DOI: 10.29252/ARIDBIOM.2024.20802.1968

تأثیر باکتری *Bacillus cereus* و سلنیوم بر برخی خصوصیات مورفوفیزیولوژیک و محتوای یونی گونه بیابانی جفنه (*Salsola arbuscula* Pall.) تحت تنش سرب (مقالهٔ پژوهشی)

۱- مهدی رمضانی، دانشجوی دکتری مدیریت و کنترل بیابان، دانشکده منابع طبیعی و کویرشناسی، دانشگاه یزد، یزد، ایران.
۲- اصغر مصلح‌آرانی، استاد گروه محیط‌زیست، دانشکده منابع طبیعی و کویرشناسی، دانشگاه یزد، یزد، ایران.
۳- حمید سودایی‌زاده*، دانشیار گروه مدیریت و کنترل بیابان، دانشکده منابع طبیعی و کویرشناسی، دانشگاه یزد، یزد، ایران.
hsodaie@yazd.ac.ir
۴- مهدی خیاط، استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران.

دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۱۰
پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۱۵

چکیده

در سال‌های اخیر به‌علت توسعه عملیات معدن‌کاوی، انواع عناصر سنگین به عرصه‌های طبیعی وارد شده است. به دلیل پایداری طولانی مدت عناصر سنگین در خاک و جهت جلوگیری از ورود آنها به زنجیره غذایی، ضرورت دارد تا با روش‌های دوستدار محیط‌زیست مانند گیاه‌پالایی، نسبت به حذف آنها از خاک اقدام گردد. این پژوهش با هدف ارزیابی تأثیر باکتری محرک رشد گیاه (*Bacillus cereus*) و سلنیوم، بر توان گیاه‌پالایی گونه جفنه (*Salsola arbuscula* Pall.) در خاک آلوده به سرب انجام شد. آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی در سه تکرار انجام گرفت. فاکتورهای مورد بررسی شامل غلظت سرب با سه سطح (شاهد، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک)، باکتری محرک رشد گیاه و سلنیوم (شاهد و غلظت ۶ میکرومول) در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد که افزایش سرب باعث کاهش معنی‌دار مقدار جذب عناصر غذایی، مقدار کلروفیل و وزن خشک گیاه و افزایش معنی‌دار پرولین و آنتوسیانین و انباشت سرب در ریشه جفنه شد. کاربرد همزمان سلنیوم و *Bacillus cereus* باعث افزایش معنی‌دار ۴۰ درصدی سرب ریشه، ۲۹ درصدی وزن خشک گیاه، ۳۶ درصدی کلروفیل و افزایش ۱۷، ۱۸ و ۲۷ درصدی پتاسیم، منیزیم و آهن شد. کاربرد همزمان سلنیوم و *Bacillus cereus* باعث کاهش معنی‌دار ۳۰ درصدی آنتوسیانین و ۲۰ درصدی پرولین شد. با توجه به انباشت سرب در ریشهٔ گیاه جفنه، نتیجه‌گیری شد که این گیاه می‌تواند برای فرآیند تثبیت گیاهی در خاک‌های آلوده به سرب مناسب باشد و باکتری *Bacillus cereus* و سلنیوم با بهبود شرایط بیوشیمیایی گیاه، توانایی گیاه‌پالایی آن را به سرب افزایش دادند.

واژگان کلیدی: تنش، عناصر سنگین، گیاه پالایی، معدنکاری.

مقدّمه

خاک به‌عنوان جزیی از زیست‌کره، نقش مهمی در محیط‌زیست دارد. آلودگی خاک به عناصر سنگین به‌دلیل پایداری طولانی مدت آنها در خاک و ورود به زنجیره غذایی، تبدیل به بحران محیط‌زیستی شده است [۲۵]. براساس داده‌های آژانس حفاظت محیط‌زیست، سرب مهم‌ترین فلز آلاینده در محیط‌زیست است که در اثر فعالیت‌های مدرن انسانی تولید می‌شوند. سرب یکی از فلزات سمی برای انسان و همچنین جزو فلزات غیرضروری برای گیاهان است که عملکرد بیولوژیک شناخته شده‌ای ندارد؛ ولی به‌علت انحلال‌پذیری این عنصر در آب، به‌راحتی توسط ریشه گیاه جذب می‌گردد [۱۷] و از این طریق، رشد و متابولیسم گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد.

یکی از آثار سمیت این عنصر به‌علت تشابه ساختار یونی کلسیم و سرب بوده و به همین علت یون سرب بسیاری از جنبه‌های رفتاری Ca^{+2} را تقلید کرده و از فعالیت بسیاری از آنزیم‌ها جلوگیری می‌کند [۲۱].

در مقابل، گیاهان ساز و کارهای مؤثری برای مقاومت در برابر غلظت‌های بالای این فلز در خاک دارند. راهبردهای

گیاه در مواجهه با تنش فلزات سنگین شامل جلوگیری از ورود به اندام هوایی و تجمع در ریشه و سمیت‌زدایی این فلز است. در راهبرد اول، گیاه از فلز گریزان است و در نهایت، آن را در ریشه انباشت می‌کند. سمیت‌زدایی نیز بیشتر در گیاهان بیش‌اندوز مشاهده می‌شود که از ورود فلز به ریشه جلوگیری نمی‌کند. بیش‌اندوزها با دارابودن سازگارهای اختصاصی سمیت‌زدایی فلزات، قادر به تجمع این فلزات در غلظت‌های بالایی در اندام‌های خود هستند [۹].

نتایج پژوهش‌های متعدد حاکی از کارایی بالای گیاهان در پالایش خاک‌های آلوده به فلزات سنگین است. فناوری گیاه‌پالایی نسبت به روش‌های فیزیکی و شیمیایی پالایش عناصر سنگین، روشی ارزان با کارکرد مؤثر و دوستدار محیط‌زیست است که در آن ساختمان و بافت طبیعی خاک حفظ می‌شود [۴۱]. در این روش احتمال تخریب زیست‌بوم به حداقل می‌رسد و از لحاظ زیباشناختی برای عموم خوشایندتر است.

با وجود مزایایی که برای این فناوری شمرده شده است، برخی محدودیت‌ها هم در کاربرد این روش ذکر شده است. برای مثال، وقتی غلظت آلاینده‌ها در خاک خیلی بالاست، برخی گیاهان قدرت رویش و تولید زیست‌توده کافی ندارند [۳۱]. در برخی موارد هم خاک‌های آلوده از نظر مواد غذایی فقیر هستند و به تأمین این عناصر نیاز است. همچنین فرآیند گیاه‌پالایی در عمل کند و زمان‌بر است و برای پالایش کامل خاک، زمان طولانی نیاز است [۲۱].

در این زمینه، شناسایی گیاهان تند رشد با بیوماس بالا، متحمل و با ظرفیت بالای تجمع عناصر سنگین می‌تواند عملکرد گیاه‌پالایی را افزایش دهد؛ اما تحقیقات انجام شده نشان می‌هد که گیاهان معدودی دارای این ویژگی‌ها هستند [۲۰] و همچنین عملکرد و بیوماس این گونه‌ها محدود است. علاوه بر این، عواملی مانند اسیدیته خاک، ترشحات ریشه و بویژه میکروارگانیسم‌ها نیز می‌توانند بر روی دسترسی عناصر سنگین در گیاه اثر گذاشته و تجمع این عناصر را در گیاه افزایش دهند [۴۲].

باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه با استفاده از ساز و کارهای مختلفی به‌طور مستقیم در افزایش رشد و عملکرد گیاه نقش ایفا می‌کنند [۳]. افزایش انحلال عناصر غذایی کم محلول مانند فسفر، تولید ACC- دآمیناز، تولید هورمون‌های رشد گیاهی مانند اکسین، تثبیت نیتروژن و تولید سیدروفور (از دیدگاه افزایش قابلیت جذب آهن) از اهم ساز و کارهای مورد استفاده در این روش محسوب می‌شوند [۲۷]. در حالت غیرمستقیم نیز باکتری‌های محرک رشد گیاه با استفاده از سازوکارهای مختلف آنتاگونیستی اثرات مضر بیمارگرهای گیاهی را خنثی یا تعدیل می‌کنند و به این ترتیب موجب رشد گیاه می‌شوند [۱۵].

عنصر سرب بعد از آرسنیک سمی‌ترین عنصر سنگین برای موجودات زنده است. همچنین به‌دلیل تجمع زیستی بالا و پایداری طولانی مدت در محیط‌زیست، این عنصر در زمرهٔ اولین ماده خطرناک در طبیعت است [۱۲]؛ بنابراین پالایش این عنصر از محیط‌زیست باید در اولویت قرار گیرد. در اکوسیستم‌های خاکی، اثربخشی گیاه‌پالایی به رابطه متقابل سویه باکتریایی، گیاه و خاک بستگی دارد. در این میان، باکتری‌هایی که از زیستگاه‌های تحت شرایط تنش محیطی انتخاب گردند به دلیل سازگاری با این شرایط از کارآیی بیشتری در افزایش مقاومت گیاه برخوردار خواهند بود [۴].

مطالعات نشان می‌دهد جداسازی سویه‌های مقاوم به سرب از گیاهان بومی می‌توانند گیاه‌پالایی را افزایش دهند [۲۶]. در مطالعه دیگری Ashour و همکاران [۶] یک سویه باکتری محرک رشد گیاه از گونه *Salsola imbricata* را خالص‌سازی کردند که اثرات مثبتی بر رشد گیاهان مورد مطالعه داشت. در تحقیق حاضر نیز *Bacillus cereus* از باطله‌های معدن سرب و روی کوشک بافق که قبلاً خالص‌سازی و اثرات مثبت آن بر روی گیاه گندم به اثبات رسیده بود، استفاده شد [۸].

مطالعات متعددی همچنین نشان داده است که گیاهان شورپسند توانایی بالایی در گیاه‌پالایی دارند. این موضوع در یک مقالهٔ مروری توسط Caparros و همکاران به تفصیل تشریح شده است [۱۲]. در مطالعه حاضر نیز از گیاه شورپسند *Salsola arbuscula* استفاده شد. علاوه بر نقش باکتری‌های محرک رشد گیاه، اخیراً استفاده از مواد مغذی معدنی مانند سلنیوم (Se) در پیشگیری از تنش عناصر سنگین توسط محققان مورد بررسی قرار

گرفته است. سلنیوم یک ریزمغذی مهم است که به‌دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی آن در گیاهان و حیوانات، مورد توجه قرار گرفته است. کاربرد سلنیوم جذب فلزات سنگین را مهار می‌کند و با بهبود سیستم آنتی‌اکسیدانی، مقاومت در برابر سمیت عناصر سنگین در گیاهان را افزایش می‌هد [۵]. کاربرد سلنیوم باعث افزایش رشد در گیاه *Vicia faba* و کاهش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی تحت تنش سرب شد [۲۲].

هدف از این تحقیق، بررسی تأثیر باکتری‌های محرک رشد گیاه و سلنیوم بر افزایش توان گیاه‌پالایی گیاه جفنه در برابر تنش آلودگی خاک با عنصر سنگین سرب بود. نتایج این تحقیق می‌تواند در مرتع‌کاری بهینه جفنه در مناطق خشک و بیابانی که در اثر فعالیت‌های معدنی، دارای خاک‌های آلوده به سرب می‌باشند، کمک کند.

مواد و روش‌ها

جهت بررسی تأثیر باکتری محرک رشد گیاه و سلنیوم بر خصوصیات رویشی و فیزیولوژیکی گونه جفنه تحت تنش آلودگی سرب، این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی در سه تکرار در بهار و تابستان ۱۴۰۰ به مدت ۶ ماه در ایستگاه تولید نهال بیابانی اداره کل منابع طبیعی و آبخیزداری خراسان‌جنوبی اجرا گردید. فاکتور اول باکتری محرک رشد گیاه (در دو سطح شامل بدون تلقیح باکتری و تلقیح با باکتری *Bacillus cereus*)، فاکتور دوم ماده سلنیوم (به صورت سلنیت سدیم در دو سطح شامل بدون سلنیوم و سلنیوم با غلظت ۶ میکرومول) [۲۲] و فاکتور سوم سرب (در سه سطح شاهد، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آب آبیاری) بود.

بذرهای جفنه از عرصه‌های طبیعی در خراسان‌جنوبی (شهرستان بیرجند) جمع‌آوری شد. برای انجام آزمایش، تعداد ۳۶ گلدان زهکش‌دار به ارتفاع ۱۸ و دهانه ۲۰ سانتی‌متر، محتوی ۳ کیلوگرم خاک با سه واحد خاک زراعی بدون هوموس و یک واحد ماسه بادی تهیه شد (جدول ۱).

در هر گلدان، تعداد ۵ عدد بذر کاشته شد. بذور بر حسب نوع تیمار، بدون تلقیح (شاهد) یا تلقیح شده با باکتری محرک گیاه (*Bacillus cereus*) کشت گردید. این سویه باکتری از ریزوسفر گیاه کک‌کش (*Pulicaria gnaphaloides*) توسط آذری و همکاران [۸] از باطله‌های معدن سرب و روی کوشک بافق خالص‌سازی و صفات محرک رشد آنها تعیین و اثر مثبت آن بر روی گندم ارزیابی شده بود.

جدول ۱- برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی نمونه خاک استفاده شده در این آزمایش

نیتروژن (درصد)	فسفر (قسمت در میلیون)	پتاسیم (قسمت در میلیون)	سدیم (میلی اکی والان بر لیتر)	کلسیم (میلی اکی والان بر لیتر)	سولفات (میلی اکی والان بر لیتر)	بافت خاک		
۰/۰۳	۱۷	۸۹۷/۲	۲/۲۷	۱/۶	۴۲	رس (درصد)	سیلت (درصد)	ماسه (درصد)
هدایت الکتریکی (دسی زیمنس بر متر)	اسیدیته	کربن آلی (درصد)	مواد آلی (درصد)	نسبت کربن به نیتروژن (درصد)	کربنات کلسیم (درصد)	۲۸/۷	۱۳	۵۸/۳
۲/۱	۷/۵۵	۰/۱۷	۰/۲۶	۵/۴	۳۱/۴	لوم رسی شنی		

گلدان‌ها تا رویش بذور و استقرار کامل با آب شهری آبیاری شدند. یک ماه پس از کاشت، نهال‌ها وجین شدند، به‌طوری‌که در هر گلدان یک نهال هم‌اندازه (۱۰ سانتیمتر) بود. اعمال تیمار سرب و سلنیوم از هفته پنجم (که گیاهان در حالت رویشی قرار داشتند) آغاز شد. آبیاری برای تیمارهای بدون سرب با آب شهری و برای تیمارهای سرب با غلظت تعیین‌شده (۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) اعمال شد. محلول‌پاشی سلنیوم برای تیمارهای مربوطه با غلظت ۶ میکرومول اعمال شد و برای تیمارهای بدون سلنیوم از آب بدون سلنیوم استفاده شد.

تهیه و تلقیح باکتری محرک رشد گیاه: برای تهیه مایه تلقیح، یک کلنی خالص از باکتری برداشته و تحت شرایط

استریل به یک ارلن حاوی محیط کشت نوترینت براث اضافه گردید. ارلن باکتری روی شیکر با سرعت ۱۲۰ دور بر دقیقه و دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار داده شدند. پس از ۴۸ ساعت مایع تلقیح باکتری با جمعیت تقریبی ۳×۱۰^{۸} سلول بر میلی لیتر آماده مصرف شدند. سوسپانسیون باکتری قبل از کاشت به بذور جفنه به مدت ۴ ساعت تلقیح شد.

اندازه‌گیری صفات فیزیولوژیکی و مورفولوژی: شش ماه پس از شروع آزمایش نهال‌های مورد نظر که هنوز در مرحله رویشی قرار داشتند، برای انجام آزمایشات فیزیولوژیک و مورفولوژی مورد نمونه‌برداری قرار گرفتند. مقدار کلروفیل کل برگ به روش Lichtenthaler [۱۹] و پرولین به روش Bates و همکاران [۱۰] اندازه‌گیری شد. در این مرحله خصوصیات مورفولوژیکی (وزن خشک اندام هوایی و وزن خشک ریشه، ارتفاع ساقه، قطر یقه) نیز اندازه‌گیری شد و در نهایت، پارامتر بیوماس خشک کل (مجموع وزن خشک ریشه و اندام هوایی) مورد محاسبه قرار گرفتند. به‌منظور اندازه‌گیری محتوای یونی، عصاره نمونه‌ها با هضم به روش سوزاندن و ترکیب با اسیدکلریدریک تهیه شد. غلظت آهن و منیزیم با دستگاه جذب اتمی و عناصر پتاسیم و کلسیم به روش نشر شعله‌ای و با دستگاه فلیم‌فتومتری اندازه‌گیری شد [۳۶].

برای اندازه‌گیری کلروفیل کل، ۰/۲ گرم بافت تازه برگی با ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد داخل هاون چینی به خوبی ساییده شد و پس از آن محلول به‌دست آمده توسط کاغذ صافی، صاف گردید. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ ۴۰۰۰ rpm قرار داده شدند و شدت جذب آن در طول موج های ۶۶۳/۲، ۶۶۴/۸ و ۴۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفوتومتر قرائت گردید. غلظت رنگیزه‌های کلروفیل a و b بر حسب میلی‌گرم بر گرم با استفاده از رابطه ۱ محاسبه گردید [۱۸].

$$\text{Chla} = 12.5A663.2 - 2.79A646.8 \quad (۱)$$
$$\text{Chlb} = 21.5A646.8 - 5.1A663.2$$
$$\text{Total chlorophyll} = \text{Chla} + \text{Chlb}$$

که در این رابطه، Chla و Chlb به‌ترتیب غلظت کلروفیل a و کلروفیل b است. A در روابط مختلف مقدار عدد قرائت شده توسط دستگاه اسپکتوفتومتر برای کلروفیل a و کلروفیل b می‌باشد.

اندازه‌گیری پرولین: میزان پرولین موجود در برگ با استفاده از ۰/۵ گرم ماده تر برگ تازه براساس واکنش با معرف نین هیدرین و با دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر بر حسب میکروگرم بر گرم وزن تر قرائت گردید [۱۰].

اندازه‌گیری آنتوسیانین: برای سنجش آنتوسیانین از روش Wanger [۳۸] استفاده شد. ۰/۱ گرم از بافت مورد نظر را در هاون چینی با ۱۰ میلی لیتر متانول اسیدی (متانول خالص و اسید کلریدریک خالص به نسبت حجمی ۱:۹۹) کاملاً سائیده و عصاره در لوله‌های آزمایش سرپیچ‌دار ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰g سانتریفوژ و جذب محلول بالایی در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. محاسبه غلظت با استفاده از ضریب خاموشی $۳۳۰۰۰\ M^{-1}\ cm^{-1}$ انجام و نتایج بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر ارائه گردید.

اندازه‌گیری عنصر سرب: ابتدا ریشه و ساقه گیاه در هاون چینی به طور کامل پودر کرده و مقدار ۰/۵ گرم از هر نمونه وزن و در لوله آزمایش ریخته شد. پس از آن حجم محتوی لوله‌ها با آب مقطر به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده و محلول حاصل با استفاده از کاغذ واتمن شماره ۱ صاف شد. غلظت سرب هر نمونه با دستگاه جذب اتمی و با استفاده از محلول استاندارد برحسب میکروگرم بر گرم وزن خشک محاسبه شد [۲۸].

آنالیز آماری: به‌منظور تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از پارامترهای مختلف اندازه‌گیری‌شده از نرم‌افزار $SPSS_{16}$ استفاده شد و نمودارها نیز در نرم افزار Excel رسم گردید. پس از اطمینان از نرمال‌بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کلموگروف-اسمیرنوف، داده‌ها با استفاده از آزمون تجزیه واریانس تحلیل و در نهایت، مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن ($p=۰/۰۵$) انجام گردید.

نتایج

نتایج آنالیز واریانس نشان داد که اثر متقابل باکتری×سلنیوم×سرب تمام صفات اندازه‌گیری شده معنی‌دار بود (جدول ۲).

مقایسه میانگین‌ها

نتایج نشان داد که در شرایط بدون باکتری و سلنیوم، وزن گیاه با افزایش مقدار سرب خاک در هر دو تیمار mg/kg ۱۰۰ و ۲۰۰ کاهش یافت. این روند کاهش معنی‌دار در وزن گیاه در mg/kg ۲۰۰ سرب نسبت به شاهد در حضور باکتری نیز مشاهده شد. در عین حال، کاربرد باکتری به‌تنهایی باعث افزایش معنی‌دار وزن گیاه در هر دو تیمار و شاهد (بدون سرب) شد. نتایج همچنین نشان داد که کاربرد سلنیوم در شرایط بدون باکتری در هر دو تیمار سرب باعث افزایش معنی‌دار وزن گیاه شد. وزن گیاه در حضور باکتری و سلنیوم فقط در شرایط شاهد افزایش یافت. نتایج نشان داد که کاربرد همزمان سلنیوم-باکتری در هر دو تیمار سرب و شاهد (بدون سرب) وزن گیاه را به‌طور معنی دار افزایش داد (شکل ۱).

جدول ۲- نتایج آنالیز واریانس تأثیر سلنیوم و باکتری *Bacillus cereus* صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاه جفنه (*Salsola arbuscula*) تحت تنش سرب

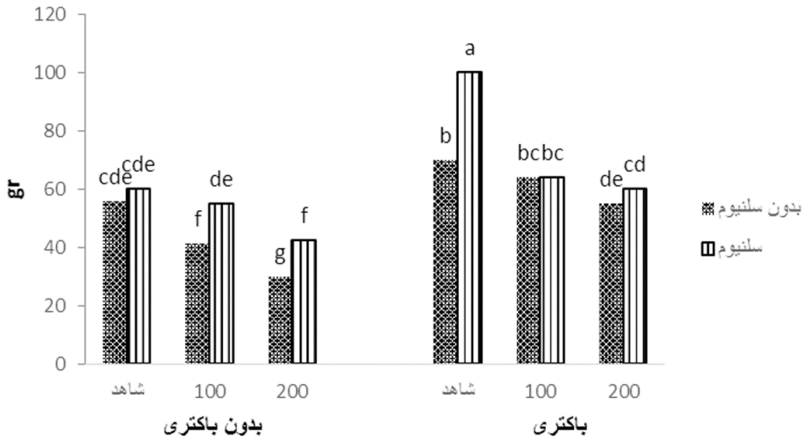
		میانگین مربعات				
منابع تغییر	درجه آزادی	سرب ریشه	پتاسیم	منیزیم	کلسیم	آهن
نوع باکتری	۱	۱۵۶۲۵**	۱۳۱۴۵۷**	۴۶۸۲۳**	۳۱۰۴۳**	۶/۶**
سرب	۲	۳۹۴۶۶**	۵۲۵۱۷۹**	۵۶۶۵**	۳۸۹۵۷**	۱۰/۵**
سلنیوم	۱	۳۷۳/۸**	۲۴۲۳۳**	۵۰۳۹**	۴۹۶۴**	۰/۷۳^{ns}
باکتری×سرب	۲	۴۱۵۸/۳**	۵۵۹۵*	۲۱۶۵**	۱۱۰۳۲**	۳/۵**
باکتری×سلنیوم	۱	۴۹^{ns}	۱۷۳۶^{ns}	۲۰۸۷**	۱۳۰۳*	۰/۱۰۳^{ns}
سرب×سلنیوم	۲	۲۰۱*	۱۳۰۲^{ns}	۳۱۷۴**	۱۶۰۱**	۰/۲۹۷^{ns}
باکتری×سرب×سلنیوم	۲	۱۳۹*	۴۱۷۸/۹*	۲۹۱۰**	۱۴۲۴/۳*	۰/۹۸*
خطا	۲۴	۳۹/۹	۱۰۷۵/۴	۲۲۴/۴	۲۵۸/۸	۰/۲۷۷

		میانگین مربعات				
منابع تغییر	درجه آزادی	ارتفاع ساقه	وزن گیاه	کلروفیل کل	آنتوسیانین	پرولین
نوع باکتری	۱	۶۰/۱**	۴۴۶۲/۲**	۲/۲**	۰/۰۰۴**	۰/۰۳۳**
سرب	۲	۷۲۸/۱**	۱۸۹۱/۳**	۱/۷**	۰/۰۰۶**	۰/۱۱۴**
سلنیوم	۱	۲۱**	۹۰۲**	۰/۱۰*	۰/۰۰۱**	۰/۰۲۷**
باکتری×سرب	۲	۹/۳**	۵۸/۶^{ns}	۰/۰۱۸**	۰/۰۰۱**	۰/۰۰۸**
باکتری×سلنیوم	۱	۲/۵^{ns}	۲۳/۴^{ns}	۰/۰۰۱^{ns}	۰/۰۰۰۰۶*	۰/۰۰۰۰۰۷^{ns}
سرب×سلنیوم	۲	۲/۵^{ns}	۱۲۷/۲**	۰/۰۰۹**	۰/۰۰۰۰۵^{ns}	۰/۰۰۲^{ns}
باکتری×سرب×سلنیوم	۲	۲/۸*	۲۸۷/۹**	۰/۱۱*	۰/۰۰۰۰۷*	۰/۰۰۵**
خطا	۲۴	۰/۸	۲۰/۳	۰/۰۲۴	۰/۰۰۰۰۱۷	۰/۰۰۱

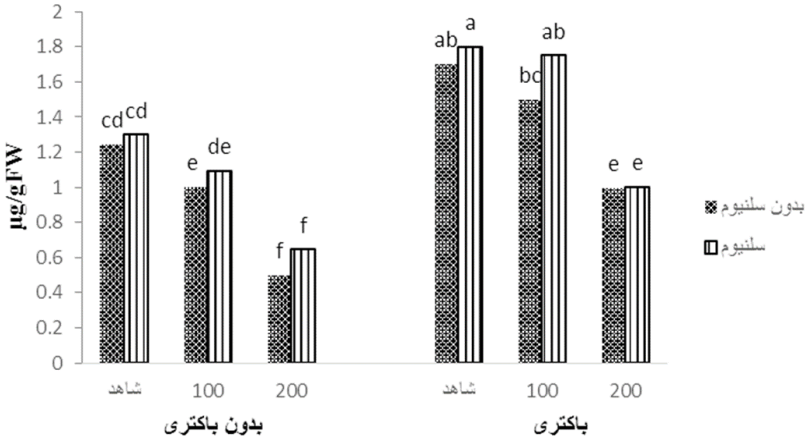
ns ,*, ** به ترتیب عدم تفاوت معنی‌دار و معنی‌داری در سطح ۵ و ۱ درصد

نتایج نشان داد که در شرایط بدون باکتری و سلنیوم، کلروفیل کل با افزایش مقدار سرب کاهش معنی‌داری یافت. مقدار کلروفیل در mg/kg ۲۰۰ نسبت به شاهد در شرایط حضور باکتری نیز کاهش یافت. در عین حال، کاربرد باکتری باعث افزایش معنی‌دار کلروفیل کل در هر دو تیمار سرب و شاهد (بدون سرب) شد. نتایج همچنین نشان داد که کاربرد سلنیوم در شرایط بدون باکتری با افزایش سرب به mg/kg ۲۰۰ باعث کاهش معنی‌دار

کلروفیل کل شد. این شرایط در حضور باکتری نیز تکرار شد. نتایج نشان داد که کاربرد همزمان سلنیوم-باکتری در هر دو تیمار سرب و شاهد (بدون سرب) کلروفیل کل را بطور معنی‌داری افزایش داد ($p<0.05$) (شکل ۲).



شکل ۱- اثر متقابل تیمار باکتری-سلنیوم و سرب بر وزن خشک گیاه جفنه. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن و با سه تکرار انجام شد. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P \leq ۰/۰۵$ است.



شکل ۲- اثر متقابل تیمار باکتری-سلنیوم و سرب بر مقدار کلروفیل کل. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن و با سه تکرار انجام شد. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P > ۰/۰۵$ است.

نتایج نشان داد که در شرایط بدون باکتری و سلنیوم، مقدار آنتوسیانین در هر دو تیمار سرب افزایش داد. این روند افزایش معنی‌دار در غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب نسبت به شاهد در حضور باکتری نیز مشاهده شد. در عین حال، کاربرد باکتری به‌تنهایی باعث کاهش معنی دار مقدار آنتوسیانین در هر دو تیمار سرب و شاهد شد.

نتایج همچنین نشان داد که کاربرد سلنیوم در شرایط بدون باکتری فقط در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب باعث کاهش معنی‌دار آنتوسیانین شد. در حضور باکتری، سلنیوم تأثیر معنی‌داری در کاهش آنتوسیانین در نداشت. نتایج نشان داد که کاربرد همزمان سلنیوم-باکتری فقط در ۲۰۰ مقدار آنتوسیانین را بطور معنی‌داری نسبت به عدم کاربرد این دو تیمار کاهش داد (شکل ۳).

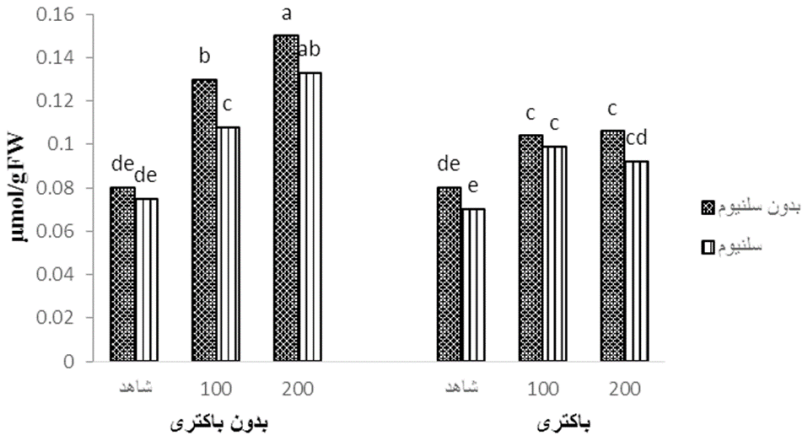
نتایج نشان داد که در شرایط بدون باکتری و سلنیوم، مقدار پرولین با افزایش مقدار سرب در هر دو تیمار افزایش یافت. این روند افزایش معنی‌دار در حضور باکتری نیز مشاهده شد. در عین حال، کاربرد باکتری به‌تنهایی باعث کاهش معنی‌دار پرولین در هر دو تیمار سرب شد.

نتایج همچنین نشان داد که کاربرد سلنیوم در شرایط بدون باکتری باعث کاهش معنی‌دار مقدار پرولین در هر دو تیمار سرب شد. شرایط مشابه در حضور باکتری نیز

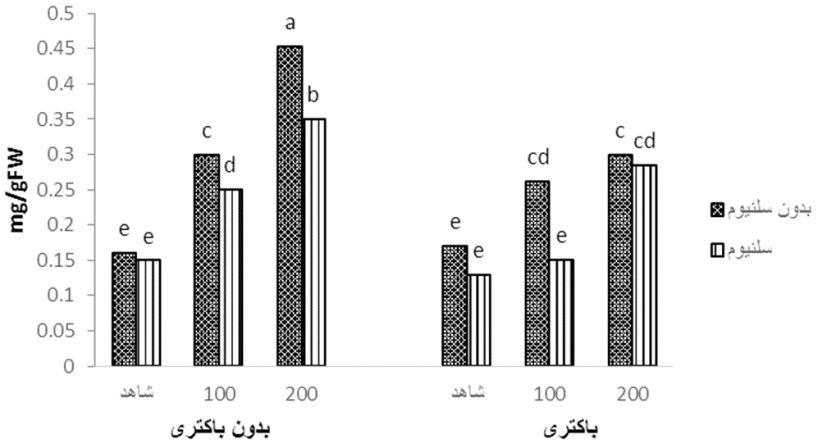
مشاهده شد. نتایج نشان داد که کاربرد همزمان سلنیوم-باکتری باعث کاهش معنی‌دار مقدار پرولین در هر دو تیمار سرب نسبت به عدم کاربرد این دو تیمار شد (شکل ۴).

نتایج نشان داد که در شرایط بدون باکتری و سلنیوم، مقدار جذب کلسیم در mg/kg ۲۰۰ سرب کاهش یافت. این روند کاهش در هر دو تیمار ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب نسبت به شاهد در کاربرد باکتری نیز مشاهده شد. در عین حال، کاربرد باکتری به تنهایی باعث افزایش معنی‌دار جذب کلسیم در mg/kg ۲۰۰ سرب و شاهد شد.

نتایج همچنین نشان داد که کاربرد سلنیوم در شرایط بدون باکتری فقط در mg/kg ۲۰۰ باعث افزایش جذب سرب شد. نتایج نشان داد که کاربرد همزمان سلنیوم-باکتری فقط در شاهد (بدون سرب) مقدار جذب کلسیم را به‌طور معنی‌داری نسبت به عدم کاربرد این دو تیمار افزایش داد (شکل ۵).



شکل ۳- اثر متقابل تیمارهای باکتری، سلنیوم و سرب بر میزان آنتوسیانین. مقایسه میانگین ها بر اساس آزمون دانکن و با سه تکرار انجام شد. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح P > ۰/۰۵ است.

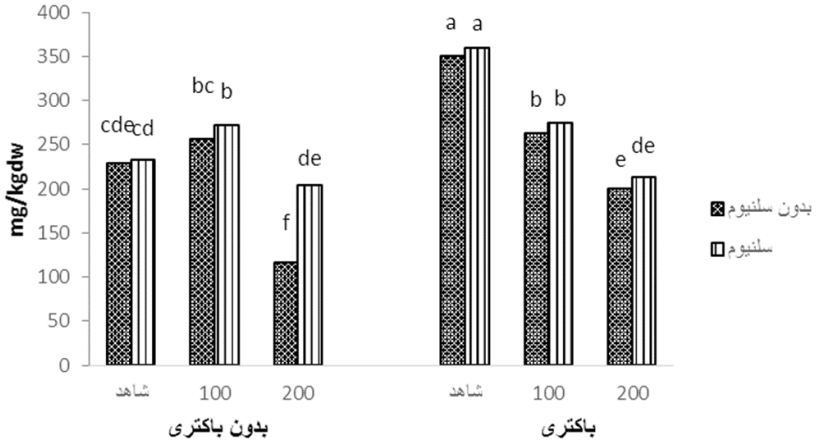


شکل ۴- اثر متقابل تیمار باکتری-سلنیوم و سرب بر میزان پرولین. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن و با سه تکرار انجام شد. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح P > ۰/۰۵ است.

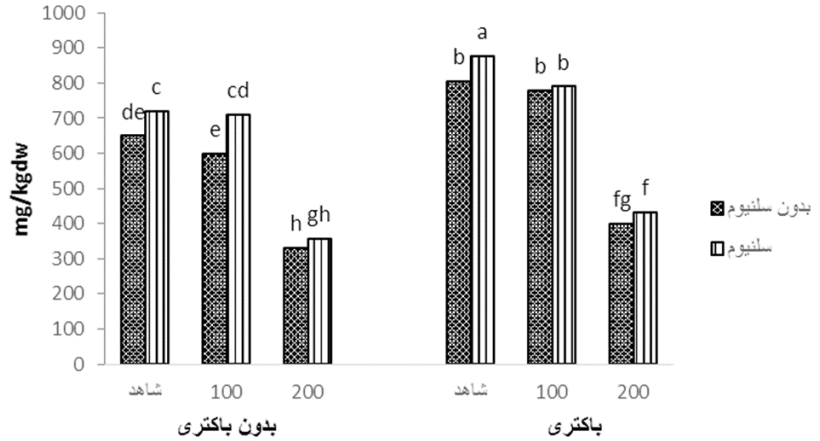
نتایج نشان داد که در شرایط بدون باکتری و سلنیوم، مقدار پتاسیم در mg/kg ۲۰۰ سرب کاهش یافت. این روند در mg/kg ۲۰۰ سرب در کاربرد باکتری نیز مشاهده شد. کاربرد باکتری به‌تنهایی باعث افزایش جذب پتاسیم در هر دو تیمار سرب و شاهد شد. نتایج همچنین نشان داد که کاربرد سلنیوم در شرایط بدون باکتری در mg/kg ۲۰۰ سرب و شاهد بدون سرب باعث افزایش معنی‌دار پتاسیم شد. در حضور باکتری، سلنیوم تاثیرمعنی‌داری در افزایش پتاسیم در شاهد (بدون سرب) داشت. نتایج نشان داد که کاربرد همزمان سلنیوم-باکتری در هر دو تیمار

سرب و شاهد (بدون سرب) پتاسیم را به‌طور معنی‌دار نسبت به عدم کاربرد این دو تیمار افزایش داد (شکل ۶).

نتایج نشان داد که در شرایط بدون باکتری و سلنیوم، مقدار منیزیم فقط در دز ۲۰۰ mg/kg کاهش یافت. این روند در هر دو تیمار سرب در کاربرد باکتری نیز مشاهده شد. کاربرد باکتری به‌تنهایی باعث افزایش معنی‌دار منیزیم در همه تیمارها شد. نتایج همچنین نشان داد که کاربرد سلنیوم در شرایط بدون باکتری در هر دو تیمار سرب باعث افزایش معنی‌دار منیزیم شد. در حضور باکتری، سلنیوم تأثیرمعنی‌داری در افزایش پتاسیم نداشت. نتایج نشان داد که کاربرد همزمان سلنیوم-باکتری در همه تیمارها مقدار منیزیم را به طور معنی‌داری نسبت به عدم کاربرد این دو تیمار افزایش داد (شکل ۷).

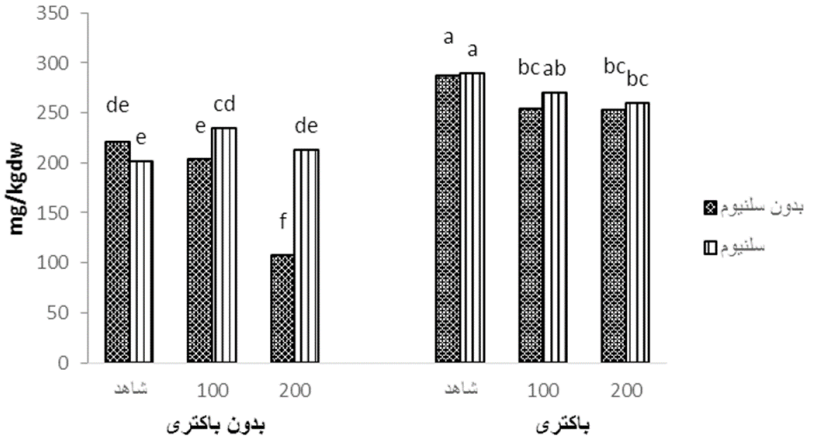


شکل ۵- اثر متقابل تیمار باکتری-سلنیوم و سرب بر مقدار کلسیم اندام هوایی جفنه. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن و با سه تکرار انجام شد. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P > ۰/۰۵$ است.

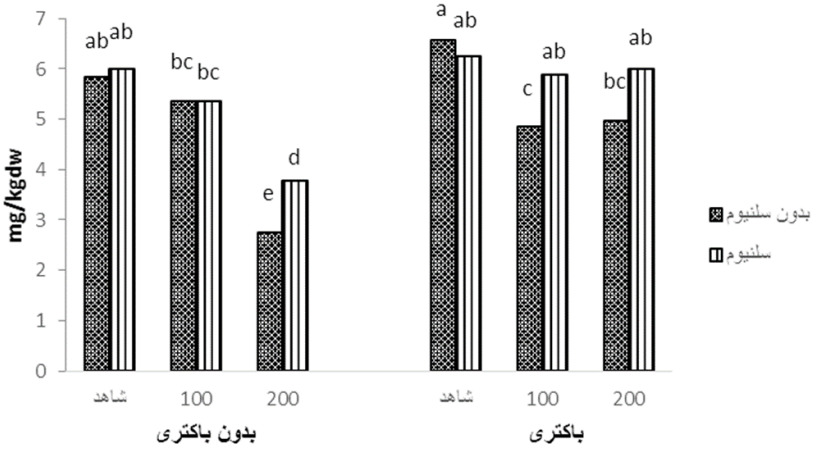


شکل ۶- اثر متقابل تیمار باکتری-سلنیوم و سرب بر میزان پتاسیم اندام هوایی جفنه. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن و با سه تکرار انجام شد. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P \leq ۰/۰۵$ است.

نتایج نشان داد که در شرایط بدون باکتری و سلنیوم، افزایش سرب خاک به ۲۰۰ mg/kg مقدار آهن را کاهش داد. این روند در برای هر دو تیمار سرب در کاربرد باکتری نیز مشاهده شد. کاربرد باکتری به تنهایی باعث افزایش مقدار آهن فقط در تیمار ۲۰۰ mg/kg سرب شد. نتایج همچنین نشان داد که کاربرد سلنیوم در شرایط بدون باکتری در تیمار ۲۰۰ mg/kg سرب باعث افزایش معنی‌دار آهن شد. در حضور باکتری، سلنیوم تأثیرمعنی‌داری فقط در ۱۰۰ mg/kg سرب داشت. نتایج نشان داد که میزان جذب آهن در کاربرد همزمان سلنیوم-باکتری فقط در تیمار ۲۰۰ mg/kg سرب نسبت به عدم کاربرد این دو تیمار افزایش معنی‌دار داشت (شکل ۸).



شکل ۷- اثر متقابل تیمارهای باکتری، سلنیوم و سرب بر میزان منیزیم اندام هوایی جفنه. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن و با سه تکرار انجام شد. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح P > ۰/۰۵ است.

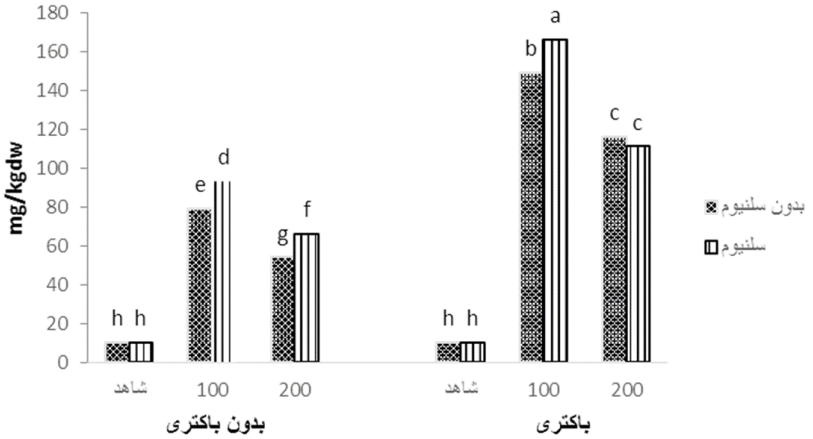


شکل ۸- اثر متقابل تیمارهای باکتری، سلنیوم و سرب بر میزان آهن اندام هوایی جفنه. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن و با سه تکرار انجام شد. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح P > ۰/۰۵ است.

نتایج نشان داد که در شرایط بدون باکتری و سلنیوم، تجمع سرب در ریشه با افزایش غلظت سرب در خاک نسبت به شاهد (بدون سرب) و افزایش داشت. این روند در کاربرد باکتری نیز مشاهده شد. کاربرد باکتری به‌تنهایی باعث افزایش جذب سرب در ریشه گیاه جفنه شد. نتایج همچنین نشان داد که کاربرد سلنیوم در شرایط بدون باکتری در هر دو تیمار سرب باعث افزایش معنی‌دار انباشت سرب در ریشه شد. در حضور باکتری، سلنیوم تأثیر معنی‌داری در افزایش انباشت سرب در ریشه فقط در تیمار ۱۰۰ mg/kg سرب داشت. نتایج نشان داد که کاربرد همزمان سلنیوم-باکتری میزان انباشت سرب در ریشه را به صورت معنی‌دار نسبت به عدم کاربرد این دو تیمار افزایش داد (شکل ۹). نتایج اندازه‌گیری سرب در اندام هوایی گیاه جفنه نشان داد که این عنصر سنگین در هیچکدام از تیمارهای مورد مطالعه قابل ردیابی نبود.

بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که با افزایش غلظت سرب تجمع آن در ریشه گیاه جفنه افزایش یافت. اعمال تیمار سلنیوم و باکتری به‌تنهایی و یا با هم توانست مقدار جذب سرب در گیاه را به طور معنی‌داری افزایش دهد. نتایج همچنین نشان داد که انتقال سرب از ریشه به اندام هوایی ناچیز است. تجمع سرب در ریشه جفنه نشان می‌دهد که این گیاه مناسب فرآیند تثبیت گیاهی (Phytostabilization) (روشی از گیاه‌پالایی که باعث غیرفعال‌سازی آلاینده‌ها با استفاده از گیاهان در خاک می‌شود) می‌باشد. از طرف دیگر، سویه *Bacillus cereus* و سلنیوم باعث افزایش تثبیت گیاهی جفنه شد.



شکل ۹- اثر متقابل تیمارهای باکتری، سلنیوم و سرب بر میزان انباشت سرب در ریشه. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن و با سه تکرار انجام شد. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح P > ۰/۰۵ است.

مطالعات زیادی در خصوص کاربرد باکتری‌های محرک رشد گیاه در افزایش جذب سرب در گیاهان گزارش شده است. در مطالعه Pietrini و همکاران نشان داده شد که تلقیح باکتری‌های محرک رشد گیاه (که از گیاهان بومی خالص‌سازی شده بود)، باعث افزایش گیاه‌پالایی سرب در دو گیاه *Brassica juncea* و*Helianthus annuus* شد [۲۶]. بررسی اثر دو سویه باکتری مقاوم به سرب (استخراج شده از خاک آلوده به سرب) بر گونه *Solanum nigrum* L. نیز نشان داد که بیوماس و تجمع سرب در گیاه به‌طورمعنی‌داری افزایش یافت [۶]. *Bacillus cereus* از طریق افزایش انحلال عناصر مانند فسفر، پتاسیم، منیزیم، کلسیم و تولید سیدروفور (از دیدگاه افزایش قابلیت جذب آهن) و افزایش بیوماس گیاه باعث جذب بیشتر سرب گردید.

نتایج نشان داد که افزایش سرب مقدار کلروفیل کل را کاهش داد؛ اما کاربرد باکتری-سلنیوم باعث افزایش مقدار کلروفیل شد. افزایش مقدار کلروفیل ممکن است به‌علت تولید سیدروفور و اکسین توسط این باکتری باشد. سیدروفور میل ترکیبی شدید برای پیوند با برخی از کاتیون‌ها از جمله آهن III دارد که از عناصر ضروری برای ساخت کلروفیل است [۳۰].

در پژوهش حاضر، باکتری محرک رشد باعث افزایش میزان کلروفیل کل و آهن شده که با نتایج مطالعات دیگر در این زمینه [۲۴، ۲۳] مطابقت دارد. سلنیوم هم باعث افزایش مقدار کلروفیل در جفنه شد که مطابق با مطالعه Sun و همکاران است که نشان دادند که کاربرد سلنیوم باعث بهبود کلروپلاست گیاه خیار تحت شرایط عناصر سنگین شد [۳۴]. سلنیوم با افزایش مقدار آنتی‌اکسیدانها، از آنزیم‌های کلروپلاست حفاظت می‌کند و بازده فتوسیستم II را ارتقا می‌دهد [۳۹]. سلنیوم همچنین از طریق افزایش متابولیسم کربوهیدرات‌ها بیوسنتز کلروفیل را تسهیل می‌کند [۱۴].

نتایج این تحقیق نشان داد که با اعمال سرب، مقدار پرولین افزایش یافت. پرولین، نقش اساسی در تنظیم اسمزی در گیاهان دارد [۲۹]. تجمع اسید آمینه پرولین رابطه‌ای مثبت با افزایش مقاومت گیاه دارد و در صورت نیاز تجزیه و به‌عنوان منبع نیتروژن و انرژی مورد استفاده گیاه قرار می‌گیرد [۳۵، ۴، ۳]. در شرایط تنش، پرولین نقش آنتی‌اکسیدانی داشته و در محافظت از ساختارهای سلولی، ساختمان ماکرومولکول‌ها و از بین بردن رادیکال‌های آزاد کاربرد دارند [۲]. پرولین نقش بسیار مهمی در گیاهان داشته و آنها را از تنش‌های مختلف محافظت می‌کند [۴۰].

تلقیح با باکتری‌های محرک رشد گیاه باعث کاهش محتوی پرولین در گونه‌ها شد. اولین دلیل آن می‌تواند تأثیر باکتری مورد استفاده در کاهش تولید رادیکال‌های آزاد باشد. باکتری‌های محرک رشد گیاه با افزایش جذب عناصر مغذی از طریق اسیدی‌کردن محیط ریزوسفر، افزایش جذب آب از طریق تولید اکسین و افزایش حجم ریشه، در کاهش تنش مشارکت می‌کنند، که این خود کاهش تولید آنتی‌اکسیدان‌ها را توجیه می‌کند [۱].

کاهش محتوای پرولین در شرایط تنش‌های زیستی در تیمارهای تلقیحی با باکتری محرک رشد گیاه در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است [۲۴، ۲۳]. افزایش غلظت سرب در خاک بر روی وزن خشک گیاه تأثیر معنی‌داری داشت و عموماً تولید ماده خشک در کلیه اندام‌های گیاهی را کاهش می‌دهد [۱۱]. کاهش مقدار بیومس خشک کل گیاه ناشی از تنش‌های محیطی در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است [۴۰]. در پژوهش حاضر، تلقیح باکتری‌های محرک رشد گیاه در تولید ماده خشک گونهٔ گیاهی مذکور تأثیر معنی‌داری نداشت.

نتایج نشان داد که با افزایش غلظت سرب، مقدار کلسیم در جفنه کاهش یافت. کاربرد باکتری به‌تنهایی باعث افزایش معنی‌دار جذب کلسیم در ۲۰۰ mg/kg سرب و شاهد شد. نتایج همچنین نشان داد که کاربرد سلنیوم در شرایط بدون باکتری فقط در ۲۰۰ mg/kg باعث افزایش جذب سرب شد. نتایج مشابه برای پتاسیم و منیزیم نیز حاصل شد.

یکی از آثار سمیت سرب به‌علت تشابه ساختار یونی کلسیم و عناصر یاد شده به‌ویژه سرب بوده و به‌همین‌علت، یون سرب، بسیاری از جنبه‌های رفتاری Ca^{+2} را تقلید کرده و از فعالیت بسیاری از آنزیم‌ها جلوگیری می‌کند. به‌همین‌دلیل سرب باعث کاهش مقدار جذب کلسیم و سایر عناصر غذایی می‌شود. افزایش کلسیم در اثر باکتری محرک رشد گیاه می‌تواند به تولید اسیدهای آلی مانند اسید گلونیک و اسید سیتریک توسط باکتری‌ها مربوط باشد که جذب کلسیم را تسهیل می‌کند. مطالعات بر روی گیاه ترب تحت تنش عناصر سنگین نشان داد که سلنیوم نیز می‌تواند جذب عناصر غذایی را تسهیل کند [۷].

نتایج نشان داد که در شرایط بدون باکتری و سلنیوم، افزایش سرب خاک به ۲۰۰ mg/kg مقدار آهن را کاهش داد. این روند در برای هر دو تیمار سرب در کاربرد باکتری نیز مشاهده شد. یکی از دلایل آن می‌تواند برهمکنش آن با عنصر آهن باشد. تأثیر سرب بر جذب و توزیع عناصر غذایی در گیاه، دلیل برخی کمبودهای عناصر در گیاهان است که موجب برهم خوردن تعادل عناصر غذایی و کاهش باروری گیاه می‌شود. کاربرد باکتری به‌تنهایی باعث افزایش مقدار آهن در تیمار ۲۰۰ mg/kg سرب شد.

در مواقعی که گیاه با کمبود عنصر آهن روبرو می‌شود باکتری‌های محرک رشد گیاه ترکیبی آلی با وزن مولکولی کم به نام سیدروفور (به‌منظور مقابله با تنش حاصل از کمبود فرم قابل جذب آهن) ترشح می‌کنند که میل ترکیبی شدید برای پیوند با برخی از کاتیون‌ها از جمله آهن III دارد، گیاه می‌تواند از سیدروفور تولید شده برای تأمین آهن مورد نیاز خود استفاده نماید که در نتیجه PGPRها با تأمین آهن مورد نیاز گیاه به‌طور غیرمستقیم بر رشد آن تأثیر می‌گذارد [۴]. افزایش غلظت آهن در تنش محیطی ناشی از باکتری‌های محرک رشد گیاه در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است [۲۳].

نتایج نشان داد که در شرایط بدون باکتری و سلنیوم، مقدار پتاسیم در ۲۰۰ mg/kg سرب کاهش یافت. این روند در ۲۰۰ mg/kg سرب در کاربرد باکتری نیز مشاهده شد. همانطور که اشاره شد یکی از دلایل آن می‌تواند تأثیر سرب بر جذب و توزیع عناصر غذایی مثل پتاسیم در گیاه باشد. کاربرد باکتری به‌تنهایی باعث افزایش جذب پتاسیم در هر دو تیمار سرب و شاهد شد. باکتری‌های محرک رشد گیاه با افزایش اسیدیته خاک و با تأثیر بر پتاسیم معدنی، فرم قابل جذب یون پتاسیم برای گیاه را در محیط ریزوسفر افزایش داده و به گیاه فرصت می‌دهند تا تعادل یونی را از طریق افزایش جریان یون پتاسیم به بخش هوایی برقرار نمایند [۳۷]. عملکرد باکتری‌های محرک رشد گیاه در پژوهش حاضر در افزایش غلظت پتاسیم، با نتایج مطالعات دیگر در این زمینه [۳] مطابقت دارد.

نتایج نشان داد که در شرایط بدون باکتری و سلنیوم، مقدار آنتوسیانین در هر دو تیمار سرب افزایش داد. این روند افزایش معنی‌دار در دز ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر گیلوگرم سرب نسبت به شاهد در کاربرد باکتری نیز مشاهده شد. در عین حال، کاربرد باکتری به‌تنهایی باعث کاهش معنی‌دار مقدار آنتوسیانین در هر دو تیمار سرب و شاهد شد. آنتوسیانین‌ها در گیاهان نقش آنتی‌اکسیدانی داشته و نقش مهمی در محافظت از سیستم فتوسنتزی در برابر تنش‌های محیطی ایفا می‌کند [۳].

آنتوسیانین‌ها نه تنها رادیکال‌های آزاد را از بین می‌برند، بلکه از تولید بیشتر آنها ممانعت به‌عمل می‌آورند. باکتری مورد مطالعه می‌تواند از طریق افزایش پتاسیم باعث کاهش

آنتوسیانین گردد. مطالعات بر روی گیاه گندم نشان داد که افزایش پتاسیم باعث کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی شد [۳۳].

نتایج این تحقیق نشان داد کاربرد سلنیوم باعث افزایش عناصر آهن، کلسیم، منیزیم و پتاسیم شد. مطالعات متعددی نشان می‌هد که سلنیوم باعث افزایش جذب عناصر ضروری گیاه شد [۴۳]. مطالعات انجام شده بر روی گیاه *Brassica juncea* تحت تنش کروم نشان داد که سلنیوم موجب افزایش عناصر معدنی شد [۱۶]. همچنین مطالعات نشان داد که سلنیوم ناقل‌های جذب آهن و کلسیم در ریشه را فعال می‌کند. آهن بخش جدایی‌ناپذیر آنزیم کاتالاز که مهم‌ترین آنزیم آنتی‌اکسیدانی حذف‌کننده رادیکال‌های آزاد می‌باشد. علاوه بر این، کلسیم نقش مهمی در جلوگیری از تخریب DNA و جلوگیری از تشکیل رادیکال‌های آزاد دارد [۳۲].

مطالعات مشابه در بررسی اثر سلنیوم در بهبود گیاه‌پالایی گزارش شده که کاربرد سلنیوم باعث افزایش رشد در گیاه *Vicia faba* و کاهش آنزیم‌های آنتی اکسیدانی تحت تنش سرب شد [۲۲]. سلنیوم یکی از عناصر مهم در افزایش تحمل گیاه به تنش اکسیداتیو می‌باشد و بنابراین باعث افزایش ایمنی گیاه در برابر تنش عناصر سنگین می‌شود [۱۳].

نتیجه‌گیری

با توجه به قابلیت بالای ذخائر معدنی در کشور و افزایش بهره‌برداری از آنها و گسترش صنایع ذوب فلزات، کنترل آلودگی‌های محیط‌زیستی ناشی از آنها ضروری می‌باشد. نتایج این تحقیق به‌وضوح توانایی گیاه جفنه را برای فرآیند تثبیت گیاهی در خاک‌های آلوده به سرب نشان داد. باکتری *Bacillus cereus* و سلنیوم توانایی گیاه‌پالایی جفنه را افزایش دادند. بنابراین نتیجه‌گیری شد که گیاه جفنه همراه با باکتری *Bacillus cereus* و استفاده از سلنیوم راهکار مناسب جهت پالایش خاک‌های آلوده به سرب در مناطق بیابانی است.

References

[1]. Abd-Allah, E. F., Alqarawi, A. A., Hashem, A., Radhakrishnan, R., Al-Huqail, A. A., Al-Otibi, F. O. N., Malik, J. A., Alharbi, R. I., & Egamberdieva, D. (2018). Endophytic bacterium Bacillus subtilis (BERA 71) improves salt tolerance in chickpea plants by regulating the plant defense mechanisms. *Journal of Plant Interactions*, *13*(1), 37-44. doi: 10.1080/17429145.2017.1414321

[2]. Abdelaal, K., AlKahtani, M., Attia, K., Hafez, Y., Király, L., & Künstler, A. (2021). The role of plant growth-promoting bacteria in alleviating the adverse effects of drought on plants. *Biology*, *10*(6), 520. doi: 10.3390/biology10060520

[3]. Amini Hajiabadi, A., Mosleh Arani, A., & Etesami, H. (2022). Salt-tolerant genotypes and halotolerant rhizobacteria: A potential synergistic alliance to endure high salinity conditions in wheat. *Environmental and Experimental Botany*, 20, 105033. doi: 10.1016/j.envexpbot.2022.105033

[4]. Amini Hajiabadi, A., Mosleh Arani, A., Ghasemi, S., Rad, M. H., Etesami, H., Shabazi Manshadi, S., & Dolati, A. (2021). Mining the rhizosphere of halophytic rangeland plants for halotolerant bacteria to improve growth and yield of salinity-stressed wheat. *Plant Physiology and Biochemistry*, 163, 139-153. doi: 10.1016/j.plaphy .2021.03.059

[5]. Asgher, M., Khan, M.I.R., Anjum, N.A., Verma, S., Vyas, D., Per, T.S., Masood, A., & Khan, N.A. (2019). Ethylene and polyamines in counteracting heavy metal phytotoxicity: A crosstalk perspective. *Journal of Plant Growth Regulation*, 37, 1050–1065. doi: 10.1007/s00344-018-9823-x

[6]. Ashour, W., Zohair, M., El-Beih, A., Hamed, E., Abd El Aty, A. (2021). Biochemical characterization and ecofriendly field application of the plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* MH046937 isolated from *Salsola imbricata* in Tur Sinai, Egypt. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, *12*(1), 94-105. doi: 10.7324/JAPS. 2021. 120109

[7]. Auobi Amirabad, S., Behtash, F., & Vafaee, Y. (2020). Selenium mitigates cadmium toxicity by preventing oxidative stress and enhancing photosynthesis and

micronutrient availability on radish (*Raphanus sativus* L.) cv. Cherry Belle. *Environmental science and pollution research international*, *27*(11), 12476–12490. doi: 10.1007/s11356-020-07751-2

[8]. Azari Najafabadi, S. (2020). *Resistance to Pb Concentration of Rhizospheric Bacteria of Pulicaria Gnaphalodes and Salsola Incanescens Growing on Lead and Zinc Mine Tailings of Kooshk* [Master's Thesis, Yazd University]. Central library of Yazd University. https://library.yazd.ac.ir/Inventory/114/15888.htm [in Persian]

[9]. Baker, A.J.M. (1981). Accumulators and excluders –strategies in the response of plant to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition. 3*(1-4), 643-654. doi: 10.1080/01904168109362867

[10]. Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39, 205–207. doi: 10.1007/BF00018060

[11]. Bauerle, W. L., Wang, G. G., Bowden, J. D., & Hong, C. M. (2006). An analysis of ecophysiological responses to drought in American chestnut. *Annals of Forest Science*, *63*(8), 833-842. doi: 10.1051/forest:2006066

[12]. Caparrós, P.G., Ozturk, M., Gul, A., Batool, T.S., Pirasteh-Anosheh, H., Turkyilmaz Unal, B., Altay, V., & Toderich, K.N. (2022). Halophytes have potential as heavy metal phytoremediators: A comprehensive review, *Environmental and Experimental Botany*, 193, 12-39. doi: 10.1016/j.envexpbot.2021.104666

[13]. Copat, C., Grasso, A., Fiore, M., Cristaldi, A., Zuccarello, P., Signorelli, S. S., Conti, G. O., & Ferrante, M. (2018). Trace elements in seafood from the Mediterranean Sea: An exposure risk assessment. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, *115*, 13–19. doi: 10.1016/j.fct.2018.03.001

[14]. Feng, R., Zhao, P., Zhu, Y., Yang, J., Wei, X., Yang, L., Liu, H., Rensing, C., & Ding, Y. (2021). Application of inorganic selenium to reduce accumulation and toxicity of heavy metals (metalloids) in plants: The main mechanisms, concerns, and risks. *The Science of the total environment*, *771*, 144776. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.144776

[15]. Goswami, M., & Deka, S. (2020). Plant growth-promoting rhizobacteria|alleviators of abiotic stresses in soil: A review. *Pedosphere*, *30*(1), 40-61. doi: 10.1016/S1002-0160(19)60839-8

[16]. Handa, N., Kohli, S. K., Thukral, A. K., Bhardwaj, R., Alyemeni, M. N., Wijaya, L., & Ahmad, P. (2018). Protective role of selenium against chromium stress involving metabolites and essential elements in *Brassica juncea* L. seedlings. *3 Biotech*, *8*(1), 66. doi: 10.1007/s13205-018-1087-4

[17]. Islam, E., Yang, X., Li, T., Liu, D., Jin, X., & Meng, F. (2007). Effect of Pb toxicity on root morphology, physiology and ultrastructure in the two ecotypes of *Elsholtzia argyi*. *Journal of hazardous materials*, *147*(3), 806–816. doi: 10.1016/j.jhazmat.2007.01.117

[18]. Kadkhodaie, H., Sodaeizadeh, H., & Mosleh arani, A. (2022). The effects of exogenous application of glycine betain on growth and some physiological characteristics of *Brossica napus* under drought stress in field condition. *Desert Ecosystem Engineering*, *3*(4), 79-90.

[19]. Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic bio-membranes. *Methods in Enzymology*, 148, 350-382.

[20]. Mahar, A., Wang, P., Ali, A., Awasthi, M. K., Lahori, A. H., Wang, Q., Li, R., & Zhang, Z. (2016). Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: A review. *Ecotoxicology and environmental safety*, *126*, 111–121. doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.12.023

[21]. Mosleh arany, A., Khosravi, M., Azimzadeh, H., Sodaeizadeh, H., & Sepahvand, A. (2018). The comparison between *Thuja orientalis* and *Olea europaea* in Pb accumulation and their applications for phytoremediation. *Journal of Natural Environment*, *71*(1), 109-123. doi: 10.22059/jne.2018.24180. [in Farsi]

[22]. Mroczek-Zdyrska, M., Strubińska, J., & Hanaka, A. (2017). Selenium Improves Physiological Parameters and Alleviates Oxidative Stress in Shoots of Lead-Exposed

Vicia faba L. *minor* Plants Grown under Phosphorus-Deficient Conditions. *Journal of Plant Growth Regulation*, 36, 186–199. doi: 10.1007/s00344-016-9629-7

[23]. Najafi Zilaie, M., Mosleh Arani, A., Etesami, H., & Dinarvand, M. (2022) Halotolerant rhizobacteria enhance the tolerance of the desert halophyte *Nitraria schoberi* to salinity and dust pollution by improving its physiological and nutritional status. *Applied Soil Ecology*, 179, 104578. doi: 10.1016/j.apsoil.2022.104578 [29]. [23].

[24]. Najafi Zilaie, M., Mosleh Arani, A., Etesami, H., & Dinarvand, M. (2022). Improved salinity and dust stress tolerance in the desert halophyte *Haloxylon aphyllum* by halotolerant plant growth-promoting rhizobacteria. *Frontiers in plant science*, *13*, 948260. doi: 10.3389/fpls.2022.948260

[25]. Okereafor, U., Makhatha, M., Mekuto, L., Uche-Okereafor, N., Sebola, T., & Mavumengwana, V. (2020). Toxic metal implications on agricultural soils, plants, animals, aquatic life and human health. *International journal of environmental research and public health*, *17*(7), 2204. doi: 10.3390/ijerph17072204

[26]. Pietrini, I., Grifoni, M., Franchi, E., Cardaci, A., Pedron, F., Barbafieri, M., Petruzzelli, G., & Vocciante, M. (2021). Enhanced Lead Phytoextraction by Endophytes from Indigenous Plants. *Soil Systems*, 5(3), 55. doi: 10.3390/soilsystems5030055

[27]. Rahmani, F., Sodaeizadeh, H., Yazdani-Biouki, R., & Kamali Aliabadi, K. (2024). Effect of bio-priming on morphological, physiological and essential oil of Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) under salinity stress. *South African Journal of Botany*, 167, 630-942.

[28]. Ryan, J. A., Zhang, P., Hesterberg, D., Chou, J., & Sayers, D. E. (2001). Formation of chloropyromorphite in a lead-contaminated soil amended with hydroxyapatite. *Environmental science & technology*, *35*(18), 3798–3803. doi: 10.1021/es010634l

[29]. Saddiq, M.S., Afzal, I., Basra, S.M. A., Iqbal, S., & Ashraf, M. (2020). Sodium exclusion affects seed yield and physiological traits of wheat genotypes grown under salt stress. *Soil Science and Plant Nutrition*, 20, 1442–1456. doi: 10.1007/s42729-020-00224-y

[30]. Santoyo, G., Sánchez-Yáñez, J. M., Santos-Villalobos, S. D. L. (2019). Methods for detecting biocontrol and plant growth-promoting traits in rhizobacteria. *Methods in Rhizosphere Biology Research*, 133–149. doi: 10.1007/978-981

[31]. Shen, X., Dai, M., Yang, J., Sun, L., Tan, X., Peng, C., Ali, I., & Naz, I. (2022). A critical review on the phytoremediation of heavy metals from environment: Performance and challenges. *Chemosphere*, *291*(Pt 3), 132979. doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.132979

[32]. Siddiqui, M. H., Alamri, S., Nasir Khan, M., Corpas, F. J., Al-Amri, A. A., Alsubaie, Q. D., Ali, H. M., Kalaji, H. M., & Ahmad, P. (2020). Melatonin and calcium function synergistically to promote the resilience through ROS metabolism under arsenic-induced stress. *Journal of hazardous materials*, *398*, 122882. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.122882

[33]. Soleimanzadeh, H., Habibi, D., Ardakani, M.R., Paknejad, F., & Rejali, F. (2010). Effect of potassium levels on antioxidant enzymes and malondialdehyde content under drought stress in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 5, 56–61. doi: 10.3844/ajabssp.2010.56.61

[34]. Sun, H., Wang, X., Li, H., Bi, J., Yu, J., Liu, X., Zhou, H., & Rong, Z. (2020). Selenium modulates cadmium-induced ultrastructural and metabolic changes in cucumber seedlings. *RSC advances*, *10*(30), 17892–17905. doi: 10.1039/d0ra02866e

[35]. Taheri Analojeh, A., Azimzadeh, H.R., Mosleh Arani, A., & Sodaiezadeh, H. (2016). Investigating and comparing short period impact of dust on physiological characteristics of three species of *Pinus eldarica*, *Cupressus sempervirens*, and *Ligustrum ovalifolium. Arabian Journal of Geosciences*, 9, 1-12. doi: 10.1007/s12517-015-2241-5

[36]. Walinga, I., Van Vark, W., Houba, V.J.G. & Van der lee, J.J. (1989). Plant Analysis Procedures. Department of Soil Science and Plant Nutrition, Wageningen Agricultural

University, Wageningen, Syllabus Part 7, 197-200.

[37]. Wang, Q., Dodd, I. C., Belimov, A. A., & Jiang, F. (2016). Rhizosphere bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase increase growth and photosynthesis of pea plants under salt stress by limiting Na^+ accumulation. *Functional plant biology: FPB*, *43*(2), 161–172. doi: 10.1071/FP15200

[38]. Wagner G. J. (1979). Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplasts. *Plant physiology*, *64*(1), 88–93. doi: 10.1104/pp.64.1.88

[39]. Xu, S., Zhao, N., Qin, D., Liu, S., Jiang, S., Xu, L., Sun, Z., Yan, D., & Hu, A. (2021). The synergistic effects of silicon and selenium on enhancing salt tolerance of maize plants. *Environmental and Experimental Botany*. *187*(2), 104482. doi: 10.1016/j.envexpbot.2021.104482

[40]. Yaghmaei, L., Jafari, R., Soltani, S., Eshghizadeh, H. R., & Jahanbazy, H. (2020). Interaction Effects of Dust and Water Deficit Stresses on Growth and Physiology of Persian Oak (*Quercus Brantii* Lindl.). *Journal of Sustainable Forestry*, *41*(2), 134-158. doi: 10.1080/10549811.2020.1845742

[41]. Yan, A., Wang, Y., Tan, S. N., Mohd Yusof, M. L., Ghosh, S., & Chen, Z. (2020). Phytoremediation: A promising approach for revegetation of heavy metal-polluted land. *Frontiers in plant science*, *11*, 359. doi: 10.3389/fpls.2020.00359

[42]. Yuan, C., Gao, B., Peng, Y., Gao, X., Fan, B., & Chen, Q. (2021). A meta-analysis of heavy metal bioavailability response to biochar aging: Importance of soil and biochar properties. *The Science of the total environment*, *756*, 144058. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.144058

[43]. Zhu, Y., Dong, Y., Zhu, N., & Jin, H. (2022). Foliar application of biosynthetic nano-selenium alleviates the toxicity of Cd, Pb, and Hg in Brassica chinensis by inhibiting heavy metal adsorption and improving antioxidant system in plant. *Ecotoxicology and environmental safety*, *240*, 113681. doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.113681

Effect of *Bacillus cereus* and selenium on some morpho-physiological characteristics and ion content of *Salsola arbuscula* under lead stress (Research Paper)

1- Mehdi Ramazani, PhD student in Desert Management, Faculty of Natural Resources and Desert Studies, Yazd University, Yazd, Iran.
2- Asghar Mosleh Arani, Professor, Department of Environmental Sciences, Faculty of Natural Resources and Desert Studies, Yazd University, Yazd, Iran.
3- Hamid Sodaeizadeh*, Associate Professor, Department of Desert Management, Faculty of Natural Resources and Desert Studies, Yazd University, Yazd, Iran.
hsodaie@yazd.ac.ir
4- Mehdi khayat, Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran.

Received: 01 Nov. 2023
Accepted: 05 Mar. 2024

Abstract

In recent years, due to the development of mining operations, all kinds of heavy metals have entered the natural fields. Due to the long-term stability of heavy elements in the soil and in order to prevent them from entering the food chain, it is necessary to remove them from the soil with environmentally friendly methods such as phytoremediation. This research was conducted with the aim of evaluating the effect of plant growth promoting bacteria (*Bacillus cereus*) and selenium on the phytoremediation ability of *Salsola arbuscula* in lead-contaminated soil. For this purpose, a factorial experiment was conducted in the form of a completely randomized design in three replications, where the investigated factors included lead concentration with three levels (control, 100 and 200 mg/kg soil), plant growth promoting bacteria and selenium (control and 6 µmol) each was considered with two levels. The results showed that the increase in lead decreased the absorption of elements, the amount of chlorophyll, and the dry weight of the plant, and caused a significant increase in proline and anthocyanin and the accumulation of lead in the roots. The simultaneous use of selenium and *Bacillus cereus* increased root lead by 40%, plant dry weight by 29%, chlorophyll by 36%, and potassium, magnesium, and iron by 17, 18, and 27%. The simultaneous use of selenium and *Bacillus cereus* decreased anthocyanin by 30% and proline by 20%. Considering the accumulation of lead in the roots of *Salsola arbuscula*, it was concluded that this plant is suitable for the process of phytostabilization in lead-contaminated soils, and *Bacillus cereus* and selenium increased its phytoremediation ability by improving the biochemical conditions.

Keywords: Stress, Heavy metal, phytoremediation, Mining.