نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۴، شماره ۳، مرداد – شهریور ۱۳۹۹، ص. ۷۵۴-۷۳۷

Journal of Water and Soil
Vol. 34, No. 3, July-August 2020, p. 737-754

مقاله علمی-پژوهشی

تأثیر باکتری‌های محرک رشد بر تولید اسیدهای آلی و غلظت سرب و کادمیوم در گیاه کلم

سمانه عبداللهی[1*]- احمد گلچین[2]- فاطمه شهریاری[3]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۲۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۱۶

چکیده

اسیدهای آلی از جمله ترکیبات طبیعی هستند که از ریشه گیاه ترشح می‌شوند و می‌توانند حلالیت و جذب فلزات سنگین را تحت تأثیر قرار دهند. به منظور بررسی تأثیر باکتری‌های محرک رشد گیاه بر تولید اسیدهای آلی و جذب فلزات سنگین توسط ارقام مختلف کلم یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه زنجان اجرا گردید. فاکتورهای آزمایشی شامل سه رقم کلم (کلم زینتی، کلم بروکلی و کلم برگ) و شش سطح تلقیح با باکتری‌های محرک رشد گیاه شامل *Pseudomonas putida* PTCC1694، *Bacillus megaterium* PTCC1656، *Bacillus subtilis* PTCC1715، *Proteus vulgaris* PTCC1079، *Azotobacter chroococcum* و یک تیمار بدون تلقیح بود. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که نوع رقم، تلقیح با باکتری‌های محرک رشد گیاه و اثرات متقابل آن‌ها تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد ($p<۰/۰۱$) بر غلظت اسیدهای آلی خاک ریزوسفری، عملکرد تر و خشک گیاه، غلظت سرب و کادمیوم ریشه و بخش هوایی گیاه کلم داشتند. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که تولید اسیدهای آلی در منطقه ریزوسفری، حلالیت و غلظت فلزات سنگین در گیاهان را افزایش داد. به‌طوری که بیش‌ترین غلظت اسیدمالیک و سیتریک در خاک ریزوسفری تلقیح شده با باکتری *P. putida* مشاهده شد. بیش‌ترین غلظت سرب و کادمیوم ریشه و بخش هوایی گیاه کلم نیز در همین تیمار به دست آمد. هم‌چنین بیش‌ترین غلظت اسید استیک، بیش‌ترین عملکرد گیاه کلم، بیش‌ترین غلظت کربن آلی محلول و کمترین اسیدیته خاک ریزوسفری مربوط به تیمار تلقیح شده با باکتری *B. megaterium* بود.

واژه‌های کلیدی: اسیدآلی، استیک، ریزوباکس، سیتریک، مالیک

مقدمه

آلودگی خاک و زوال محیط زیست به‌عنوان یک مشکل جدی و چالش برانگیز، مخاطراتی را برای انسان به‌وجود آورده است. افزایش جمعیت، بهره‌برداری بی‌رویه از منابع طبیعی و فرسایش خاک، آلودگی بخش‌های بزرگی از کره زمین را در طول قرن گذشته باعث شده‌اند (۴ و ۲۹). از مهم‌ترین و شناخته‌شده‌ترین آلاینده‌ها که ورودشان به محیط زیست باعث بروز بیماری‌های مختلف در انسان می‌شود، فلزات سنگین هستند که به‌دلیل ماندگاری بسیار بالا در محیط و عدم تجزیه توسط ریزجانداران خاکزی و امکان ورود به چرخه غذایی انسان از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند (۵۷). از میان فلزات سنگین، سرب و کادمیوم به‌دلیل سمی بودن برای انسان و گیاه و نداشتن نقش فیزیولوژیک دارای اهمیت خاصی هستند و می‌توانند از طریق گیاه جذبی وارد چرخه غذایی انسان شوند (۴ و ۲۹). در این راستا، یافتن روش‌هائی به منظور کاهش غلظت این عناصر در خاک‌ها ضروری می‌باشد.

شرایط ریزوسفر و تعامل ریزجانداران ریزوسفری با گیاه به‌طور بالقوه زیست فراهمی فلزات و شبه فلزات را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۸۲). به‌طور کلی، گسترش ریشه، اسیدی شدن منطقه ریزوسفر، تولید کربن آلی محلول[4] (DOC) و تولید ترشحات ریشه از مکانیزم‌های مهم گیاهان در جذب و تحمل به تنش‌های محیطی بسیاری از فلزات سنگین می‌باشد (۳۷). اسیدهای آلی با وزن مولکولی کم از جمله ترکیبات طبیعی هستند که از ریشه گیاه ترشح شده، می‌توانند حلالیت و گیاه فراهمی فلزات سنگین را تحت تأثیر قرار دهند (۵۰). این ترکیبات با تأثیر بر روی فعالیت‌های میکروبی ریزوسفر، شرایط منطقه ریزوسفری را بهبود می‌بخشند (۸۳) و با فلزات سنگین ایجاد کمپلکس نموده و ریشه را در برابر اثرات سمی فلزات محافظت

۱ و ۲- به‌ترتیب دکتری و استاد گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان
(*- نویسنده مسئول: Email: samaneh.abdollahi87@yahoo.com)
۳- استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

DOI: 10.22067/jsw.v34i3.85068

4- Dissolved Organic Carbon (DOC)

می‌کنند (۳۹ و ۶۹). تفاوت تولید اسیدهای آلی بستگی به ویژگی‌های ریزجانداران دارد؛ علاوه بر این، نوع اسید تولیدی به‌طور عمده وابسته به منبع کربن خاک است (۷۱). مین (۵۱) مشاهده کرد که اسیدهای آمینه می‌توانند سمیت یون‌های فلزی را کاهش دهند و بعضی از اسیدهای آلی و یون کادمیوم، کمپلکس‌های غیر قابل دسترس برای گیاهان تولید می‌کنند. لین و همکاران (۴۰) نشان دادند که تجمع کمپلکس‌های کادمیوم با اکسیدهای آهن و منگنز و برخی از اسیدهای آلی در ریزوسفر برنج خیلی بیش‌تر از خاک غیرریزوسفری بود. لین و همکاران (۴۱) نیز تأثیر ترشحات ریشه‌ای را بر جذب فلزات سنگین (سرب و کادمیوم) مورد مطالعه قرار دادند و بیان کردند ترشحات ریشه جذب و توزیع سرب و کادمیوم را در گیاهان تحت تأثیر قرار دادند.

از سوی دیگر باکتری‌های محرک رشد نه تنها در افزایش رشد و عملکرد گیاه، جذب مواد غذایی از محیط و جلوگیری از بیماری‌های گیاهی مؤثر هستند، بلکه به صورت همزیستی با گیاهان در بازسازی و اصلاح خاک‌های آلوده به فلزات سنگین نیز کارایی دارند (۹۳). باکتری‌های محرک رشد با تأثیر بر pH خاک، فراهم کردن آهن از طریق تولید سیدروفور، کاهش پاتوژن‌های گیاهی، افزایش حلالیت فسفر، تولید ایندول استیک اسید و انتقال فلز از خاک به گیاه می‌توانند کارایی گیاه‌پالایی را افزایش دهند (۱). این باکتری‌ها می‌توانند قابلیت‌های زیستی فلزات سنگین در خاک را از طریق مکانیسم‌های مختلفی مانند اسیدی کردن، کلاته کردن، کمپلکس کردن و واکنش‌های احیاء تغییر دهند (۴۵). مثلاً روی پیوند شده با اکسیدهای منگنز در اثر ایجاد شرایط احیاء و حل شدن منگنز آزاد می‌شود (۴۷). هم‌چنین تغییرات pH می‌تواند بر روی گونه‌های شیمیایی فلز در محلول خاک تأثیر بگذارد. تقریباً در تمامی تحقیقات انجام شده از pH به عنوان مهم‌ترین عامل مؤثر بر جذب گیاهی فلزات سنگین یاد شده است، زیرا pH خاک تمام مکانیزم‌های جذب سطحی و جزءبندی فلزات را در محلول خاک کنترل می‌کند. به‌طوری که رابطه معکوسی بین pH و جذب فلزات توسط گیاه وجود دارد (۴). کاهش در میزان pH خاک منجر به افزایش میزان کادمیوم بخش محلول و در نتیجه منجر به افزایش کادمیوم قابل دسترس برای گیاه می‌شود (۱۲ و ۴۸). بسیاری از محققان نیز گزارش کرده‌اند که استفاده از باکتری‌های محرک رشد باعث افزایش جذب کادمیوم توسط گیاه شده است (۳۳, ۶۱, ۶۶, ۷۴ و ۸۴). این امر عمدتاً به افزایش زیست فراهمی کادمیوم در خاک مربوط می‌شود (۳۳ و ۶۶).

بعضی از اسیدهای آلی تولید شده توسط ریزجانداران به راحتی می‌توانند در محدوده مجاور پخش شوند و سپس اشکال نامحلول پتاسیم را از مواد معدنی مانند مسکوویت، میکرولین و ارتوکلاز (۷۵)، فلدسپار و ایلیت (۷۳)، فلدسپار، بیوتیت و فیلوسلیکات‌ها (۷۶) آزاد و به فرم محلول در آورند. به‌طور کلی می‌توان گفت که مکانیسم اصلی باکتری‌های حل کننده پتاسیم، تولید اسیدهای آلی است که منجر به اسیدی شدن محیط اطراف ریشه شده و حلالیت مواد معدنی نامحلول را افزایش می‌دهند (۲). هم‌چنین اسیدی شدن محیط ریشه از طریق تولید اسیدهای آلی می‌تواند باعث افزایش محلول‌سازی فسفات معدنی شود (۸۱). اگر چه مکانیزم انحلال فسفر معدنی توسط اسیدهای آلی به خوبی درک نشده است، با این حال مکانیسم‌های تشکیل کلات و کاهش pH مهم‌ترین فرآیندهای مؤثر در انحلال فسفات معدنی هستند (۷۲). جونز و همکاران (۲۰) توانایی‌های برخی از باکتری‌های محرک رشد را مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که بیش‌ترین مقدار اسیدهای آمینه شامل: آسپارتات، آسپاراژین، گلوتامین، پرولین و بیش‌ترین مقدار اسیدهای آلی شامل: مالونیک و اگزالیک در تیمار تلقیح شده با باکتری *B. megaterium* (باکتری حل کننده پتاسیم) به دست آمد. در مطالعه‌ای مشخص شد که تمام ایزوله‌هایی که توانایی بالا در محلول‌سازی پتاسیم داشتند قادر به تولید اسیدهای آلی سیتریک، فرولیک و کوماریک بودند و بعضی از ایزوله‌ها قادر به تولید اسید مالیک بودند (۷۱).

در بسیاری از مناطق کشور بالاخص استان زنجان به‌دلیل تمرکز فعالیت‌های صنعتی مرتبط با سرب و روی و وجود معادن فراوان و عملیات استخراج، تغلیظ و حمل و نقل مواد معدنی، آلودگی خاک در سطح وسیعی اتفاق افتاده است؛ ولی تحقیقاتی که در آن تأثیر ریزجانداران بر تولید اسیدهای آلی و گیاه فراهمی فلزات سنگین در این منطقه مورد بررسی قرار گرفته باشند؛ کم‌تر صورت گرفته است. به‌همین دلیل تحقیق حاضر با هدف تأثیر تلقیح با باکتری‌های محرک رشد گیاه بر تولید اسیدهای آلی و غلظت عناصر سرب و کادمیوم در سه رقم کلم اجرا شد.

مواد و روش‌ها

به منظور نیل به اهداف مورد نظر این پژوهش، یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه زنجان اجرا گردید. فاکتورهای آزمایشی شامل سه رقم کلم (کلم زینتی (*Brassica oleracea var. acephala* L.)، کلم برگ (*Brassica oleracea var. capitata* L.) و کلم بروکلی (*Brassica oleracea var. italica* L.)) و شش سطح تلقیح با باکتری‌های محرک رشد گیاه شامل *Pseudomonas putida* PTCC1694، *Bacillus megaterium* PTCC1656، *Bacillus subtilis* PTCC1715، *Proteus vulgaris* PTCC1079، *Azotobacter chroococcum* و یک تیمار بدون تلقیح بود. بنابراین تعداد تیمارهای آزمایشی ۱۸ عدد (۳ × ۶) و با لحاظ نمودن سه تکرار در مجموع ۵۴ واحد آزمایشی بود.

جدول ۱- برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در این مطالعه

Table 1- The physical and chemical properties of the soil used in this study

صفت (Property)	مقدار (Quantity)	واحد (Unit)	صفت (Property)	مقدار (Quantity)	واحد (Unit)
شن (Sand)	55	%	فسفر قابل جذب (Available P)	12.5	(mg kg^{-1})
سیلت (Silt)	27	%	پتاسیم قابل جذب (Available K)	240	(mg kg^{-1})
رس (Clay)	18	%	آهن قابل جذب (Available Fe)	7.4	(mg kg^{-1})
کربن آلی (OC)	0.66	%	روی کل (Total Zn)	636	(mg kg^{-1})
کربن آلی محلول (DOC)	0.21	(g C/kg soil)	روی قابل جذب (Available Zn)	37	(mg kg^{-1})
کربنات کلسیم معادل (TNV)	13.66	%	سرب کل (Total Pb)	560	(mg kg^{-1})
رطوبت مزرعه (FC)	19	%	سرب قابل جذب (Available Pb)	54	(mg kg^{-1})
نیتروژن کل (Total N)	0.21	%	کادمیوم کل (Total Cd)	7	(mg kg^{-1})
قابلیت هدایت الکتریکی (EC)	0.926	(dS m^{-1})	کادمیوم قابل جذب (Available Cd)	0.62	(mg kg^{-1})
اسیدیته خاک (pH)	7.69	(1:5)			

خاک مورد استفاده در این آزمایش یک خاک با آلودگی متوسط به سرب و کادمیوم بود که از موقعیت جغرافیایی ۳۶ درجه و ۳۲ دقیقه تا ۳۶ درجه و ۳۵ دقیقه عرض شمالی و ۴۷ درجه و ۳۶ دقیقه تا ۴۷ درجه و ۴۰ دقیقه طول شرقی (اطراف کارخانه سرب و روی ایران واقع در ۹۰ کیلومتری جنوب غربی استان زنجان مجاور شهر دندی) از عمق صفر تا ۲۰ سانتی‌متری تهیه و پس از هوا خشک کردن و عبور از الک دو میلی‌متری برخی از ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن از قبیل غلظت کل سرب و کادمیوم (۲۸) و غلظت قابل جذب سرب و کادمیوم (۴۲) توسط دستگاه جذب اتمی (Varian Spectra. AA20، pH و قابلیت هدایت الکتریکی خاک در عصاره یک به پنج (خاک به آب) (۶۵)، ماده‌آلی خاک (۸۰)، کربن آلی محلول (DOC) (۷۹)، کربنات کلسیم معادل (۲۷) و بافت خاک (۹) اندازه‌گیری گردید (جدول ۱).

به منظور بررسی دقیق‌تر منطقه ریزوسفری از ریزوباکس استفاده (۸۷) و سه عدد نشاء کلم در قسمت مرکزی هر ریزوباکس (منطقه ریزوسفری) کشت گردید. هر ریزوباکس یک جعبه پلاستیکی به طول ۲۰۰، عرض ۱۲۰ و ارتفاع ۲۰۰ میلی‌متر بود که در آن خاک ریزوسفری با استفاده از توری فلزی با منافذ کوچکتر از ۳۷ میکرون از خاک غیرریزوسفری جدا شدند. ایزوله *Azotobacter chroococcum* از موسسه تحقیقات خاک و آب کرج و سایر ایزوله باکتری‌ها از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (بخش کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران[1]) تهیه شد و پس از تکثیر به مقدار مورد نیاز مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۲). از هر نوع باکتری به میزان دو میلی‌لیتر با جمعیت ($۱۰^{۷}$–$۱۰^{۸}$ cfu ml^{-1}[2]) پای هر بوته و در منطقه ریشه اضافه شد. شرایط گلخانه از نظر دمایی ۲۰– ۱۵ درجه سانتی‌گراد و طول روشنایی ۱۲– ۱۰ ساعت در روز بود. در طی دوره رشد، آبیاری گلدان‌ها با آب مقطر در حد رطوبت ظرفیت مزرعه انجام شد. برای این منظور گلدان‌ها در فاصله زمانی هر دو روز یکبار توزین شده و آب از دست رفته تا رسیدن گلدان‌ها به وزن نهایی (رطوبت ظرفیت مزرعه) به گلدان‌ها اضافه گردید. پس از گذشت سه ماه، گیاه کلم برداشت شد. ریشه و بخش هوایی گیاه به‌طور جداگانه داخل پاکت‌های کاغذی قرار داده شدند و در آون به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک گردیدند. غلظت نیتروژن برگ براساس روش کجلدال (VELP scientifica UDK 129 Kjeldahl Distillation Unit) (۱۵)، فسفر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (CE 292 Digital UV-Visible spectrophotometer) (۱۵)

1- PTCC - Persian Type Culture Collection
2- Colony forming unit

جدول ۲- برخی ویژگی‌های باکتری‌های محرک رشد مورد استفاده در این مطالعه

Table 2- Characteristics of growth-promoting bacterial species used in this study

گونه باکتریایی (Bacterial species)	توانایی انحلال فسفات معدنی (Phosphate solubilizing)	توانایی انحلال پتاسیم (Potassium solubilizing)	توانایی تثبیت نیتروژن (Nitrogen fixation)	توانایی احیای سولفات (Sulfate reduction)	تولید ایندول استیک اسید (IAA)	تولید سیانید هیدروژن (HCN)
Proteus vulgaris	-	+	-	+	+	-
Pseudomonas putida	+	-	-	-	-	-
Bacillus subtilis	-	-	-	-	-	+
Bacillus megaterium	-	+	-	-	+	+
Azotobacter chroococcum	-	-	+	-	-	+

+ پاسخ مناسب به صفت مورد مطالعه، - پاسخ نامناسب به صفت مورد مطالعه

+: appropriate response to studied trait, -: lack of appropriate response to studied trait

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس تأثیر نوع رقم و باکتری‌های محرک رشد گیاه بر غلظت برخی اسیدهای آلی خاک ریزوسفری و غلظت عناصر نیتروژن، فسفر و پتاسیم برگ گیاه کلم

Table 3- The Analyses of variance of data showing the effects of plant type and PGPR species on concentrations of organic acids of the rhizosphere soil and concentrations of the N, P and K in the leaf of cabbage plant

منابع تغییرات (Variables)	درجه آزادی (df)	اسید مالیک (Malic acid)	اسید استیک (Acetic acid)	اسید سیتریک (Citric acid)	غلظت نیتروژن (N concentration)	غلظت فسفر (P concentration)	غلظت پتاسیم (K concentration)
رقم کلم (Cabbage varieties)	2	14.46**	8144.00**	13747.87**	0.28**	0.01**	5.54**
گونه باکتری (Bacterial species)	5	19.75**	24175.75**	2720.81**	1.95**	0.01**	2.26**
رقم کلم×گونه باکتری (Cabbage varieties × Bacteria species)	10	7.86**	875.99**	752.23**	0.08**	0.0005**	0.13**
خطا (Error)	36	0.0184	24.8753	4.7996	0.004	0.00007	0.004
ضریب تغییرات (Coefficient of Variation (%)	-	7.18	4.48	8.89	3.06	3.87	4.93

** و * به ترتیب در سطح ۱٪ و ۵٪ معنی‌دار و ns اختلاف معنی‌دار نیست.

** significant at 0.01 level, * significant at 0.05 level, ns, not significant.

و پتاسیم با استفاده از دستگاه فلیم‌فتومتر (flame photometer, Jenway PFP7) (۱۵) در عصاره حاصل از هضم تر و غلظت سرب و کادمیوم در اندام‌های هوایی و ریشه به روش آلن و همکاران (۳) با استفاده از دستگاه جذب اتمی (Varian Spectra. AA20) اندازه‌گیری شد.

برای اندازه‌گیری اسیدهای آلی، پنج گرم خاک ریزوسفری هوا خشک شده و عبور داده شده از الک دو میلی‌متری توزین و داخل لوله سانتریفوژهای ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد. ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه شیک گردید. سپس شش گرم کلرور پتاسیم به لوله حاوی عصاره و نمونه خاک اضافه و نمونه‌ها مجدداً ۳۰ دقیقه شیک شدند و سپس ۱۰ دقیقه با ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ (مدل Heraeus) شدند. محلول رویی از فیلتر ۰/۴۲ میکرومتر عبور داده شد. عصاره حاصل تا زمان قرائت اسیدهای آلی در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۳۸). استاندارد هر یک از اسیدهای آلی با غلظت‌های صفر، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر تهیه و پس از کالیبره کردن دستگاه و قرائت استانداردها، عصاره‌های خاک با مقدار ۱۰ میکرولیتر در هر بار تزریق با استفاده از دستگاه HPLC-DAD[1] (PDA detector, Agilent 1200) قرائت و بر حسب میلی‌گرم بر دسی‌لیتر عصاره خاک محاسبه گردید. تجزیه

1- High performance liquid chromatography- Diode Array Detector

آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار SAS 9.4 (۶۸)، مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک و پنج درصد و ترسیم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج و بحث

تأثیر رقم و باکتری بر غلظت برخی اسیدهای آلی خاک ریزوسفری

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان می‌دهد که نوع رقم، تلقیح با باکتری و اثرات متقابل آن‌ها تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد ($p<۰/۰۱$) بر غلظت اسیدهای مالیک، استیک و سیتریک داشت (جدول ۳).

مقایسه میانگین‌های اثرات متقابل رقم و باکتری بر غلظت اسیدهای آلی نشان می‌دهد که کم‌ترین غلظت اسیدهای آلی مالیک، استیک و سیتریک در هر سه رقم کلم زینتی، کلم بروکلی و کلم برگ در خاک ریزوسفری تلقیح نشده (تیمار شاهد) اندازه‌گیری شد و با تلقیح خاک با باکتری غلظت اسیدهای آلی افزایش یافت. به‌طوری که بیش‌ترین غلظت اسید مالیک و اسید سیتریک به ترتیب با میانگین‌های ۹/۵۹ و ۱۱۸/۳۴ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر عصاره (۱:۵) در خاک ریزوسفری کلم بروکلی، تلقیح شده با باکتری *P. putida* اندازه‌گیری شد (جدول ۴). نتایج حاصل نشان می‌دهد در هر سه رقم کلم خاک‌های ریزوسفری تلقیح شده با باکتری‌های *B. megaterium* و *B. subtilis* در مکان‌های دوم و سوم قرار گرفتند. به‌طوری که تلقیح خاک با باکتری‌های *P. putida*، *B. megaterium* و *B. subtilis* غلظت اسید مالیک را در خاک ریزوسفری رقم کلم زینتی به ترتیب ۳/۴، ۲/۵ و ۲ برابر، در رقم کلم بروکلی به ترتیب ۱۰/۵، ۲/۸ و ۲/۳ برابر و در رقم کلم برگ به ترتیب ۳/۴، ۲/۳ و ۱/۸ برابر نسبت به خاک ریزوسفری تلقیح نشده (تیمار شاهد) افزایش داد (جدول ۴).

جدول ٤- مقایسه میانگین‌های اثرات متقابل نوع رقم و باکتری‌های محرک رشد بر غلظت برخی اسیدهای آلی خاک ریزوسفری و غلظت عناصر نیتروژن، فسفر و پتاسیم برگ گیاه کلم

Table 4- The interactive effects of cabbage varieties and PGPR species on concentrations of organic acids of the rhizosphere soil and concentrations of the N, P and K in the leaf of cabbage varieties

رقم کلم Cabbage varieties	گونه باکتری PGPR species	اسید مالیک Malic acid	اسید استیک Acetic acid	اسید سیتریک Citric acid	غلظت نیتروژن N concentration	غلظت فسفر P concentration	غلظت پتاسیم K concentration
		میلی‌گرم بر دسی لیتر عصاره (۱:۵) (mg/dl 1:5)				درصد (%)	
کلم زینتی Ornamental cabbage	Control	0.61 (k)	21.03 (l)	2.29 (ij)	1.13 (i)	0.16 (i)	0.40 (i)
	Proteus vulgaris	1.04 (hij)	71.69 (i)	7.52 (ghi)	1.32 (h)	0.20 (h)	1.27 (f)
	Pseudomonas putida	2.09 (cd)	112.75 (ef)	30.36 (e)	2.03 (ef)	0.25 (cd)	0.62 (h)
	Bacillus subtilis	1.21 (fghi)	120.44 (de)	8.36 (gh)	2.03 (ef)	0.21 (gh)	0.61 (h)
	Bacillus megaterium	1.50 (ef)	149.44 (c)	12.18 (g)	2.10 (def)	0.20 (h)	1.57 (e)
	Azotobacter chroococcum	1.02 (hij)	72.58 (i)	3.81 (hij)	2.35 (c)	0.21 (gh)	0.71 (h)
کلم بروکلی Broccoli	Control	0.91 (ijk)	43.49 (k)	18.22 (f)	1.40 (h)	0.16 (i)	0.73 (h)
	Proteus vulgaris	1.19 (fghi)	98.32 (gh)	45.91 (d)	1.86 (g)	0.24 (de)	1.31 (f)
	Pseudomonas putida	9.59 (a)	141.30 (c)	118.34 (a)	1.89 (g)	0.30 (b)	0.94 (g)
	Bacillus subtilis	2.12 (c)	179.96 (b)	57.45 (c)	2.07 (def)	0.20 (h)	0.95 (g)
	Bacillus megaterium	2.54 (b)	233.88 (a)	69.28 (b)	2.06 (def)	0.22 (efg)	1.83 (d)
	Azotobacter chroococcum	1.12 (ghi)	104.96 (fg)	29.53 (e)	2.68 (b)	0.21 (gh)	0.93 (g)
کلم برگ Cabbage	Control	0.78 (jk)	56.25 (j)	1.22 (j)	1.17 (i)	0.21 (gh)	1.22 (f)
	Proteus vulgaris	1.07 (hij)	92.39 (h)	2.85 (ij)	1.95 (fg)	0.24 (de)	2.54 (b)
	Pseudomonas putida	2.69 (b)	94.15 (gh)	19.33 (f)	2.09 (def)	0.32 (a)	1.25 (f)
	Bacillus subtilis	1.43 (fg)	128.22 (d)	5.69 (hij)	2.16 (de)	0.23 (def)	1.56 (e)
	Bacillus megaterium	1.79 (de)	189 50 (b)	8.49 (gh)	2.18 (d)	0.26 (c)	2.87 (a)
	Azotobacter chroococcum	1.28 (fgh)	92.46 (h)	2.51 (ij)	2.88 (a)	0.23 (def)	2.11 (c)

میانگین‌ها در هر ستون که حداقل یک حرف مشترک دارند، از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری ($p<0.05$) با هم ندارند.

Different letters indicate significant differences at the 5% probability level.

مقایسه میانگین‌های اثرات متقابل رقم و باکتری بر غلظت اسید استیک نشان می‌دهد که بیش‌ترین غلظت اسید استیک با میانگین ۲۳۳/۸۸ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر عصاره (۱:۵) متعلق به خاک ریزوسفری کلم بروکلی تلقیح شده با باکتری *B. megaterium* بود (جدول ۴). در هر سه رقم کلم زینتی، کلم بروکلی و کلم برگ، خاک‌های تلقیح شده با باکتری‌های *B. subtilis* و *P. putida* در مکان‌های دوم و سوم قرار گرفتند. به‌طوری که تلقیح خاک با باکتری‌های *B. megaterium*، *B. subtilis* و *P. putida*، غلظت اسید استیک را در خاک ریزوسفری رقم کلم زینتی به ترتیب ۷/۱، ۵/۷ و ۵/۴ برابر، در رقم کلم بروکلی به ترتیب ۵/۴، ۴/۱ و ۳/۲ برابر و در رقم کلم برگ به ترتیب ۳/۴، ۲/۳ و ۱/۷ برابر نسبت به خاک ریزوسفری تلقیح نشده افزایش داد (جدول ۴).

توانایی باکتری‌ها برای کاهش pH به عنوان نشانه‌ای از اسیدی‌سازی محیط بر اثر تولید اسیدهای آلی است (۷۱). به خوبی شناخته شده است که اسیدی شدن محیط ریشه از طریق تولید اسیدهای آلی با وزن مولکولی کم توسط ریزجانداران نقش مهمی در انحلال مخازن فسفات معدنی و افزایش فسفر محلول در خاک دارند (۳۵, ۵۸, ۷۰ و ۸۱). جونز و همکاران (۲۰) در بررسی توانایی برخی باکتری‌های محرک رشد گیاه گزارش کردند که بیش‌ترین مقدار اسیدهای آلی مالونیک و اگزالیک در تیمار تلقیح شده با باکتری *B. megaterium* به دست آمد. می‌توان دلیل این امر را توانایی این باکتری در انحلال پتاسیم و تولید ایندول استیک اسید دانست. در مطالعه دیگری گزارش شد که تمام ایزوله‌هایی که توانایی بالا در محلول‌سازی پتاسیم داشتند قادر به تولید ۱۳۰/۴۲ تا ۴۳۴/۴۴ میلی‌گرم بر لیتر اسیدهای آلی سیتریک، فرولیک، کوماریک و مالیک بودند (۷۱). به‌طور کلی می‌توان گفت که مکانیسم اصلی باکتری‌های حل کننده پتاسیم، تولید اسیدهای آلی است که منجر به اسیدی شدن محیط اطراف ریشه شده و حلالیت مواد معدنی نامحلول را افزایش می‌دهند (۲). محققان دیگری نیز تولید اسیدهای آلی مختلف را توسط باکتری‌های حل کننده پتاسیم گزارش کرده‌اند؛ تولید اسیدهای آلی اگزالیک، سیتریک و گلوکونیک (۷۶)، اگزالیک و تارتاریک (۷۳)، اگزالیک، سیتریک، مالیک و تارتاریک (۴۷ و ۶۰) و سیتریک، مالیک، فرولیک و کوماریک (۷۱) گزارش شده است.

تأثیر رقم و باکتری بر غلظت نیتروژن، فسفر و پتاسیم برگ کلم

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان می‌دهد که تلقیح خاک با باکتری تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد ($p<۰/۰۱$) بر غلظت عناصر پر مصرف (نیتروژن، فسفر، پتاسیم) در برگ گیاه کلم داشت (جدول ۳). مقایسه میانگین‌های غلظت عناصر پر مصرف در برگ گیاه کلم نشان می‌دهد که کم‌ترین غلظت عناصر نیتروژن، پتاسیم و فسفر در هر سه رقم کلم مربوط به تیمار شاهد (بدون تلقیح با باکتری) بود و تلقیح با باکتری، غلظت این عناصر در برگ را به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۱$) افزایش داد. به‌طوری که بیش‌ترین غلظت‌های نیتروژن، فسفر و پتاسیم با میانگین‌های ۲/۸۸، ۰/۳۲ و ۲/۸۷ درصد مربوط به رقم کلم برگ و به ترتیب تیمارهای تلقیح شده با باکتری‌های *A. chroococcum*، *P. putida* و *B. megaterium* بود (جدول ۴). با توجه به توانایی باکتری‌های مورد استفاده در آزمایش (جدول ۲) به خوبی می‌توان دریافت که باکتری *A. chroococcum* با تثبیت نیتروژن سبب افزایش نیتروژن قابل جذب برای گیاه شده و گیاه نیتروژن بیشتری جذب و به اندام‌های هوایی انتقال داده است. هم‌چنین باکتری *P. putida* به دلیل توانایی انحلال فسفر نامحلول سبب افزایش غلظت فسفر قابل جذب در خاک شده و گیاه توانایی جذب فسفر بیشتری نسبت به سایر تیمارها داشته است. باکتری *B. megaterium* نیز با داشتن توانایی انحلال پتاسیم نامحلول توانسته است پتاسیم قابل جذب بیشتری برای گیاه فراهم کند. انحلال فسفات‌های نامحلول و مواد معدنی حاوی پتاسیم و تثبیت بیولوژیکی نیتروژن باعث افزایش دسترسی نیتروژن، پتاسیم و فسفر و در نتیجه بهبود تغذیه گیاه و افزایش رشد گیاه می‌شود (۸۴ و ۹۳).

به‌طور کلی غلظت بالای فلزات سنگین در خاک با جذب عناصر غذایی گیاه مانند فسفر، باعث کمبود فسفر قابل جذب در خاک می شود که این امر کاهش رشد گیاه را در پی دارد (۲۳). کمبود فسفر را می‌توان با برخی گونه‌های باکتری‌های محرک رشد گیاه که توانایی حل کنندگی فسفات را دارا هستند جبران کرد (۲۲ و ۹۱). جونز و همکاران (۲۰) بیان کردند تلقیح گیاه با باکتری‌های محرک رشد غلظت عناصر غذایی در گیاه را افزایش می‌دهد. آن‌ها بیش‌ترین غلظت عناصر غذایی پر مصرف شامل: نیتروژن، پتاسیم، فسفر، کلسیم و منیزیم را در تیمار تلقیح شده با باکتری *B. megaterium* گزارش کردند. محققان دیگری نیز افزایش جذب عناصر غذایی نیتروژن، پتاسیم، فسفر، کلسیم و منیزیم توسط گیاه را در اثر تلقیح با گونه‌های باسیلوس گزارش کرده‌اند (۸, ۱۱, ۱۰, ۱۷, ۲۴, ۵۶ و ۷۸).

تأثیر رقم و باکتری بر غلظت سرب و کادمیوم ریشه و بخش هوایی گیاه کلم

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان می‌دهد که رقم، تلقیح با باکتری و اثر متقابل آن‌ها تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد ($p<۰/۰۱$) بر غلظت سرب و کادمیوم ریشه و بخش هوایی گیاه کلم داشت (جدول ۵).

جدول ۵- نتایج تجزیه واریانس تأثیر نوع رقم و باکتری‌های محرک رشد گیاه بر غلظت‌های سرب و کادمیوم ریشه و بخش هوایی و عملکرد تر و خشک گیاه کلم

Table 5- The analyses of variance of data showing the effects of plant type and PGPR species on concentrations of the Pb and Cd in the root and shoot and fresh-dry biomass weight of cabbage plant

منابع تغییرات (Variables)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (Mean square)					
		غلظت سرب (Pb concentration)		غلظت کادمیوم (Cd concentration)		عملکرد تر (Fresh biomass)	عملکرد خشک (Dry biomass)
		ریشه (Root)	بخش هوایی (Shoot)	ریشه (Root)	بخش هوایی (Shoot)		
رقم کلم (Cabbage varieties)	2	14940.92**	495.88**	19.25**	1.44**	175236.4056**	6261.66285**
گونه باکتری (Bacterial species)	5	2180.99**	386.86**	39.78**	2.62**	44658.4806**	1517.48343**
رقم کلم×گونه باکتری (Cabbage varieties × Bacteria species)	10	285.84**	94.33**	5.65**	0.30**	5544.0095**	200.26983**
خطا (Error)	36	15.00	4.33	0.17	0.02	33.2278	4.03538
ضریب تغییرات (Coefficient of Variation (%)	-	4.52	3.69	4.58	2.18	2.974132	5.956490

** و * به ترتیب در سطح ۱٪ و ۵٪ معنی‌دار و ns اختلاف معنی‌دار نیست.

** significant at 0.01 level, * significant at 0.05 level, ns, not significant.

مقایسه میانگین‌های اثرات متقابل رقم و تلقیح با باکتری بر غلظت سرب ریشه و بخش هوایی گیاه کلم نشان می‌دهد که بیش‌ترین غلظت سرب ریشه و بخش هوایی به ترتیب با میانگین‌های ۱۲۰/۲۰ و ۹۰/۷۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم مربوط به رقم کلم زینتی و تیمار تلقیح شده با باکتری *P. putida* بود. همان‌طور که در جدول ۶ مشاهده می‌شود بیش‌ترین غلظت سرب ریشه و بخش هوایی در رقم‌های کلم بروکلی و کلم برگ نیز در تیمارهای تلقیح شده با باکتری *P. putida* اندازه‌گیری شد. به‌طوری که تلقیح با این باکتری سبب شد غلظت سرب ریشه در رقم‌های کلم زینتی، کلم بروکلی و کلم برگ به ترتیب ۱/۳، ۱/۲ و ۱/۳ برابر و غلظت سرب بخش هوایی در رقم‌های کلم زینتی، کلم بروکلی و کلم برگ به ترتیب ۱/۷، ۱/۳ و ۱/۵ برابر نسبت به تیمار شاهدشان (بدون تلقیح با باکتری) افزایش یابد (جدول۶).

مقایسه میانگین‌های اثرات متقابل رقم و تلقیح با باکتری بر غلظت کادمیوم ریشه و بخش هوایی گیاه کلم نشان می‌دهد که بیش‌ترین غلظت کادمیوم ریشه مربوط به رقم کلم زینتی و تیمارهای تلقیح شده با باکتری‌های *P. putida* و *B. subtilis* (با میانگین‌های ۹/۰۱ و ۸/۸۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و رقم کلم بروکلی و تیمار تلقیح شده با باکتری *P. putida* بودند که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند. هم‌چنین بیش‌ترین غلظت کادمیوم بخش هوایی با میانگین ۸/۱۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم مربوط به رقم کلم بروکلی و تیمار تلقیح شده با باکتری *P. putida* بود (جدول ۶). همان‌طور که در جدول ۶ مشاهده می‌شود بیش‌ترین غلظت کادمیوم ریشه و بخش هوایی کلم برگ نیز مربوط به تیمار تلقیح شده با باکتری *P. putida* بود. به‌طوری که تلقیح خاک ریزوسفری با این باکتری سبب شد غلظت کادمیوم ریشه رقم‌های کلم زینتی، کلم بروکلی و کلم برگ به ترتیب ۱/۳، ۱/۲ و ۱/۱ برابر و غلظت کادمیوم بخش هوایی به ترتیب ۱/۵، ۱/۴ و ۱/۲ برابر نسبت به تیمار شاهدشان (بدون تلقیح با باکتری) افزایش یابد (جدول ۶).

براساس نتایج حاصل از این پژوهش مشاهده می‌شود که تلقیح با باکتری‌ها، سبب شد غلظت سرب و کادمیوم ریشه و بخش هوایی گیاه نسبت به تیمار شاهد (بدون تلقیح با باکتری) افزایش یابد. دلیل این امر را می‌توان به تولید اسیدهای آلی توسط باکتری‌ها و حلالیت بیشتر فلزات سنگین در منطقه ریزوسفر مرتبط دانست که به موازات آن گیاه مقدار بیشتری از فلزات سنگین را جذب و در گیاه انباشته کرده است. همان‌طور که در جدول ۴ نیز مشاهده می‌شود در هر سه رقم مورد بررسی تیمارهای تلقیح شده با باکتری *P. putida* بیش‌ترین غلظت اسیدهای آلی مالیک و سیتریک را داشتند. نکته قابل توجه دیگر این است که بیش‌ترین غلظت سرب ریشه و بخش هوایی و کادمیوم ریشه در رقم کلم زینتی مشاهده گردید (جدول ۶) اما بیش‌ترین غلظت اسیدهای مالیک، استیک و سیتریک در رقم کلم بروکلی اندازه‌گیری شد (جدول ۴).

جدول ٦- مقایسه میانگین‌های اثرات متقابل نوع رقم و باکتری‌های محرک رشد گیاه بر غلظت‌های سرب و کادمیوم ریشه و بخش هوایی و عملکرد تر و خشک گیاه کلم

Table 6- The interactive effects of cabbage varieties and PGPR species on concentrations of the Pb and Cd in the root and shoot and fresh-dry biomass weight of cabbage plant

رقم کلم (Cabbage varieties)	گونه باکتری (PGPR species)	غلظت سرب (Pb concentration)		غلظت کادمیوم (Cd concentration)		عملکرد تر (Fresh biomass)	عملکرد خشک (Dry biomass)
		ریشه (Root)	بخش هوایی (Shoot)	ریشه (Root)	بخش هوایی (Shoot)		
		میلی‌گرم بر کیلوگرم ($mg\ kg^{-1}$)				گرم در گلدان (g in the plot)	
کلم زینتی (Ornamental cabbage)	Control	91.00 (d)	52.75 (e)	7.21 (b)	4.79 (k)	41.88 (l)	6.25 (i)
	Proteus vulgaris	98.55 (bc)	60.95 (bc)	7.56 (b)	6.15 (ij)	59.64 (k)	8.79 (hi)
	Pseudomonas putida	120.20 (a)	90.77 (a)	9.01 (a)	7.37 (bc)	78.03 (j)	11.49 (gh)
	Bacillus subtilis	95.45 (bcd)	59.77 (cd)	8.85 (a)	6.45 (fghi)	95.80 (i)	14.57 (fg)
	Bacillus megaterium	100.22 (b)	66.00 (b)	7.69 (b)	6.50 (fgh)	109.59 (h)	17.59 (ef)
	Azotobacter chroococcum	95.00 (cd)	60.10 (cd)	7.39 (b)	6.27 (hij)	95.16 (i)	14.65 (fg)
کلم بروکلی (Broccoli)	Control	61.28 (h)	45.88 (f)	7.27 (b)	5.98 (j)	115.19 (h)	20.39 (e)
	Proteus vulgaris	67.27 (fg)	53.47 (e)	7.45 (b)	6.69 (efg)	228.64 (f)	36.08 (d)
	Pseudomonas putida	77.63 (e)	62.05 (bc)	8.76 (a)	8.18 (a)	251.57 (de)	41.06 (c)
	Bacillus subtilis	66.02 (fgh)	54.83 (de)	7.77 (b)	6.86 (cd)	253.13 (de)	47.44 (b)
	Bacillus megaterium	67.95 (f)	56.52 (cde)	7.92 (b)	7.05 (cd)	397.11 (b)	72.50 (a)
	Azotobacter chroococcum	67.50 (fg)	54.22 (de)	7.68 (b)	6.70 (efg)	230.10 (f)	43.01 (bc)
کلم برگ (Cabbage)	Control	55.45 (i)	41.10 (f)	7.12 (b)	6.40 (ghi)	111.64 (h)	20.21 (e)
	Proteus vulgaris	65.62 (fgh)	54.37 (de)	7.24 (b)	6.70 (efg)	213.31 (g)	40.98 (c)
	Pseudomonas putida	73.95 (e)	61.27 (bc)	7.82 (b)	7.51 (b)	249.03 (e)	45.63 (bc)
	Bacillus subtilis	66.90 (fg)	54.27 (de)	7.29 (b)	7.09 (cd)	277.83 (c)	46.42 (b)
	Bacillus megaterium	62.38 (gh)	52.97 (e)	7.34 (b)	6.85 (de)	416.77 (a)	76.96 (a)
	Azotobacter chroococcum	62.38 (gh)	53.52 (e)	7.20 (b)	6.79 (def)	264.27 (d)	43.03 (bc)

میانگین‌ها در هر ستون که حداقل یک حرف مشترک دارند، از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری ($p<0.05$) با هم ندارند.

Different letters indicate significant differences at the 5% probability level.

شاید بتوان این تفاوت را به توانایی خود رقم کلم زینتی در جذب و انتقال فلزات سنگین به اندام‌های هوایی مرتبط دانست. نیو و همکاران (۵۴) بیان کردند که ذخیره‌سازی بیولوژیکی فلزات سنگین در گیاه علاوه بر ویژگی‌های ماده و عوامل محیطی، به ویژگی‌های خود گیاه نیز بستگی دارد. محققین دیگری نیز نتایج مشابهی را گزارش کرده‌اند (۱۳ و ۴۹). راج‌کومار و فریتس (۶۲) گزارش کردند تلقیح گیاه *Ricinus communis* با ایزوله‌های *Pseudomounas* (PsM6) و *Pseudomounas* (PjM15) سبب افزایش غلظت فلزات سنگین (بجز روی) در ریشه، ساقه و بخش هوایی گیاه گردید. نتایج آن‌ها نشان داد که ایزوله PsM6 کارآیی بیش‌تری در محلول کردن فلز روی و ایزوله PjM15 در محلول کردن مس و نیکل داشت. کریمی و همکاران (۳۲) گزارش کردند که تلقیح گیاه خارپنبه با باکتری‌های محرک رشد غلظت سرب ریشه و بخش هوایی گیاه را نسبت به تیمارهای بدون تلقیح افزایش داد.

ریزجاندران با اسیدی کردن منطقه ریشه و افزایش حلالیت و دسترسی فلزات سنگین، سبب افزایش جذب آن‌ها توسط گیاه می‌شوند. برخی ویژگی‌های باکتری‌های مورد استفاده در این پژوهش مانند: توانایی انحلال فسفات معدنی، انحلال پتاسیم، تولید سیانید هیدروژن، تولید ایندول استیک و نیز تولید اسیدهای آلی می‌توانند دلیلی برای کاهش pH و افزایش حلالیت فلزات سنگین سرب و کادمیوم در منطقه ریشه باشند. بسیاری از محققان نیز گزارش کرده‌اند که استفاده از باکتری‌های محرک رشد باعث افزایش جذب کادمیوم توسط گیاه شده است (۳۳, ۶۱, ۶۶, ۷۴ و ۸۴). این امر عمدتاً به افزایش زیست فراهمی کادمیوم در خاک مربوط می‌شود (۳۳ و ۶۶).

تأثیر رقم و باکتری بر عملکرد تر و خشک گیاه کلم

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان می‌دهد که رقم، تلقیح با باکتری و اثر متقابل آن‌ها تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال یک

درصد ($p<۰/۰۱$) بر عملکرد تر و خشک گیاه کلم داشت (جدول ۵). با مقایسه میانگین‌های اثرات متقابل رقم و باکتری بر عملکرد تر و خشک گیاه کلم مشاهده گردید که بیش‌ترین مقدار عملکرد تر و خشک به ترتیب با میانگین‌های ۴۱۶/۷۷ و ۷۶/۹۶ گرم در گلدان مربوط به رقم کلم برگ و تیمار تلقیح شده با باکتری *B. megaterium* و کم‌ترین میزان عملکرد تر و خشک به ترتیب با میانگین‌های ۴۱/۸۸ و ۶/۲۵ گرم در گلدان مربوط به رقم کلم زینتی و تیمار شاهد (بدون تلقیح با باکتری) بود (جدول ۶).

همان‌طور که در جدول ۶ مشاهده می‌شود در هر سه رقم کلم (زینتی، بروکلی و برگ) بیش‌ترین مقدار عملکرد تر و خشک در تیمار تلقیح شده با باکتری *B. megaterium* به دست آمد. به‌طوری که عملکرد تر کلم زینتی، کلم بروکلی و کلم برگ در این تیمار به ترتیب ۲/۶، ۳/۵ و ۳/۷ برابر و عملکرد خشک به ترتیب ۲/۸، ۳/۸ و ۳/۵ برابر نسبت به تیمار شاهد (بدون تلقیح با باکتری) افزایش داشت. در مرحله بعد تیمارهای تلقیح شده با باکتری *B. subtilis* دارای بیش‌ترین عملکرد تر و خشک بودند. به‌طوری که تلقیح خاک ریزوسفری با این باکتری سبب شد عملکرد تر و خشک در رقم کلم زینتی به ترتیب ۲/۳ و ۲/۳ برابر، در کلم بروکلی به ترتیب ۲/۲ و ۲/۳ برابر و در کلم برگ به ترتیب ۲/۵ و ۲/۳ برابر نسبت به تیمار شاهد (بدون تلقیح با باکتری) افزایش یابد (جدول ۶).

به خوبی شناخته شده است که شمار قابل توجهی از گونه‌های باکتریایی که با ریزوسفر گیاه ارتباط دارند، می‌توانند تأثیر مثبتی بر رشد گیاهان داشته باشند. استفاده از این باکتری‌ها به عنوان کودهای زیستی در کشاورزی، چندین سال است که مورد توجه قرار گرفته است. به نظر می‌رسد که تأثیر مثبت این باکتری‌ها بر رشد گیاه به دلیل تولید تنظیم کننده‌های رشد گیاه (۱۱, ۲۱, ۳۱, ۵۶, ۷۷ و ۷۸)، امکان دسترسی بیش‌تر به مواد غذایی در خاک (۵۵)، کنترل بیماری‌ها (۱۶, ۱۸, ۳۰ و ۳۶) و تثبیت نیتروژن (۱۴ و ۹۲) توسط این باکتری‌ها باشد. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که تلقیح گیاهان توسط باکتری‌های محرک رشد گیاه می‌تواند از طریق تقویت رشد و محافظت از گیاهان در برابر فلزات سنگین، باعث افزایش کارآیی و راندمان گیاهان شود. نسبت سطح به حجم باکتری‌ها بسیار زیاد است (۶) و این ریزجانداران از ظرفیت بالایی برای جذب فلزات از محلول‌های خاک برخوردار هستند (۵۳). هم‌چنین باکتری‌های محرک رشد گیاه توانایی جذب بیولوژیکی و تجمع بیولوژیکی فلزات سنگین را دارا هستند که می‌تواند در کاهش اثرات سمی فلزات برای گیاه نقش داشته باشد (۹۰).

مطالعات متعددی نشان داده اند که استفاده از باکتری های محرک رشد، باعث افزایش رشد، توسعه ریشه و جذب فلزات سنگین در کلزا (*Brassica napus*) (۷۴)، خردل (*Brassica juncea*) (۴۳) و کلزا و خردل (۴۴) گردید. مارولاندا-آگوری و همکاران (۴۶) گزارش کردند که تلقیح با باکتری *B. megaterium* باعث افزایش سطح برگ و ماده خشک کاهو شد. در مطالعه‌ای تلقیح گیاه لوبیا با باکتری *Proteus vulgaris* سبب شد وزن تر و خشک گیاه به ترتیب ۵۵/۸ و ۶۰ درصد نسبت به گیاه شاهد افزایش یابد (۵۱)(64). زی و همکاران (۸۵) گزارش کردند که باکتری *B. subtilis* (GB03) وزن تر و خشک گیاه شاهی گوش موشی (*Brassicaceae*) را به ترتیب ۵۸ و ۷۱ درصد نسبت به تیمار شاهد افزایش داد. سانترو و همکاران (۶۷) گزارش کردند که تلقیح گیاه نعناع فلفلی با باکتری *B. subtilis* وزن خشک ریشه و بخش هوایی گیاه را به ترتیب ۳/۵ و ۲ برابر نسبت به تیمار بدون تلقیح افزایش داد. بهارلویی و همکاران (۵) گزارش کردند که تلقیح گیاه جو و کلزا با گونه‌های *P. putida* و *P. fluorescens* سبب افزایش ماده خشک بخش هوایی گیاه گردید. یو و لی (۸۸) اظهار داشتند که تولید ایندول استیک اسید توسط ایزوله *Proteus vulgaris* (JBLS202) به‌طور موثری باعث رشد گیاهچه کلم چینی شد. به‌طوری که وزن تر گیاه را ۳۲/۶ درصد نسبت به تیمار شاهد افزایش داد. هم‌چنین باتاچاریا و همکاران (۷) گزارش کردند که تلقیح گیاه شاهی گوش موشی با ایزوله (JBLS202) *Proteus vulgaris* وزن تر گیاه را ۷۵ تا ۸۰ درصد نسبت به تیمار شاهد افزایش داد. آن‌ها دلیل این امر را تولید ایندول استیک اسید توسط این ایزوله گزارش کردند. پاتیل (۵۹) در بررسی تأثیر باکتری *B. subtilis* بر رشد گیاه ذرت گزارش کرد که تلقیح گیاه با این باکتری عملکرد تر و خشک گیاه را نسبت به گیاه شاهد (بدون تلقیح) افزایش داد. هاریناتان و همکاران (۲۵) تأثیر دو گونه باکتری *Bacillus* (C2) و *Pseudomonas* (C7) را بر رشد و عملکرد گیاه ارزن مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که تلقیح گیاه با باکتری *Bacillus* (C2) بیش‌ترین تأثیر را بر افزایش ویژگی‌های فیزیولوژیکی گیاه داشت. محمدزاده و همکاران (۵۲) گزارش کردند که تلقیح گیاه آفتابگردان با باکتری‌های محرک رشد باعث افزایش جذب آهن و روی در گیاه و افزایش زیست توده گیاه گردید. کشاورز زرجانی و همکاران (۳۴) بیان کردند که کاربرد باکتری *B. megaterium* بیش‌ترین وزن خشک اندام هوایی و وزن خشک ریشه را در گیاه گوجه فرنگی تولید کرد که نسبت به تیمار شاهد تا ۵۲/۲۳ درصد افزایش نشان داد.

تأثیر رقم و باکتری بر غلظت سرب، کادمیوم و فسفر قابل جذب، اسیدیته و کربن آلی محلول خاک ریزوسفری بعد از برداشت گیاه کلم

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان می‌دهد که تلقیح با باکتری تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد ($p<۰/۰۱$) بر غلظت سرب قابل جذب، فسفر قابل جذب و کربن آلی محلول خاک ریزوسفری داشته است. اما اثرات متقابل رقم و تلقیح با باکتری‌ها تأثیر معنی‌داری بر غلظت کادمیوم قابل جذب و اسیدیته خاک ریزوسفری نداشت (جدول ۷).

جدول ۷- نتایج تجزیه واریانس تأثیر نوع رقم و باکتری‌های محرک رشد گیاه بر غلظت سرب، کادمیوم و فسفر قابل جذب، اسیدیته و کربن آلی محلول خاک ریزوسفری بعد از برداشت گیاه کلم

Table 7- The Analyses of variance of data showing the effects of plant type and PGPR species on available concentration of Pb, Cd and phosphorus, pH and DOC of the rhizosphere soil after harvest of cabbage plant

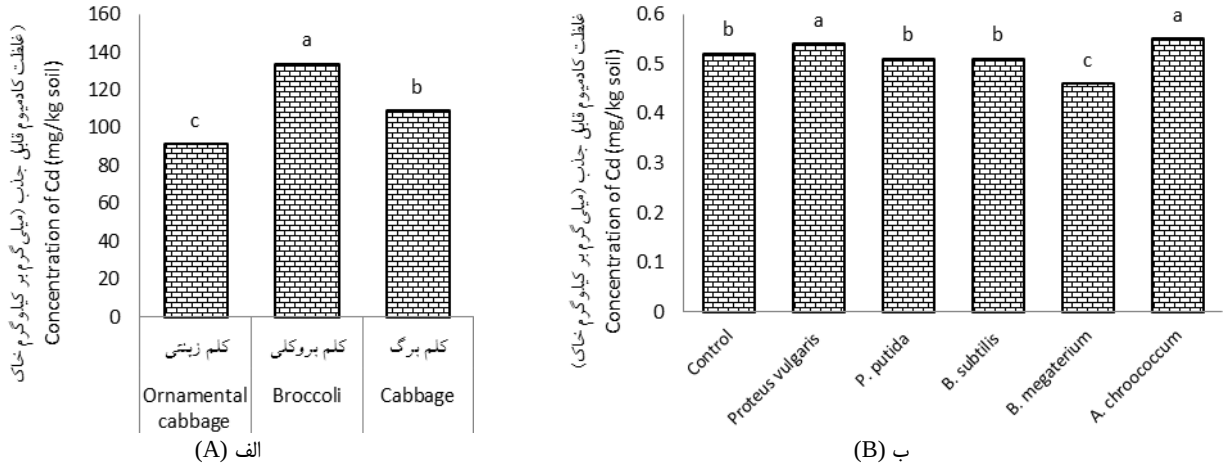
منابع تغییرات (Variables)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (Mean square)				
		سرب قابل جذب (Available Pb)	کادمیوم قابل جذب (Available Cd)	فسفر قابل جذب (Available P)	اسیدیته خاک (pH)	کربن آلی محلول (DOC)
رقم کلم (Cabbage varieties)	2	81.69**	0.006*	18.05**	0.15**	0.16**
گونه باکتری (Bacterial species)	5	170.01**	0.006*	230.47**	0.15**	0.60**
رقم کلم×گونه باکتری (Cabbage varieties × Bacteria species)	10	12.14**	0.004ns	7.70**	0.008ns	0.01**
خطا (Error)	36	2.99	0.002	1.04	0.018	0.002
ضریب تغییرات (Coefficient of Variation (%)	–	3.87	9.43	4.03	1.99	5.63

** و * به ترتیب در سطح ۱٪ و ۵٪ معنی‌دار و ns اختلاف معنی‌دار نیست.

** significant at 0.01 level, * significant at 0.05 level, ns, not significant.

مقایسه میانگین‌های تأثیر رقم بر غلظت کادمیوم قابل جذب خاک نشان داد که خاک ریزوسفری رقم کلم بروکلی بیش‌ترین غلظت کادمیوم قابل جذب و خاک ریزوسفری رقم کلم زینتی کمترین غلظت کادمیوم قابل جذب را پس از برداشت گیاه داشته است (شکل ۱-الف). هم‌چنین مقایسه میانگین‌های تأثیر باکتری بر غلظت کادمیوم قابل جذب خاک نشان می‌دهد که کم‌ترین غلظت کادمیوم قابل جذب مربوط به تیمار تلقیح شده با باکتری *B. megaterium* و بیشترین غلظت کادمیوم قابل جذب مربوط به تیمارهای تلقیح شده با باکتری‌های *A. chroococcum* و *proteus vulgaris* است (شکل ۱-ب). همان‌طور که نتایج حاصل نشان می‌دهد تیمارهای تلقیح شده با باکتری‌های *P. putida*، *B. megaterium* و *B. subtilis* بیش‌ترین غلظت اسیدهای آلی (جدول ۴) و بیش‌ترین غلظت سرب و کادمیوم ریشه و بخش هوایی (جدول ۶) را داشتند و کم‌ترین غلظت این عناصر در تیمارهای تلقیح شده با باکتری‌های *A. chroococcum* و *proteus vulgaris* مشاهده گردید (جداول ۴ و ۶). بر این اساس می‌توان گفت که به دلیل جذب کمتر سرب و کادمیوم توسط گیاه در تیمارهای تلقیح شده با باکتری‌های *A. chroococcum* و *proteus vulgaris* مقدار سرب و کادمیوم قابل جذب بیشتری در خاک ریزوسفری این تیمارها باقی مانده است. محققان دیگری نیز گزارش کرده‌اند تولید اسیدهای آلی، کلات‌های آهن و سیدروفورها توسط باکتری‌های محرک رشد گیاه، سبب کاهش اسیدیته خاک و افزایش غلظت کادمیوم قابل جذب در خاک می‌شود (۳۳، ۶۱، ۶۶ و ۸۶).

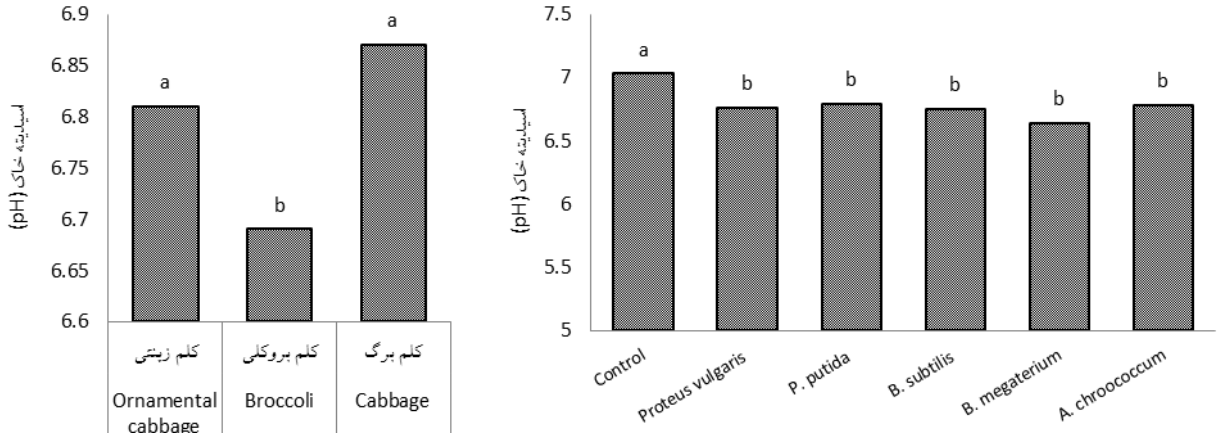
مقایسه میانگین‌های تأثیر باکتری‌ها بر اسیدیته خاک نشان می‌دهد که بیش‌ترین اسیدیته مربوط به تیمار شاهد (بدون تلقیح باکتری) بود و تلقیح خاک با باکتری‌ها سبب کاهش اسیدیته خاک ریزوسفری گردید (شکل ۲-ب). به خوبی شناخته شده است که ریشه‌های گیاه توسط چندین فرآیند از جمله اکسیداسیون و تنفس، تعادل کاتیون و جذب آنیون و آزاد سازی آنیون آلی توانایی تغییر اسیدیته خاک را دارند (۲۶). اما، فرایندهای اصلی کنترل تغییرات اسیدیته خاک ریزوسفری رهاسازی H^+ و OH^- از ریشه‌های گیاه به محلول خاک برای جبران عدم تعادل بار ناشی از جذب نابرابر کاتیون‌ها و آنیون‌ها توسط ریشه‌های گیاه است (۲۶). علاوه بر این، گزارش شده است که باکتری‌های محرک رشد گیاه با کاهش اسیدیته خاک، آزاد کردن مواد کلات کننده، انحلال فسفات نامحلول و تغییر پتانسیل احیاء خاک سبب تغییر قابلیت دسترس بودن مواد مغذی و حمل و نقل فلزات سنگین و در نهایت بهبود فرآیند فیتواکسیداتیو می‌شوند (۶۳). تأثیر اسیدیته خاک بر حلالیت فلزات سنگین توسط محققان دیگری نیز گزارش شده است (۱۹).



الف (A) ب (B)

شکل ۱- تأثیر نوع رقم کلم (الف) و باکتری‌های محرک رشد گیاه (ب) بر غلظت کادمیوم قابل جذب خاک ریزوسفری بعد از برداشت گیاه کلم

Figure 1- The main effects of cabbage varieties (A) PGPR species (B) on available concentration of the rhizosphere soil after harvest of cabbage plant



الف (A) ب (B)

شکل ۲- تأثیر نوع رقم کلم (الف) و باکتری‌های محرک رشد گیاه (ب) بر اسیدیته خاک ریزوسفری بعد از برداشت گیاه کلم

Figure 2- The main effects of cabbage varieties (A) PGPR species (B) on pH of the rhizosphere soil after harvest of cabbage plant

مقایسه میانگین‌های اثرات متقابل رقم و تلقیح با باکتری بر غلظت سرب قابل جذب خاک ریزوسفری بعد از برداشت گیاه کلم نشان می‌دهد که بیش‌ترین غلظت سرب قابل جذب مربوط به رقم کلم زینتی و تیمار شاهد (بدون تلقیح با باکتری) بود و تلقیح با باکتری‌ها در هر سه رقم کلم سبب کاهش غلظت سرب قابل جذب خاک شده است. به‌طوری که کمترین غلظت سرب قابل جذب خاک ریزوسفری مربوط به رقم کلم برگ و تیمار تلقیح شده با باکتری *B. megaterium* بود که ۲۱/۳۳ درصد نسبت به تیمار شاهدش کاهش داشت (جدول ۸). این کاهش غلظت سرب قابل جذب بعد از برداشت گیاه کلم را از یک سو می‌توان به جذب سرب توسط گیاه و انتقال آن به اندام‌های هوایی گیاه نسبت داد و از سوی دیگر می‌توان گفت فعالیت باکتری‌های محرک رشد سبب تبدیل شدن اشکال قابل جذب سرب به اشکال با قابلیت جذب پایین‌تر شده است تا امکان جذب توسط گیاه کاهش یابد.

همان‌طور که در جدول ۸ مشاهده می‌شود بیش‌ترین غلظت فسفر قابل جذب و کربن آلی محلول خاک ریزوسفری بعد از برداشت گیاه کلم مربوط به رقم کلم برگ و به ترتیب تیمارهای تلقیح شده با باکتری‌های *P. putida* و *B. megaterium* بود که به ترتیب ۷۹/۲۲ و ۱۲۰ درصد نسبت به تیمار شاهدش افزایش داشت (جدول ۸).

جدول ۸- مقایسه میانگین‌های اثرات متقابل نوع رقم و باکتری‌های محرک رشد بر بر غلظت سرب، کادمیوم و فسفر قابل جذب، اسیدیته و کربن آلی محلول خاک ریزوسفری بعد از برداشت گیاه کلم

Table 8- The interactive effects of cabbage varieties and PGPR species on available concentration of Pb, Cd and phosphorus, pH and DOC of the rhizosphere soil after harvest of cabbage plant

رقم کلم (Cabbage varieties)	گونه باکتری (PGPR species)	سرب قابل جذب (Available Pb)	فسفر قابل جذب (Available P)	کربن آلی محلول (DOC)
		(mg/kg soil)		(g C/kg soil)
کلم زینتی (Ornamental cabbage)	Control	50.62 (a)	15.08 (h)	0.54 (ij)
	Proteus vulgaris	49.65 (ab)	23.64 (ef)	0.74 (gh)
	Pseudomonas putida	48.52 (a-d)	31.82 (b)	0.83 (fg)
	Bacillus subtilis	38.67 (hij)	25.36 (de)	0.88 (ef)
	Bacillus megaterium	38.84 (hij)	27.79 (c)	1.28 (b)
	Azotobacter chroococcum	49.55 (abc)	24.55(ef)	0.68 (h)
کلم بروکلی (Broccoli)	Control	48.01 (a-e)	19.31(g)	0.52 (j)
	Proteus vulgaris	47.81 (a-e)	22.87 (f)	0.65 (hi)
	Pseudomonas putida	50.00 (ab)	32.96 (ab)	0.81 (fg)
	Bacillus subtilis	45.03 (def)	22.77 (f)	0.96 (de)
	Bacillus megaterium	37.83 (ij)	27.01 (cd)	1.30 (b)
	Azotobacter chroococcum	46.20 (b-f)	24.47 (ef)	0.86 (ef)
کلم برگ (Cabbage)	Control	45.29 (c-f)	19.39 (g)	0.65 (hi)
	Proteus vulgaris	43.74 (efg)	23.55 (ef)	0.84 (efg)
	Pseudomonas putida	46.18 (b-f)	34.75 (a)	0.89 (ef)
	Bacillus subtilis	40.31 (ghi)	28.88 (c)	1.15 (c)
	Bacillus megaterium	35.63 (j)	28.84 (c)	1.43 (a)
	Azotobacter chroococcum	42.10 (fgh)	23.78 (ef)	1.02 (d)

میانگین‌ها در هر ستون که حداقل یک حرف مشترک دارند، از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری ($p<0.05$) با هم ندارند.

Different letters indicate significant differences at the 5% probability level.

اسیدهای آلی با وزن مولکولی کم تولید شده توسط باکتری‌های محرک رشد گیاه فسفات معدنی را حل می‌کنند و فسفر قابل دسترس را افزایش می‌دهند (۸۹). باکتری‌های *P. putida* و *B. megaterium* با داشتن توانایی انحلال فسفات معدنی، انحلال پتاسیم نامحلول و کاهش اسیدیته خاک سبب افزایش غلظت کربن آلی محلول در خاک شده‌اند که خود این امر در کاهش اسیدیته و افزایش دسترس بودن عناصر غذایی و افزایش رشد گیاه موثر بوده است.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که تلقیح خاک ریزوسفری با باکتری‌های محرک رشد گیاه با توجه به توانایی باکتری‌ها در تولید ایندول استیک اسید، سیانید هیدروژن، تثبیت نیتروژن، حلالیت فسفات نامحلول و پتاسیم، سبب رشد و عملکرد بهتر ارقام کلم گردید. افزایش تولید اسیدهای آلی، کربن آلی محلول و اسیدی کردن منطقه ریزوسفر از یک سو قابلیت دسترسی عناصر غذایی نیتروژن، فسفر و پتاسیم توسط گیاه را افزایش داد و از سوی دیگر به دلیل کاهش اسیدیته منطقه ریزوسفر حلالیت فلزات سنگین سرب و کادمیوم افزایش یافت. لذا افزایش حلالیت فلزات سنگین در منطقه ریشه سبب افزایش جذب این فلزات توسط ارقام مختلف کلم گردید. این امر از دو جنبه حائز اهمیت می‌باشد: اولاً در مورد ارقام خوراکی شامل کلم برگ و کلم بروکلی باید توجه داشت که کشت این گیاهان در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین با توجه به توانایی بالایی که در جذب این فلزات دارند، پرخطر می‌باشد و می‌بایست در صورت کشت نیز قبل از استفاده و عرضه به بازار مصرف از لحاظ غلظت فلزات سنگین در بافت‌های خوراکی مورد آزمایش قرار گیرند. ثانیاً در خصوص رقم کلم زینتی، با توجه به توانایی زیاد این رقم در جذب سرب و کادمیوم، می‌توان این رقم را به منظور پالایش خاک های آلوده به این عناصر در فضاهای سبز و زمین‌های آلوده به فلزات سنگین کشت کرد.

منابع

1. Ahmad I., Akhtar M.J., Asghar H.N., Ghafoor U., and Shahid, M. 2016. Differential effects of plant growth-promoting rhizobacteria on maize growth and cadmium uptake. Journal of Plant Growth Regulation 35: 303-315.
2. Aleksandrov V.G., Blagodyr R.N., and Ilev I.P. 1967. Liberation of phosphoric acid from apatite by silicate bacteria. Microbiological Journal 29: 111-114.
3. Allen S.E., Grimshaw H.M., and Rowland A.P. 1986. Chemical Analysis. pp. 285-344, In: Moore P.D., and Chapman S.B. (Ed.), Methods in plant ecology. Blackwell, Scientific Publication, Oxford, London.
4. Alloway B.J. 1995. Heavy metals in soils. 2nd edn. Blackey Academic and Professional.
5. Baharlouei J., Pazira E., and Solhi M. 2011. Evaluation of inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria on cadmium uptake by canola and barley, Proceedings of the 2nd International Conference on Environmental Science and Technology.
6. Beveridge T.J. 1988. The bacterial surface: general considerations towards design and function. Canadian Journal of Microbiology 34: 363-372.
7. Bhattacharyya D., Garladinne M., and Lee Y.H. 2015. Volatile indole produced by rhizobacterium *Proteus vulgaris* JBLS202 stimulates growth of *Arabidopsis thaliana* through auxin, cytokinin, and brassinosteroid pathways. Journal of Plant Growth Regulation 34: 158-168.
8. Biswas J.C., Ladha J.K., and Dazzo F.B. 2000. Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice. Soil Science Society of America Journal 64: 1644-1650.
9. Bouyoucos G.J. 1962. Hydrometer method improved for making particle size analyses of soils. Agronomy Journal 54: 464-465.
10. Cakmakci R., Turan M., Gulluce M., and Sahin F. 2014. Rhizobacteria for reduced fertilizer inputs in wheat (*Triticum aestivum* spp. vulgare) and barley (*Hordeum vulgare*) on Aridisols in Turkey. International Journal of Plant Production 8: 163-181.
11. Çakmakçı R., Erat M., Erdoğan Ü., and 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: 288-295.
12. Chaney R.L., Green C.E., Filcheva E., and Brown S.L. 1994. Effect of Iron, Manganese, and Zinc Enriched Biosolids Compost on Uptake of Cadmium by Lettuce from Cadmium-Contaminated Soils. pp. 205-207, In: Clapp C.E., Larson W.E., and Dowdy R.H. (Ed.), Sewage sludge: Land utilization and the environment. American Society of Agronomy.
13. Curaqueo G., Schoebitz M., Borie F., Caravaca F., and Roldán A. 2014. Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and addition of composted olive-mill waste enhance plant establishment and soil properties in the regeneration of a heavy metal-polluted environment. Environmental Science and Pollution Research 21: 7403-7412.
14. Elkoca E., Kantar F., and Sahin F. 2007. Influence of nitrogen fixing and phosphorus solubilizing bacteria on the nodulation, plant growth, and yield of chickpea. Journal of Plant Nutrition 31: 157-171.
15. Emami A. 1996. Methods of plant analysis. Journal of Research Organ Education and Agricultural 982: 11-28. (In Persian with English abstract).
16. Erman M., Kotan R., Çakmakçı R., Çığ F., Karagöz K., and Sezen M. 2010. Effect of nitrogen fixing and phosphate-solubilizing rhizobacteria isolated from van lake basin on the growth and quality properties in wheat and sugar beet. Organic Farming Symposium 28: 325-329.
17. Esitken A., Karlidag H., Ercisli S., Turan M., and Sahin F. 2003. The effect of spraying a growth promoting bacterium on the yield, growth and nutrient element composition of leaves of apricot (*Prunus armeniaca* L. cv. Hacihaliloglu). Australian Journal of Agricultural Research 54: 377-380.
18. Fayetorbay D., Karagoz K., Dadasoglu F., Comakli B., Cakmakci R., and Kotan R. 2010. Common vetch (*Vicia sativa*) growth and yield in relation to single and mixed cultures of plant growth promoting bacteria, mineral and organic fertilizers. Proceedings of the Turkey IV Organic Farming Symposium 696-701.
19. Gadd G.M. and Sayer J.A. 2000. Influence of fungi on the environmental mobility of metals and metalloids. pp. 237-256, Environmental Microbe-Metal Interactions. American Society of Microbiology.
20. Gunes A., Karagoz K., Turan M., Kotan R., Yildirim E., Cakmakci R., and Sahin F. 2015. Fertilizer efficiency of some plant growth promoting rhizobacteria for plant growth. Research journal of soil biology 7: 28-45.
21. Güneş A., Turan M., Güllüce M., and Şahin F. 2014. Nutritional content analysis of plant growth-promoting rhizobacteria species. European Journal of Soil Biology 60: 88-97.
22. Gupta A., Meyer J.M., and Goel R. 2002. Development of heavy metal-resistant mutants of phosphate solubilizing *Pseudomonas sp.* NBRI 4014 and their characterization. Current Microbiology 45: 323-327.
23. Halstead R.L., Finn B.J., and MacLean A.J. 1969. Extractability of nickel added to soils and its concentration in plants. Canadian Journal of Soil Science 49: 335-342.
24. Han H.S. and Lee K.D. 2005. Physiological responses of soybean-inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* with PGPR in saline soil conditions. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences 1: 216-221.

25. Harinathan B., Sankaralingam S., Palpperumal S., Kathiresan D., Shankar T., and Prabhu D. 2016. Effect of phosphate solubilizing bacteria on growth and development of Pearl Millet and Ragi. Journal of Advances in Biology and Biotechnology 7: 1-7.
26. Hinsinger P., Plassard C., Tang C., and Jaillard B. 2003. Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints. Plant and Soil 248: 43-59.
27. Horváth B., Opara-Nadi O., and Beese F. 2005. A simple method for measuring the carbonate content of soils. Soil Science Society of America Journal 69: 1066-1068.
28. Hseu Z.Y. 2004. Evaluating heavy metal contents in nine composts using four digestion methods. Bioresource Technology 95: 53-59.
29. Jalil A., Selles F., and Clarke J.M. 1994. Effect of cadmium on growth and the uptake of cadmium and other elements by durum wheat. Journal of Plant Nutrition 17: 1839-1858.
30. Karagoz K. and Kotan R. 2010. Effects of some plant growth promoting bacteria on growth of lettuce and bacterial leaf spot disease. Turkey Biyoloji Mucadele Dergisi 1: 165-179.
31. Karakurt H., Kotan R., Dadasoglu F., Aslantas R., and Şahhin F. 2011. Effects of plant growth promoting rhizobacteria on fruit set, pomological and chemical characteristics, color values, and vegetative growth of sour cherry (*Prunus cerasus* cv. Kütahya). Turkish Journal of Biology 35: 283-291.
32. Karimi A., Khodaverdiloo H., and Rasouli Sadaghiani M. H. 2017. Fungi and bacteria as helping agents for remediation of a Pb-contaminated soil by *Onopordum acanthium*. Caspian Journal of Environmental Sciences 15: 249-262.
33. Kartik V.P., Jinal H.N., and Amaresan N. 2016. Characterization of cadmium-resistant bacteria for its potential in promoting plant growth and cadmium accumulation in *Sesbania bispinosa* root. International Journal of Phytoremediation 18: 1061-1066.
34. Keshavarz Zarjani J., Aliasgharzad N., and Oustan S. 2013. Effects of six strains of potassium releasing bacteria on growth and potassium uptake of Tomato Plant. Water and Soil Science 23: 245-255.
35. Khan A., Jilani G., Akhtar M.S., Saqlan Naqvi S., and Rasheed M. 2009. Phosphorus solubilizing bacteria: Occurrence, Mechanisms and their role in crop production. Agricultural biology Science 1: 48-58.
36. Kotan R. and Şahin F. 2006. Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. syringae and nutritional similarity in carbon source utilization of pathogen and its potential biocontrol agents. The Journal of Turkish Phytopathology 35: 1-13.
37. Lasat M.M. 2002. Phytoextraction of toxic metals. Journal of Environment Quality 31: 109-120.
38. Lawongsa P., Inubushi K., and Wada H. 1987. Determination of organic acids in soil by high performance liquid chromatography. Soil Science and Plant Nutrition 33: 299-302.
39. Liao M. and Xie X.M. 2004. Cadmium release in contaminated soils due to organic acids. Pedosphere 14: 223-228.
40. Lin Q., Zheng C.R., Chen H.M., and Chen Y.X. 1998. Transformation of cadmium species in rhizosphere. Acta Pedologica Sinica 35: 461-467.
41. Lin Q., Chen Y.X., Chen H.M., and Zheng C.M. 2003. Study on chemical behavior of root exudates with heavy metals. Plant Nutrition and Fertilizer Science 9: 425-431.
42. 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.
43. Ma Y., Rajkumar M., and Freitas H. 2009. Improvement of plant growth and nickel uptake by nickel resistant-plant-growth promoting bacteria. Journal of Hazardous Materials 166: 1154-1161.
44. Ma Y., Rajkumar M., Rocha I., Oliveira R.S., and Freitas H. 2015. Serpentine bacteria influence metal translocation and bioconcentration of *Brassica juncea* and *Ricinus communis* grown in multi-metal polluted soils. Frontiers in Plant Science 5: 757-766.
45. Ma Y., Oliveira R.S., Freitas H., and Zhang C. 2016. Biochemical and molecular mechanisms of plant-microbe-metal interactions: relevance for phytoremediation. Frontiers in Plant Science 7: 1-19.
46. Marulanda-Aguirre A., Azcón R., Ruiz-Lozano J.M., and Aroca R. 2008. Differential effects of a *Bacillus megaterium* strain on *Lactuca sativa* plant growth depending on the origin of the arbuscular mycorrhizal fungus coinoculated: physiologic and biochemical traits. Journal of Plant Growth Regulation 27: 1-10.
47. McBride M.B. 1994. Environmental Chemistry of Soils. Oxford University Press, New York.
48. McLaughlin M.J., Smolders E., Merckx R., and Maes A. 1997. Plant uptake of Cd and Zn in chelator-buffered nutrient solution depends on ligand type. In: Plant nutrition for sustainable food production and environment, vol.78, pp. 113-118. Developments in Plant and Soil Sciences, Springer, Dordrecht.
49. Meier S., Cornejo P., Cartes P., Borie F., Medina J., and Azcón R. 2015. Interactive effect between Cu-adapted arbuscular mycorrhizal fungi and biotreated agrowaste residue to improve the nutritional status of *Oenothera picensis* growing in Cu-polluted soils. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 178: 126-135.
50. Mench M. and Martin E. 1991. Mobilization of cadmium and other metals from two soils by root exudates of *Zea mays* L., *Nicotiana tabacum* L. and *Nicotiana rustica* L. Plant and Soil 132: 187-196.
51. Min T. 1998. Progress in study on VA-mycorhiza fungi in enhancing plant resistance to saline-alkali and heavy

metals. Turang (China).
52. Mohammadzadeh A., Tavakoli M., Motesharezadeh B., and Chaichi M.R. 2017. Effects of plant growth-promoting bacteria on the phytoremediation of cadmium-contaminated soil by sunflower. Archives of Agronomy and Soil Science 63: 807-816.
53. Mullen M.D., Wolf D.C., Ferris F.G., Beveridge T.J., Flemming C.A., and Bailey G.W. 1989. Bacterial sorption of heavy metals. Applied and Environmental Microbiology 55: 3143-3149.
54. Niu Z.X., Sun L.N., Sun T.H., Li Y.S., and Wang H. 2007. Evaluation of phytoextracting cadmium and lead by sunflower, ricinus, alfalfa and mustard in hydroponic culture. Journal of Environmental Sciences 19: 961-967.
55. Öğüt M. and Er F. 2006. Micronutrient composition of field-grown dry bean and wheat inoculated with *Azospirillum* and *Trichoderma*. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 169: 699-703.
56. Orhan E., Esitken A., Ercisli S., Turan M., and Sahin F. 2006. Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. Scientia Horticulturae 111: 38-43.
57. Papa S., Bartoli G., Pellegrino A., and Fioretto A. 2010. Microbial activities and trace element contents in an urban soil. Environmental Monitoring and Assessment 165: 193-203.
58. Park J., Bolan N., Megharaj M., and Naidu R. 2010. Isolation of phosphate-solubilizing bacteria and characterization of their effects on lead immobilization. Pedologist 53: 67-75.
59. Patil V. 2014. *Bacillus subtilis*: A potential salt tolerant phosphate solubilizing bacterial agent. International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research 3: 141.
60. Prajapati K.B., and Modi H.A. 2012. Isolation and characterization of potassium solubilizing bacteria from ceramic industry soil. CIBTech Journal of Microbiology 1: 8-14.
61. Prapagdee B. and Khonsue N. 2015. Bacterial-assisted cadmium phytoremediation by *Ocimum gratissimum* L. in polluted agricultural soil: a field trial experiment. International Journal of Environmental Science and Technology 12: 3843-3852.
62. Rajkumar M. and Freitas H. 2008. Influence of metal resistant-plant growth-promoting bacteria on the growth of *Ricinus communis* in soil contaminated with heavy metals. Chemosphere 71: 834-842.
63. Rajkumar M., Ae N., Prasad M.N.V., and Freitas H. 2010. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. Trends in Biotechnology 28: 142-149.
64. Rani A., Shouche Y.S., and Goel R. 2008. Declination of copper toxicity in pigeon pea and soil system by growth-promoting *Proteus vulgaris* KNP3 strain. Current Microbiology 57: 78.
65. Rayment G.E., and Lyons D.J. 2011. Soil Chemical Methods: Australasia. vol.3 pp. 512,. CSIRO publishing.
66. Sangthong C., Setkit K., and Prapagdee B. 2016. Improvement of cadmium phytoremediation after soil inoculation with a cadmium-resistant *Micrococcus* sp. Environmental Science and Pollution Research 23: 756-764.
67. Santoro M.V., Zygadlo J., Giordano W., and Banchio E. 2011. Volatile organic compounds from rhizobacteria increase biosynthesis of essential oils and growth parameters in peppermint (*Mentha piperita*). Plant Physiology and Biochemistry 49: 1177-1182.
68. SAS Institute Inc. 1990. Output delivery system: User's guide. SAS institute.
69. Schwab A.P., He Y., and Banks M.K. 2005. The influence of organic ligands on the retention of lead in soil. Chemosphere 61: 856-866.
70. Serna-Posso E.J., Sánchez-de Prager M., and Cisneros-Rojas C.A. 2017. Organic acids production by rhizosphere microorganisms isolated from a Typic Melanudands and its effects on the inorganic phosphates solubilization. Acta Agronómica 66: 241-247.
71. Setiawati T.C. and Mutmainnah L. 2016. Solubilization of potassium containing mineral by microorganisms from sugarcane rhizosphere. Agriculture and Agricultural Science Procedia 9: 108-117.
72. Sharma S., Kumar V., and Tripathi R.B. 2017. Isolation of phosphate solubilizing microorganism (PSMs) from soil. Journal of microbiology and Biotechnology Research 1: 90-95.
73. Sheng X.F. and He L.Y. 2006. Solubilization of potassium-bearing minerals by a wild-type strain of *Bacillus edaphicus* and its mutants and increased potassium uptake by wheat. Canadian Journal of Microbiology 52: 66-72.
74. 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.
75. Sugumaran P. and Janarthanam B. 2007. Solubilization of potassium containing minerals by bacteria and their effect on plant growth. World Journal of Agricultural Sciences 3: 350-355.
76. Torre M.A.D.L., Gomez-Alarcon G., Vizcaino C., and Garcia M.T. 1992. Biochemical mechanisms of stone alteration carried out by filamentous fungi living in monuments. Biogeochemistry 19: 129-147.
77. Turan M., Ataoğlu N., and Şahın F. 2006. Evaluation of the capacity of phosphate solubilizing bacteria and fungi on different forms of phosphorus in liquid culture. Journal of Sustainable Agriculture 28: 99-108.
78. Turan M., Gulluce M., and Şahin F. 2012. Effects of plant-growth-promoting rhizobacteria on yield, growth, and some physiological characteristics of wheat and barley plants. Communications in Soil Science and Plant Analysis 43: 1658-1673.
79. Vance E.D., Brookes P.C., and Jenkinson D.S. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C.

Soil Biology and Biochemistry 19: 703-707.
80. Walkley A. and Black I.A. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. Soil Science 37: 29-38.
81. Walpola B.C., and Yoon M.H. 2013. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria and their co-inoculation efficiency on tomato plant growth and phosphorous uptake. African Journal of Microbiology Research 7: 266-275.
82. Wenzel W.W. 2009. Rhizosphere processes and management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils. Plant and Soil 321: 385-408.
83. Wu L.H., Luo Y.M., Christie P., and Wong M.H. 2003. Effects of EDTA and low molecular weight organic acids on soil solution properties of a heavy metal polluted soil. Chemosphere 50: 819-822.
84. Wu S.C., Cheung K.C., Luo Y.M., and Wong M.H. 2006. Effects of inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria on metal uptake by *Brassica juncea*. Environmental Pollution 140: 124-135.
85. Xie X., Zhang H., and Pare P. 2009. Sustained growth promotion in *Arabidopsis* with long-term exposure to the beneficial soil bacterium *Bacillus subtilis* (GB03). Plant Signaling and Behavior 4: 948-953.
86. Yousaf S., Andria V., Reichenauer T.G., Smalla K., and Sessitsch A. 2010. Phylogenetic and functional diversity of alkane degrading bacteria associated with Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) and Birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) in a petroleum oil-contaminated environment. Journal of Hazardous Materials 184: 523-532.
87. Youssef R.A., and Chino M. 1988. Development of a new Rhizobox system to study the nutrient status in the rhizosphere. Soil Science and Plant Nutrition 34: 461-465.
88. Yu S.M., and Lee Y.H. 2013. Plant growth promoting rhizobacterium *Proteus vulgaris* JBLS202 stimulates the seedling growth of *Chinese cabbage* through indole emission. Plant and Soil 370: 485-495.
89. Zaidi A., Khan M., Ahemad M., and Oves M. 2009. Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 56: 263-284.
90. Zaidi S. and Musarrat J. 2004. Characterization and nickel sorption kinetics of a new metal hyper-accumulator *Bacillus sp*. Journal of Environmental Science and Health 39: 681-691.
91. Zaidi S., Usmani S., Singh B.R., and Musarrat J. 2006. Significance of *Bacillus subtilis* strain SJ-101 as a bioinoculant for concurrent plant growth promotion and nickel accumulation in *Brassica juncea*. Chemosphere 64: 991-997.
92. Zhang F., Dashti N., Hynes R.K., and Smith D.L. 1996. Plant growth promoting rhizobacteria and soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] nodulation and nitrogen fixation at suboptimal root zone temperatures. Annals of Botany 77: 453-460.
93. Zhuang X., Chen J., Shim H., and Bai Z. 2007. New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. Environment International 33: 406-413.

Journal of Water and Soil
Vol. 34, No. 3, July-August 2020, p. 737-754

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۴، شماره ۳، مرداد – شهریور ۱۳۹۹، ص. ۷۵۴-۷۳۷

Effects of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on Organic Acids Production and Concentration of Lead and Cadmium in Cabbage

S. Abdollahi[1*]- A. Golchin[2]- F. Shahryari[3]

Received: 17-02-2020
Accepted: 05-05-2020

Introduction: Contamination of soils by heavy metals is one of the most serious environmental problems that increases the risk of toxic metal entry into the food chains. When heavy metals enter the soil, they are progressively converted to the insoluble form by reactions with soil components. A variety of mechanisms such as absorption, ion exchange, co-precipitation and complexation incorporates heavy metals into soil minerals or bounds them to various soil phases. Organic acids are natural compounds that are secreted from the root of the plant and can affect the solubility and uptake of heavy metals.

Materials and Methods: To evaluate the effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on organic acids production and heavy metal uptake by different cabbage varieties, a factorial pot experiment with completely randomized design and three replications was performed under the greenhouse conditions. The factors included (a) rhizosphere soils of three varieties of cabbage [*Brassica oleracea var. acephala* L. (Ornamental cabbage), *Brassica oleracea var. italica* L. (Broccoli cabbage) and *Brassica oleracea var. capitata* L. (Cabbage)] and (b) five species of PGPR consisting of *Pseudomonas putida* PTCC 1694, *Bacillus megaterium* PTCC 1656, *Proteus vulgaris* PTCC 1079, *Bacillus subtilis* PTCC 1715 and *Azotobacter chroococcum* and control (without rhizobacteria) used to inoculate the rhizosphere soils. The experiment had 18 treatments and there were 54 experimental units and three seedlings of cabbage were planted in each pot. In all treatments inoculated with rhizobacterial species, 2 ml of a bacterial suspension with 10^7-10^8 (cfu ml^{-1}) were used to inoculate the soil of root area. The data obtained in this study were statistically analyzed by SAS software (version 9.4) and the mean comparison was performed by Duncan's multiple range test at 1 and 5 percent probability levels.

Results and Discussion: The analysis of variance (ANOVA) showed that the cabbage varieties, bacterial inoculation and their interactions had significant effects ($p < 0.01$) on organic acids concentration, fresh and dry biomass of plant, concentrations of Pb and Cd in root and shoot of cabbage plant. The results showed that inoculation of the rhizosphere soils with PGPR species increased organic acids concentration of rhizosphere. The highest concentration of malic and citric acids in rhizosphere soil (9.59 and 118.34 mg dl^{-1}, respectively) was obtained when the rhizosphere soils of the broccoli were inoculated with *Pseudomonas putida* PTCC 1694 and the highest concentration of acetic acid in rhizosphere (233.88 mg dl^{-1}) was determined when the rhizosphere of broccoli were inoculated with *Bacillus megaterium* PTCC 1656. Inoculation of the rhizosphere with PGPR species also increased the fresh and dry biomass of plant, and Pb and Cd concentrations in cabbage root and shoot. The highest fresh and dry biomass of cabbage (416.77 and 76.96 g in the plot, respectively) were obtained when the rhizosphere soils of cabbage were inoculated with *Bacillus megaterium* PTCC 1656, the highest concentration of Pb in the root and shoot and Cd in the root of cabbage (12.20, 90.77 and 9.01 mg kg^{-1}, respectively) were obtained when the rhizosphere soils of the ornamental cabbage were inoculated with *Pseudomonas putida* PTCC 1694. Inoculation of the rhizosphere soils of the ornamental cabbage, broccoli and cabbage by *B. megaterium* PTCC1656 caused an increase in the DOC concentration by 137, 150 and 120%, respectively, compared to uninoculated rhizosphere soils. Bacterial inoculation also increased the concentrations of available phosphorus in the rhizosphere soils and the highest concentration of phosphorus was measured in the treatments inoculated by *P. putida* PTCC1694. Furthermore, the concentrations of available phosphorus in the rhizosphere soils of the ornamental cabbage, broccoli and cabbage increased by 79, 71 and 111%, respectively, relative to uninoculated rhizosphere soils.

Conclusion: It is concluded that inoculation of Pb and Cd contaminated soils by PGPR species, especially *Bacillus megaterium* PTCC 1656 and *Pseudomonas putida* PTCC 1694, enhances the tolerance of host plants,

1 and 2- Ph.D. and Professor of Soil Science Department, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, respectively.
(*- Corresponding Author Email: samaneh.abdollahi87@yahoo.com)
3- Assistant Professor, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, University of Zanjan
DOI: 10.22067/jsw.v34i3.85068

metal uptake performance and thus phytoremediation process by increasing the metal bioavailability and biomass production of the plant. As the distribution and accumulation of heavy metals in plant tissues are important factors for evaluation of plant role in phytoremediation of polluted soils, the PGPR inoculation of rhizosphere soils can be used as a biotechnological tool to enhance biomass production and plant uptake and thus the efficiency of phytoextraction.

Keywords: Acitic, Citric, Malic, Organic acid, Rhizobox