جداسازی، غربالگری و بررسی صفات محرک رشد گیاهی میکروارگانیسم‌های مقاوم به آرسنیک (III) & (V) و ارزیابی تأثیر جدایه‌های برتر بر خصوصیات مرفولوژیک گیاه پونه و گیاه‌پالایی خاک آلوده به آرسنیک

لیلا حیدرپور، علی اشرف سلطانی طولارود[1] و اسماعیل گلی کلانپا

دانش‌آموخته کارشناسی ارشدگروه علوم و مهندسی خاک دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی؛ **heydarpoor.leila.bio92@gmail.com**

استادیار گروه علوم و مهندسی خاک دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی؛ **ali_soltani_t@yahoo.com**

استادیار گروه علوم و مهندسی خاک دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی؛ **goli@uma.ac.ir**

دریافت: **95/6/24** و پذیرش: **95/7/12**

چکیده

یکی از مهم‌ترین راه‌های افزایش راندمان گیاه‌پالایی خاک‌های آلوده به فلزات سنگین استفاده از میکروارگانیسم‌های محرک رشد گیاهی مقاوم به این فلزات می‌باشد. این ریزجانداران با بهبود رشد گیاه و افزایش میزان جذب فلزات سنگین می‌توانند باعث افزایش میزان پایش خاک‌های آلوده گردند. به‌منظور انجام این تحقیق، چهار نمونه خاک آلوده به آرسنیک از اطراف معدن زرشوران شهرستان تکاب واقع در استان آذربایجان غربی تهیه و برخی خواص فیزیکی و شیمیایی در آنها اندازه‌گیری گردید. از خاک‌های تهیه شده میکروارگانیسم‌های مقاوم به آرسنیک (III) و (V) جداسازی، غربالگری و بعضی از صفات محرک رشد گیاهی آنها تعیین شد. در نهایت به‌منظور بررسی تأثیر میکروارگانیسم‌های مقاوم و دارای صفات محرک رشدی بالا بر روی صفات مرفولوژیکی گیاه پونه، آزمایشی گلخانه‌ای در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. در این پژوهش از 4 نمونه خاک آلوده در مجموع 42 جدایه جداسازی شد و 19 جدایه متفاوت از نظر شکل، رنگ، حاشیه کلنی و سرعت رشد انتخاب گردید. نتایج آزمایش غربالگری نشان داد که تمامی جدایه‌ها توانایی رشد در غلظت‌های مختلف آرسنیک سه ظرفیتی و پنج ظرفیتی را نداشتند. در میان میکروارگانیسم‌های جداسازی شده، جدایه‌های AHG-1 ، AHG-2 ، AHG-4 ، AHG-5 ، AHG-6، AHG-7 و AHG15 در همه‌ی غلظت‌های مورد بررسی آرسنیک سه ظرفیتی رشد کرده و در بین آنها جدایه‌های AHG-5، AHG-6 بیشترین رشد را نشان دادند. در خصوص آرسنیک پنج ظرفیتی جدایه‌های AHG-1، AHG-2، AHG-3، AHG-5، AHG-6، AHG-7، AHG10، AHG-11 و AHG-19 از جدایه‌های مورد مطالعه در همه غلظت‌ها رشد نموده و از بین آنها جدایه‌های AHG-6 ، AHG-7 ، AHG-5 بیشترین رشد را نشان دادند. نتایج حاصل از ارزیابی صفات محرک رشدی در 10 جدایه مقاوم به غلظت‌های مختلف آرسنیک (III) و (V) نشان داد که کلیه این جدایه‌ها توانایی تولید اکسین و توانایی حل‌کنندگی فسفات‌های معدنی نامحلول را داشتند. متوسط میزان تولید اکسین 1/38 میلی‌گرم در لیتر و دامنه آن از 0/35 تا 3/41 میلی‌گرم در لیتر بود. بیشترین و کمترین میزان حل‌کنندگی فسفات‌های معدنی نامحلول به ترتیب486/036 و 251/69 میلی‌گرم در لیتر و مربوط به جدایه‌های AHG-7 و AHG-10 بود. 6 جدایه توانایی حل‌کنندگی ترکیبات نامحلول روی را دارا بوند که مؤثرترین جدایه در این خصوص AHG-7 بود. توانایی تولید سیدروفور در 5 جدایه مشاهده گردید که جدایه AHG10 بیشترین میزان این متابولیت را تولید نمود. از 10 جدایه مورد مطالعه تنها سه جدایه در حد کم و یک جدایه در حد متوسط توانایی تولید سیانید هیدروژن را داشتند. نتایج حاصل از آزمون گلخانه‌ای پژوهش نشان داد که تلقیح گیاه پونه با جدایه‌های برتر موجب افزایش معنی‌دار تعداد برگ، سطح برگ، طول ساقه، انشعابات ساقه، حجم ریشه، وزن تر ریشه، وزن خشک ریشه، وزن تر اندام هوایی در یک خاک آلوده به آرسنیک شد. نتایج نشان داد که تاثیر مایه‌زنی گیاه پونه با جدایه‌های مورد مطالعه بر غلظت آرسنیک ریشه و اندام هوایی و میزان فاکتور انتقال آرسنیک در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود، طوری‌که کاربرد جدایه-های مورد مطالعه باعث افزایش چشمگیر این شاخص‌ها در گیاه پونه گردید. در این پژوهش گیاه پونه توانایی بالایی در انتقال عنصر آرسنیک از ریشه به اندام هوایی نشان داد. می‌توان نتیجه‌گیری کرد که جدایه‌های دارای صفات محرک رشد گیاهی بالا و مقاوم به آرسنیک، با بهبود و افزایش رشد گیاه پونه، افزایش میزان جذب آرسنیک و فاکتور انتقال می‌توانند در افزایش راندمان گیاه‌پالایی یک خاک آلوده به آرسنیک با استفاده از این گیاه نقش مهمی ایفا نمایند. همچنین گیاه پونه می‌تواند در پایش سبز خاک آلوده به آرسنیک نقش مفیدی را ایفا نماید.

واژه‌های کلیدی: آلودگی آرسنیک، پونه، صفات مرفولوژیک، میکروارگانیسم‌های مقاوم به آرسنیک، صفات محرک رشد گیاهی، فاکتور انتقال

---

[1] نویسنده مسئول، آدرس: اردبیل- بلوار دانشگاه دانشگاه محقق اردبیلی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی گروه علوم و مهندسی خاک.

مقدمه

امروزه افزایش جمعیت و پیشرفت علم و تکنولوژی باعث افزایش فعالیت‌های صنعتی و کشاورزی و متعاقب آن افزایش تولید مواد آلاینده‌ی محیط‌زیست گردیده است. آلاینده‌ها از جمله عوامل مختل کننده محیط زیست به‌شمار رفته و از میان آن‌ها فلزات سنگین به‌دلیل غیرقابل تجزیه بودن و اثرات سوء آن‌ها بر سلامتی موجودات زنده و انسان حائز اهمیت می‌باشند (راج کومار و همکاران،2010؛). فلزات سنگین به عنوان فلزاتی با عدد اتمی بالاتر از 20 و چگالی بالاتر از پنج گرم بر سانتی‌متر مکعب تعریف شده‌اند. یون‌های فلزات سنگین زمانی که در مقادیر زیاد در محیط وجود داشته باشند به وسیله ریشه گیاهان جذب و به اندام‌های هوایی منتقل شده و موجب اختلال در سوخت و ساز گیاه و کاهش رشد می‌شوند (لی و همکاران، 2010). علاوه بر این، وجود مقادیر زیاد فلزات سنگین در خاک یک تهدید جدی می‌باشد، زیرا ممکن است سبب تخریب ساختمان خاک، کاهش فعالیت‌های زیستی و حاصلخیزی خاک، کاهش عملکرد، افت کیفیت محصولات، افزایش غلظت آن‌ها در تولیدات کشاورزی و آسیب به سلامت انسان از طریق ورود به زنجیره غذایی شود (لی و همکاران،2006). آرسنیک یک فلزسنگین بسیار خطرناک می‌باشد که به‌وسیله‌ی منابع طبیعی و منابع مصنوعی وارد محیط زیست می‌شود (بارونی و همکاران، 2000). این فلز با ایجاد اختلال در سیستم عصبی، گردش خون، گوارش و پوست، سلامتی انسان را تهدید می‌کند؛ به‌طوری که در مسمومیت‌های حاد حتی باعث مرگ افراد می‌شود. اگرچه آلودگی آرسنیک بیشتر متعلق به کشورهای جنوب شرقی آسیا (هندوستان، پاکستان و بنگلادش) می‌باشد؛ ولی در مناطقی از ایران (استان‌های کردستان و خراسان) نیز آلودگی خاک و آب به این آلاینده گزارش شده است (کریمی و همکاران، 1392).

روش‌های پاکسازی خاک‌های آلوده به سه طبقه فیزیکی (مانند استخراج بخارات آلاینده‌ها از خاک)، شیمیایی (مانند شستشوی خاک) و زیستی تقسیم می‌شوند که گاه ممکن است ترکیبی از این روش‌ها نیز بکار گرفته شود (شارما،2004). یکی از روش‌های زیستی جهت پاک‌سازی محیط از آلاینده از جمله فلزات سنگین استفاده از گیاهان می‌باشد. واژه گیاه پالایی[1] در سال 1991 ابداع شد و عبارت است از استفاده از گیاهان جهت کاهش میزان، تحرک و سمیت آلاینده‌ها از خاک. این تکنولوژی یک روش کم هزینه و دوستدار محیط زیست برای پالایش خاک‌های آلوده به فلزات سنگین توسط گیاهان بوده که باعث حذف این آلاینده‌ها از خاک و اصلاح مجدد آن، بهبود خواص فیزیکی و شیمیایی خاک، استقرار دوباره فعالیت‌های زیستی در خاک و در نتیجه افزایش کیفیت خاک می‌شود (رحمانیان و همکاران، 2011). موفقیت این روش نه تنها به گیاه، بلکه به اثرات متقابل ریشه‌های گیاه با میکروارگانیسم‌های ریزوسفری, نوع و غلظت فلزات سنگین در خاک نیز بستگی دارد (زانگ و همکاران، 2007). میکروارگانیسم‌های ریزوسفری مخصوصاً باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR[2]) می‌توانند با افزایش میزان جذب فلز سنگین و کمک به استقرار بهتر گیاه، افزایش رشد سیستم ریشه‌ای و در نتیجه افزایش رشد گیاه با استفاده از مکانیسم‌های مختلفی از قبیل انحلال ترکیبات کم محلول و نامحلول عناصر غذایی و در نتیجه افزایش زیست فراهمی آن‌ها، تثبیت نیتروژن مولکولی و فراهمی زیستی نیتروژن برای گیاه، تولید هورمون‌های گیاهی مانند ایندول استیک اسید (IAA)، افزایش تحمل گیاه به تنش‌های محیطی مانند تنش شوری، خشکی، کنترل و حذف بیمارگرهای گیاهی با تولید متابولیت‌هایی از قبیل سیانید هیدروژن، تولید سیدروفور، آنزیم‌های لیتیک، آنتی بیوتیک و رقابت برای اشغال آشیان‌های اکولوژیک مناسب در ریزوسفر باعث بهبود کارایی گیاه‌پالایی شوند (گلیک و همکاران، 2014؛ ما و همکاران، 2011؛ یانده و همکاران، 2007). بلیموو و همکاران (2005) گزارش کردند که باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد *variovorax paradoxus* و *Flavobacterium sp.* در حضور و یا عدم حضور کادمیم سبب افزایش طول ریشه‌ی گیاهچه‌های خردل هندی در یک خاک آلوده به کادمیم شدند.

نتایج پژوهشی در مورد پالایش خاک‌های آلوده به آرسنیک توسط پیازچه و کلم زینتی در حضور دو مایه تلقیح A و B به‌ترتیب شامل (*Pseudomonas putida*4,11) و (*P.putida* strain 158 و *P.fluorescens* strain 169)، نشان داد که در هر دو گیاه، مایه تلقیح B جذب آرسنیک را در مقایسه با مایه تلقیح A و شاهد به صورت معنی‌داری ($p<0.05$) افزایش داد و حداکثر جذب در تیمار 100 میلی‌گرم در کیلوگرم آرسنیک خاک اتفاق افتاد (لادن و همکاران، 1388). لی و همکاران (2007) نشان دادند که تلقیح گیاه گل ناز (*Sedum alfredii*) با باکتری‌های محرک رشد در خاک‌های تیمار شده با سطوح

1. Phytoremediation

2. Plant Growth Promoting Rhizobacteria

مختلف روی، بطور معنی‌داری ($p<0.001$) وزن خشک اندام هوایی و جذب روی را در مقایسه با گیاهان بدون تلقیح افزایش داد. نتایج حاصل ازتحقیق وئو و همکاران (2006) در خاک¬های آلوده به سرب و روی، نشان داد که میزان تجمع سرب و روی در ساقه و ریشه گیاهان خردل هندی مایه‌زنی شده با باکتری ریزوسفری مفید، در مقایسه با گیاهان بدون تلقیح بیشتر بود. حسناین و صبری (1996) گزارش کردند که تلقیح گیاه خردل هندی با باکتری‌های جنس *سودوموناس و باسیلوس* گیاه را در برابر اثرات بازدارندگی فلز کروم (Cr) حفاظت می‌کند. رحمانیان و همکاران (2011) با بررسی رشد برخی گیاهان مرتعی در خاک‌های آلوده به کادمیم و با حضور میکروارگانیسم‌های مقاوم به آلودگی نشان دادند که این موجودات با افزایش شکل‌های قابل دسترس کادمیم برای گیاه سبب افزایش جذب آن توسط گیاه شدند.

مطالعه پژوهش‌های انجام شده بیانگر آن است که چنانچه میکروارکانیسم‌های استفاده شده به‌عنوان مایه تلقیح برای حمایت از رشد گیاه در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین، توانایی مقاومت به این فلزات را داشته باشند خیلی بهتر می‌توانند با حمایت از رشد گیاه و افزایش جذب فلزسنگین به افزایش راندمان گیاه‌پالایی کمک نمایند. در سال‌های اخیر تحقیقات نسبتاً گسترده‌ای در سرتاسر دنیا در زمینه‌ی غربال‌گری و شناسایی ریز موجودات ریزوسفری مقاوم به عناصر سنگین و نقش آن-ها در گیاه‌پالایی خاک‌های آلوده به این عناصر انجام شده است (اندرسون و کوک، 2004)، اما در خصوص غربالگری میکروارگانیسم‌های مقاوم به آرسنیک و بررسی توانایی آن‌ها در گیاه‌پالایی خاک‌های آلوده به این فلز تحقیقی به‌خصوص در ایران صورت نگرفته است. بنابراین، با توجه به اثرات بسیار سمی این عنصر در طبیعت و گزارشات متعدد مبنی بر بر وجود آلودگی ناشی از آرسنیک در خاک‌های ایران، شناسایی باکتری‌های مقاوم به آرسنیک و استفاده از آن‌ها در پایش خاک‌های آلوده ضروری به نظر می‌رسد. همچنین تحقیقات صورت گرفته حاکی از آن است که سبزی‌ها به دلیل توانایی بالا در جذب می‌توانند ظرفیت بالایی در پایش خاک‌های آلوده به فلزات سنگین داشته باشند (مودگال و همکاران، 2010؛ عیسی‌زاده لزرجان و همکاران، 1393؛ اوگکو، 2015). پونه با نام علمی *Mentha pulegium*، گیاهی است علفی، پایا و دارای ساقه‌ای با ظاهر تقریباً استوانه‌ای که به حالت وحشی در دشت‌های مرطوب و حاشیه جریان‌های آب می‌روید. این گیاه دارای سیستم ریشه‌ای افشان بوده و تند رشد می‌باشد. در کشور در خصوص گیاه‌پالایی خاک‌های آلوده به فلزات سنگین با استفاده از گیاه پونه و بررسی توانایی این سبزی در پایش خاک‌های آلوده تحقیقی صورت نگرفته است. این در حالی است که با توجه به خصوصیات گیاه پونه، پیش بینی می‌شود که این گیاه پتانسیل مناسبی برای پایش سبز خاک‌ها از فلزات سنگین داشته باشد. لذا پژوهش حاضر با هدف جداسازی و غربالگری میکروارگانیسم‌های مقاوم به آرسنیک، بررسی صفات محرک رشد گیاهی آنها، ارزیابی تأثیر میکروارگانیسم‌های برتر بر رشد و نمو گیاه پونه در یک خاک آلوده به آرسنیک، بررسی میزان گیاه‌پالایی این خاک توسط پونه و ارزیابی کارایی این گیاه در پایش سبز انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه‌های خاک و اندازه‌گیری برخی از خواص فیزیکوشیمیایی

جهت انجام پژوهش، 4 نمونه خاک از عمق 20-0 سانتی‌متری از خاک‌های آلوده به آرسنیک اطراف معدن صنعتی زرشوران شهرستان تکاب به‌طور تصادفی تهیه شد. نمونه‌ها پس از گذراندن از الک 2 میلی‌متری و بسته‌بندی در کیسه‌های پلاستیکی در داخل فلاسک یخ‌دار به آزمایشگاه منتقل و در دمای 4 درجه سانتی‌گراد و در تاریکی تا زمان اندازه‌گیری خصوصیات زیستی در یخچال نگه‌داری گردید. به منظور تعیین برخی از خواص فیزیکی و شیمیایی خاک، بخشی از خاک‌های تهیه شده در دمای آزمایشگاه هوا خشک شده و پس از آماده‌سازی مورداستفاده قرار گرفت.

خصوصیات فیزیکی و شیمیایی متداول خاک نظیر بافت خاک به روش هیدورمتری چهار قرائته (گی و عور، 2002)، درصد رطوبت وزنی، ظرفیت زراعی، pH و EC در عصاره گل اشباع، کربنات کلسیم کل معادل بر اساس روش تیتراسیون برگشتی با اسید و باز، ماده آلی به روش والکلی و بلاک (والکلی و بلاک، 1934)، نیتروژن کل خاک به روش کجلدال (برمنر و همکاران، 1982)، آرسنیک معادل کل به روش ریچاردز و استینهوس (1998) و آرسنیک قابل دسترس به روش ونزل و همکاران (2001) اندازه‌گیری شد.

جداسازی، غربالگری میکروارگانیسم‌های مقاوم به آرسنیک

جداسازی میکروارگانیسم‌های مقاوم به آرسنیک

یک گرم خاک در 9 میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک تهیه شده از کلرور سدیم با غلظت 9/. درصد حل و به مدت 30 دقیقه روی به هم زن دورانی با دور 120 دور در دقیقه تکان داده شد. جهت غنی‌سازی و جداسازی میکروارگانیسم‌های مقاوم، 5 میلی‌لیتر از سوسپانسون حاصل به 50 میلی‌لیتر محیط کشت BSMY حاوی 150 میکروگرم در میلی لیتر آرسنیک پنج ظرفیتی (از منبع آرسنات سدیم (Na3AsO4.9H2O)) منتقل گردید. ارلن-های تلقیح شده به مدت 48 ساعت در شیکر انکوباتور با دمای 27 درجه سانتیگراد و دور 120 دور در دقیقه نگه-داری شد. 5 میلی‌لیتر از سوسپانسون حاصل به 50 میلی-لیتر محیط کشت BSMY حاوی 250 میکروگرم در میلی لیتر آرسنیک پنج ظرفیتی منتقل و مجدداً عمل انکوباسیون مشابه مرحله قبل صورت پذیرفت. در ادامه فرایند غنی-سازی عمل انتقال از سوسپانسیون حاصل به محیط کشت BSMY حاوی 500 میکرو گرم در میلی‌لیتر آرسنیک پنج ظرفیتی مشابه با شرایط ذکر شده طی دو مرحله انجام شد. جهت جداسازی میکروارگانیسم‌های مقاوم به آرسنیک، 100 میکرولیتر از محیط کشت غنی شده بر روی پلیت-های حاوی محیط کشت BSMY دارای 500 میکروگرم در میلی لیتر آرسنیک پنج ظرفیتی پخش و پلیت‌ها به مدت 48 ساعت در دمای 27 درجه سانتیگراد خوابانیده شدند. کلونی جدایه‌های دارای مقاومت بالا در پلیت ظاهر شده که این کلونی‌ها طی چندین مرحله تهیه زیرکشت، خالص‌سازی گردیدند (آپاراجیتا و همکاران،2013).

تعیین مقاومت سویه‌های جداسازی شده نسبت به آرسنیک

بدین منظور سویه‌های مورد مطالعه در 15 میلی لیتر محیط کشت BSMY حاوی 500، 750، 1000، 1250، ۱۵۰۰،۱۷۵۰ و 2000 میلی‌گرم در لیتر در لیتر As(III) (از منبع آرسنیت سدیم ($NaAsO_2$)) و 1000، 2000، 4000، 6000، 8000، 10000، 12000، 14000 و 16000میلی‌گرم در لیتر در لیتر As(V) (از منبع آرسنات سدیم (Na3AsO4.9H2O)) به مدت 72 ساعت در دمای 30C رشد داده شدند. میزان رشد میکروارگانیسم‌ها با اندازه‌گیری میزان جذب نور از طریق دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج 600 نانومتر تعیین گردید (آپاراجیتا و همکاران، 2013).

ارزیابی صفات محرک رشدی گیاهی میکروارگانیسم‌های غربالگری شده

از صفات محرک رشد گیاهی تولید اکسین (مواد شبه IAA) به روش پتن و گلیک (2002)، توان حل فسفات‌های معدنی نامحلول در محیط مایع به روش اسپربر (1985)، توان تولید سیدروفور به روش آلکساندر و زوبرر (1991)، توان تولید سیانید هیدروژن به روش سلطانی طولارود و همکاران (1386) و توان حل کنندگی ترکیبات کم‌محلول روی در محیط مایع به روش ساروانان و همکاران (2003) تعیین گردید.

آزمایش گلخانه‌ای

به‌منظور بررسی جدایه‌های دارای صفات محرک رشد گیاهی بالا و مقاوم به آرسنیک در گیاه‌پالایی خاک آلوده به آرسنیک توسط گیاه پونه، آزمایشی گلخانه‌ای در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل کاربرد و عدم کاربرد مایه تلقیح میکروارگانیسم‌ها بود.

آماده‌سازی مایه تلقیح

برای انجام این تحقیق تعداد 5 جدایه (AHG-5، AHG-6، AHG-7، AHG-10، AHG-19) برتر جداسازی شده از خاک آلوده طبیعی به آرسنیک براساس توانایی بالای آن‌ها در صفات محرک رشد گیاهی (تولید اکسین، آنزیم ACC- دآمیناز، تولید سیدروفور بالا و حل کنندگی فسفات‌های معدنی نامحلول و حل کنندگی روی) انتخاب گردید. به‌منظور تهیه مایه تلقیح، مقداری از کلنی جدایه‌های برتر به 5 ارلن مایر 250 میلی‌لیتری حاوی 100 میلی‌لیتر محیط BSMY اضافه گردید. ارلن‌های مایر تلقیح شده به مدت 48 ساعت روی به هم زن دورانی با دور 120 دور در دقیقه و دمای 28 درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

کشت گیاه و اندازه‌گیری شاخص‌های رشدی

جهت آماده‌سازی بستر جهت کاشت گیاه، خاک آلوده به آرسنیک با غلظت 897 میلی‌گرم در کیلوگرم پس از عبور از الک 4 میلی‌متری به گلدان‌های 4 کیلوگرمی منتقل گردید. ریزوم‌های گیاه پونه پس از مایه‌زنی با مایه تلقیح تهیه شده از میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه به تعداد 4 عدد در داخل هر گلدان کشت شد. گلدان‌ها پس از کشت، به گلخانه با طول دوره روشنایی 14 ساعت و با دمای متوسط 22-20 درجه سانتیگراد منتقل گردید. در طول دوره رشد گیاهان، عملیات داشت شامل آبیاری و مبارزه با علف‌های هرز در طول دوره رشد گیاهان، بر روی گلدان‌ها صورت گرفت. پس از گذشت 75 روز از تاریخ کشت، تعداد برگ و تعداد انشعابات ساقه شمارش

و میزان سطح برگ به وسیله دستگاه سطح سنج مدلADC Bioscientific Ltd اندازه‌گیری شد. سپس گیاهان برداشت، طول ساقه، وزن تر اندام هوایی، وزن تر و خشک ریشه و چگالی ریشه در آنها تعیین گردید. غلظت آرسنیک در اندام هوایی و ریشه گیاه پونه به روش ونزل و همکاران (2001) و فاکتور انتقال به روش چن و همکاران (2006) اندازه‌گیری شد.

تجزیه آماری

داده‌های حاصل از این آزمایش با نرم‌افزار آماری SAS 9.1 مورد تجزیه و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال 5 درصد انجام شد.

نتایج و بحث

خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک مورد مطالعه

برخی خواص فیزیکی و شیمیایی نمونه خاک‌های مورد استفاده در جدول 1 نشان داده شده است.

جدول 1- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی نمونه خاک‌های مورد بررسی

شماره خاک	بافت	OC	CCE	N	pH	K	P	$As_{(t)}$	$As_{(av)}$*	EC
		%				mg kg^{-1}				ds m^{-1}
1	silt loam	0/34	36/84	0/05	6/87	197/48	15/22	568/98	0/009	2/84
2	silt loam	0/25	10/96	0/01	7/4	123/44	16/7	897/58	0/188	2/51
3	Sandy clay loam	0/85	15/99	0/05	7/34	116/53	13/77	16/140	0/023	2/27
4	clay loam	1/16	10/05	0/08	7/57	85/73	18/48	49/04	0/014	0/43

As(av) آرسنیک استخراج شده با سولفات آمونیوم، As(t) آرسنیک کل، CCE کربنات کلسیم کل، OC ماده آلی

تعیین مقاومت جدایه‌های جداسازی شده نسبت به آرسنیک

جداسازی

در این پژوهش از 4 نمونه خاک مورد مطالعه در مجموع 42 جدایه جداسازی شد. 19 جدایه متفاوت از نظر شکل، رنگ، حاشیه کلنی و سرعت رشد انتخاب و پس از کشت مجدد روی محیط کشت اختصاصی آن‌ها، خالص و برای استفاده‌های بعدی در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

غربالگری

نتایج این مطالعه نشان داد که جدایه‌ها توانایی مقاومتی یکسانی نسبت به غلظت‌های مختلف استفاده شده و نوع آرسنیک نداشتند (جدول 4-4). نتایج حاصل از ارزیابی مقاومت جدایه‌های انتخاب شده نسبت به غلظت‌های مختلف آرسنیک As(III) و As(V) نشان داد که همه جدایه‌ها توانایی رشد در غلظت‌های 4000-1000 میلی‌گرم بر لیتر As(V) و 500 میلی‌گرم بر لیتر As(III) را داشتند. 9 جدایه AHG-1، AHG-2، AHG-3، AHG-5، AHG-6، AHG-7، AHG-10، AHG-11، AHG-

19توانایی رشد در تمامی غلظت‌های مورد ارزیابی آرسنیک As (V) و 7 جدایهAHG-1، AHG-2، AHG-4، AHG-5، AHG-6، AHG-7، AHG-15 در همه غلظت‌های مورد بررسی آرسنیک As(III) را و همچنین 5 جدایه AHG-1، AHG-2، AHG-6، AHG-5، AHG-7 توانایی رشد در محیط کشت با غلظت 1000 تا 16000 میلی‌گرم بر لیتر As(V) و 500 تا 2000 میلی‌گرم بر لیتر As(III) را نشان دادند (جدول 2). چانگ و همکاران (2010) و آپاراجیتا و همکاران (2013) توانایی متفاوت میکروارکانیسم‌ها را در مقابله با آرسنیک گزارش نمودند. یافته‌های این پژوهشگران نشان داد که تنها تعدادی از میکروارگانیسم‌ها توانایی رشد در حضور غلظت‌های متفاوت آرسنیک را داشتند. میکروارگانیسم‌ها هنگام مواجه شدن با فلزات سنگین، برای زنده ماندن، باید خود را با محیط سازگار و اثر فلزات را در داخل سیتوپلاسم خود کنترل کنند. بنابراین آن‌ها می‌توانند مقادیر کافی از فلزات ضروری را کسب نمایند و از تجمع مقادیر سمی اجتناب کنند. این واکنش را ریز موجودات از طریق بیان ژن‌هایی که تولیدات آن‌ها باعث خارج‌سازی فلزات اضافی از سلول می‌شوند و تولید پروتئین‌های جذب کننده فلز و سیستم‌های جذب با همبستگی بالا انجام می‌دهند. گزارش محققین حاکی از آن است که علت متفاوت بودن مقاومت به آرسنیک می‌تواند به دلیل تفاوت ذاتی

میکروارگانیسم‌ها در مقاومت به سمیت این عنصر باشد (اسمیت و همکاران، 1998). در خصوص مقاومت میکروارگانیسم‌ها نسبت به آرسنیک می‌توان گفت که زمانی که میکروارگانیسم در طی فرایند غنی‌سازی در معرض غلظت‌های مختلف این فلز قرار می‌گیرد، این امر باعث فعال‌سازی سیستم‌های مقاومت در میکروارگانیسم‌ها می‌گردد. در واقع قرار گرفتن در معرض فلز سنگین باعث فعال سازی و بیان ژن‌های واقع در پلاسمیدهای مقاومتی میکروارگانیسم‌ها می‌شود.

جدول 2- تعیین مقاومت جدایه‌ها به غلظت‌های مختلف آرسنیک (III) و (V)

جدایه	غلظت آرسنیک (III (V) (mg.l^{-1})) mg.l^{-1}															غلظت آرسنیک
	1000	2000	4000	6000	8000	10000	12000	14000	16000	500						
						750	1000	1250	150 0	1750	2000					
AHG-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					
AHG-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					
AHG-3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-					
AHG-4	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+					
AHG-5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					
AHG-6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					
AHG-7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					
AHG-8	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-					
AHG-9	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-					
AHG-10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-					
AHG-11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-					
AHG-12	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-					
AHG-13	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-					
AHG-14	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-					
AHG-15	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+					
AHG-16	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-					
AHG-17	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-					
AHG-18	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-					
AHG-19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					

*علامت + برای جدایه‌های رشد کرده در غلظت مورد نظر و علامت – جدایه‌هایی که رشد نکرده‌اند

ارزیابی صفات محرک رشد گیاهی جدایه‌های مقاوم

تولید اکسین

بر اساس جدول تجزیه واریانس تولید اکسین توسط جدایه‌های مختلف در سطح 1 درصد معنی‌دار شد (جدول 3). مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن نشان داد که همه‌ی جدایه‌ها قادر به تولید اکسین در غلظت 100 پی پی ام ال- تریپتوفان بودند، طوری‌که بیش‌ترین مقدار آن (3/41 میلی‌گرم در لیتر) مربوط به جدایه AHG-6 و کم‌ترین مقدار آن (0/36 میلی‌گرم در لیتر) متعلق به جدایه AHG-7 بود که به جزء جدایه‌های AHG-1، AHG-2 و AHG-15 اختلاف معنی‌داری با سایر جدایه‌ها داشت (جدول 4).

اکسین از مهم‌ترین هورمون‌های گیاهی است که به‌عنوان تنظیم کننده رشد گیاه شناخته شده و بر رشد، نمو و تمایز گیاه مؤثر است (گلیک، 1995). ایندول استیک اسید مهم‌ترین نوع اکسین است که از طریق متابولیسم ال- تریپتوفان توسط گیاهان و ریزجانداران مختلف مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها و جلبک‌ها تولید می‌شود. توانایی جدایه‌های مورد مطالعه در این تحقیق از نظر تولید اکسین متفاوت بود. یافته‌های این پژوهش در خصوص این فیتوهورمون با نتایج گزارش شده توسط محققین دیگر همخوانی دارد. نتایج حاصل از بررسی توان تولید IAA 11 جدایه توسط احمد و همکاران (2005) نشان داد که در غلظت‌های مختلف ال- تریپتوفان، دامنه تولید این هورمون توسط جدایه‌ها بین 5/34 تا 53/2 میکروگرم بر میلی‌لیتر متغیر بود. بنت و همکاران (2001) میزان تولید IAA توسط *سودوموناس فلورسنس* سویه M20 در محیط کشت 48 ساعته بین 5/1 تا 96 میکروگرم بر میلی‌لیتر

گزارش کردند. گزارشات حاکی از آن است که فاکتورهای محیطی و ژنتیکی بر تولید IAA توسط باکتری‌ها تأثیر می‌گذارند. از فاکتورهای محیطی مؤثر می‌توان به پ‌هاش محیط، فشار اسمزی و محدودیت کربن اشاره نمود. فاکتورهای ژنتیکی مختلفی در تولید این هورمون توسط باکتری‌ها نقش دارند که از مهم‌ترین آنها می‌توان به مکان استقرار ژن‌های درگیر در تولید IAA در ژنوم باکتری و حالت بیان ژن اشاره نمود (اسپیین و همکاران، 2007). تفاوت در میزان تولید IAA توسط جدایه‌های مختلف را می‌توان به توانایی متفاوت این ریزموجودات در بهره‌گیری و سازگاری با شرایط محیطی و همچنین تفاوت آنها در عوامل ژنتیکی درگیر در سنتز این هورمون نسبت داد.

توان حل کنندگی فسفات‌های معدنی نامحلول

نتایج حاصل از ارزیابی انحلال تری کلسیم فسفات در محیط مایع توسط جدایه‌ها نشان داد که همه‌ی جدایه‌ها قادر به انحلال آن بودند. بیش‌ترین مقدار انحلال فسفات متعلق به جدایه AHG-7 (486/036 میلی‌گرم در لیتر) و کمترین آن به جدایه AHG-10 (251/69 میلی‌گرم در لیتر) و همچنین متوسط انحلال فسفات توسط جدایه‌ها در محیط مایع برابر 329 میلی‌گرم در لیتر بود. مقایسه pH محیط کشت حاوی جدایه‌های مختلف با تیمار شاهد بدون باکتری نشان داد که تمامی جدایه‌ها موجب کاهش معنی‌دار pH شدند. کم‌ترین مقدار pH (4/32) مربوط به جدایه AHG-6 و بیش‌ترین pH مربوط به جدایه AHG-11 و pH تیمار شاهد برابر 5/59 بود (جدول 4). توانایی انحلال ترکیبات معدنی نامحلول فسفر میکروارگانیسم‌های خاک توسط محققین مختلف گزارش شده است (جوگ و همکاران، 2014؛ لین و همکاران، 2016؛ نوری و سعود، 2012). مهم‌ترین مکانیسم استفاده شده توسط این میکروارگانیسم‌ها در انحلال ترکیبات معدنی نامحلول فسفر تولید اسیدهای آلی و معدنی (به‌خصوص آلی) و کاهش پ‌هاش درون خود میکروارگانیسم و محیط اطراف آن است. در این حالت گروه کربوکسیل و هیدروکسیل اسیدهای ترشح شده کاتیون‌ها (از قبیل آهن، آلومینیوم وکلسیم) را کلات نموده و باعث اسیدی شدن محیط و در نتیجه افزایش حلالیت ترکیبات نامحلول می‌شوند.

توان حل‌کنندگی ترکیبات کم‌محلول روی در محیط مایع

تجزیه واریانس انحلال ترکیبات کم‌محلول روی در محیط مایع حاوی نمک‌های نامحلول ZnO و ZnCO3 در سطح 1 درصد معنی‌دار شد (جدول 3). از نظر انحلال روی در محیط حاوی اکسید روی بیشترین و کمترین مقدار مربوط به جدایه‌های AHG-7 (5/31 میلی‌گرم در لیتر) و AHG-15 (0 میلی‌گرم در لیتر) بود که جدایه AHG-7 اختلاف معنی‌داری با دیگر جدایه‌ها داشت. بیش‌ترین کاهش pH در این محیط به جدایه AHG-7 تعلق داشت. در محیط مایع حاوی ZnCO3 نیز بیش‌ترین انحلال روی در جدایه AHG-7 (15/9 میلی‌گرم در لیتر) و کم‌ترین انحلال (0 در جدایه‌های AHG-2، AHG-10، AHG-11، AHG-19 میلی‌گرم در لیتر) مشاهده گردید که اختلاف معنی‌داری با سایر جدایه‌ها داشتند. (جدول4). میکروارگانیسم‌های محرک رشد گیاه با مکانیسم‌هایی از قبیل ترشح اسیدهای آلی، یون+H، ترکیبات کلات کننده و همچنین اسیدهای معدنی (سولفوریک، کربنیک و ...) می‌توانند موجب افزایش انحلال ترکیبات کم محلول روی گردند (شهاب و احمد، 2008). در حالت کلی، حلالیت ترکیبات روی با افزایش pH از حالت اسیدی به قلیایی با رسوب به‌صورت هیدروکسید، فسفات، کربنات و سیلیکات‌ها کاهش می‌یابد. در پژوهش حاضر اکثر جدایه-ها توانایی انحلال ZnO و ZncO3 را داشتند که دلیل آن می‌تواند تولید اسیدهای آلی و یون H^+ و کاهش پ‌هاش توسط این جدایه‌ها باشد، به طوری که با کاهش pH محیط کشت، انحلال روی افزایش یافت.

تولید سیدروفور و سیانید هیدروژن

تنها 50 درصد از جدایه‌ها توانایی رشد و تولید سیدروفور به‌صورت هاله زرد تا نارنجی در اطراف کلنی در محیط CAS-Agar را داشتند. بیشترین (2/16) و کمترین (0) نسبت قطر هاله به کلونی به ترتیب به جدایه AHG-10 و جدایه‌های AHG-1، AHG-2، AHG-7، AHG-11، AHG-15 تعلق داشت و همچنین تمامی جدایه‌های مورد بررسی توانایی تولید سیانید هیدروژن را نداشتند. جدایه‌های AHG-2، AHG-7 و AHG-15 سیانید هیدروژن کم و جدایه AHG-11 تولید متوسط و بقیه جدایه‌ها تولید سیانید هیدروژن را دارا نبودند (جدول 4). سیدروفور تولیدی توسط ریزموجودات ریزوسفری با آهن (III) کمپلکس پایداری را تشکیل می‌دهد که جذب آن فقط توسط ریزجانداران دارای پذیرنده‌ی اختصاصی در غشا امکان‌پذیر می‌باشد.

بنابراین جذب آهن توسط عوامل بیمارگر گیاهی بدون پذیرنده امکان‌پذیر نبوده و رشد آنها مختل می‌گردد (اسیلوان و اگارا، 1992). تولید سیدروفور توسط باکتری‌های جداسازی شده از خاک توسط محققین مختلف گزارش شده است (رسولی صدقیانی و همکاران، 1384؛ سلطانی و همکاران، 1386؛ عباس‌زاده و همکاران، 2009). در ارزیابی توانایی تولید سیدروفور در این پژوهش مشاهده گردید که علی‌رغم تلقیح با جمعیت اولیه تقریباً یکسان جدایه‌های مورد مطالعه در محیط کشت

CAS-Agar، با گذشت زمان 50 درصد از جدایه‌ها توانایی رشد در این محیط را نداشتند و باقی جدایه‌ها نیز میزان رشدجمعیت متفاوتی را از خود نشان دادند، طوری- که با گذشت زمان این تفاوت در رشد باعث ایجاد اختلاف مشهود در قطر کلنی جدایه‌ها گردید. از طرف دیگر از نظر لوپر و هنکلس (1999) قطر هاله تولیدی توسط میکروارگانیسم‌ها می‌تواند به‌عنوان معیاری از میزان تولید سیدروفور توسط آنها به‌کار رود. با توجه به این مطالب می‌توان گفت که نسبت قطر هاله به کلنی می‌تواند شاخص نسبتاً خوبی برای مقایسه توان تولید سیدروفور در جدایه‌ها باشد.

در این تحقیق جدایه‌های AHG-2، AHG-7 و AHG-15 توانایی تولید سیانید هیدروژن به مقدار کم، جدایه AHG-11 توانایی تولید در حد متوسط و بقیه جدایه‌ها فاقد توانایی تولید این متابولیت بودند (جدول4). یافته‌های حاصل از پژوهش سلطانی و همکاران (1386) و آذرمی و همکاران (1393) نیز نشان داد که تمام باکتری‌های مورد مطالعه توانایی تولید سیانید هیدروژن را نداشتند.

جدول 3- تجزیه واریانس صفات محرک رشدی در جدایه‌های مختلف

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		حل‌کنندگی فسفر	حل‌کنندگی ZnO	حل‌کنندگی $ZnCO_3$	اکسین	سیدروفور	pH
جدایه‌ها	9	0/490**	12/6**	102**	4/25**	2/18**	0/478**
خطا	20	0/072	0/020	0/130	0/103	0/003	0/074
cv	-	5/48	7/99	7/05	23/1	7/98	5/50

**: معنی‌دار بودن در سطح 1 درصد

جدول 4- مقایسه میانگین صفات محرک رشدی در جدایه‌های مختلف

جدایه‌ها	pH	حل‌کنندگی فسفر	حل‌کنندگی ZnO	حل‌کنندگی $ZnCO_3$	اکسین	سیدروفور	HCN
		میلی‌گرم در لیتر				هاله به کلونی	*
AHG-1	5/08bc	335 c	2/30 d	3/33 e	0/400 g	0/00 f	0
AHG-2	5/26c	305 d	0/00 f	0/00 g	0/520 gf	0/00 f	1
AHG-4	5/12bc	277 e	1/12 e	8/01 d	0/843 e	1/13 d	0
AHG-5	5/10bc	381 b	3/57 c	8/23 c	1/47 d	1/08 e	0
AHG-6	4/32a	392 b	4/70 b	12/7 b	3/41 a	1/48 c	0
AHG-7	4/57a	485 a	5/31 a	15/9 a	0/360 g	0/00 f	1
AHG-10	4/42a	251 f	0/00 f	0/00 g	3/06 b	2/16 a	0
AHG-11	5/39c	282 e	0/00 f	00/00 g	0/680 ef	0/00 f	2
AHG-15	5/34c	305 d	1/08 e	2/98 f	0/520 gf	0/00 f	1
AHG-19	4/62ab	281 e	0/00 f	0/00 g	2/62 c	1/71 b	0

در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح 5 درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشند

*: 0: عدم تولید، 1: تولید کم، 2: تولید متوسط

بررسی تأثیر مایه‌زنی با جدایه‌های مقاوم به آرسنیک دارای صفات محرک رشد گیاهی بالا بر شاخص‌های رشدی گیاه پونه

تعداد برگ

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تأثیر جدایه‌های مقاوم جداسازی شده از خاک آلوده به آرسنیک بر شاخص تعداد برگ در نمونه خاک مورد بررسی در سطح احتمال 1 درصد معنی‌دار بود (جدول 5). بیش‌ترین تعداد برگ (82 برگ در گلدان) در تیمار مایه- زنی شده با جدایه AHG-19 و کمترین تعداد برگ (10 برگ در گلدان) در تیمار شاهد مشاهده گردید که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار داشتند (جدول 6).

رشد گیاه که با پارامترهایی مانند سطح برگ، ماده خشک و تعداد برگ تعیین می‌شود، شاخص اصلی برای ارزیابی وضعیت زنده‌مانی و سازگاری گیاه در شرایط زیست محیطی است. کاپولینک و همکاران (1982) افزایش تعداد برگ و دوام سطح برگ گیاه را در اثر تلقیح بذر با باکتری‌های محرک رشد گزارش نمودند. آن‌ها اظهار داشتند که این افزایش را می‌توان به کاهش تولید اتیلن در گیاه توسط باکتری‌های محرک رشد و تاخیر در ایجاد لایه جداگر در دمبرگ و جلوگیری از ریزش برگ نسبت داد. حمیدی و همکاران (2007) گزارش کردند که تلقیح بذر ذرت علوفه‌ای با *آزوسپریلوم* باعث گسترش دوره تولید برگ در گیاه شده و تعداد برگ در هر بوته را افزایش داد. آن‌ها دلیل این امر را تأثیر باکتری‌ها در تأمین مواد غذایی برای گیاه و افزایش تولید فیتوهورمون‌های محرک رشد از قبیل اکسین، سیتوکینین و جیبرلین دانستند که این هورمون‌های گیاهی باعث افزایش تقسیم سلولی و رشد سلول‌ها و همچنین تداوم رشد برگ می‌شوند. افزایش تعداد برگ گیاه گوجه‌فرنگی تلقیح شده با کودهای زیستی در یک خاک آلوده به کادمیوم توسط نعمتی و همکاران (1394) گزارش شد.

تعداد انشعابات ساقه

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که مایه‌زنی گیاه پونه با جدایه‌های مقاوم مورد مطالعه تعداد انشعابات ساقه را در سطح احتمال 1 درصد به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر قرار داد (جدول 5). بیش‌ترین تعداد انشعابات ساقه (5 عدد در گلدان) در گیاهان تیمار شده با جدایه‌های AHG-19 و AHG-6 و کمترین تعداد انشعابات ساقه (2 عدد در گلدان) در شاهد حاصل شد که با همه تیمارها اختلاف معنی‌دار داشت (جدول6). مرادی (1388) کاربرد انواع کودهای آلی و بیولوژیک را در افزایش تعداد شاخه اصلی و فرعی گیاه دارویی رازیانه معنی‌دار گزارش کرد. تولید هورمون‌های رشد گیاهی از قبیل اکسین و سیتوکینین توسط باکتری‌های محرک رشد در افزایش انشعابات فرعی در گیاه سهیم هستند (وسی، 2003).

ارتفاع بوته

در این پژوهش اثر مایه‌زنی گیاه پونه با جدایه-های مورد مطالعه بر شاخص طول ساقه در سطح احتمال 1 درصد معنی‌دار بود (جدول 5). بیش‌ترین طول ساقه (23 سانتی‌متر در گلدان) و کوتاه‌ترین طول ساقه (6/33 سانتی‌متر در گلدان) به ترتیب مربوط به گیاهان تیمار شده با جدایه AHG-19 و شاهد بود که با همه تیمارها اختلاف معنی‌دار داشت (جدول 6) محققین مختلف افزایش ارتفاع بوته گیاهان به دنبال مایه زنی با باکتری‌های محرک رشد گیاهی در بسیاری از گیاهان نظیر گوجه‌فرنگی (گلیک و همکاران، 1995)، رازیانه (محفوظ و شرف الدین، 2007)، مرزه (رضوانی مقدم، 1383) و ذرت (غلامی و همکاران، 2009) را گزارش نموده‌اند. باکتری‌های ریزوسفری و محرک رشد می‌توانند ارتفاع گیاه را از طریق هورمون‌های گیاهی مانند اکسین، افزایش فراهمی مواد غذایی، آسان کردن جذب مواد غذایی، کاهش سمیت فلزات سنگین در گیاهان رشد یافته در خاک‌های آلوده، جلوگیری از فعالیت عوامل بیماری‌زا و القای مقاومت سیستماتیک به عوامل بیماری‌زا افزایش دهند (بورد و همکاران،2000؛ دالپکومار و همکاران، 1992؛ بلیمو و همکاران، 2001).

سطح برگ

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر مایه‌زنی گیاه پونه با جدایه‌های مود مطالعه بر شاخص سطح برگ در سطح احتمال 1 درصد معنی‌دار بود (جدول5). بیش‌ترین سطح برگ (253 میلی‌متر مربع در گلدان) مربوط به تیمار مایه‌زنی شده با جدایه AHG-10 و کمترین سطح برگ مربوط به تیمار شاهد (104/33 میلی‌متر مربع در گلدان) بود که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت (جدول 6). تحقیقات متعدد نشان داده است که وقتی گیاهان در معرض غلظت‌های بالای فلزات سنگین قرار می‌گیرند وزن تر و خشک، طول بخش هوایی و ریشه در آن‌ها کاهش می‌یابد (چانگ و هانگ، 2006). در این پژوهش نیز کاهش سطح برگ در تیمار شاهد مشاهده گردید. فلزات سنگین خسارات قابل رویتی نظیر کلروزیس (زردی) و نکروزیس (قهوه‌ای) در برگ‌های گیاهان به وجود می‌آورند و باعث کاهش طول و قهوه‌ای شدن ریشه‌ها می‌گردند. کاهش رشد ممکن است به دلیل کاهش میزان فتوسنتز باشد. زیرا نشان داده شده است که قرارگیری گیاهان در معرض غلظت‌های بالای فلزات سنگین موجب کاهش میزان فتوسنتز می‌شود. آسیب به فتوسنتز اساساً در اثر کاهش کلروفیل و افزایش پر اکسیداسیون لیپیدها رخ می‌دهد (ویتوریا و همکاران، 2005). در پژوهش حاضر مایه‌زنی با جدایه‌های مقاوم باعث افزایش معنی‌دار سطح برگ نسبت به تیمار شاهد شد. مایه‌زنی گیاه گوجه‌فرنگی با کودهای زیستی در یک خاک آلوده به کادمیوم باعث افزایش سطح برگ در این گیاه شد (نعمتی و همکاران، 1394). مطالعات نشان داده است که باکتری‌های محرک رشد، با تولید انواع مواد مؤثر در رشد گیاه مانند ویتامین‌ها، هورمون‌های محرک رشد، کاهش میزان تولید رادیکال‌های آزاد در گیاه تحت تنش فلز سنگین، کاهش میزان اتیلن تنشی باعث بهبود رشد

گیاه تحت شرایط تنش فلزات سنگین شوند (زهیر و همکاران، 2004).

وزن تر اندام هوایی

در تحقیق حاضر تأثیر مایه‌زنی گیاه پونه با جدایه‌های مورد مطالعه بر شاخص وزن تر اندام هوایی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول 5). گیاهان مایه‌زنی شده با جدایه AHG-10 بیش‌ترین وزن تر اندام هوایی (2/7 گرم در گلدان) را دارا بودند که با همه تیمارها اختلاف معنی‌داری داشتند در حالی که تیمار شاهد کم‌ترین وزن تر اندام هوایی (0/75 گرم در گلدان) را داشت (جدول6). مطالعات و تحقیقات مختلف حاکی از آن است که تحت تنش فلزات سنگین باکتری‌های محرک رشد گیاهی می‌توانند با تجمع متابولیت‌هایی از قبیل پرولین و کربوهیدرات‌های محلول و همچنین بهبود میزان جذب آب و عناصر غذایی باعث افزایش میزان وزن گیاه شوند.

وزن تر و خشک و حجم ریشه

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که کاربرد جدایه‌های مورد مطالعه بر شاخص وزن تر و خشک ریشه اثر معنی‌داری در سطح احتمال 1 درصد داشت (جدول 5). بیش‌ترین وزن تر ریشه (6/7 گرم در گلدان) درگیاهان مایه‌زنی شده با جدایه‌ی AHG-6 و کمترین آن (2/9 گرم در گلدان) در تیمار شاهد و بیش-ترین وزن خشک ریشه (2/6 گرم) در تیمار مایه‌زنی شده با جدایه AHG-19 و کم‌ترین آن در تیمار مایه‌زنی شده با تیمار شاهد (0/65 گرم در گلدان) حاصل شد که هردو تیمار با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشتند (جدول 6). در این پژوهش مایه‌زنی گیاه پونه با جدایه‌های مورد مطالعه اثر معنی‌داری در سطح احتمال 1 درصد بر شاخص حجم ریشه داشت (جدول 5). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که گیاهان مایه‌زنی شده با جدایه AHG-6 بیش‌ترین حجم ریشه (5/35 سانتی‌متر مکعب در گلدان) را داشتند و کمترین آن (1/6 سانتی‌متر مکعب در گلدان) در تیمار شاهد مشاهده گردید که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان داد (جدول 6). در تحقیق حاضر گیاه پونه با جدایه‌های مورد مطالعه باعث افزایش رشد ریشه گردید. دوبلیر و همکاران (2001) نشان دادند باکتری های محرک رشد با ترشح موادی مانند اکسین، جیبرلین و سیتوکینین موجب این تغییرات می‌شوند. ریشه‌ها به‌عنوان سطوح جذب کننده‌ی آب و مواد غذایی تأثیر بسیار زیادی در جذب آب و املاح گوناگون دارند. تنش فلزات سنگین ازجمله عوامل محدود کننده‌ی رشد ریشه است که کاهش رشد ریشه فعالیت‌های رشدی گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد. عدم توسعه و گسترش مناسب سیستم ریشه‌ای باعث کاهش سطوح جذب کننده‌ی مواد غذایی، تغییر در ساختار غشای سلولی و کاهش جذب و محتوای آب می‌شود که این امر بر فرایندهای فیزیولوژیکی مانند تعرق، تنفس و فتوسنتز اثر گذاشته و در نهایت موجب کاهش رشد می‌شود (شارما و دوبی، 2005). تحت شرایط تنش فلزات سنگین، ریزموجودات محرک رشد به‌خصوص با کاهش میزان اتیلن تنشی از طریق تولید ACC- دآمیناز و توسعه سیستم ریشه‌ای با تولید IAA باعث بهبود رشد گیاه می‌شوند (بورد و همکاران، 2000). افزایش وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی گیاه در حضور میکروارگانیسم‌های محرک رشد در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین توسط محققین مختلف گزارش شده است (کاظم‌علیلو و رسولی‌صدقیانی،1391؛ ویواس و همکاران، 2003؛ پازکی، 1391).

جدول 5- تجزیه واریانس تأثیر جدایه‌های جداسازی شده از خاک آلوده بر صفات رشدی پونه

منابع تغییرات	درجه آزادی	تعداد برگ	طول ساقه	انشعابات ساقه	سطح برگ	وزن تر ریشه	وزن تر اندام هوایی	وزن خشک ریشه	حجم ریشه
							میانگین مربعات		
جدایه	5	1754/ 19**	98/76**	3/41**	1044/19**	10/14**	1/60**	1/58**	4/93**
خطا	12	3/26	2/1	0/36	151/45	0/30	0/07	0/083	0/38
ضریب تغییرات (%)	-	4/68	10/92	16/91	6/71	11/08	16/49	22/95	21/12

**: معنی‌دار بودن در سطح 1 درصد

در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح 5 درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشند

جدول 6- مقایسه میانگین اثر جدایه های مقاوم به آرسنیک بر صفات رشدی پونه

جدایه	تعداد برگ (عدددر- گلدان)	طول ساقه (سانتی متر در گلدان)	انشعابات ساقه (عدددر- گلدان)	سطح برگ (میلی‌مترمربع در گلدان)	وزن تر ریشه (گرم‌در- گلدان)	وزن تر اندام هوایی (گرم‌در- گلدان)	وزن خشک ریشه (گرم‌در- گلدان)	حجم ریشه (سانتی‌متر مکعب‌در- گلدان)
AHG-5	26e	16/66b	3/6b	a232	3/4bc	2/5ab	0/83cd	2/33c
AHG-6	52/33b	12c	5a	160/67b	6/7a	1/5c	1/85b	5/35a
AHG-7	18/33f	8/66de	2/6 bc	161b	6/8a	2/03b	1/73d	2/66c
AHG-10	38d	17b	3/3bc	253/3a	7/2a	2/7a	1/33c	2/66c
AHG-19	82/33a	23a	5a	239a	4/1b	1/3c	2/6a	4b
شاهد	10g	6/33e	2/3c	104/33d	2/9c	0/75d	0/65d	1/6c

بررسی تأثیر مایه‌زنی با جدایه‌های مقاوم به آرسنیک دارای صفات محرک رشد گیاهی بالا بر غلظت آرسنیک ریشه و اندام هوایی و میزان فاکتور انتقال گیاه پونه

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که تأثیر مایه‌زنی گیاه پونه با جدایه‌های مورد مطالعه بر غلظت آرسنیک ریشه و اندام هوایی و میزان فاکتور انتقال در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول 7). بیشترین میزان غلظت آرسنیک در اندام هوایی و ریشه گیاهان پونه مایه‌زنی شده به‌ترتیب با جدایه‌های AHG-6 و AHG-5 مشاهده گردید که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشتند. بیشترین میزان فاکتورانتقال آرسنیک در گیاهان تلقیح شده با جدایه‌های AHG-6 و AHG-19 مشاهد گردید (جدول 8). در این پژوهش کاربرد جدایه-های محرک رشد باعث افزایش معنی‌دار غلظت آرسنیک در ریشه و اندام هوایی در گیاهان تلقیح شده در مقایسه با گیاهان شاهدگردید. این نتیجه نشان می‌دهد که جدایه-های محرک رشد استفاده شده در این پژوهش توانسته‌اند با افزایش توسعه سیستم ریشه‌ای از طریق تولید اکسین و همچنین با بهبود رشد گیاه در شرایط تنش ناشی از فلز سمی آرسنیک با مکانیسم‌هایی مانند کاهش میزان اتیلن تنشی، تولید متابولیت‌های مورد نیاز برای مقابله با تنش منجمله پرولین و افزایش میزان فتوسنتز باعث افزایش جذب این عنصر توسط گیاه گردند. افزایش جذب فلزات سنگین توسط گیاه در حضور باکتری‌های محرک رشد توسط واسیلو و همکاران (2002)، کوفنر و همکاران (2008) و دلامیکو و همکاران (2008) نیز گزارش شده است. در گیاه‌پالایی فاکتور انتقال بیانگر این است که فلز سنگین مورد نظر در کدام قسمت گیاه (ریشه یا اندام هوایی) تجمع بیشتری داشته است. گیاهی که برای گیاه-پالایی مورد استفاده قرار می‌گیرد، غلظت عنصر در اندام هوایی آن در مقایسه با ریشه بیشتر است. مقدار فاکتور انتقال بیشتر حاکی از آن است که که گیاه می‌تواند فلز سنگین را از خاک بگیرد و با بازده بالایی در اندام هوایی ذخیره کند (زو و سونگ، 2004؛ هاکو و همکاران، 2008). در این پژوهش میزان فاکتور انتقال در گیاه پونه بالای یک بود. این موضوع نشان می‌دهد که این گیاه توانسته به‌طور مؤثر در انتقال آرسنیک از ریشه به اندام هوایی عمل کند. این ویژگی گیاه پونه می‌تواند عاملی در جهت موفقیت گیاه‌پالایی خاک‌های آلوده به آرسنیک توسط این گیاه باشد. در تحقیق حاضر کاربرد جدایه‌های محرک رشد به‌خوبی توانست باعث افزایش خیلی مؤثر فاکتور انتقال آرسنیک در گیاه پونه مایه‌زنی شده در مقایسه با شاهد گردد، به‌طوریکه در برخی از تیمارها باعث افزایش چند برابری این شاخص گردید. این یافته را می‌توان این‌گونه توجیه نمود که جدایه‌های محرک رشد با افزایش رشد گیاه شرایط را برای جذب آرسنیک بیشتر فراهم نموده‌اند. افرایش فاکتور انتقال فلزات سنگین در گیاه در حضور باکتری‌های محرک رشد توسط پژوهشگران گزارش شده است (وو و همکاران، 2006؛ استوار و همکاران، 1391).

نتیجه‌گیری

مجموع نتایج این تحقیق حاکی از آن است که گیاه پونه می‌تواند به‌عنوان یک گیاه مناسب جهت پایش سبز خاک آلوده به آرسنیک استفاده گردد. همچنین نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که مایه‌زنی گیاه پونه با جدایه‌های برتر (از نظر مقاومت به آرسنیک و صفات محرک رشد گیاهی) میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه با افزایش شاخص‌های رشدی گیاه، افزایش چشمگیر میزان غلظت آرسنیک در ربشه و اندام هوایی و همچنین افزایش میزان فاکتور انتقال آرسنیک در گیاه می‌تواند باعث افزایش راندمان گیاه‌پالایی خاک آلوده به آرسنیک گردد که در این خصوص جدایه‌های AHG-19 و AHG-6

بالاترین کارایی را نشان دادند. بنابراین پیشنهاد می‌گردد اثر گیاه پونه و جدایه‌های مورد مطالعه در گیاه‌پالایی خاک آلوده به آرسنیک و دیگر فلزات سنگین در شرایط مزرعه بررسی گردد

جدول 7- تجزیه واریانس تأثیر جدایه‌های مورد مطالعه بر فاکتور انتقال و غلظت آرسنیک ریشه و اندام هوایی بر صفات رشدی پونه

		میانگین مربعات		
		فاکتور انتقال آرسنیک	غلظت آرسنیک	
منابع تغییرات	درجه آزادی		اندام هوایی	ریشه
جدایه	5	26/9567522**	0/00238730**	0/00005250**
خطا	12	1/4221000	0/00000850	0/00000754
ضریب تغییرات (%)	-	30/52	6/6	21/96

**: معنی‌دار بودن در سطح 1 درصد

جدول 8- مقایسه میانگین تأثیر جدایه¬های مورد مطالعه بر فاکتور انتقال و غلظت آرسنیک ریشه و اندام هوایی بر صفات رشدی پونه

جدایه	فاکتور انتقال آرسنیک	غلظت آرسنیک (%)	
		اندام هوایی	ریشه
AHG-5	3/056b	0/060c	0/020a
AHG-6	8/236a	0/080a	0/010b
AHG-7	2/003b	0/020d	0/010b
AHG-10	1/726b	0/025d	0/015b
AHG-19	7/116a	0/067 b	0/010b
شاهد	1/303b	0/013 e	0/010b

در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح 5 درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشند

فهرست منابع:

1. استوار، پ. خاوازی، ک. ملکوتی، م ج. 1391. نقش باکتری‌های مفید خاکزی در افزایش کارایی پالایش سبز یک خاک آلوده به کادمیوم. 1 / مجله پژوهش‌های خاک (علوم خاک و آب). جلد 26، شماره 2، صفحه 175-183.
2. آذرمی، ف. مظفری، و. عباس‌زاده دهجی، پ. حمیدپور، م. 1394. جداسازی باکتری‌های *سودوموناس فلورسنس* از ریزوسفر درختان پسته و تعیین برخی خصوصیات محرک رشدی آن‌ها. نشریه زیست شناسی خاک. جلد2. شماره2. ص 1-14.
3. پازکی، ع. 1391. بررسی اثر سرب، *آزوسپریلیوم* و هیومیک اسید بر محتوی کلروفیل، وزن ریشه و اندام هوایی گیاه کلزا. مجله پژوهش‌های به‌زراعی. جلد 4، شماره 2، صفحه 173-184.
4. حمیدی، آ .اصغرزاده، ا .چوکان، ر .دهقان شعار، م .قلاوند، ا .و ملکوتی، م .ج .1389 . تأثیر کاربرد باکتری‌های افزاینده رشد (PGPR) بر تسهیم ماده خشک و برخی ویژگی‌های رشد گیاه ذرت در شرایط گلخانه .مجله پژوهش‌های علوم خاک و آب.24 (1): 55-67.
5. رسولی‌صدقیانی، ح . خاوازی، ک . رحیمیان، ح . ملکوتی، م . ج . و اسدی‌رحمانی، ه. 1384 . بررسی تراکم جمعیت وشناسایی سودوموناس‌های فلورسنت در ریزوسفر گندم مناطق مختلف ایران . مجله علوم خاک و آب . جلد26، 195-206.

6. رضوانی مقدم، پ. بخشایی، س. غفوری، ا. جعفری، ل. 1393. بررسی اثر مدیریت مختلف کودی بر تولید گیاه دارویی مرزه (*Saturea hortensis*) در شرایط مشهد، نشریه پژوهش‌های زراعی ایران. سال چهارم. دوره دوازدهم. شماره اول. ص 33-27.

7. رفعتی، م. خراسانی، ن. مراقبی، ف. شیروانی، ا. 1390. توانایی گونه‌های توت سفید (*Morus alba*) و سپیدار (*Populus alba*) در تثبیت و برداشت فلزات سنگین. مجله منابع طبیعی ایران، دوره 65، شماره 2، ص 181-191.

8. سلطانی طولارود، ع . صالح راستین، خاوازی، ک . اسدی رحمانی، ه و عباس‌زاده دهجی، پ . 1386. جداسازی و بررسی صفات محرک رشد گیاهی برخی از *سودوموناس‌های فلورسنت* بومی خاک‌های ایران . مجله علوم خاک و آب، جلد 21، 289-277.

9. عیسی زاده لزرجان، س. اسدی کپورچال، ص، همایی، م. پالایش گیاهی و تخمین زمان بهینه پالایش خاک‌های آلوده به کادمیم با استفاده از گیاه اسفناج (*Spinacia oleracea L.*). نشریه بوم شناسی کشاورزی. جلد 6، شماره 4، زمستان 1393 ، صفحه 926-916.

10. کاظم‌علیلو، س . رسولی‌صدقیانی، م. ح. 1391. اثر آلودگی کادمیومی خاک بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیک گیاه بنگدانه در حضور و عدم حضور ریزجانداران محرک رشد گیاه. نشریه دانش آب و خاک. جلد 22، شماره 4، صفحه 17-30.

11. کریمی، ن. خان احمدی، م. مرادی، ب. 1392. اثر غلظت‌های مختلف سرب بر برخی پارامترهای فیزیولوژیکی گیاه کنگرفرنگی. مجله پژوهش‌های تولید گیاهی. سال پنجم. دوره بیستم. شماره اول، صفحه 62- 49.

12. لادن، ش . 1388. بررسی زیست‌پالایی خاک‌های آلوده به آرسنیک توسط پیازچه و کلم زینتی .پایان‌نامه دوره ارشد خاکشناسی .دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس .تهران، ایران.

13. مرادی، ر. 1388. تأثیر کودهای بیولوژیک و آلی بر عملکرد، اجزای عملکرد دانه و میزان اسانس گیاه رازیانه (*Foeniclum vulgar*). پایان‌نامه کارشناسی ارشد اگرولوژی. دانشگاه فردوسی مشهد. مشهد.

14. نعمتی، ا. گلچین، ا. بشارتی، ح. 1394. بررسی اثرات کودهای زیستی بر عملکرد و اجزای عملکرد گیاه گوجه‌فرنگی در یک خاک آلوده به کادمیوم. نشریه پژوهش‌های خاک. جلد 29، شماره 1، صفحه 23-36.

15. .Kapulink, Y., Sarig, S., Nur, A., Okon, Y. and Henis, Y. 1982. The effect of *Azospirillum* inoculation on growth and yield of corn. Israel journal of botany. 31: 247- 255.

16. Abbas-Zadeh, P., Saleh-Rastin, N., Asadi-Rahmani, H., Khavazi, K., Soltani, A., Shoary- Nejati, R. and Miransari. M. 2010. Plant growth-promoting activities of fluorescent pseudomonads, isolated from the Iranian soils. Acta Physiologiae Plantrum. 32:281 -288.

17. Ahmad, F., Ahmad, I., and Sahir khan, M. 2005. Indoleacetic acid production by indigenous isolates of azotobacter and fluorescent pseudomonas in the presence and absence of tryptophan. Turk. J. *Biology and Fertility of Soils*. 29: 29-34.

18. Alexander, D. B. and Zuberer, D. A. 1991. Use of cgrome azural S reagents to evaluate sidrophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils.* 12: 39-45.

19. Anderson, C. R., and Cook, G. M. 2004. Isolation and characterization of arsenate-reducing bacteria from arsenic-contaminated sites in New Zealand. *current microbiology*. 48(5): 341- 347.

20. Aparajita, M., Sagarmoy G., Niharendu S., S. C. kole and suparadip S. 2013. Arsenic accumulating bacteria isolated from tannery effluent. *Bioresource Tech.* 78: 31-35.

21. Baroni, F., Boscagli, A., Protano, G., and Riccobono, F. 2000. Antimony accumulation in Achillea ageratum, Plantago lanceolata and Silene vulgaris growing in an old Sb-mining area. *Environmental Pollution*, 109: 347- 352.
22. Belimov, A.A., Safronova, V.I., Sergeyeva, T.A., Egorova, T.N., Matveyeva, V.A., Tsyganov, V.E., Borisov, A.Y., Tikhonovich, I.A., Kluge, C., Preisfeld, A., Dietz,K.J., and Stepanok, V.V. 2001. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. Canadian journal of Microbiology. 47: 642-652.
23. Belimov, A.A., Hontzeas, N., Safronova, V.I., Demchinskaya, S.V., Piluzza, G., Bullitta, S., and Glick, B.R., 2005. Cadmium- tolerant plant growth- promoting bacteria associated with the roots of India mustard (*Brassica juncea L. Czer*.). Soil Biology. Biochem. 37(2): 241-250.
24. Bent, E., Tvzun, S., Chanway, C.P., and Enebak, S. 2001. Alterations in plant growth and root hormone levels of pole pines inoculated with rhizobacteria. Canadian journal of Microbiology. 47: 793-800.
25. Bremner,J. M., and Mulvaney. C. S. 1982. Nitrogen total. P595-624. In: Page, A.L., Miller, R.H., and Keeney, D.R (eds), Methods of Soil Analysis. Part 2, 2nd ed. ASA and SSSSA. Madison, WI.
26. Burd, G. I., Dixon, D. G. and Glick, B. R. 2000. Plant growth promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. Canadian journal of Microbiology. 46:237-245.
27. Chang, J.S, and kim, I. S. 2010. Arsenit oxidation by Bacillus sp. strain Sea H-As22w isolated from coastal seawater in yeosu Bay. Environ, Eng, Res. 15: 15-21.
28. Chen, B.D., Zhu, Y.G., and Smith F.A. 2006. Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation on uranium and arsenic accumulation by Chinese brake fern (*Pteris vittata* L.) from a uranium mining-impacted soil. Chemosphere, 62: 1464-1473.
29. Dell'Amico, E., Cavalca, L., and Andreoni, V. 2008. Improvement of *Brassica napus* growth under cadmium stress by cadmium-resistant rhizobacteria. Journal of Soil Biology. and Biochemistry 40:74-84.
30. Dileepkumar, B.S., and Dube, H. C. 1992. Seed bacterization with fluorescent pseudomonads for enhanced plant growth, yield and disease control. Soil Biology. Biochem. 24: 539-542.
31. Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Vanderleyden, J., Dutto, P., Labandera-Gonzalez, C., J. Caballero-Mellado, J.F. Aguirre, Y. Kapulnik, S. Brener, S. Burdman, D. Kadouri, S. and Sarigand Y. Okon. 2001. Responses ofagronomically important crops to inoculation with Azospirillum. J. Genetic and Breeding. 40:51-60.
32. Dominguez, M. T., Maranon, T., Murilli, J. M., and Sc hulin, R. 2007. Trace elements accumulation in woo dy plants of the Guadiamar valley, SW Spain: a large – scale phytomanagement case study. Environmental. Pollution . 152: 50-59.
33. Gee, GW., and Orr, D., 2002. Partical- size analysis. Soil Science Society of America. Madison. 16:255-293.
34. Glick, B. R., D. M. Penrose and J., Li. 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growthpromoting bacteria. J. Theor. Biol. 190:3-68.
35. Glick, B. R. 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help tofeed the world. Microbiological Research 169: 30- 39.
36. Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by- free- living bacteria. Canadian Journal of Microbiology. 41: 109-117.
37. Haque, N., J. R. Peralta-Videa, G. L. Jones, T. E. Gill., and Gardea-Torresdey, J. L. 2008. Screening the phytoremediation potential of desert broom (*Baccharis sarothroides Gray*) growing on mine tailing in Arizona, USA. Environmental Pollution. 153: 362-368.

38. Hasnain. S. and Sabri. AN. 1996. Growth Stimulation of Triticum aestivum seedling under Cr- stresses by non rhizospheric pseudomonad strains. P. 36. Abstracts of the 7th International Symposium on biological Nitrogen Fixation with Non- Legumes. Kluwer Academic Publishers, the Netherlands.
39. Jog, R., Pandya M., Nareshkumar, G. and Rajkumar, S. 2014. Mechanism of phosphate solubilization and antifungal activity of Streptomyces spp. Isolated from wheat roots and rhizosphere and their application in improving plant growth. Microbiology. 160: 778–788.
40. Jones, J. and Benton. 2001. Laboratory guide for conducting soil tests and plant analysis. CRS Press. 308 p.
41. Kuffner, M., Puschenreiter, M., Wieshammer, G., Gorfer, M. and Sessitsch, A. 2008. Rhizospher bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows, plant Soils., 304:35-44.
42. Leoni L, Ambrosi C, Petrucca A and Visca P, 2002. Transcriptional regulation of Pseudobactin synthesis in the plant
43. Lin, G. , Fanyu, K., Chao, F., Jing W.and Jiaming, G. 2016. Isolation, Characterization, and Growth Promotion of Phosphate-Solubilizing Bacteria Associated with *Nicotiana Tabacum* (Tobacco). Polish Journal of Environmental Studied 25: 993-1003
44. Lin, W., Xiao, T., Wu, Y., Ao, Z. and Ning, Z. 2012. Hyperaccumulation of zinc by *Corddalis davidii* in Zn-polluted soils. Chemosphere 86: 837-842.
45. Ma, Y., Prasad, MNV., Rajkumar, M., and Freitas, H. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnology Advances.* 29: 248–258.
46. Mahfouz, S., and Sharaf-Eldin, M. 2007. Effect of mineral vs. biofertilizer in growth, yield, and essential oil content of fennel (*Feoniculum vulgare*). *International agrophysics.* 21: 361- 366.
47. Marchiol, L., Assolari, S., Sacco, P. and Zerbi, G. 2004. Phytoextraction of heavy metals by canola(*Brassica napus*) and radish (Raphanus sativus) grown on multicotaminated soil. Environ. Pollut. 132: 21-27.
48. Mudgal, V., Madaan, N., and Mudgal, A. 2010. Heavy metals in plants: phytoremediation: Plants used to remediate heavy metal pollution. Agriculture and biology journal of nourth America.1(1): 40-46.
49. Naees, M., Qurban, A., Shahbaz, M., and Fawad, A. 2011. Role of rhizobacteria in phytoremediation of heavy metals: An overview. International Research. J. Plant Science. 2: 8.220-232.
50. Nagarajkumar, M., Bhaskaran, R. and Velazhahan, R. 2004. Involvement of secondary metaboloties and extracellular lytic inhibition of Rhizoctonia solani, the rice, sheath blight pathogen. Microbiology Research enzymes produced by Pseudomonas fluorescens in159: 73-81.
51. Noori, M.S. Sh. and Saud, H.M. 2012. Potential Plant Growth- Promoting Activity of Pseudomonas sp. Isolated from Paddy Soil in Malaysia as Biocontrol Agent. Plant Pathology and Microbiology. 3:1-4.
52. O'Sullivan, D. J. and O'Gara, F. 1992. Traits of *Pseudomonas fluorescens* spp. Involved in suppression of plant root pathogens. Microbiological Reviews. 56: 662-676.
53. Ogoko, E. C. 2015. Accumulation of Heavy Metal in Soil and Their Transfer to Leafy Vegetables with Phytoremediation Potential. American Journal of Chemistry. 5(5): 125-131.
54. Patten, CL., and Glick BR . 2002. Role of Pseudomonas putidaandindole acetic acid in development of the host plant root system. Appl. Environment. Microbiol. 68: 3795-3801.

55. Rahmanian, M., Khodaverdiloo, H., Rezaei Danesh, Y., and Rasouli Sadaghiani, M. 2001. Effects of heavy matal resistant soil microbs inoculation and soil Cd concentration on growth and metal uptake of millet, couch grass and alfalfa. J. *Microbiology Research*. 5: 4. 403-410.
56. Rajkumar, M., Ae, N., Prasad, M. N. V., and Freitas, H., 2010. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. Trends Biotechnol. 28, 142-149.
57. Richards Bk and Steenhuis TS, 1998. Metal mobility at an old heavy metal loaded sluge application site. Environ poll 99:365-377.
58. Saravanan, V. S., Subramoniam, S. R. and Raj, S. A. 2003. Assessing in vitro solubilization potential of different zinc solubilizing bacterial (zsb) isolates. *Brazilian Journal of Microbiology* 34: 121-125.
59. Schippers, B., Bakker, A.W. and Bakker, A. H. M. 1987. Intractions of deleterious and and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. Annual Review of Phytopathology 25: 339-59.
60. Shahab, S. and Ahmed, N. 2008. Effect of various parameters on the efficiency of zinc phosphate solubilization by indigenous bacterial isolates. *African Journal of Biotechnology*. 7: 1543-1549.
61. Sharma, P., and Dubey, R. 2005. Lead toxicity in plants. Plant physiology. 17: 35- 52.
62. Sharma, S., Kaul, A., Metwally, K. Goyal, I., Finkemeier, K., and Dietz, J. 2004. Cadmium toxicity in barley (Hordeum vulgar) as affected by varying Fe nutritional status. Plant science. 166: 1287- 1295.
63. Smith, S. E. and Read, D.J.1997. mycorrhizal symbiosis. 2 nded. Academic press, London. Soil Environ. 30: 1. 18-26.
64. Spaepen, S., Vanderleyden, J. and Roseline, R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant Signaling. FEMS Microbiol Rev. 1-24.
65. Sperber, J. I. 1958. the incidence of apatite soulbilizing organisms in the rhizospher. Aust. J. Agr. Res. 9: 778-781.
66. Vassilev, A., Vangronsveld, J. and Yordanov, I. 2002. Cadmium phytoextraction: Present state, Biological Backgrounds and Research Needs. BULG. J. plant physiol, 28(3-4): 68-95.
67. Vessey, J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant Soil. 255: 571-586.
68. Vitoria, A.P., Dacunha, M., and Azevedo, R.A. 2005. Ultra structural changes of radish leaf exposed to cadmium. Environmental and Experimental Botany, 58: 47-52.
69. Vivas A., Vo¨ro¨s I., Biro´ B., Barea J.M., Ruiz-Lozano J.M., and Azco´n R. 2003. Beneficial effects of indigenous Cd-tolerant and Cdsensitive Glomus mosseae associated with a Cd-adapted strain of *Brevibacillus brevis* in improving plant tolerance to Cd contamination. Applied Soil Ecology. 24:177–186.
70. Walkly, A., I. and A., Black. 1934. An examination of Degtijaref method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid in soil analysis. I. Experimental. Soil Science Society of America Journal. 79: 459- 465.
71. Wenzel WW, Kirchbaumer N and Prohaska T, 2001. Arsenic fractionation in soils using an improved sequential extraction procedure. Analytical Chimica Acta 436: 309-323.
72. Wu, S. C. Cheung, K. C. Luo, Y. M. and Wonge, M.H. 2006. Effects of inoculation of plant growth- promoting rhizobacteria on metal uptake by Brassica juncea. Environmental Pollution. 140(1):124-135.
73. 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*. Journal of En viromental pollution. 140: 124-135.

74. Yan-de, J., Zhen-li, H., and Xiao, Y. 2007. Role of soil rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. Journal of zhejiang univercity science. 8(3): 197- 207.
75. Zahir, A. Z., H. N. Asghar, M. J. Akhtar, and M. Arshad. 2005. Precursor(L-tryptophan)-Inoculum(Azotobacter) Interaction for Improving Yield and nitrogen uptake of maize. Journal of plant nutrition, vol. 28, no. 5, 805-817.
76. Zhou, Q.X., and Song, Y.F. 2004. Principles and Method of Treating Contaminated Soil Remediation, Science Press, Beijing, 489 pp.
77. Zhuang, X., Chen, J., Shim, H., and Bai, Z. 2007. New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. Environment International. 33, 406-413.