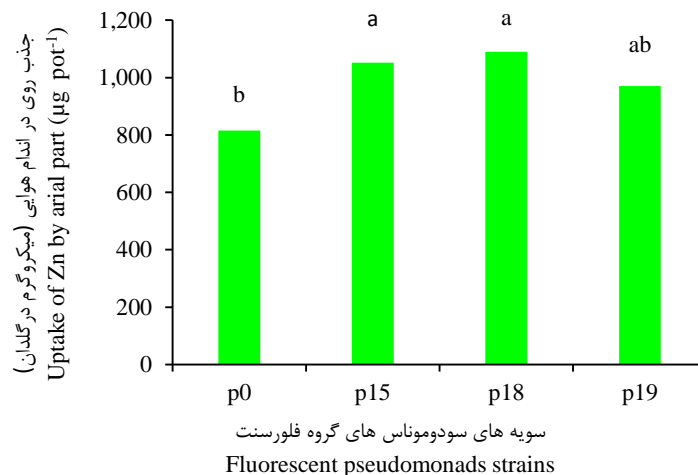
۵۵ و ۴۸ درصد نسبت به شاهد افزایش داد ولی این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود. توانایی تشکیل کمپلکس‌های سیدروفور- روی بر فعالیت روی در محلول خاک، زیست‌فراهمی و حرکت آن در محلول خاک اثر می‌گذارد (Neubauer *et al.*, 2002). مطالعات نشان داده است که لیگاند سیدروفور جذب سطحی روی توسط بخش رس خاک و کانی‌های خاک را به دلیل تشکیل کمپلکس‌های محلول کاهش می‌دهد، بنابراین می‌تواند زیست‌فراهمی روی را در خاک افزایش دهد (Neubauer *et al.*, 2002). نتایج مقایسه میانگین اثر باکتری بر جذب روی اندام هوایی نشان داد، کاربرد سویه‌های p18 و p15 جذب روی اندام هوایی را ۳۳ درصد در مقایسه با شاهد افزایش دادند (شکل ۶).

جدول ۳- برهمکنش باکتری و لیگاند سیدروفور بر غلظت روی ریشه (میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک)
Table 3: The interaction of bacteria and siderophore ligand on Zinc concentrations in the root.

میانگین (Mean)	سطوح لیگاند سیدروفور ($\mu\text{M kg}^{-1}$ soil)			سویه Strain
	Siderophore ligand levels ($\mu\text{M kg}^{-1}$ soil)			
	140	70	0	
631A	576 ^{bc}	734 ^{ab}	534 ^{bc}	p0
634A	825 ^a	551 ^{bc}	589 ^{bc}	p15
491B	507 ^c	428 ^c	570 ^{bc}	p18
555AB	595 ^{bc}	620 ^{abc}	400 ^c	p19
	622A	583A	530A	میانگین (Mean)

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

Means with similar letter(s) are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range tests.



شکل ۶- تأثیر سویه‌های باکتری سودوموناس فلورسنت بر جذب روی توسط اندام هوایی گیاه ذرت میانگین‌های داری حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشند.
Figure 6: Comparison of the effect of fluorescent pseudomonads strains on Zn uptake by plant Means with similar letter(s) are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range tests.

جدول ۴- برهمکنش باکتری و لیگاند سیدروفور بر جذب روی در ریشه (میکروگرم در گلدان)

Table 4: The interaction of bacteria and siderophore on zinc uptake in the root (µg pot⁻¹)

میانگین (Mean)	سطوح لیگاند سیدروفور (µM kg ⁻¹ soil)			سویه Strain
	Siderophore ligand levels (µM kg ⁻¹ soil)			
	140	70	0	
670B	456 ^c	988 ^{bc}	516 ^{bc}	p0
1050A	1967 ^a	714 ^{bc}	733 ^{bc}	p15
841AB	1171 ^b	637 ^{bc}	653 ^{bc}	p18
945AB	1122 ^b	1022 ^b	717 ^{bc}	p19
	1107A	824AB	861B	(Mean) میانگین

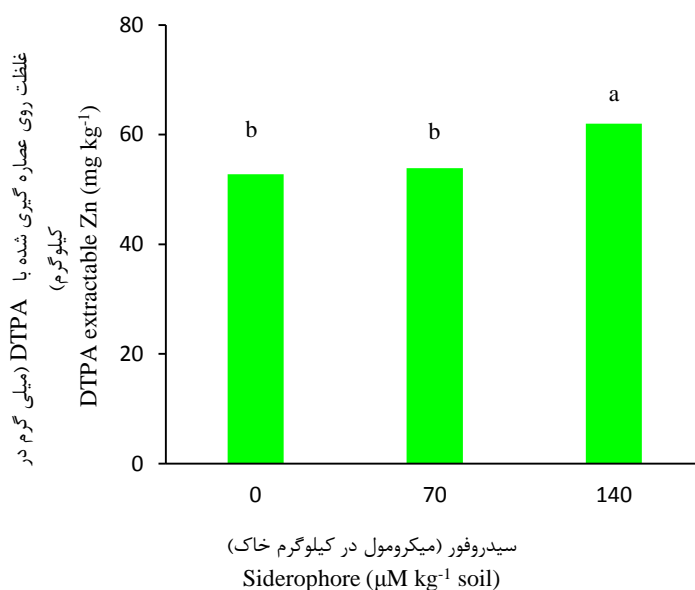
میانگین‌های داری حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشند.
Means with similar letter(s) are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range tests.

شکل آن‌ها و رهاسازی مواد مغذی علاوه بر آهن مانند کبالت، فسفر و منگنز اثر می‌گذارد (Cervini-Silva *et al.*, 2012). سیدروفورها (لیگاندهای آلی با وزن مولکولی کم) تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها و بعضی از گیاهان هستند که جهت تأمین آهن گیاه کمپلکس‌های پایداری با فلزات تشکیل می‌دهند و در نتیجه تحرک فلز را از طریق فرایندهای جذب و واجذب تحت تأثیر قرار می‌دهند (Mishra *et al.*, 2010). حمیدپور و همکاران (Hamidpour *et al.*, 2010) در پژوهشی که به منظور بررسی اثر سیدروفور دسفرال بر جذب سطحی کادمیوم توسط کانی مونت-

غلظت روی قابل استخراج با عصاره گیر DTPA
نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که با کاربرد سطح ۱۴۰ میکرومول لیگاند سیدروفور در کیلوگرم خاک، غلظت روی استخراج شده با DTPA افزایش یافت. در صورتی که کاربرد سیدروفور در سطح ۷۰ میکرومول در کیلوگرم خاک تفاوتی با شاهد نداشت (شکل ۷). نتایج حاصل از این پژوهش تأثیر مثبت سیدروفور بر افزایش حلالیت و زیست‌فراهمی روی در خاک را نشان داد. احتمالاً تشکیل کمپلکس محلول روی با این لیگاند دلیل اصلی افزایش غلظت روی در خاک بود. سیدروفورها بر جذب و واجذب فلزات سنگین، تغییر

کاهش و در نتیجه غلظت تعادلی آن را افزایش داد.

موریلونایت انجام دادند، به این نتیجه رسیدند که سیدروفور DFOB میزان جذب سطحی کادمیوم را



شکل ۷- تأثیر لیگاند سیدروفور دسفروکسامین بر غلظت روی عصاره گیری شده با DTPA در خاک

Figure 7- The effects of siderophore ligand on concentration of DTPA-extractable Zn

یافت. در حضور سویه p15، کاربرد سیدروفور به طور معنی‌داری غلظت روی پیوند شده با کربنات‌ها را در هر دو سطح کاهش داد. ولی در حضور سایر سویه‌ها، این کاهش معنی‌دار نبود. کاهش غلظت روی پیوند شده با کربنات‌ها نشان دهنده این است که روی از شکل پیوند شده با کربنات‌ها به سایر شکل‌ها توزیع شده است. اگرچه تیمارها اثر معناداری بر غلظت روی محلول نداشتند، ولی مطابق جدول ۵، غلظت روی محلول با کاربرد سیدروفور در حضور جدایه‌های باکتری به صورت غیر معنی‌دار افزایش یافت که نشان دهنده تبدیل روی از سایر شکل‌های شیمیایی به این فرم می‌باشد. نیوبائر و همکاران (Neubauer *et al.*, 2002) اثر سیدروفور DFOB را بر تحرک روی در کانی‌های رسی بررسی نموده و بیان کردند که جذب سطحی روی در $pH > 7$ توسط رس‌های خاک کاهش و در نتیجه تحرک و فراهمی زیستی آن افزایش یافت. سیدروفور DFOB می‌تواند با روی در محلول، کمپلکس‌های $H_3Zn(DFOB)^{2+}$ ، $H_2Zn(DFOB)^+$ ، $HZn(DFOB)^0$ را تشکیل دهد (Neubauer *et al.*,

تأثیر تیمارها بر شکل‌های شیمیایی روی

شکل‌های شیمیایی روی در نمونه‌های خاک آلوده پس از اعمال تیمارهای لیگاند و باکتری در جدول ۵ ارائه شده است. به‌طور کلی الگوی توزیع شکل‌های شیمیایی روی به صورت زیر است:

شکل باقیمانده (۷۸٪) < شکل پیوند شده با اکسیدهای آهن و منگنز (۱۰/۹٪) < شکل کربناتی (۶/۴۳٪) < شکل تبادل (۲/۶۲٪) < شکل آلی (۱/۷٪) < شکل محلول (۰/۰۲٪).

عباس‌پور و گلچین (Abbaspour and Golchin, 2011) گزارش کردند شکل باقیمانده، شکل اصلی روی در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین بود. باتوجه به اینکه غلظت روی در خاک مورد مطالعه زیاد بود، انتظار می‌رود بخش بیشتری از آن به صورت ساختاری وارد فاز جامد خاک شده باشد. نتایج مقایسه میانگین اثر کاربرد لیگاند و باکتری بر غلظت شکل کربناتی روی در جدول ۵ نشان داده شده است. با کاربرد لیگاند دیفروکسامین غلظت روی پیوند شده با کربنات‌ها در مقایسه با شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش

2002). با تشکیل گونه بدون بار، سیدروفور با روی افزایش می‌دهد. مانع از جذب روی توسط خاک شده و حلالیت آن را

جدول ۵- برهمکنش باکتری و لیگاند سیدروفور غلظت شکل های شیمیایی روی در خاک (میلی گرم در کیلوگرم خاک)
Table 5: The interaction of bacteria isolates and siderophore ligand on the concentration of the chemical forms of Zn in the soil (mg kg⁻¹)

میانگین (Mean)	سطوح لیگاند سیدروفور (میکرومول در کیلوگرم خاک) Siderophore ligand levels (μmole/kg soil)			باکتری (Bacteria)
	140	70	0	
محلول (Soluble)				
0.385A	0.415 ^a	0.310 ^a	0.350 ^a	p0
0.296A	0.455 ^a	0.390 ^a	0.045 ^a	p15
0.173A	0.165 ^a	0.315 ^a	0.04 ^a	p18
0.355A	0.615 ^a	0.375 ^a	0.07 ^a	p19
	0.412A	0.347A	0.127A	(Mean) میانگین
تبادلی (Exchangeable)				
24.9B	24.0 ^c	27.1 ^{bc}	23.6 ^c	p0
32.3A	27.6 ^{a-c}	28.8 ^{a-c}	40.5 ^a	p15
32.6A	33.6 ^{a-c}	26.7 ^{bc}	37.3 ^{ab}	p18
27.1AB	25.5 ^{bc}	26.1 ^{bc}	29.4 ^{a-c}	p19
	27.8A	27.3A	32.7A	(Mean) میانگین
پیوند شده با کربنات‌ها (Carbonates bound)				
66.0A	62.5 ^{bc}	75.9 ^{bc}	59.6 ^{bc}	p0
74.6A	66.5 ^{bc}	54.8 ^c	102 ^a	p15
74.4A	79.4 ^b	69.1 ^{bc}	80.6 ^b	p18
66.2A	63.2 ^{bc}	64.8 ^{bc}	70.7 ^{bc}	p19
	68.0B	66.1B	78.3A	(Mean) میانگین
پیوند شده با اکسیدهای آهن و منگنز (Bounded with Fe and Mn oxides)				
112A	106 ^{bc}	127 ^{a-c}	102 ^c	p0
125A	123 ^{a-c}	119 ^{a-c}	133 ^{ab}	p15
127A	121 ^{a-c}	119 ^{a-c}	140 ^a	p18
116A	118 ^{a-c}	116 ^{a-c}	115 ^{a-c}	p19
	117A	120A	122A	(Mean) میانگین
پیوند شده با مواد آلی (Organically bound)				
17.3A	16.1 ^a	19.8 ^a	15.9 ^a	p0
19.9A	21.0 ^a	20.4 ^a	18.3 ^a	p15
20.8A	19.1 ^a	20.5 ^a	22.8 ^a	p18
20.7A	19.0 ^a	19.6 ^a	23.4 ^a	p19
	18.8A	20.1A	20.1A	(Mean) میانگین
باقیمانده (Residual)				
878A	889 ^a	848 ^{a-c}	898 ^a	p0
847AB	860 ^{a-c}	876 ^{ab}	805 ^c	p15
842B	846 ^{a-c}	863 ^{a-c}	818 ^{bc}	p18
868AB	872 ^{a-c}	872 ^{ab}	861 ^{a-c}	p19
	867A	865A	845A	(Mean) میانگین

نتیجه‌گیری کلی

افزودن لیگاند سیدروفور دسفروکسامین باعث تغییر شکل‌های شیمیایی روی در خاک و افزایش فراهمی زیستی آن گردید. نتایج نشان داد که کاربرد سویه‌های باکتریایی در حضور لیگاند سیدروفور نقش موثرتری بر افزایش رشد گیاه، غلظت و جذب روی در گیاه داشت. نتایج نشان داد که سویه‌های p15 و p19 دارای توانایی بالاتری در افزایش کارایی گیاه‌پالایی روی در خاک داشتند که علت این امر را می‌توان به تولید آنزیم

ACC-دآمیناز توسط این دو سویه در مقایسه با سویه p18 نسبت داد. در نتیجه استفاده از باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد کارآمد (به‌خصوص آنهایی که توانایی تولید آنزیم ACC-دآمیناز دارند) و مقاوم به فلزات سنگین، و همچنین کاربرد کلات کننده‌ها می‌تواند نقش موثری در افزایش فراهمی برخی فلزات سنگین در خاک و به‌تبع آن افزایش کارایی گیاه‌پالایی و استخراج فلز از خاک داشته باشد.

References

- Abbaspour, A., and Golchin, A. (2011). Immobilization of heavy metals in a contaminated soil in Iran using di-ammonium phosphate, vermicompost and zeolite. *Environmental Earth Sciences*, 63, 935–943.
- Abbaszadeh-Dahaji, P., Saleh-Rastin, N., Asadi-Rhmani, H., Khvazi, K., Soltani, A. A., Shoary-Nejati, A. R. and Miransari, M. (2010). Plant growth-promoting activities of fluorescent pseudomonads isolated from Iranian soils. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32, 281-288.
- Alloway, B. J. and Jackson, A. P. (1991). The behavior of heavy metals in sewage sludge amended soils. *Science of the Total Environment*, 100, 151-176.
- Bar-Ness, E., Hadar, Y., Chen, Y., Shanzer, A. and Libman, J. (1992). Iron uptake by plants from microbial siderophores: A study with 7-Nitrobenz-2 Oxa-1,3-Diazole-Desferrioxamine as fluorescent ferrioxamine B analog. *Plant Physiology*, 99, 1329-1335.
- Cervini-silva, J., Kearns, J. and Banfield, J. (2012). Steady-state dissolution kinetics of mineral ferric phosphate in the presence of desferrioxamine-B and oxalate ligands at pH= 4-6 and T= 24 ± 0.6°C. *Chemical Geology*, (320-321), 1-8
- Chapman, H. D. (1965). Cation exchange capacity. In: Black CA. (Ed.). *Methods of Soil Analysis. Part 2. American Society of Agronomy*, Madison, Wisconsin, pp. 891-900.
- Chelliah, E. R., Sundaresan, S. and Govindan, S. S. (2008). Adaptive and cross resistance to Cadmium (II) and Zinc (II) by *Pseudomonas aeruginosa* BC15. *Biologia*, 63(4), 461-465
- Cline, G. R., Reid, C. P., Powell, P. E. and Szaniszlo, P. J. (1984). Effects of a hydroxamate siderophore on iron absorption by sunflower and-sorghum. *Plant Physiology*, 76, 36-39.
- Dell Amico, E., Cavalca, L. and Andreoni, V. (2008). Improvement of *Brassica napus* growth under cadmium stress by cadmium resistant rhizobacteria. *Soil Biology and Biochemistry*, 40, 74-84.
- Demir, S. (2004). Influence of arbuscular mycorrhiza on some physiological growth parameters of pepper. *Turkish Journal of Biology*, 28, 85-90
- Gavrilescu, M. (2004). Removal of heavy metals from the environment by biosorption. *Engineering in Life Sciences*, 3, 219-232.
- Glick, B. R., Jacobson, C. B., Schwarze, M. M. and Pasternak, J. J. (1994). 1-amino cyclopropane-1-carboxylic acid deaminase mutants of the plant-growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 do not stimulate canola root elongation. *Canadian Journal of Microbiology*, 40, 911-915.
- Glick, B. R. (2003). Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnology Advances*, 21: 383–393.
- Gohre, V. and Paszkowski, U. (2006). Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta*, 223, 1115-1122.

- Haag-Kerwer, A., Schafer, H. J., Heiss, S., Walter, C. and Rausch, T. (1999). Cadmium exposure in *Brassica juncea* causes a decline in transpiration rate and leaf expansion without effect on photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 50, 1827–1835.
- Hamidpour, M., Shirani, H. and Akhgar, A. (2012). Adsorption of Cd on montmorillonite in the presence of desferal siderophore. *Journal of Water and Soil*, 26, 42-52, (In Persian).
- Jarak, M., Mrkovacki, N., Bjelic, D., Josic, D., Hajnal-Jafari, T. and Stamenov, D. (2012). Effects of plant growth promoting rhizobacteria on maize in greenhouse and field trial. *African Journal of Microbiology*, 6, 5683-5690.
- Jiang, C. Y., Sheng, X. F., Qien, 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.
- Karimzadeh, L. Nai, S. and Merkel, B. J. (2012). Effect of microbial siderophore DFO-B on Cd accumulation by *Thlaspi caerulescens* hyperaccumulator in the presence of zeolite. *Chemosphere*, 88, 683-6877.
- Klopper, J. W., Lifshitz R. R. and Zablotwicz, R. M. (1989). Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology*, 7, 39-43.
- Li, J. T., Liao, B., Lan, C. Y., Ye, Z. H., Baker, A. J. and Shu, W. S. (2010). Cadmium tolerance and accumulation in cultivars of a high-biomass tropical tree (*Averrhoa carambola*) and its potential for phytoextraction. *Journal of Environmental Quality*, 39, 1262–1268.
- Lim, J. H., An, C. H., Kim, Y. H., Jung, B. K., and Kim, S. D. (2012). Isolation of auxin- and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-producing bacterium and its effect on pepper growth under saline stress. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 55(5), 607–612
- Lindsay, W. L. and Norvell, W. A. (1978). Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper. *Soil Science Society of America Journal*, 42, 421-428.
- Liu, Z., Ge, H., Li, C., Zhao, Z., Song, F. and Hu, S. (2015). Enhanced phytoextraction of heavy metals from contaminated soil by plant co-cropping associated with PGPR. *Water, Air and Soil Pollution*, 226, 29-38.
- Long, X. X., Chen, X. M., Chen, Y. G., Wong, J. W., Wei, Z. B. and Wu, Q. T. (2010). Isolation and characterization endophytic bacteria from *Sedum alfredii* Hance and their potential to promote phytoextraction of zinc polluted soil. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 27, 1197-1207.
- Ma, Y., Rajkumar, M., Luo, Y. and Freitas, H. (2013). Phytoextraction of heavy metal polluted soils using *Sedum plumbizicicola* inoculated with metal mobilizing *Phyllobacterium myrsinacearum* RC6b. *Chemosphere*, 93, 1386-1392.
- Mehnaz, S., Kowalik, T., Reynold, B. and Lazarovits, G. (2010). Growth promoting effects of corn (*Zea mays*) bacterial isolates under greenhouse and field conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 42, 1848-1856.
- Mishra, B., Haack, E.A., Maurice, P. A. and Bunker, B. A. (2010). A spectroscopic study of the effects of a microbial siderophore on Pb adsorption to kaolinite. *Chemical Geology*, 275, 199-207.
- Neubauer, U., Furrer, G. and Schulin, R. (2002). Heavy metal sorption on soil minerals affected by the siderophore desferrioxamine B: the role of Fe(III) (hydr) oxides and dissolved Fe(III). *European Journal of Soil Science*, 53, 45-55.
- Norvell, W.A. (1991). Reactions of metal chelates in soils and nutrient solutions. In: Mortvedt JJ, Cox FR., Shuman LM. and Welch RM. (Eds.), Micronutrients in Agriculture. *Soil Science Society of America*, Madison, Wisconsin, pp. 187–227.
- Prapagdee, B., Chanprasert, M. and Mongkolsuk, S. (2013). Bioaugmentation with cadmium-resistant plant growth promoting rhizobacteria to assist cadmium phytoextraction by *Helianthus annuus*. *Chemosphere*, 92(6), 659-666.

- Richards, L.A. (1954). *Diagnosis and Improvement of Saline and Alkali Soils*. U.S.D.A. Handbook, 60. Washington, DC, USA, 162 p.
- Salbu, B., Krekling, T. and Oughton, D. H. (1998). Characterization of radioactive particles in the environment. *Analyst*, 123, 843-849
- Salehzade, H., Shishvan, M.I., Ghiyasi, M., Forouzin, F. and Siyahjani, A.A. (2009). Effect of seed priming on germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Research Journal of Biological Science*, 4, 629-631.
- Shaharoon, B., Arshad, M., Zahir, A. Z. and Khalid, A. (2006). Performance of *Pseudomonas* spp. containing ACC deaminase for improving growth and yield of maize in the presence of nitrogenous fertilizer. *Journal of Soil Biology and Biochemistry*, 38, 2971-2975.
- 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.
- Sparks, D. L. (2003). *Environmental soil chemistry*. Academic Press, San Diego, CA, 352 p.
- Sun, Y., Zhou, Q., Xu, Y., Wang, L., and Liang, X. (2011). The role of EDTA on cadmium phytoextraction in a cadmium-hyperaccumulator *Rorippa globosa*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 3, 45-51.
- Vithanage, M., Dabrowska, B.B., Mukherjee, B., Sandhi, A. and Bhattacharya, P. (2012). Arsenic uptake by plants and possible phytoremediation applications: a brief overview. *Environmental Chemistry Letters Impact*, 10, 217-224.
- Walky, A., and Black, T.A. (1934). An examination of the Degtjareff method for determining organic matter and a proposed modification of chromic acid titration method. *Soil Science*, 37, 29-38.
- Zafar, M., Rahim, N., Shaheen, A., Khaliq, A., Arjam T., Jamil, M., Rehman, Z.U. and Sultan, T. (2011). Effect of combining poultry manure, inorganic phosphate solubilizing bacteria on growth, yield, protein content and uptake in maize. *Advances in Agriculture and Botany-International Journal of the Bioflux Society*, 3, 46-58.

Effects of plant growth promoting rhizobacteria and siderophore on distribution of chemical fractions of Zn in soil and its uptake by corn

Hamideh Nemati¹, Mohsen Hamidpur^{2*}, Peyman Abbaszadeh³,
Hamid Reza Rosta⁴

(Received: May 2015

Accepted: March 2016)

Abstract

Successful phytoremediation of metal-contaminated soils largely depends on their bioavailability in soil. Samples of a contaminated soil with elevated concentration of Zn were applied in the pots to evaluate the interactive effects of DFOB siderophore (0, 70 and 140 $\mu\text{M kg}^{-1}$) and metal tolerant bacterial inoculation (p0, p15, p18, and p19) on Zn accumulation in corn and metal speciation and sequential fractions in soil. Results indicated that bacterial inoculation increased Zn concentrations in corn shoot. Addition of DFOB (140 $\mu\text{M kg}^{-1}$) to pots of the soil which was inoculated with p15 isolate significantly enhanced Zn concentration in roots as compared to control. The uptake of Zn by shoots was increased in pots inoculated by bacterial isolates compared to those in the un-amended soils. Ligand addition significantly enhanced the concentration of DTPA-extractable Zn. Also co-application of DFOB and bacterial inoculation significantly decreased Zn bound to carbonates fraction and increased water soluble Zn concentration. Based on the results of this study, it can be concluded that co-application of DFOB and metal tolerant bacteria are efficient in increasing the bioavailability of Zn when expressed relative to the control treatment, which might be of great significance for the successful phyto-extraction of Zn-polluted soils.

Keywords: Soil pollution, Heavy metals, Phytoremediation, Siderophore

1- MSc Student, Associate Professor, Department of Soil Science, University of Vali-Asr Rafsanjan

2- Associate Professor, Department of Soil Science, University of Vali-Asr Rafsanjan

3- Assistant Professor, Department of Soil Science, University of Vali-Asr Rafsanjan

4- Professor, Department of Horticulture, University of Vali Asr Rafsanjan

*Corresponding author Email: Mohtesen_hamidpour@yahoo.com