



Research Article

Vol. 40, No. 2, Summer. 2026, p. 211-226

Evaluation of the Role of Plant Growth-promoting Bacteria in Improving Nutrient Content and Reducing Nitrate Accumulation in Spinach

N. Enayatizamir^{1*}, N. Rangzan², M. Mokfi¹

1- Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

(*- Corresponding Author Email: n.enayatizamir@scu.ac.ir)

2- Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Khuzestan, Iran

Received: 24 May 2026

Revised: 19 July 2026

Accepted: 15 August 2026

Available Online: 15 August 2026

How to cite this article:

Enayatizamir, N., Rangzan, N., & Mokfi, M. (2026). Evaluation of the role of plant growth-promoting bacteria in improving nutrient content and reducing nitrate accumulation in spinach. *Journal of Soil and Water*, 40(2), 211-226. (In Persian). <https://doi.org/10.22067/jsw.2026.98889.1544>

Introduction

The heavy reliance on chemical N-P-K fertilizers in intensive vegetable farming has raised significant environmental and health concerns. Nitrate accumulation in leafy greens, especially spinach, is a major food safety challenge. Nitrate is directly linked to nitrogen metabolism and accumulates in plant tissue when its uptake exceeds the plant's capacity to use it for growth and protein synthesis. Plant growth-promoting bacteria (PGPB) offer a sustainable alternative by enhancing nutrient bioavailability through mechanisms such as phosphate solubilization, nitrogen fixation, and siderophore production. Growth-promoting bacteria prevent nitrate accumulation in leaves by improving nitrogen uptake and transport. While the efficacy of PGPB is well-documented in cereal crops, their potential to mitigate the negative effects of reduced fertilization in high-demand vegetables like spinach remains under-explored.

Materials and Methods

This study aimed to evaluate the efficiency of PGPB in improving spinach characteristics under greenhouse conditions using a factorial experiment based on a completely randomized design. The treatments consisted of two levels of N-P-K fertilizer (100% of recommended rate and 70% of the recommended rate) and four levels of microbial inoculation (no bacteria, *Pseudomonas putida*, *Phytobacter diazotrophicus*, and a mix of both). The experiment was conducted in 3 kg pots. Six seeds were sown 1 cm below the soil surface and one milliliter of each strain was inoculated under each seed. The soil moisture of the pots was maintained at approximately 75% of field capacity moisture by weight during the experiment. After two weeks, the plants were thinned to three plants. The plants were harvested 50 days after planting. Parameters including leaf nitrogen (N), phosphorus (P), potassium (K), iron (Fe), chlorophyll content, nitrate concentration, and nitrate reductase enzyme activity were measured.

Results

The results showed that the interaction effect of fertilizer level and bacterial inoculation was significant for all measured traits. Microbial inoculation, particularly the mix of bacteria, effectively compensated for the yield loss caused by the 30% reduction in chemical fertilizer. The highest leaf fresh weight was obtained in both the 100% and 70% recommended NPK fertilizer treatments when plants were inoculated with the combined bacterial consortium, representing 1.7- and 2.2-fold increases, respectively, compared with the corresponding non-inoculated treatments. Application of 100% of the recommended NPK fertilizer in combination with the mixed bacterial inoculum increased leaf nitrogen (62%), phosphorus (23%), potassium (51%), and iron (32%) contents



Authors retain the copyright. This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

<https://doi.org/10.22067/jsw.2026.98889.1544>

compared with the corresponding non-inoculated treatment. The second-highest contents of these nutrients were observed in the treatment receiving 70% of the recommended fertilizer rate together with the mixed bacterial inoculum. Total chlorophyll content declined with reduced fertilizer application; however, bacterial inoculation compensated for this reduction, such that no significant difference was observed between the inoculated treatments and the treatment receiving 100% of the recommended fertilizer rate. The highest total chlorophyll content was measured in the treatment receiving 100% of the recommended fertilizer rate together with the mixed bacterial inoculum,

which was 34% higher than the corresponding non-inoculated treatment. The highest leaf nitrate content (6123 mg kg^{-1}) was recorded in the treatment receiving 100% of the recommended fertilizer rate without bacterial inoculation. The lowest leaf nitrate content was measured in the treatment receiving 70% of the recommended fertilizer rate combined with the mixed bacterial inoculum, representing a 25% reduction compared with the corresponding non-inoculated treatment. The highest nitrate reductase activity was measured in the treatment receiving 70% of the recommended fertilizer rate together with the mixed bacterial inoculum, showing a 47% increase compared with the corresponding non-inoculated treatment. There was a negative correlation between nitrate content in the leaf and nitrate reductase activity. The results indicated that chlorophyll content was positively correlated with the contents of nitrogen, phosphorus, potassium, and iron, as well as with nitrate reductase activity. Plant fresh weight was also positively correlated with chlorophyll content, the contents of nitrogen, phosphorus, potassium, and iron, and the activity of nitrate reductase.

Conclusion

Overall, these findings suggest that the combined application of *Pseudomonas putida* and *Phytobacter diazotrophicus* with 70% of the recommended NPK fertilizer rate may represent a promising strategy to reduce chemical fertilizer use by 30% without substantial yield loss, while enhancing the nutritional quality of spinach. Nevertheless, further validation under field conditions and diverse environmental settings is required before this approach can be recommended for widespread agricultural use.

Keywords: Biofertilizer, Iron, Nitrate, Nitrate reductase, Phosphorus

ارزیابی نقش باکتری‌های محرک رشد گیاه در بهبود محتوای عناصر غذایی و کاهش تجمع نیترات در اسفناج

نعیمه عنایتی‌ضمیر^{۱*} - نفیسه رنگ‌زن^۲  - مهناز مکفی^۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۳/۰۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۵/۲۴

چکیده

این پژوهش با هدف بررسی کارایی باکتری‌های محرک رشد گیاه در بهبود ویژگی‌های اسفناج، به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در گلخانه انجام شد. تیمارها شامل دو سطح کود NPK (۱۰۰ درصد مقدار توصیه‌شده و ۷۰ درصد آن) و چهار سطح مایه‌زنی میکروبی (بدون باکتری، *Pseudomonas putida*، *Phytobacter diazotrophicus* و مخلوط دو باکتری) بودند. شاخص‌هایی مانند مقدار نیتروژن، فسفر، پتاسیم، آهن، کلروفیل کل، نیترات و فعالیت آنزیم نیترات رداکتاز اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که اثر متقابل کود و مایه‌زنی بر تمامی صفات اندازه‌گیری شده معنی‌دار بود. بیشترین وزن تر برگ در هر دو سطح ۱۰۰ و ۷۰ درصد مقدار توصیه‌شده کود، همراه با مایه‌زنی مخلوط دو باکتری به‌دست آمد که به‌ترتیب ۱/۷ و ۲/۲ برابر بیشتر از تیمارهای متناظر بدون مایه‌زنی باکتری بود. مصرف ۱۰۰ درصد مقدار توصیه‌شده کود همراه با مایه‌زنی مخلوط دو باکتری، در مقایسه با تیمار متناظر بدون مایه‌زنی، موجب افزایش محتوای نیتروژن (۶۲ درصد)، فسفر (۲۳ درصد)، پتاسیم (۵۱ درصد) و آهن (۳۲ درصد) برگ شد. پس از این تیمار، بیشترین مقادیر این عناصر در تیمار ۷۰ درصد مقدار توصیه‌شده کود همراه با مخلوط دو باکتری مشاهده شد. مقدار کلروفیل کل با کاهش مصرف کود کاهش یافت، اما مایه‌زنی باکتری این کاهش را جبران کرد، به‌طوری‌که در تیمارهای تلقیح شده با باکتری، تفاوت معنی‌داری با تیمار مصرف ۱۰۰ درصد مقدار توصیه‌شده کود مشاهده نشد. بیشترین مقدار کلروفیل در تیمار ۱۰۰ درصد مقدار توصیه‌شده کود همراه با مایه‌زنی مخلوط دو باکتری به‌دست آمد که ۳۴ درصد بیشتر از تیمار متناظر بدون مایه‌زنی بود. بیشترین مقدار نیترات برگ (6123 mg kg^{-1}) در تیمار مصرف ۱۰۰ درصد مقدار توصیه‌شده کود و بدون مایه‌زنی باکتری ثبت شد. کمترین مقدار نیترات برگ در تیمار ۷۰ درصد مقدار توصیه‌شده کود همراه با مخلوط دو باکتری اندازه‌گیری شد که نسبت به تیمار متناظر بدون مایه‌زنی باکتری، کاهش ۲۵ درصدی داشت. بیشترین فعالیت آنزیم نیترات رداکتاز در تیمار ۷۰ درصد مقدار توصیه‌شده کود همراه با مایه‌زنی مخلوط دو باکتری مشاهده شد که در مقایسه با تیمار متناظر بدون مایه‌زنی باکتری، ۴۷ درصد افزایش نشان داد. به‌طور کلی، کاربرد مخلوط *Pseudomonas putida* و *Phytobacter diazotrophicus* همراه با ۷۰ درصد مقدار توصیه‌شده کود NPK، پس از انجام بررسی‌های بیشتر، می‌تواند به‌عنوان راهکاری مناسب برای کاهش ۳۰ درصدی مصرف کود شیمیایی، بدون افت چشمگیر عملکرد و با بهبود کیفیت تغذیه‌ای اسفناج، پیشنهاد شود.

واژه‌های کلیدی: آهن، فسفر، کود زیستی، نیترات، نیترات رداکتاز

۱- گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

(*)- نویسنده مسئول: Email: n.enayatzamir@scu.ac.ir

۲- گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، خوزستان، ایران

مقدمه

اسفناج (*Spinacia oleracea* L.) از خانواده کنوپودیاسه^۱ بوده و به عنوان یک سبزی ارزشمند یک ساله شناخته می شود که سرشار از عناصر غذایی مهمی همچون آهن، کلسیم، فسفر و پتاسیم است. این گیاه به عنوان یک سبزی برگي کشت می شود و خاستگاه آن مناطق آسیای مرکزی و جنوب غربی گزارش شده است. ترکیب و میزان مواد مغذی موجود در اسفناج به طور عمده تحت تأثیر مصرف کودهای معدنی نیتروژن، فسفر و پتاسیم قرار دارد. در میان این عناصر، نیتروژن نقش اساسی در رشد و نمو گیاه ایفا می کند. کمبود نیتروژن موجب زردی برگ های پایینی، کاهش رشد رویشی و در نهایت افت عملکرد می شود. در مقابل، مصرف بیش از حد نیتروژن سبب رشد رویشی بیش از اندازه، افزایش حساسیت گیاه به آفات و بیماری ها، ضعف توسعه ریشه، ورس و تأخیر در رسیدگی محصول می گردد که همگی منجر به کاهش عملکرد و کیفیت نهایی محصول می شوند (Singh & Singh, 2020). فسفر نیز از عناصر کلیدی در توسعه اولیه ریشه، بهبود رشد گیاه، افزایش عملکرد و ارتقای کیفیت محصول به شمار می رود. در مطالعه ای، حسینی دارانی و همکاران (Hosseini Darani et al., 2013) بیان کردند که سطوح نیتروژن در محدوده ۷۵ تا ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار برای دستیابی به عملکرد رضایت بخش اسفناج مناسب است. همچنین زمان و همکاران (Zaman et al., 2018) بیان کردند که مصرف کود در سطح ۱۰۰-۱۵۰ کیلوگرم نیتروژن-فسفر می تواند برای دستیابی به عملکرد مطلوب اسفناج توصیه شود. کاربرد همزمان نیتروژن و فسفر تأثیر مثبتی بر صفات مورفولوژیک و عملکرد اسفناج دارد. با وجود نقش اساسی این کودها در بهبود رشد و کیفیت محصول، بسیاری از کشاورزان سالانه میزان مصرف کودهای نیتروژنه را بدون توجه به نیاز واقعی گیاه و واکنش گونه های مختلف به مقدار و نوع عناصر غذایی افزایش می دهند. اگرچه تأمین کافی عناصر غذایی می تواند رشد گیاه و تولید محصول را بهبود بخشد، مصرف بیش از حد و نامناسب کودهای شیمیایی منجر به تجمع ترکیبات ناخواسته در بخش های خوراکی گیاه می شود که می تواند سلامت انسان را تهدید کند، موجب آلودگی محیط زیست گردد و زیان های اقتصادی به همراه داشته باشد (Patel et al., 2021).

تجمع نیترات در سبزی های برگي، به ویژه اسفناج، یکی از چالش های مهم ایمنی غذایی است. نیترات مستقیماً با متابولیسم نیتروژن مرتبط است و زمانی در بافت گیاه تجمع می یابد که میزان جذب آن بیش از ظرفیت گیاه برای مصرف در رشد و سنتز پروتئین باشد. این پدیده در سبزی های برگي مانند اسفناج، کاهو و جعفری

شدیدتر است، زیرا برگ ها محل اصلی تجمع نیترات هستند (Santamaria, 2006; Bian et al., 2020).

مطالعات نشان داده اند که محصولات ارگانیک معمولاً نیترات کمتری نسبت به محصولات تولید شده با کودهای شیمیایی دارند، زیرا آزادسازی نیتروژن در کودهای آلی آهسته تر است (Koh et al., 2012; Nunez de Gonzalez et al., 2015). باکتری های محرک رشد گیاه به عنوان یکی از مهم ترین نهادهای زیستی در مدیریت پایدار تولید سبزی های برگي شناخته می شوند. این میکروارگانیسم ها از طریق سازوکارهای مختلف، کارایی مصرف عناصر غذایی را افزایش داده و می توانند نقش مؤثری در کاهش وابستگی به کودهای شیمیایی و بهبود کیفیت محصول ایفا کنند. کودهای زیستی شامل گروهی از ریزجانداران با توانایی تثبیت نیتروژن و انحلال عناصر هستند که قابلیت دسترسی عناصر را برای گیاه افزایش می دهند. استفاده از کودهای زیستی دسترسی گیاه را به مواد غذایی و مقاومت در برابر بیماری های گیاهی را افزایش و میزان مصرف کودهای شیمیایی و آلودگی های زیست محیطی را کاهش می دهد (Aisha et al., 2013).

استفاده مفرد از کودهای شیمیایی یا زیستی به تنهایی نمی تواند مسیر کشاورزی را به سمت پایدار هدایت کند. افزایش مصرف کودهای شیمیایی موجب تجمع نیترات در گیاه بدون افزایش عملکرد می شود (Custic et al., 1994) و همچنین هزینه های تولید و آلودگی محیطی را افزایش می دهد. بنابراین مدیریت مصرف کودهای شیمیایی و بهره گیری از روش های تلفیقی کودهای شیمیایی و زیستی از اهمیت ویژه ای برخوردار است. تجمع نیترات در اسفناج یکی از چالش های مهم ایمنی غذایی است. باکتری های محرک رشد با بهبود جذب و انتقال نیتروژن، از انباشت نیترات در برگ ها جلوگیری می کنند. این امر موجب تبدیل سریع تر نیترات به اسیدهای آمینه و پروتئین می شود (Bhattacharyya, 2012; Jha, 2012). آنزیم نیترات رداکتاز در احیای نیترات نقش دارد (Fischer et al., 2014). افزایش فعالیت نیترات رداکتاز سرعت احیای نیترات را افزایش داده و مانع از تجمع آن در بافت های برگي می شود (Saharan & Nehra, 2011). باکتری *Pseudomonas putida* از مهم ترین باکتری های محرک رشد گیاه است که از طریق تولید سیدروفور، انحلال فسفات، و سنتز فیتوهورمون ها و بهبود جذب عناصر غذایی موجب افزایش رشد گیاه می شود. افزون بر این، بسیاری از سویه های این باکتری دارای آنزیم نیترات رداکتاز هستند که در متابولیسم نیتروژن نقش داشته و می توانند با افزایش همانندسازی نیترات، به بهبود سنتز کلروفیل و کاهش تجمع نیترات در گیاه کمک کنند (Costa-Gutierrez et al., 2020; Kalantari et al., 2022; Purnima, & Singh, 2023; Oliveira et al., 2025a). از دیگر باکتری های

آزمایش گلدانی

تأثیر باکتری‌های محرک رشد بر رشد اسفناج در گلخانه به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار بررسی شد. فاکتورهای آزمایش شامل مایه‌زنی باکتری به خاک در چهار سطح [شاهد (B1)، *Pseudomonas putida* (B2)، *Phytobacter diazotrophicus* (B3) و مخلوط دو باکتری (B4)] و فاکتور دوم شامل دو سطح کودی N-P-K با مقدار مصرف ۶۰-۹۰-۱۲۰ کیلوگرم در هکتار [مصرف کامل (F1) و ۷۰ درصد (F2)] بود (Safdar et al., 2022). خاک با ویژگی‌های ذکر شده در جدول ۲ در گلدان‌هایی با قطر ۲۲ سانتی‌متر و ارتفاع ۲۰ سانتی‌متر ریخته شد. برخی ویژگی‌های خاک شامل بافت خاک به روش هیدرومتری، هدایت الکتریکی و pH خاک در عصاره ۱:۱ خاک: آب، مواد آلی به روش والکی و بلک، فسفر قابل دسترس به روش اولسن، پتاسیم قابل دسترس با استفاده از استات آمونیوم و نیتروژن به روش کج‌لدال تعیین گردیدند (Gupta, 2004). سوپر فسفات تریپل و سولفات پتاسیم قبل از کاشت با خاک مخلوط شد. اوره در سه نوبت (یک سوم قبل از کاشت و بقیه بعد از سبز شدن و در مرحله ۳ تا ۴ برگه) مصرف شد. تعداد شش بذر در عمق ۱ سانتی‌متری از سطح خاک کاشته شدند و در زیر هر بذر با یک میلی‌لیتر از هر سویه تلقیح شد. رطوبت خاک گلدان‌ها طی دوره آزمایش از طریق وزنی تقریباً در حد ۷۵ درصد رطوبت ظرفیت مزرعه (FC) نگه داشته شد. گلدان‌ها در گلخانه و در دمای حدود ۲۵ درجه سلسیوس با میانگین ۱۲ ساعت روشنایی در روز نگهداری شدند. پس از دو هفته به سه گیاه تنک شد. گیاهان ۵۰ روز پس از کاشت برداشت شدند.

نمونه‌های تازه برگ در اواسط روز آفتابی برداشت و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از شستشو با آب مقطر و خشک کردن سطحی، مقدار ۵۰ گرم از بافت تازه هر نمونه جدا گردید. فعالیت آنزیم نیترات رداکتاز بر اساس روش ارائه‌شده توسط جاواراسکای (Jaworski, 1971) اندازه‌گیری شد. تمامی مراحل در شرایط خنک انجام شد تا از کاهش فعالیت آنزیمی جلوگیری شود. بافت‌های برگه‌های آزمایش حاوی بافر فسفات پتاسیم، نیترات پتاسیم و پروپرانول قرار داده شد. برای تسهیل نفوذ محلول به داخل بافت، لوله‌ها به مدت چند دقیقه در خلأ قرار گرفتند. نمونه‌ها به مدت ۷۵ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و در تاریکی گرماگذاری شدند و پس از آن ۵ دقیقه در آب جوش قرار گرفتند. برای اندازه‌گیری نیتريت از واکنش رنگ‌سنجی با استفاده از معرف سولفانیل‌آمید و آلفا- نفتیل اتیلن دی‌آمین دی- هیدروکلراید استفاده شد.

محرک رشد گیاه می‌توان *Phytobacter diazotrophicus* را نام برد که از طریق تثبیت زیستی نیتروژن و افزایش فراهمی عناصر غذایی رشد و تغذیه گیاه را بهبود می‌بخشد (Salha et al., 2020; De la Vega-Camarillo et al., 2023; Jia et al., 2026). اطلاعات موجود درباره ویژگی‌های محرک رشدی و کاربرد این باکتری در گیاهان به‌ویژه در مقایسه با سایر باکتری‌های محرک رشد، هنوز محدود است. با وجود مطالعات متعدد درباره نقش باکتری‌های محرک رشد گیاه در افزایش رشد و بهبود جذب عناصر غذایی، بیشتر این پژوهش‌ها بر عملکرد گیاه یا کاهش مصرف کودهای شیمیایی تمرکز داشته‌اند و اطلاعات محدودی درباره اثر هم‌زمان این باکتری‌ها بر تجمع نیترات، فعالیت آنزیم نیترات رداکتاز و کیفیت تغذیه‌ای اسفناج تحت شرایط کاهش مصرف کودهای NPK وجود دارد. همچنین، تا آن‌جا که بررسی منابع نشان می‌دهد، اثر *Phytobacter diazotrophicus* و *Pseudomonas putida*، به‌ویژه به صورت تلفیقی و در شرایط کاهش ۳۰ درصدی مصرف کود شیمیایی، تاکنون بررسی نشده است. از این‌رو، هدف پژوهش حاضر ارزیابی هم‌زمان اثر این دو باکتری، به صورت منفرد و تلفیقی، بر رشد، مقدار عناصر غذایی، تجمع نیترات و فعالیت آنزیم نیترات رداکتاز اسفناج در سطوح مختلف کود NPK است. بر این اساس، فرض شد که تلقیح تلفیقی این دو باکتری بتواند ضمن کاهش ۳۰ درصدی مصرف کود شیمیایی، عملکرد و کیفیت تغذیه‌ای اسفناج را حفظ یا بهبود داده و تجمع نیترات را در مقایسه با مصرف کامل کود کاهش دهد.

مواد و روش‌ها

تهیه باکتری‌های محرک رشد

باکتری‌های *Phytobacter diazotrophicus* و *Pseudomonas putida* که از برگ چغندر قند در دزفول جداسازی شده بودند از کلکسیون میکروبی دانشگاه شهید چمران اهواز تهیه شدند. یک تک کلنی از پلیت اصلی به محیط کشت مایع مغذی^۱ استریل انتقال یافت و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه قرار گرفت. کدورت سوسپانسیون میکروبی بر اساس استاندارد مک‌فارلند تنظیم شد که معادل تقریبی 1×10^8 CFU ml⁻¹ در نظر گرفته شد. برخی ویژگی‌های محرک رشدی این باکتری‌ها شامل تثبیت نیتروژن (Döbereiner et al., 1972)، انحلال فسفات معدنی نامحلول (Pikovskaya, 1948)، تولید سیدروفور (Schwyn & Neilands, 1987) و ایندول استیک اسید (Bric et al., 1991) در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- برخی ویژگی‌های محرک رشدی باکتری‌های مورد استفاده

Table 1- Some growth promotion traits of utilized bacteria

باکتری Bacterium	تولید سیدروفور Siderophore prooduction ($\mu\text{M DTPA equivalents}$)	ایندول استیک اسید Indole-3-acetic acid ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	حل کنندگی فسفات Phosphate solubilization (mg L^{-1})	تثبیت نیتروژن Nitrogen fixation
<i>Pseudomonas putida</i>	33.3	2.2	598.1	+
<i>Phytobacter diazotrophicus</i>	1.12	8.36	290.35	+

جدول ۲- برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده

Table 2- Some physical and chemical properties of used soil

ویژگی Property	واحد Unit	مقدار Amount
بافت Texture	-	لومی Loamy
EC	dS m^{-1}	2.4
pH	-	7.2
پتاسیم قابل دسترس Available K	mg kg^{-1}	189.2
فسفر قابل دسترس Available P	mg kg^{-1}	8.3
نیتروژن کل Total N	%	0.05
کربن آلی Organic Carbon	%	0.54

($\mu\text{g NO}_3^- \text{ g}^{-1} \text{ FW}$) گزارش شد.

اندازه‌گیری کلروفیل در بافت تازه برگ انجام شد. مقدار نیم گرم برگ را با ۱۰ میلی‌لیتر استن ۸۰ درصد به تدریج سائیده تا کلروفیل وارد محلول استن شود. محلول حاصل به مدت ۵ دقیقه در ۲۵۰۰ دور سانتریفیوژ گردید و سپس به یک میلی‌لیتر از عصاره رویی مقدار ۹ میلی‌لیتر استن ۸۰ درصد اضافه شد. مقدار کلروفیل a و b به ترتیب در طول موج‌های ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر قرائت شد؛ سپس مقدار کلروفیل کل طبق معادله‌های (۱)، (۲) و (۳) به دست آمد (Wellburn, 1994).

$$C_a (\mu\text{g/ml}) = (12.25A_{663} - 2.79A_{645}) \quad (1)$$

$$C_b = (21.50A_{645} - 5.10A_{663}) \quad (2)$$

$$\text{Chlorophyll}_{\text{total}} = \text{chlorophyll a} + \text{chlorophyll b} \quad (3)$$

وزن خشک اندام هوایی گیاه از سطح خاک جدا و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۰ درجه سلسیوس در آون، خشک و سپس توسط ترازو توزین شد. فسفر در اندام هوایی بعد از هضم خشک نمونه‌ها به روش کالریمتری (رنگ زرد واناتات مولبیدات) با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقدار پتاسیم نیز به روش نشر

میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Peak-E-1000uv) قرائت شد. به منظور محاسبه مقدار نیتريت تولید شده، منحنی استاندارد با غلظت‌های مختلف سدیم نیتريت تهیه شد و تیمارهای رنگ‌سنجی مشابه نمونه‌ها انجام گرفت. فعالیت آنزیم نیترات رداکتاز به صورت ($\mu\text{mol NO}_2^- \text{ g}^{-1} \text{ FW h}^{-1}$) گزارش شد. برای اندازه‌گیری نیترات، مقدار ۰/۱ گرم از برگ تازه با استفاده از نیتروژن مایع منجمد و سپس با دستگاه سونیکاتور (MSE) به مدت یک دقیقه هوموژن شد. سپس مقدار یک میلی‌لیتر آب دیونیزه به نمونه اضافه شده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس جوشانده شد. نمونه به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و ۰/۱ میلی‌لیتر از مایع رویی به لوله جدید منتقل گردید. سپس ۰/۴ میلی‌لیتر محلول ۵ درصد سالیسیلیک اسید به آن اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در ۲۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. سود ۲ نرمال به آن اضافه شد تا pH در حدود ۱۲ تنظیم گردد. محلول به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. در نهایت جذب نوری در طول موج ۴۱۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (Cataldo et al., 1975). منحنی استاندارد با استفاده از غلظت‌های مختلف نیترات پتاسیم تهیه گردید و غلظت نیترات به صورت

مصرف کود و مایه‌زنی باکتری بر میزان نیتروژن برگ معنی‌دار بود (جدول ۳). کاهش مصرف کود شیمیایی از ۱۰۰ درصد مقدار توصیه شده به ۷۰ درصد، موجب کاهش ۲۶ درصدی نیتروژن برگ در تیمار B1 (بدون مایه‌زنی) شد. مایه‌زنی باکتری‌های محرک رشد به خاک در هر دو تیمار کودی موجب افزایش نیتروژن برگ شد.

در میان تیمارهای کاربرد انفرادی باکتری، میزان نیتروژن برگ در تیمار حاوی *Pseudomonas putida* بیشتر از تیمارهای حاوی *Phytobacter diazotrophicus* بود. بیشترین مقدار نیتروژن برگ در تیمار مصرف کامل کود همراه با مایه‌زنی مخلوط دو باکتری مشاهده شد که ۶۲ درصد بیشتر از تیمار متناظر بدون مایه‌زنی بود. پس از آن، تیمار مصرف ۷۰ درصد مقدار توصیه شده کود همراه با مایه‌زنی مخلوط دو باکتری قرار داشت که ۹۱ درصد افزایش نسبت به تیمار متناظر بدون مایه‌زنی نشان داد (شکل ۲).

کاهش مقدار کود شیمیایی به ۷۰ درصد مقدار توصیه شده، موجب کاهش ۲۳/۶ درصدی مقدار فسفر برگ در تیمار بدون مایه‌زنی (B1) شد. مایه‌زنی باکتری‌های محرک رشد در هر دو سطح کودی، فسفر برگ را نسبت به تیمار بدون مایه‌زنی افزایش داد. در میان تیمارهای تک‌سویه، *Pseudomonas putida* نسبت به *Phytobacter diazotrophicus* تأثیر بیشتری بر افزایش فسفر برگ داشت. بیشترین مقدار فسفر برگ در تیمار مصرف ۱۰۰ درصد مقدار توصیه شده کود همراه با مایه‌زنی مخلوط باکتری‌ها اندازه‌گیری شد که ۲۳ درصد بیشتر از تیمار متناظر بدون مایه‌زنی بود (شکل ۲ الف).

شعله‌ای و با استفاده از دستگاه فلیم فتومتر (Sherwood 410) و مقدار آهن با جذب اتمی (GBC) اندازه‌گیری شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با نرم‌افزار Statistix نسخه ۹/۱ انجام و مقایسه مقادیر میانگین‌ها بوسیله آزمون توکی انجام و نمودارها با نرم‌افزار Excel رسم شدند.

نتایج و بحث

تجزیه واریانس داده‌ها نشان‌دهنده تأثیر معنی‌دار اثر ساده و متقابل تلقیح باکتریایی و مصرف کود بر ویژگی‌های مورد مطالعه بود (جدول ۳).

نتایج نشان داد که اثر متقابل سطوح کود و مایه‌زنی باکتریایی بر وزن تر برگ اسفناج معنی‌دار بود. بیشترین وزن تر برگ در تیمارهای مصرف ۱۰۰ درصد مقدار توصیه شده کود و ۷۰ درصد آن، همراه با مایه‌زنی مخلوط دو باکتری به خاک بدست آمد که به ترتیب ۱/۷ و ۲/۲ برابر تیمارهای متناظر بدون مایه‌زنی بود (شکل ۱). تلقیح هر یک از باکتری‌ها نیز موجب افزایش وزن تر گیاه شد؛ این افزایش در تیمارهای حاوی *Pseudomonas putida* بیشتر از *Phytobacter diazotrophicus* بود. همچنین، در سطح ۷۰ درصد مقدار توصیه شده کود، مایه‌زنی باکتریایی وزن تر گیاه افزایش داد، به طوری که در تیمار مایه‌زنی همزمان دو باکتری با ۷۰ درصد کود تنها حدود ۳ درصد کمتر از تیمار متناظر با ۱۰۰ درصد کود بود. این نتیجه نشان می‌دهد که مایه‌زنی همزمان دو باکتری توانسته است کاهش ۳۰ درصدی مصرف کود را بدون افت قابل توجه وزن تر برگ جبران کند. اثر متقابل میزان

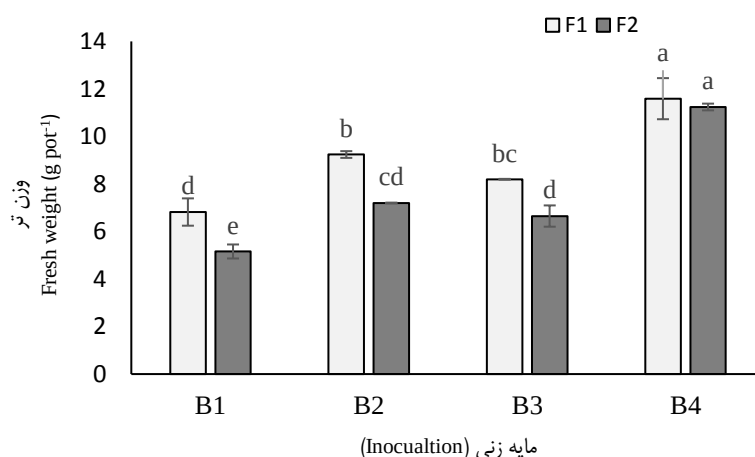
جدول ۳- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثرات مایه‌زنی باکتری و مصرف کود بر برخی ویژگی‌های اسفناج

Table 3- ANOVA (mean squares) for the effects of bacterial inoculation and fertilizer application on some characteristics of spinach

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی Df	وزن تر Fresh weight	نیتروژن Nitrogen	فسفر Phosphorus	پتاسیم Potassium	آهن Iron	کلروفیل Chlorophyll	نیتрат Nitrate	نیترات رداکتاز Nitrate reductase
تلقیح باکتری Bacterial inoculation (I)	3	11.7**	149.8*	0.027*	15**	2059**	200.7**	6925153**	62.27**
سطح کود Fertilizer level (F)	1	31.6**	73.5**	0.056**	5.8**	1134**	384**	1843374**	54.63**
تلقیح باکتری × سطح کود Bacterial inoculation × Fertilizer level (I×F)	3	0.8**	1.31**	0.001*	0.62*	116.1**	61.2**	25413*	2.45*
خطا error	16	0.22	0.22	0.0002	0.10	16	13.9	5043	0.5
ضریب تغییرات C.V (%)	-	5.68	3.29	2.79	4.44	3.59	2.98	1.51	3.98

ns, ** و * به ترتیب عدم معنی‌داری، معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

ns, ** and *: non-significant, significant at $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.05$, respectively.



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر متقابل کود و مایه‌زنی باکتری بر وزن تر برگ

ستون‌های با حروف مشابه از لحاظ آماری در سطح ۵ درصد با آزمون توکی اختلاف معنی‌داری با هم ندارند. تیمارها شامل F1: مصرف ۱۰۰ درصد کود، F2: ۷۰ درصد کود، B1: بدون مایه‌زنی، B2: *Phytobacter diazotrophicus*، B3: *Pseudomonas putida*، B4: مخلوط دو باکتری.

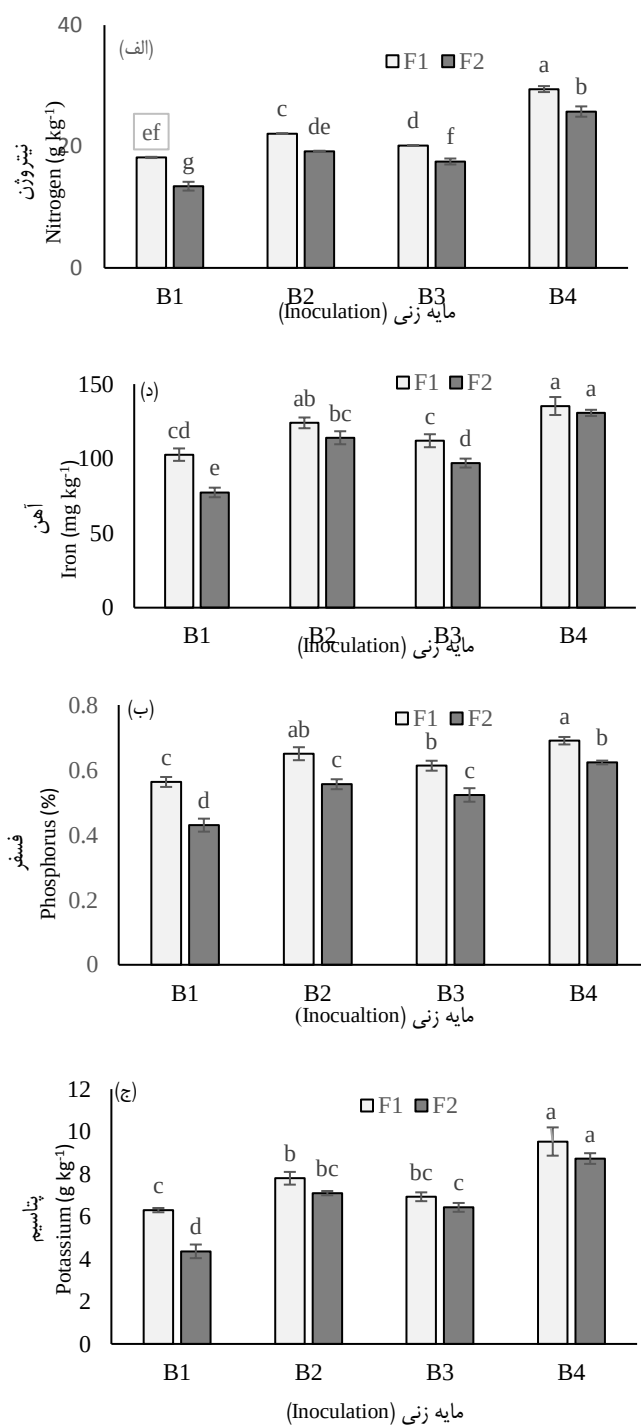
Figure 1- Mean comparison of the interaction effect of fertilizer and bacterial inoculation on leaf fresh weight

Numbers followed by same letters in each column are not significantly different according to the Tukey's HSD test at 5% probability level. Treatments: F1: use of 100% application of fertilizer, F2: 70% of fertilizer, B1: without inoculation, B2: *Phytobacter diazotrophicus*, B3: *Pseudomonas putida*, B4: mix of both bacteria.

افزایش نسبت به تیمار متناظر بدون مایه‌زنی نشان داد (شکل ۲د). مقدار کلروفیل برگ نیز به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفت. کاهش مقدار کود به ۷۰ درصد مقدار توصیه‌شده، موجب کاهش ۱۵ درصدی مقدار کلروفیل کل برگ در تیمار بدون مایه‌زنی (B1) شد (شکل ۳الف). مایه‌زنی باکتری‌های محرک رشد در هر دو سطح کودی، کلروفیل برگ را نسبت به تیمار بدون مایه‌زنی افزایش داد. بیشترین مقدار کلروفیل در تیمار ۱۰۰ درصد مقدار توصیه‌شده کود همراه با مایه‌زنی مخلوط دو باکتری بدست آمد که ۳۴ درصد بیشتر از تیمار متناظر بدون مایه‌زنی بود. پس از آن، تیمار مصرف ۷۰ درصد مقدار توصیه‌شده کود همراه با مایه‌زنی باکتری *Pseudomonas putida* و مخلوط دو باکتری قرار گرفتند که هر دو حدود ۴۸ درصد افزایش نسبت به تیمار بدون مایه‌زنی نشان دادند (شکل ۳الف).

مقدار نیترات برگ اسفناج در تیمار مصرف ۱۰۰ درصد مقدار توصیه‌شده کود بیشتر از تیمار ۷۰ درصد مقدار توصیه‌شده کود بود. کاهش مقدار کود به ۷۰ درصد مقدار توصیه‌شده، موجب کاهش ۲۰ درصدی نیترات برگ در تیمار بدون مایه‌زنی (B1) شد. مایه‌زنی باکتری‌های محرک رشد در هر دو سطح کودی، نیترات برگ را نسبت به شرایط بدون مایه‌زنی باکتریایی کاهش داد و این کاهش در تیمارهای حاوی *Pseudomonas putida* بیشتر از *Phytobacter diazotrophicus* بود.

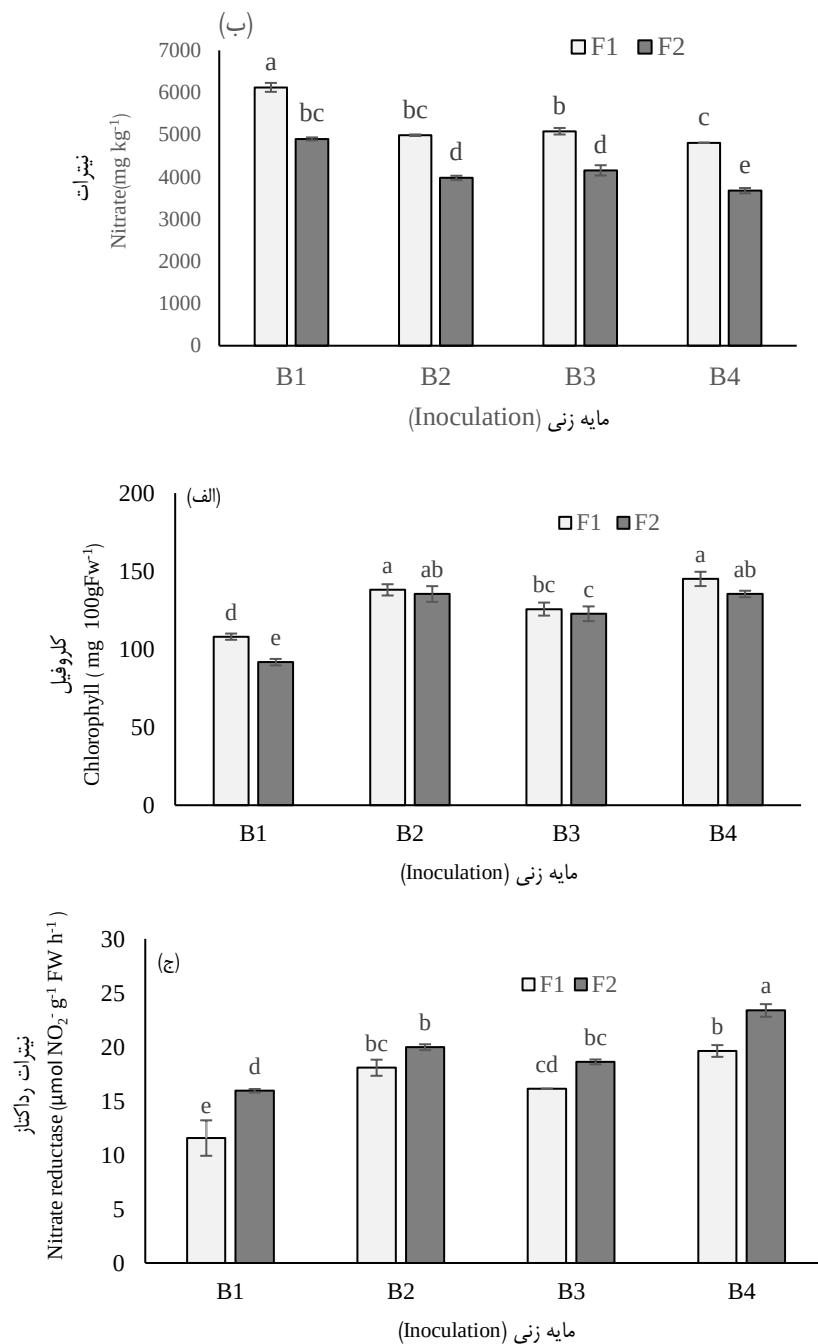
پس از آن، تیمار مصرف ۷۰ درصد مقدار توصیه‌شده کود همراه با مایه‌زنی مخلوط باکتری‌ها قرار گرفت که ۴۵ درصد افزایش نسبت به تیمار متناظر بدون مایه‌زنی نشان داد (شکل ۲ب). مقدار پتاسیم برگ نیز تحت تأثیر تیمارها قرار گرفت. کاهش مقدار کود به ۷۰ درصد مقدار توصیه‌شده، موجب کاهش ۳۰/۸ درصدی غلظت پتاسیم برگ در تیمار بدون مایه‌زنی (B1) شد. مایه‌زنی باکتری‌های محرک رشد در هر دو سطح کودی، پتاسیم برگ را نسبت به تیمار بدون مایه‌زنی باکتریایی افزایش داد. بیشترین مقدار پتاسیم برگ به‌ترتیب در تیمار مصرف ۱۰۰ درصد مقدار توصیه‌شده همراه با مایه‌زنی مخلوط دو باکتری مشاهده شد که ۵۱ درصد بیشتر از تیمار متناظر بدون مایه‌زنی بود. پس از آن، تیمار مصرف ۷۰ درصد مقدار توصیه‌شده کود همراه با مایه‌زنی همزمان دو باکتری قرار گرفت که ۱۰۰ درصد افزایش نسبت به تیمار متناظر بدون مایه‌زنی نشان داد (شکل ۲ج). میزان آهن برگ نیز تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفت (شکل ۲د). کاهش مقدار کود به ۷۰ درصد مقدار توصیه‌شده، موجب کاهش ۲۵ درصدی غلظت آهن برگ در تیمار بدون مایه‌زنی (B1) شد. مایه‌زنی باکتری‌های محرک رشد در هر دو سطح کودی، آهن برگ را نسبت به تیمارهای بدون مایه‌زنی افزایش داد و این افزایش در تیمارهای حاوی *Pseudomonas putida* بیشتر از *Phytobacter diazotrophicus* بود. بیشترین مقدار آهن برگ در تیمار مصرف ۱۰۰ درصد مقدار توصیه‌شده کود همراه با مایه‌زنی همزمان دو باکتری اندازه‌گیری شد که ۳۲ درصد بیشتر از تیمار متناظر بدون مایه‌زنی بود. پس از آن، تیمار مصرف ۷۰ درصد مقدار توصیه‌شده کود همراه با مایه‌زنی همزمان دو باکتری قرار گرفت که ۶۹ درصد



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل کود و مایه‌زنی باکتری بر محتوای عناصر غذایی برگ

ستون‌های با حروف مشابه از لحاظ آماری در سطح ۵ درصد با آزمون توکی اختلاف معنی‌داری با هم ندارند. تیمارها شامل F1: مصرف ۱۰۰ درصد کود، F2: ۷۰ درصد کود، B1: بدون مایه‌زنی، B2: *Phytophthora diazotrophica*، B3: *Pseudomonas putida*، B4: مخلوط دو باکتری.

Figure 2- Mean comparison of the interaction effect of fertilizer and bacterial inoculation on leaf mineral nutrient content
Numbers followed by same letters in each column are not significantly different according to the Tukey's HSD test at 5% probability level. Treatments: F1: use of 100% application of fertilizer, F2: 70% of fertilizer, B1: without inoculation, B2: *Phytophthora diazotrophica*, B3: *Pseudomonas putida*, B4: mix of both bacteria.



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل کود و مایه زنی باکتری بر کلروفیل، مقدار نیترات و فعالیت نیترات ردکتاز برگ

ستون‌های با حروف مشابه از لحاظ آماری در سطح ۵ درصد با آزمون توکی اختلاف معنی‌داری با هم ندارند. تیمارها شامل F1: مصرف ۱۰۰ درصد کود، F2: ۷۰ درصد کود، B1: بدون مایه‌زنی، B2: *Phytobacter diazotrophicus*، B3: *Pseudomonas putida*، B4: مخلوط دو باکتری.

Figure 3- Mean comparison of the interaction effect of fertilizer and bacterial inoculation on leaf chlorophyll, nitrate content, and nitrate reductase activity

Numbers followed by same letters in each column are not significantly different according to the Tukey's HSD test at 5% probability level. Treatments: F1: use of 100% application of fertilizer, F2: 70% of fertilizer, B1: without inoculation, B2: *Phytobacter diazotrophicus*, B3: *Pseudomonas putida*, B4: mix of both bacteria.

نشان دادند (شکل ۳). این نتایج نشان می‌دهد که کاهش مصرف کود شیمیایی همراه با مایه‌زنی باکتری‌های محرک رشد، به‌ویژه استفاده از مخلوط دو باکتری، موجب تحریک فعالیت آنزیم نیترات رداکتاز و احتمالاً افزایش کارایی احیای نیترات در گیاه اسفناج شده است.

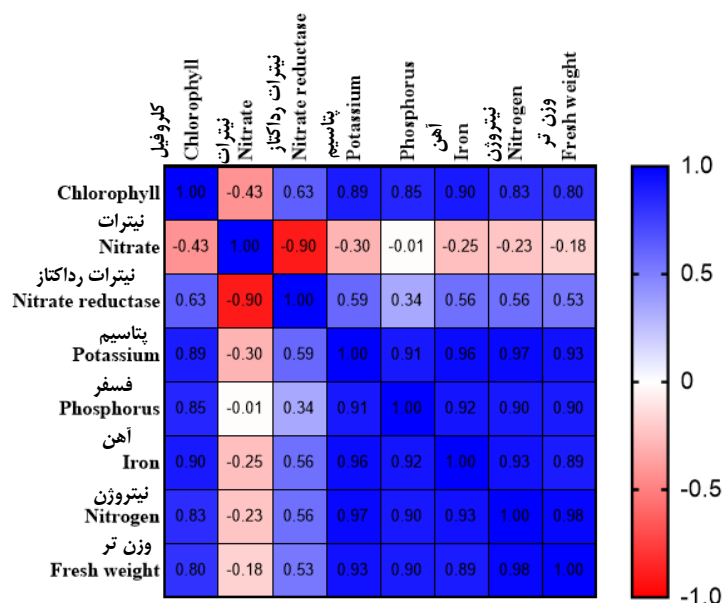
نتایج این مطالعه نشان داد که دو سطح مصرف کود شیمیایی اثر معنی‌داری بر وزن تر گیاه، غلظت عناصر غذایی و فعالیت نیترات رداکتاز داشتند. با کاهش میزان کود به ۷۰ درصد مقدار توصیه شده، مقدار ویژگی‌های ذکر شده کاهش یافت. اگرچه نیترات برای رشد گیاه مهم است، اما تجمع بیش از حد آن در سبزیجات برگی مانند اسفناج موجب کاهش ارزش تغذیه‌ای و ایجاد نگرانی‌های ایمنی غذایی می‌شود. باکتری‌های محرک رشد گیاه با افزایش کارایی مصرف نیتروژن و تنظیم فعالیت آنزیم نیترات رداکتاز می‌توانند از تجمع نیترات در برگ‌ها جلوگیری کنند.

کاهش مصرف کود نیتروژنی از ۱۰۰ به ۷۰ درصد مقدار توصیه شده در تمامی تیمارها موجب کاهش غلظت نیترات برگ اسفناج شد که نشان‌دهنده نقش مستقیم میزان نیتروژن مصرفی در تجمع نیترات است. همچنین، در هر دو سطح کود، بیشترین غلظت نیترات در تیمار بدون مایه‌زنی باکتری و کمترین مقدار در تیمار ۷۰ درصد مقدار توصیه شده کود همراه با مخلوط دو باکتری مشاهده شد. غلظت نیترات

اندازه‌گیری شده با حدود مجاز تعیین شده در Commission Regulation (EU) 2023/915 مقایسه شد.

بیشترین مقدار آن در تیمار مصرف ۱۰۰ درصد مقدار توصیه‌شده کود و در شرایط بدون مایه‌زنی باکتری با مقدار 6123 mg kg^{-1} ثبت شد (شکل ۳ب)، در حالی که کمترین مقدار آن در تیمار ۷۰ درصد مقدار توصیه‌شده کود همراه با مایه‌زنی مخلوط دو باکتری با مقدار mg kg^{-1} ۳۶۷۵ اندازه‌گیری شد. این تیمار در مقایسه با تیمار ۷۰ درصد مقدار توصیه‌شده کود بدون مایه‌زنی باکتری، مقدار نیترات را ۲۵ درصد کاهش داد و نسبت به تیمار مصرف ۱۰۰ درصد کود بدون مایه‌زنی باکتری، ۴۰ درصد کاهش نشان داد (شکل ۳ب).

فعالیت آنزیم نیترات رداکتاز نیز به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفت. فعالیت آنزیم نیترات رداکتاز به‌طور کلی در تیمار مصرف ۷۰ درصد مقدار توصیه‌شده کود بیشتر از تیمار مصرف ۱۰۰ درصد مقدار توصیه‌شده کود بود (شکل ۳ج). مایه‌زنی باکتری‌های محرک رشد در هر دو سطح کودی، فعالیت این آنزیم را نسبت به تیمار بدون مایه‌زنی افزایش داد و این افزایش در تیمارهای حاوی *Pseudomonas putida* بیشتر از *Phytobacter diazotrophicus* بود. بیشترین فعالیت نیترات رداکتاز در تیمار مصرف ۷۰ درصد مقدار توصیه‌شده کود همراه با مایه‌زنی مخلوط دو باکتری مشاهده شد که ۴۷ درصد بیشتر از تیمار متناظر بدون مایه‌زنی بود. پس از آن، تیمارهای مصرف ۷۰ درصد مقدار توصیه‌شده کود همراه با مایه‌زنی *Pseudomonas putida* و مصرف ۱۰۰ درصد مقدار توصیه‌شده کود همراه با مایه‌زنی همزمان دو باکتری قرار گرفتند که به ترتیب ۲۵ و ۷۰ درصد افزایش نسبت به تیمار متناظر بدون مایه‌زنی



شکل ۴- همبستگی بین ویژگی‌های اندازه‌گیری شده
Figure 4- Correlation between measured properties

بر اساس این مقررات، حداکثر مجاز نیترات در اسفناج، بسته به فصل برداشت و شرایط تولید، بین ۲۰۰۰ تا ۷۰۰۰ میلی گرم نیترات در کیلوگرم وزن تر متغیر است و مقدار مرجع برای اسفناج تازه ۳۵۰۰ میلی گرم نیترات در کیلوگرم وزن تر است. در پژوهش حاضر، غلظت نیترات در دامنه ۳۶۵۷ تا ۶۱۲۳ میلی گرم در کیلوگرم وزن تر قرار داشت. بنابراین، اگرچه تیمار ۷۰ درصد مقدار توصیه شده کود همراه با مخلوط دو باکتری کمترین غلظت نیترات را ایجاد کرد، این مقدار همچنان اندکی بالاتر از مقدار مرجع برای اسفناج تازه بود، اما در محدوده مجاز تعیین شده برای برخی شرایط تولید و فصل برداشت قرار داشت. در مجموع، نتایج این پژوهش نشان می دهد که تلفیق کاهش ۳۰ درصدی مصرف کود نیتروژنی با مایه زنی باکتری های محرک رشد، بدون حذف کامل کود شیمیایی، می تواند تجمع نیترات را به طور معنی داری کاهش داده و کیفیت و ایمنی اسفناج را بهبود بخشد. با این حال، برای تعمیم این یافته ها به شرایط تولید تجاری، انجام مطالعات مزرعه ای در فصول مختلف و تحت شرایط اقلیمی گوناگون، همراه با ارزیابی راهبردهای بهینه مدیریت نیتروژن، ضروری است.

نتایج این پژوهش نشان داد که بین مقدار نیترات برگ و فعالیت آنزیم نیترات رداکتاز همبستگی منفی وجود دارد (شکل ۴)؛ به گونه ای که افزایش فعالیت این آنزیم با کاهش غلظت نیترات همراه بود. بیشترین فعالیت نیترات رداکتاز در تیمار مصرف ۷۰ درصد توصیه شده کود همراه با مایه زنی مخلوط دو باکتری مشاهده شد که هم زمان کمترین غلظت نیترات را نیز داشت. در مقابل، تیمار مصرف ۱۰۰ درصد کود بدون مایه زنی باکتریایی، کمترین فعالیت نیترات رداکتاز و بیشترین غلظت نیترات را نشان داد. این نتیجه نشان می دهد که با افزایش فعالیت این آنزیم، نیترات احیا شده و از تجمع آن در بافت برگ جلوگیری می شود. بنابراین، به نظر می رسد افزایش فعالیت نیترات رداکتاز ناشی از مایه زنی با باکتری های محرک رشد، به ویژه در شرایط کاهش ۳۰ درصدی مصرف کود، یکی از سازوکارهای اصلی کاهش تجمع نیترات در برگ اسفناج در این پژوهش بوده است. همبستگی مثبت بین کلروفیل، آهن و فعالیت نیترات رداکتاز (شکل ۴) نشان می دهد که این صفات از طریق مسیرهای مشترک متابولیسم نیتروژن و فتوسنتز به یکدیگر مرتبط هستند. نیتروژن یکی از اجزای اصلی کلروفیل است؛ بنابراین، افزایش جذب و همانندسازی نیتروژن به طور مستقیم سنتز کلروفیل و ظرفیت فتوسنتزی گیاه را افزایش می دهد. از سوی دیگر، نیترات رداکتاز به عنوان یکی از مهم ترین آنزیم ها در مسیر احیای نیترات است و افزایش فعالیت آن موجب تسهیل تبدیل نیترات به ترکیبات آلی و کاهش تجمع نیترات در گیاه می شود. آهن نیز به عنوان یکی از عناصر ضروری در انتقال الکترون، سنتز کلروفیل و حفظ فعالیت آنزیم های دخیل در متابولیسم نیتروژن، از جمله نیترات رداکتاز، اهمیت دارد (Therby-Vale et al., 2022; Hong et al., 2022).

2025). از این رو، همبستگی مثبت بین آهن، کلروفیل و فعالیت نیترات رداکتاز در این پژوهش با نقش فیزیولوژیکی این عنصر در فتوسنتز و متابولیسم نیتروژن همخوانی دارد. همچنین پتاسیم، آهن و نیتروژن با کلروفیل و وزن تر گیاه همبستگی مثبت داشتند (شکل ۴)، که نشان می دهد بهبود تغذیه معدنی با افزایش رشد رویشی و ظرفیت فتوسنتزی اسفناج همراه بوده است.

باکتری های محرک رشد مورد استفاده توانستند ویژگی های اندازه گیری شده را بهبود بخشند و اثرات منفی کاهش مصرف کود شیمیایی را جبران کنند. باکتری های محرک رشد گیاه از طریق مجموعه ای از مکانیسم های مستقیم و غیرمستقیم شامل تثبیت زیستی نیتروژن، انحلال فسفات، تولید سیدروفور، سنتز فیتوهورمون هایی مانند اکسین، تعدیل هورمون اتیلن از طریق ACC دآمیناز و افزایش توسعه سیستم ریشه، موجب افزایش جذب عناصر غذایی و بهبود کارایی مصرف کود می شوند (Timofeeva et al., 2023; Sun et al., 2024). نتایج پژوهش حاضر با مطالعات پیشین روی اسفناج و سایر سبزی های برگی همخوانی دارد. گونه های مختلف *Pseudomonas* از طریق مکانیسم هایی مانند تولید سیدروفور، کلات کردن آهن و افزایش دسترسی گیاه به آهن (Khare et al., 2018)، افزایش طول ریشه و ساقه و تعداد برگ، افزایش وزن تر و خشک گیاه، بهبود غلظت عناصر ریزمغذی (Bolhassani et al., 2019) و همچنین بهبود تغذیه نیتروژن و فسفر (Çakmakçı et al., 2007) موجب ارتقای رشد اسفناج شده اند. اثرات مثبت این باکتری ها چه در حضور و چه در غیاب کودهای شیمیایی گزارش شده است. در مطالعه ای روی اسفناج، تلفیق *Pseudomonas putida* و *Pseudomonas fluorescens* موجب افزایش معنی دار فعالیت آنزیم نیترات رداکتاز، کاهش غلظت نیترات در اندام هوایی و افزایش غلظت آهن در ریشه و بخش هوایی گیاه شد. بیشترین فعالیت نیترات رداکتاز و کمترین تجمع نیترات در گیاهان تلقیح شده با *P. putida* گزارش شد که به توانایی این باکتری در تولید سیدروفور، افزایش فراهمی زیستی آهن و بهبود متابولیسم نیتروژن نسبت داده شد (Kalantari et al., 2022). در مطالعه ای دیگر، باکتری *Sphingomonas panaciterrae* موجب افزایش رشد، وزن تر و رنگدانه های فتوسنتزی اسفناج شد (Sultana et al., 2024). در کاهوی کشت هیدروپونیک، تلفیق *Pseudomonas fluorescens* موجب افزایش کارایی فتوسنتز، زیست توده، فعالیت نیترات رداکتاز و کاهش تجمع نیترات در برگ شد که نشان دهنده نقش این باکتری در بهبود متابولیسم نیتروژن بود (Oliveira et al., 2025a). همچنین، در مطالعه ای روی کاهو و آروگولا، تلفیق همزمان *P. fluorescens*، *Bacillus subtilis* و *Azospirillum brasilense*، وزن تر اندام هوایی، کلروفیل و جذب عناصر غذایی، فعالیت نیترات رداکتاز را افزایش و تجمع نیترات را کاهش داد که نشان دهنده نقش

و افزایش محتوای آهن در برگ‌ها برای بهبود ارزش تغذیه‌ای آن اهمیت دارد. استفاده از باکتری‌های محرک رشد در این پژوهش موجب افزایش آهن برگ شد که احتمالاً به دلیل توانایی تولید سیدروفور و حل کردن آهن نامحلول در خاک است. علاوه بر این، کاربرد باکتری‌ها ممکن است توانایی گیاه در جذب آب و عناصر غذایی را افزایش داده و در نهایت موجب بهبود رشد گیاه شده باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که کاهش مصرف کود شیمیایی، موجب کاهش وزن تر گیاه، غلظت عناصر غذایی و فعالیت آنزیم نیترات رداکتاز در اسفناج شد. با این حال، مایه‌زنی باکتری‌های محرک رشد توانست این کاهش را جبران کرده و بهبود قابل توجهی در رشد و کیفیت گیاه ایجاد کند. استفاده از باکتری‌های محرک رشد با افزایش جذب عناصر نیتروژن، فسفر، پتاسیم و آهن، افزایش تولید کلروفیل و تقویت فعالیت نیترات رداکتاز، موجب کاهش تجمع نیترات در برگ‌ها شد؛ موضوعی که از نظر ایمنی غذایی و ارزش تغذیه‌ای اهمیت ویژه‌ای دارد. همبستگی مثبت بین وزن تر گیاه، کلروفیل و عناصر غذایی، و همچنین همبستگی منفی بین نیترات برگ و فعالیت نیترات رداکتاز، نقش مؤثر این باکتری‌ها را در بهبود متابولیسم نیتروژن و افزایش کارایی مصرف کود تأیید می‌کند. نتایج نشان می‌دهد که ترکیب مصرف ۷۰ درصد کود شیمیایی همراه با مایه‌زنی مخلوط دو باکتری، می‌تواند عملکرد و کیفیت اسفناج را در سطحی مشابه یا حتی بالاتر از مصرف کامل کود شیمیایی فراهم کند. بنابراین، استفاده از باکتری‌های محرک رشد گیاه به عنوان یک راهکار زیستی مؤثر، می‌تواند ضمن کاهش وابستگی به کودهای شیمیایی، موجب بهبود کیفیت تغذیه‌ای اسفناج، کاهش تجمع نیترات و ارتقای پایداری تولید شود. با این حال، نتایج این پژوهش بر اساس یک آزمایش گلدانی در شرایط کنترل شده گلخانه‌ای به دست آمده است؛ از این رو، برای تعمیم این یافته‌ها به شرایط مزرعه، انجام مطالعات تکمیلی به منظور ارزیابی کارایی این تیمارها در شرایط واقعی کشت ضروری است.

سپاسگزاری

نویسندگان از دانشگاه شهید چمران اهواز (SCU.AS1404.248) تقدیر و تشکر می‌نمایند.

این باکتری‌ها در بهبود متابولیسم نیتروژن و کیفیت سبزی‌های برگی است (Oliveira et al., 2025b). باکتری‌های مورد استفاده در پژوهش حاضر نیز دارای چندین ویژگی‌های محرک رشدی هستند (جدول ۱). اگرچه این باکتری‌ها در این پژوهش از برگ چغندر قند جداسازی شده بودند، مطالعات نشان داده‌اند که بسیاری از باکتری‌های اندوفیت و فیلوسفری، از انعطاف‌پذیری اکولوژیک برخوردار هستند و پس از تلقیح با بذر یا خاک، قادر به استقرار در ریزوسفر و برقراری برهم‌کنش با ریشه گیاه هستند. استفاده از جدایه‌های اندوفیت در تلقیح بذر یا خاک در مطالعات متعددی گزارش شده است (Compant et al., 2010; Thomas & Sekhar, 2016; Deng et al., 2023). این باکتری‌ها می‌توانند رشد گیاه را به طور مستقیم از طریق تسهیل جذب عناصر غذایی (نیتروژن، فسفر و مواد معدنی ضروری) یا تعدیل سطح هورمون‌های گیاهی، و به طور غیرمستقیم از طریق کاهش اثرات پاتوژن‌ها به عنوان عوامل کنترل زیستی بهبود بخشند (Glick, 2012). با این وجود، در پژوهش حاضر کلونیزاسیون ریشه و پایداری این سویه‌ها در خاک ارزیابی نشد؛ بنابراین، بررسی توانایی استقرار آن‌ها در ریزوسفر اسفناج با استفاده از روش‌های میکروبیولوژی یا مولکولی در مطالعات آینده ضروری است.

در سال‌های اخیر نشان داده شده است که کنسرسیوم‌های باکتریایی معمولاً نسبت به تلقیح تک‌سویه عملکرد بهتری دارند، زیرا هر سویه بخشی از نیازهای تغذیه‌ای و فیزیولوژیکی گیاه را تأمین کرده و اثرات هم‌افزایی میان آن‌ها موجب افزایش جذب عناصر، بهبود فتوسنتز و ارتقای متابولیسم نیتروژن می‌شود (Negi et al., 2024; Moretti et al., 2024). در پژوهش حاضر نیز به نظر می‌رسد برتری تیمار حاوی مخلوط *Pseudomonas putida* و *Phytobacter diazotrophicus* ناشی از همین اثر هم‌افزایی باشد. این باکتری‌ها احتمالاً با تولید سیدروفور و افزایش فراهمی زیستی آهن، جذب ریزمغذی‌ها را بهبود می‌بخشند، همچنین با مشارکت در تثبیت نیتروژن و بهبود چرخه نیتروژن، فراهمی این عنصر را برای گیاه افزایش می‌دهد. توانایی هر دو سویه در انحلال فسفات و تولید ترکیبات محرک رشد مانند IAA می‌تواند توسعه ریشه، جذب آب و عناصر غذایی و در نتیجه سنتز کلروفیل و فعالیت نیترات رداکتاز را افزایش دهد؛ موضوعی که با نتایج همبستگی‌های مشاهده‌شده در شکل ۴ نیز همخوانی دارد. بنابراین، افزایش وزن تر گیاه احتمالاً ناشی از اثرات تلفیقی تولید IAA، جذب بهتر عناصر غذایی به ویژه نیتروژن، فسفر و آهن، و همچنین افزایش سنتز رنگدانه‌های فتوسنتزی است. اسفناج منبع غنی آهن است

References

1. Aisha, H.A., Hafez, M.M., Mahmoud, A.R., & Shafeek, M.R. (2013). Effect of bio and chemical fertilizers on growth, yield and chemical properties of spinach plant (*Spinacia oleracea* L.). *Middle East Journal of Agriculture Research*, 2(1), 16-20.
2. Bhattacharyya, P.N., & Jha, D.K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in

- agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1327-1350. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>
3. Bian, Z., Wang, Y., Zhang, X., Li, T., Grundy, S., Yang, Q., & Cheng, R. (2020). A review of environment effects on nitrate accumulation in leafy vegetables grown in controlled environments. *Foods*, 9(6), 732. <https://doi.org/10.3390/foods9060732>
4. Bolhassani, Z., Ronaghi, A.M., Ghasemi, R., & Zarei, M. (2019). Influence of rice-husk derived biochar and growth promoting rhizobacteria on the yield and chemical composition of spinach in soil under salinity stress. *Iranian Journal of Soil Research*, 33(3), 335-348. (In Persian). <https://doi.org/10.22092/ijsr.2019.122566.380>
5. Bric, J.M., Bostock, R.M., & Silverstone, S.E. (1991). Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(2), 535-538. <https://doi.org/10.1128/aem.57.2.535-538.1991>
6. Çakmakçı, R., Erat, M., Erdoğan, Ü., & Dönmez, M.F. (2007). The influence of plant growth-promoting rhizobacteria on growth and enzyme activities in wheat and spinach plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 170(2), 288-295. <https://doi.org/10.1002/jpln.200625105>
7. Cataldo, D.A., Haroon, M., Schrader, L.E., & Youngs, V.L. (1975). Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 6(1), 71-80. <https://doi.org/10.1080/00103627509366547>
8. Compant, S., Clément, C., & Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(5), 669-678. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>
9. Costa-Gutierrez, S.B., Lami, M.J., Caram-Di Santo, M.C., Zenoff, A.M., Vincent, P.A., Molina-Henares, M.A., Espinosa-Urgel, M., & de Cristóbal, R.E. (2020). Plant growth promotion by *Pseudomonas putida* KT2440 under saline stress: role of eptA. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(10), 4577-4592. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10516-z>
10. Custic, M., Poljak, M., & Cosic, T. (1994). Nitrate content in leafy vegetables as related to nitrogen fertilization in Croatia. *Acta Horticulturae*, 371, 407-412. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1994.371.54>
11. Hosseini Darani, F., Zeinali, H., Shirani Rad, A.H., Khourgami, A., & Nasrollahi, H. (2013). Effect of planting date and nitrogen fertilizer on two varieties (inner and outer) of spinach. *Annals of Biological Research*, 4, 56-59.
12. De la Vega-Camarillo, E., Sotelo-Aguilar, J., Rios-Galicia, B., Mercado-Flores, Y., Arteaga-Garibay, R., Villa-Tanaca, L., & Hernández-Rodríguez, C. (2023). Promotion of the growth and yield of *Zea mays* by synthetic microbial communities from Jala maize. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1167839. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1167839>
13. Deng, B., Wu, L., Xiao, H., & Cheng, Q. (2023). Characterization of *Pseudomonas* sp. En3, an endophytic bacterium from poplar leaf endosphere with plant growth-promoting properties. *Forests*, 14(11), 2203. <https://doi.org/10.3390/f14112203>
14. Döbereiner, J., Day, J.M., & Dart, P.J. (1972). Nitrogenase activity in the rhizosphere of sugarcane and some other tropical grasses. *Plant and Soil*, 37, 191-196.
15. European Commission. (2023). *Commission Regulation (EU) 2023/915 of 25 April 2023 on maximum levels for certain contaminants in food and repealing Regulation (EC) No 1881/2006*. *Official Journal of the European Union*, L 119, 103-157.
16. Fischer, M., Falke, D., Pawlik, T., & Sawers, R.G. (2014). Oxygen-dependent control of respiratory nitrate reduction in mycelium of *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Journal of Bacteriology*, 196(23), 4152-4162. <https://doi.org/10.1128/JB.02202-14>
17. Glick, B.R. (2012). Plant growth- promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012(1), 963401. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>
18. Gupta, P.K. (2004). *Soil, Plant, Water and Fertilizer Analysis*. Agrobios (India), 438 p.
19. Hong, Y., Liu, R., Xiang, W., Lei, P., & Fang, X. (2025). Emergent plants improve nitrogen uptake rates by regulating the activity of nitrogen assimilation enzymes. *Plants*, 14(10), 1484. <https://doi.org/10.3390/plants14101484>
20. Jaworski, E.G. (1971). Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 43(6), 1274-1279. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(71\)80010-4](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(71)80010-4)
21. Jia, W., Hong, L., Xu, X., Hong, C., Zhu, W., Zhu, F., & Yao, Y. (2026). Divergent defense strategies induced by *Variovorax soli* and *Microbacterium phyllosphaerae*: benefits for strawberry growth and powdery mildew resistance. *Horticulturae*, 12(2), 225. <https://doi.org/10.3390/horticulturae12020225>
22. Kalantari, A., Aliasgharzad, N., & Najafi, N. (2022). Nitrate reductase activity, iron and nitrate concentrations in spinach inoculated with two species of *Pseudomonas* under different nitrogen levels. *Water and Soil Science*, 32(2), 25-41. (In Persian). <https://doi.org/10.22034/ws.2021.29495.2173>
23. Khare, A., More, H., Madliya, S., & Patil, V.D. (2018). Biofortification of spinach (*Spinacia oleracea*) with plant growth promoting rhizobacteria-*Pseudomonas fluorescens*. *International Journal of Emerging Technologies and*

- Innovative Research*, 5(8), 669-675.
24. Koh, E., Charoenprasert, S., & Mitchell, A.E. (2012). Effect of organic and conventional cropping systems on ascorbic acid, vitamin C, flavonoids, nitrate, and oxalate in 27 varieties of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(12), 3144-3150. <https://doi.org/10.1021/jf300051f>
25. Moretti, L.G., Crusciol, C.A.C., Leite, M.F.A., Momesso, L., Bossolani, J.W., Costa, O.Y.A., Hungria, M., & Kuramae, E.E. (2024). Diverse bacterial consortia: key drivers of rhizosoil fertility modulating microbiome functions, plant physiology, nutrition, and soybean grain yield. *Environmental Microbiome*, 19(1), 50. <https://doi.org/10.1186/s40793-024-00595-0>
26. Negi, R., Sharma, B., Jan, T., Kaur, T., Chowdhury, S., Kapoor, M., Singh, S., Kumar, A., Rai, A.K., Rustaqi, S., Shreaz, Sh., Kour, D., Ahmed, N., Kumar, K., & Yadav, A.N. (2024). Microbial consortia: promising tool as plant bioinoculants for agricultural sustainability. *Current Microbiology*, 81(8), 222. <https://doi.org/10.1007/s00284-024-03755-0>
27. Nunez de Gonzalez, M.T., Osburn, W.N., Hardin, M.D., Longnecker, M., Garg, H.K., Bryan, N.S., & Keeton, J.T. (2015). A survey of nitrate and nitrite concentrations in conventional and organic- labeled raw vegetables at retail. *Journal of Food Science*, 80(5), C942-C949. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12858>
28. Oliveira, C.E.D.S., Gato, I.M.B., Jalal, A., Girardi, V.D.A.M., Oliveira, J.R., Tamburi, K.V., Caetano, G.C., Oliveira, R.M., Aguilar, J.V., de Camargos, L.S., & Teixeira Filho, M.C.M. (2025a). *Pseudomonas fluorescens* rates increase nitrate reductase activity and reduce shoot nitrate accumulation in hydroponic lettuce. *Journal of Plant Nutrition*, 48(2), 208-221. <https://doi.org/10.1080/01904167.2024.2399289>
29. Oliveira, C.E.D.S., Sena Oliveira, T.J.S., Jalal, A., Fernandes, G.C., Bastos, A.D.C., da Silva, M.R., Sant'Ana, G.R., Aguilar, J.V., de Camargos, L.S., & Teixeira Filho, M.C.M. (2025b). Inoculation and co-inoculation of lettuce and arugula hydroponically influence nitrogen metabolism, plant growth, nutrient acquisition and photosynthesis. *Frontiers in Plant Science*, 16, 1547821. <https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1547821>
30. Patel, V.K., Vikram, B., Sikarwar, P.S., & Sengupta, J. (2021). Effect of different levels of nitrogen and phosphorus on growth and yield of spinach (*Spinacea oleracea* L.) cv. all green. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 10(1), 2229-2231.
31. Pikovskaya, R.I. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*, 17, 362-370.
32. Safdar, H., Jamil, M., Hussain, A., Albalawi, B.F.A., Ditta, A., Dar, A., Aimen, A., Ahmad, H.T., Nazir, Q., & Ahmad, M. (2022). The effect of different carrier materials on the growth and yield of spinach under pot and field experimental conditions. *Sustainability*, 14(19), 12255. <https://doi.org/10.3390/su141912255>
33. Saharan, B.S., & Nehra, V. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sciences and Medicine Research*, Article LSMR-21.
34. Salha, Y., Sudalaimuthasari, N., Kundu, B., AlMaskari, R.S., Alkaabi, A.S., Hazzouri, K.M., Abuqamar, S.F., El-Tarabily, K.A., & Amiri, K.M. (2020). Complete genome sequence of *Phytobacter diazotrophicus* strain UAEU22, a plant growth-promoting bacterium isolated from the date palm rhizosphere. *Microbiology Resource Announcements*, 9(25), e00499-20. <https://doi.org/10.1128/MRA.00499-20>
35. Santamaria, P. (2006). Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(1), 10-17. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2351>
36. Schwyn, B., & Neilands, J.B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160(1), 47-56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)
37. Singh, N., & Singh, H. (2020). Impact of nitrogen and phosphorus on growth and seed yield of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Asian Journal of Horticulture*, 15(1), 1-3. <https://doi.org/10.15740/HAS/TAJH/15.1/1-3>
38. Purnima, & Singh, P. (2023). Growth effects of *Pseudomonas*, a plant growth-promoting rhizobacteria on spinach (*Spinacia oleracea* L.)-a review. *Current Agriculture Research Journal*, 11(1), 63-68. <https://doi.org/10.12944/CARJ.11.1.05>
39. Sultana, R., Islam, S.M.N., Sriti, N., Ahmed, M., Shuvo, S.B., Rahman, M.H., & Jashim, A.I.I. (2024). *Sphingomonas panaciterrae* PB20 increases growth, photosynthetic pigments, antioxidants, and mineral nutrient contents in spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Heliyon*, 10(3), e25596. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e25596>
40. Sun, W., Shahrajabian, M.H., & Soleymani, A. (2024). The roles of plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR)-based biostimulants for agricultural production systems. *Plants*, 13(5), 613. <https://doi.org/10.3390/plants13050613>
41. Therby-Vale, R., Lacombe, B., Rhee, S.Y., Nussaume, L., & Rouached, H. (2022). Mineral nutrient signaling controls photosynthesis: focus on iron deficiency-induced chlorosis. *Trends in Plant Science*, 27(5), 502-509. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.11.005>
42. Thomas, P., & Sekhar, A.C. (2016). Effects due to rhizospheric soil application of an antagonistic bacterial endophyte on native bacterial community and its survival in soil: a case study with *Pseudomonas aeruginosa* from banana. *Frontiers in Microbiology*, 7, 493. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00493>
43. Timofeeva, A.M., Galyamova, M.R., & Sedykh, S.E. (2023). Plant growth-promoting soil bacteria: nitrogen

- fixation, phosphate solubilization, siderophore production, and other biological activities. *Plants*, 12(24), 4074. <https://doi.org/10.3390/plants12244074>
44. Wellburn, A.R. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144(3), 307-313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)
45. Zaman, Q.U., Hamid, F.S., Islam, S.U., Ahmad, F., & Ahmad, N. (2018). Impact of various levels of nitrogen and phosphorus on growth and yield of spinach (*Spinacea oleracea* L.) under conditions of Mansehra (Pakistan). *Open Academic Journal of Advanced Science and Technology*, 2(1), 5-8. <https://doi.org/10.33094/5.2017.2018.21.5.8>