

## تأثیرات هم‌افزای کنسرسیوم میکروبی و سدیم‌ادتا بر سمیت‌زدایی کادمیوم و سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در سورگوم علوفه‌ای (*Sorghum bicolor* L.)

فرزاد رستمی<sup>۱</sup>، حمیدرضا عیسوند<sup>۱\*</sup>، ماشاله دانشورا<sup>۱</sup>، محسن سعیدی<sup>۲</sup>، سجاد رحیمی مقدم<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

<sup>۲</sup> گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

### چکیده

شدت گرفتن آلودگی خاک‌های زراعی به کادمیوم، ضرورت یافتن شیوه‌های پایدار برای کاهش تنش اکسیداتیو و بهبود کارکرد فیزیولوژیک گیاهان را دوچندان کرده است. کنسرسیوم‌های میکروبی و عوامل کلات‌کننده از گزینه‌های نوین در مدیریت این تنش محسوب می‌شوند. هدف این پژوهش بررسی تأثیر باکتری‌های محرک رشد (پانتونه آگلومرانس و سودوموناس فلورسنس)، مایکوریزا آربسکولار و سدیم‌ادتا بر شاخص‌های رشدی، رنگیزه‌های فتوسنتزی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سورگوم علوفه‌ای در خاک آلوده به ۴۰ میلی‌گرم در کیلوگرم سولفات کادمیوم بود. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار در گلخانه انجام شد. نتایج نشان داد اثر متقابل سه‌گانه بر درصد ظهور گیاهچه، کلروفیل *b* و فعالیت آنزیم‌های دفاعی معنی‌دار بود. بیشترین درصد ظهور گیاهچه در تیمار پانتونه آگلومرانس × بدون مایکوریزا × بدون سدیم‌ادتا با ۳۱/۷۲ درصد افزایش نسبت به شاهد مشاهده شد. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در تیمار سودوموناس فلورسنس × مایکوریزا × بدون سدیم‌ادتا ۲۲/۱۷ درصد و فعالیت پراکسیداز در تیمار سودوموناس فلورسنس × بدون مایکوریزا × سدیم‌ادتا ۴۹/۵ درصد بیشتر از شاهد بود. مایکوریزا به تنهایی موجب افزایش ۷/۴ درصدی پروتئین محلول برگ و ۹/۱۳ درصدی کلروفیل کل گردید. بیشترین میزان کارتنوئید نیز در تیمار پانتونه آگلومرانس × سدیم‌ادتا با ۳/۱۳ درصد افزایش نسبت به شاهد حاصل شد. نتایج حاکی از آن است که ترکیب زیستی سودوموناس فلورسنس با مایکوریزا بدون استفاده از سدیم‌ادتا، بیشترین بهبود را در سازوکار دفاعی و حفظ رنگیزه‌های فتوسنتزی ایجاد کرد. بنابراین، کاربرد هم‌افزای میکروارگانیسم‌های مفید می‌تواند به عنوان راهکاری زیست‌پایدار برای کاهش سمیت کادمیوم و افزایش کارایی گیاه‌پالایی سورگوم علوفه‌ای پیشنهاد شود.

واژه‌های کلیدی: استرس اکسیداتیو، پالایش زیستی، پاسخ فیزیولوژیک، ریزوسفر، فلزات سنگین، هم‌زیستی میکروبی

دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۰۷/۲۵، بازنگری: ۱۴۰۴/۰۹/۲۰، پذیرش: ۱۴۰۴/۱۰/۰۷، اولین انتشار: ۱۴۰۵/۰۳/۱۲

\* نویسنده مسئول، رایانامه: [eisvand.hr@lu.ac.ir](mailto:eisvand.hr@lu.ac.ir)



حق انتشار این مستند، متعلق به انجمن فیزیولوژی گیاهی ایران است. © ۱۴۰۳

این مقاله تحت گواهی زیر منتشر شده و هر نوع استفاده غیرتجاری از آن مشروط بر استناد صحیح به مقاله و با رعایت شرایط مندرج در آدرس زیر مجاز است:

Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

## مقدمه

آلودگی خاک با فلزات سنگین به‌ویژه کادمیوم (Cd) یکی از چالش‌های جدی در کشاورزی پایدار و سلامت اکوسیستم‌های زراعی محسوب می‌شود. کادمیوم به‌دلیل تحرک بالا، نیمه‌عمر طولانی و سمیت زیستی، در میان آلاینده‌های غیرآلی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و منجر به کاهش رشد، فتوسنتز، جذب مواد مغذی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاهان می‌شود (Hassan et al., 2020). این عنصر در اثر فعالیت‌های انسانی مانند استفاده از کودهای فسفاته، فاضلاب صنعتی، و ذوب فلزات به خاک وارد شده و از طریق ریشه جذب گیاه می‌گردد و در نهایت به زنجیره غذایی انسان منتقل می‌شود (Alengebawy et al., 2021).

اثرات کادمیوم بر گیاهان شامل اختلال در فتوسنتز، تخریب ساختار کلروپلاست‌ها، کاهش محتوای کلروفیل و تحریک تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) است که منجر به استرس اکسیداتیو و آسیب سلولی می‌گردد (Zulfiqar et al., 2022). از این‌رو، یافتن راهکارهای زیستی و پایدار برای کاهش اثرات سمی کادمیوم در گیاهان زراعی اهمیت روزافزون دارد. در سال‌های اخیر، استفاده از روش‌های زیستی مانند به‌کارگیری باکتری‌های محرک رشد گیاه (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) و قارچ‌های میکوریزای آربسکولار (Arbuscular Mycorrhizal Fungi) به‌عنوان جایگزینی ایمن و سازگار با محیط‌زیست برای کاهش تنش فلزات سنگین مورد توجه قرار گرفته است (Fasusi et al., 2023). این میکروارگانیسم‌ها از طریق مکانیسم‌هایی مانند تثبیت نیتروژن، انحلال فسفر، تولید فیتوهورمون‌ها، افزایش سطح جذب عناصر غذایی و تحریک سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی، موجب بهبود رشد گیاه و افزایش مقاومت آن در برابر تنش‌های محیطی می‌شوند (Timofeeva et al., 2023). قارچ‌های میکوریزا نیز با تشکیل همزیستی در ریشه، سطح جذب مواد معدنی را افزایش داده و از طریق کاهش انتقال کادمیوم به بخش‌های هوایی، مقاومت گیاه را بهبود می‌بخشند (Sterckeman, 2021). مطالعات نشان داده‌اند که تلفیق هم‌زمان باکتری‌های محرک

رشد و میکوریزا در گیاهان حساس به فلزات، می‌تواند اثرات هم‌افزایی قابل‌توجهی بر عملکرد فیزیولوژیک و آنزیمی داشته باشد (Zeng et al., 2025).

گیاه سورگوم علوفه‌ای (*Sorghum bicolor* L.) به‌دلیل رشد سریع، سیستم ریشه‌ای عمیق، توانایی بالای تحمل خشکی و قابلیت جذب فلزات سنگین، یکی از گونه‌های مستعد برای گیاه‌پالایی (Phytoremediation) خاک‌های آلوده است (Gorelova et al., 2023). این گیاه در مناطق نیمه‌خشک ایران و جهان به‌عنوان منبع علوفه‌ای مهم استفاده می‌شود و توانایی بالایی در انباشت عناصر فلزی در بافت‌های خود دارد (Aliyat et al., 2024). با این حال، تجمع بیش از حد کادمیوم در بافت‌های گیاه منجر به کاهش رشد، تخریب رنگیزه‌های فتوسنتزی و افزایش استرس اکسیداتیو می‌شود (Ivanov and Kosobryukhov, 2020). بنابراین، استفاده از عوامل زیستی مانند باکتری‌های مفید و قارچ‌های همزیست به‌همراه ترکیبات کلات‌کننده‌ای نظیر سدیم‌ادتا (Na<sub>2</sub>EDTA) می‌تواند رویکردی مؤثر برای افزایش تحمل و کارایی گیاه در پالایش خاک‌های آلوده باشد (Guarino et al., 2020). سدیم‌ادتا یکی از کلاته‌کننده‌های پرکاربرد است که با تشکیل کمپلکس پایدار با فلزات سنگین، قابلیت انتقال آن‌ها را به درون ریشه افزایش می‌دهد. کاربرد کنترل‌شده این ماده در کنار میکروارگانیسم‌های مفید می‌تواند جذب و انباشت فلزات را در گیاه افزایش دهد بدون آنکه آسیب شدید به فیزیولوژی گیاه وارد کند (Gupta et al., 2024). با این حال، نتایج پژوهش‌ها درباره اثرات متقابل ادتا و عوامل زیستی متناقض است؛ برخی مطالعات از افزایش کارایی گیاه پالایی در اثر کاربرد ترکیبی گزارش داده‌اند (Khanpour-Alikelayeh and Partovinia, 2021). در حالی که برخی دیگر به اثرات منفی ناشی از افزایش زیست‌فراهمی فلزات و القای استرس اکسیداتیو اشاره کرده‌اند (Akoto et al., 2022). این اختلاف نظرها نشان می‌دهد که نوع باکتری، میزان ادتا و گونه گیاهی می‌توانند تعیین‌کننده نوع تعامل باشند.

در میان باکتری‌های محرک رشد، گونه‌های پانتوئه آگلومرانس و سودوموناس فلورسنس از مهم‌ترین

افزایش معنی دار این آنزیم‌ها و در نتیجه کاهش اثرات سمی کادمیوم شود (Anas et al., 2025). همچنین، حضور قارچ میکوریزا با تنظیم جذب یون‌های فلزی و افزایش غلظت عناصر ضروری مانند فسفر و روی، تعادل تغذیه‌ای گیاه را حفظ می‌کند و اثرات کادمیوم را تعدیل می‌نماید (Begum et al., 2023).

با وجود مطالعات متعدد، هنوز شکاف دانشی قابل توجهی در زمینه تعامل سه‌گانه میان باکتری‌های محرک رشد، میکوریزا و ترکیبات کلات‌کننده وجود دارد (Mashabela et al., 2022). در پژوهش حاضر، تأثیر هم‌زمان باکتری‌های محرک رشد، میکوریزا و سدیم ادتا بر شاخص‌های رشد، رنگیزه‌های فتوسنتزی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو سورگوم علوفه‌ای در خاک آلوده به کادمیوم بررسی شد. فرضیه این پژوهش آن است که ترکیب عوامل زیستی و شیمیایی می‌تواند با تقویت مکانیسم‌های فیزیولوژیک و آنتی‌اکسیداتیو، اثرات زیان‌بار کادمیوم را کاهش داده و کارایی گیاه‌پالایی سورگوم را افزایش دهد.

#### مواد و روش‌ها

این پژوهش در تابستان سال زراعی ۱۴۰۳ در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی کرمانشاه اجرا گردید. خاک مورد استفاده از مزرعه مجاور گلخانه به صورت تصادفی و از دو عمق ۰-۳۰ و ۶۰-۳۰ سانتی‌متری برداشت شد و پس از اختلاط هوا خشک و از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شد. بافت خاک به روش هیدرومتری (Bouyoucos, 1962) تعیین شد و در نهایت برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آن اندازه‌گیری گردید (جدول ۱). همچنین نمونه‌ای از آب چاه، به‌عنوان منبع آبیاری گلخانه، اندازه‌گیری شد (جدول ۲). این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار و در ۴۸ گلدان با قطر ۲۶ و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر انجام شد. تیمارها شامل: (۱) باکتری محرک رشد در سه سطح صفر، بذرمال با مایه تلقیح جامد پانتوئه آگلومرانس (Pantoea agglomerans) (۶ گرم در کیلوگرم بذر) تهیه‌شده از کود

میکروارگانیسم‌های مورد استفاده در خاک‌های آلوده به فلزات هستند. باکتری پانتوئه آگلومرانس با تثبیت نیتروژن، ترشح اکسین و سیترات، و افزایش قابلیت جذب عناصر، نقش مؤثری در بهبود رشد گیاه دارد (Melini et al., 2023). از سوی دیگر، باکتری سودوموناس فلروسنس با تولید سیدروفور و تنظیم بیان ژن‌های دفاعی گیاه، موجب بهبود مقاومت به استرس فلزی و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، پراکسیداز (POD) و کاتالاز (CAT) می‌شود (Vindeirinho et al., 2021). پژوهش‌های اخیر نشان داده‌اند که استفاده توأم از باکتری سودوموناس فلروسنس و قارچ میکوریزا می‌تواند به‌صورت هم‌افزا منجر به افزایش کلروفیل، پروتئین‌های محلول و کاهش سمیت فلزات شود (Shool and Shamshiri, 2014). در زمینه تعامل میان قارچ میکوریزا و کلاته‌کننده‌ها، مطالعات متعددی وجود دارد. برای مثال Burlakoti و همکاران (۲۰۲۴) گزارش کردند که همزیستی میکوریزا و باکتری‌های محرک رشد در ذرت باعث افزایش معنی دار رنگیزه‌های فتوسنتزی و تحمل به کادمیوم شده است. در مطالعه‌ای دیگر، محققین نشان دادند که استفاده از قارچ‌های میکوریزا همراه با باکتری‌های حل‌کننده فسفر موجب بهبود رشد و کاهش تجمع کادمیوم در آفتابگردان شده است (Amouzegar et al., 2022). باکتری‌های نیتروژن سیکل با تحریک همزیستی میکروبی، جذب کادمیوم را در گیاه تاج‌ریزی سیاه (*Solanum nigrum*) افزایش می‌دهند، در حالی که موجب فعال‌سازی سیستم دفاع آنتی‌اکسیداتیو نیز می‌شوند (You et al., 2023). در سطح فیزیولوژیکی، مکانیسم‌های متعددی در گیاهان برای مقابله با تنش کادمیوم وجود دارد که از جمله آن‌ها می‌توان به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو، تجمع ترکیبات فنولی، افزایش سنتز رنگیزه‌های فتوسنتزی و تغییر در ترکیب پروتئین‌ها اشاره کرد (Goncharuk and Zagoskina, 2023). فعال‌سازی سیستم آنتی‌اکسیداتیو نقش کلیدی در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد و حفاظت از ساختارهای سلولی دارد. گزارش‌ها نشان می‌دهد که تلقیح گیاهان با میکروارگانیسم‌های مفید می‌تواند موجب

جدول ۱- آنالیز خاک قبل از اعمال تیمارها)

کادمیوم ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	هدایت الکتریکی ( $\text{dS m}^{-1}$ )	pH	رس	شن	سیلت	نیتروژن کل درصد	کربن آلی آهک	بافت خاک	فسفر ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	پتاسیم
۱۸۶	۰/۴۳۵	۷/۹۵	۳۱	۴۷	۲۲	۰/۱۴	۱/۳۲۶	رسی لومی	۹/۰۵	۴۷۴

جدول ۲- آنالیز آب

کادمیوم ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	هدایت الکتریکی ( $\text{dS m}^{-1}$ )	pH	بی‌کربنات ( $\text{mg L}^{-1}$ )
۲۸/۴	۰/۸۲۷	۸/۲۸	-

گلدان‌ها اضافه شد. آبیاری بر اساس نیاز گیاه و ظرفیت زراعی انجام شد و برداشت، ۹۳ روز پس از کاشت بذرها در ابتدای مرحله زایشی انجام شد.

صفات مورد بررسی، میانگین زمان جوانه‌زنی بر حسب روز (Mean Germination Time): طبق رابطه ۱ محاسبه گردید، که در آن (ni) تعداد بذرهایی که در روز i جوانه زده‌اند، (ti) زمان (بر حسب روز) از شروع آزمایش تا روز i، (Ni) مجموع کل بذره‌های جوانه‌زده در طول آزمایش است (Sudhakar et al., 2018).

رابطه (۱)

$$\text{MGT} = \sum (ti \times ni) / Ni$$

درصد ظهور گیاهچه (Seedling Emergence Percentage):

ظهور گیاهچه به‌طور روزانه، از روز سوم پس از کاشت ثبت گردید و نسبت عددی گیاهچه‌های ظاهر شده عادی به کل تعداد بذره‌های کشت‌شده به صورت درصد بیان شد (Sudhakar et al., 2018). داده‌های درصد ظهور گیاهچه پیش از انجام آنالیز با استفاده از تبدیل آرکسین - جذرمربع ( $\arcsin \sqrt{p}$ ) نرمال سازی شدند تا فرضیات نرمال بودن و یکنواختی واریانس‌ها رعایت شود. مقایسه میانگین‌ها بر اساس داده‌های تبدیل‌شده انجام شد و میانگین‌ها به صورت درصد برگشت‌زده گزارش گردید.

اندازه‌گیری غلظت پروتئین محلول برگ: غلظت

پروتئین‌های محلول در عصاره برگ براساس روش Bradford (۱۹۷۶) و با استفاده از معرف کوماسی بلو G-250 اندازه‌گیری

زیستی از توپاکتر از شرکت زیست‌فناور سبز، بذرمال با محلول سودوموناس فلورسنس (*Pseudomonas fluorescens*) (۷) میلی‌لیتر در کیلوگرم بذر) تهیه‌شده از شرکت راهبر زیست‌فناور البرز. (۲) قارچ مایکوریزا آربسکولار (Arbuscular Mycorrhizal Fungi) در دو سطح (صفر و بذرمال با مایه جامد ۳۰ گرم در کیلوگرم بذر) محصول مایکورت شرکت زیست‌فناور پیشتاز واریان و (۳) پودر سدیم‌ادتا (Ethylenediaminetetra Acetic acid Disodium salt) در دو سطح (صفر و مصرف ۳ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک) تهیه‌شده از شرکت کیان کاوه آزما بود. محتوی گلدان‌ها به نسبت خاک (۲) و ماسه (۱) با پودر سولفات کادمیوم ( $\text{Cadmium sulfate hydrate } (3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O})$ ) (۴۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) تهیه‌شده از شرکت نیوترون فارما شیمی‌کال کمپانی ایران، به صورت محلول در آب و اسپری مخلوط و به مدت (یک ماه) در زیر نایلون آماده شد، سپس به نسبت مساوی در هر گلدان توزین و برای کاشت آماده شد. برای بذرمال کردن بذور با مایه جامد آماده مایکوریزا آربسکولار و مایه جامد باکتری پانتوئه آگلومرانس از محلول رقیق‌شده آب و شکر ۲٪ استفاده شد. زمان غوطه‌وری بذور: ۲-۳ دقیقه و پس از آغشته‌کردن بذرها در سایه خشک و سپس در محلول باکتری سودوموناس فلورسنس به مدت حداکثر ۲ دقیقه قرار داده و پس از خشک‌شدن در سایه، تعداد ۱۰ بذر با فواصل مساوی کشت شد، پس از استقرار گیاهچه پنج بوته در هر گلدان باقی ماند و سدیم‌ادتا به صورت محلول در آب به

در این رابطه:  $\Delta A_{240}$  کاهش جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر در واحد زمان،  $t$  زمان واکنش بر حسب دقیقه،  $\epsilon$  ضریب خاموشی ( $0.394 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )،  $\text{H}_2\text{O}_2$ ،  $C_p$  غلظت پروتئین نمونه بر حسب ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) است.

#### فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD): فعالیت

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با روش Dhindsa و همکاران (۱۹۸۱) بر اساس توانایی آن در مهار احیای نیتروبلو تترازولیوم (NBT) در طول موج ۵۶۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر UV-vis مدل (MAPADA) UV-3200 اندازه‌گیری شد. یک واحد فعالیت SOD به عنوان مقدار آنزیمی تعریف می‌شود که موجب ۵۰ درصد مهار احیای NBT تحت شرایط آزمایشی شود. فعالیت آنزیم با استفاده از معادله (۵) محاسبه گردید:

رابطه (۵)

$$\text{SOD activity (U mg}^{-1} \text{ protein)} = (V_t / (V_s \times C_p)) \times ((A_0 - A_1) / A_0) \times 100$$

در این رابطه:  $V_t$  حجم کل واکنش بر حسب میلی‌لیتر،  $V_s$  حجم نمونه مورد استفاده بر حسب میلی‌لیتر،  $C_p$  غلظت پروتئین نمونه بر حسب  $\text{mg mL}^{-1}$ ،  $A_0$  جذب در طول موج ۵۶۰ نانومتر برای نمونه شاهد،  $A_1$  جذب در طول موج ۵۶۰ نانومتر برای نمونه حاوی آنزیم است.

#### اندازه‌گیری رنگی‌های فتوستزی: مقدار کلروفیل $a$

کلروفیل  $b$  و کاروتنوئیدها در مرحله پایانی رشد رویشی گیاه به روش Lichtenthaler و Wellburn (۱۹۸۳) اندازه‌گیری شد. جذب نوری محلول صاف‌شده در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۶ و ۴۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده گردید. سپس غلظت رنگی‌ها برحسب میلی‌گرم در گرم وزن تر ( $\text{mg g}^{-1} \text{ FW}$ ) با استفاده از روابط ۶، ۷ و ۸ محاسبه شد:

رابطه (۶)

$$\text{Chlorophyll } a \text{ (mg g}^{-1} \text{ FW)} = ((12.25 \times A_{663} - 2.79 \times A_{646}) \times V) / (1000 \times W)$$

رابطه (۷)

$$\text{Chlorophyll } b \text{ (mg g}^{-1} \text{ FW)} = ((21.50 \times A_{646} - 5.10 \times A_{663}) \times V) / (1000 \times W)$$

رابطه (۸)

$$\text{Carotenoids (mg g}^{-1} \text{ FW)} = ([1000 \times A_{470} - (1.82 \times \text{Chl } a + 85.02 \times \text{Chl } b)] \times V) / (198 \times 1000 \times W)$$

که در آن:  $A_{663}$ ،  $A_{646}$  و  $A_{470}$  میزان جذب نوری در

شد. جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر با اسپکتروفتومتر UV-vis مدل (MAPADA) UV-3200 ثبت گردید و مقدار پروتئین براساس منحنی استاندارد آلومین سرم گاوی (BSA) محاسبه شد. رابطه (۲) رابطه مورد استفاده را نشان می‌دهد:

رابطه (۲)

$$\text{Protein concentration (mg g}^{-1} \text{ FW)} = [(A_{595} - b) / m] \times (V / W)$$

در این رابطه  $A_{595}$  جذب نوری نمونه در طول موج ۵۹۵ نانومتر،  $b$  عرض از مبدأ منحنی استاندارد،  $m$  شیب منحنی استاندارد،  $V$  حجم کل عصاره‌گیری بر حسب میلی‌لیتر،  $W$  وزن تر نمونه برگ بر حسب گرم است.

#### فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD): فعالیت آنزیم پراکسیداز

مطابق روش Chance و Maehly (۱۹۵۵) با استفاده از سوبسترای گایاکول تعیین شد. در این روش، افزایش جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر ناشی از تشکیل تترآگایاکول با اسپکتروفتومتر UV-vis مدل (MAPADA) UV-3200 ثبت گردید. فعالیت آنزیم بر اساس رابطه (۳) محاسبه شد:

رابطه (۳)

$$\text{POD activity (U mg}^{-1} \text{ protein)} = (\Delta A_{470} / (\epsilon \times t)) \times (V_t / (V_s \times C_p))$$

در این رابطه:  $\Delta A_{470}$  تغییرات جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر در واحد زمان،  $\epsilon$  ضریب خاموشی تترآگایاکول ( $2676 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )،  $t$  زمان واکنش بر حسب دقیقه،  $V_t$  حجم کل واکنش بر حسب میلی‌لیتر،  $V_s$  حجم نمونه مورد استفاده بر حسب میلی‌لیتر،  $C_p$  غلظت پروتئین نمونه بر حسب ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) است.

#### فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT): فعالیت آنزیم کاتالاز بر

اساس روش Aebi (۱۹۸۴) سنجیده شد. این روش بر پایه کاهش جذب  $\text{H}_2\text{O}_2$  در طول موج ۲۴۰ نانومتر در اثر تجزیه توسط آنزیم استوار است و با اسپکتروفتومتر UV-vis مدل (MAPADA) UV-3200 ثبت گردید. فعالیت آنزیم با استفاده از رابطه (۴) محاسبه گردید:

رابطه (۴)

$$\text{CAT activity (U mg}^{-1} \text{ protein)} = (\Delta A_{240} / t) / (\epsilon \times C_p)$$

کردند که کاربرد هم‌زمان عوامل زیستی موجب بهبود توان بذر جو و ذرت در عبور از مرحله تنش جوانه‌زنی می‌شود، اما اختلافات معنی‌دار به عوامل مختلفی نظیر شرایط محیطی، سطح تنش و گونه گیاهی بستگی دارد.

**میانگین زمان جوانه‌زنی:** اثر تیمارهای آزمایشی بر میانگین زمان جوانه‌زنی معنی‌دار نبود (جدول ۳). عدم معنی‌داری اثر تیمارها بر میانگین زمان جوانه‌زنی بیانگر آن است که تیمارهای اعمال‌شده، از جمله کاربرد باکتری‌های محرک رشد، قارچ میکوریزا و ترکیبات کلات‌کننده نظیر سدیم‌ادتا، نتوانسته‌اند به‌طور معنی‌داری زمان لازم برای جوانه‌زنی بذر سورگوم تحت تنش کادمیوم را تغییر دهند. باتوجه به مشاهدات Olzacki و همکاران (۲۰۲۵) تیمارهای زیستی در شرایط تنش فلزات سنگین تأثیر معنی‌داری بر مدت‌زمان جوانه‌زنی نداشتند. همچنین، در مطالعه‌ای دیگر بر روی گیاه ماش (*Vigna radiate*) تحت تنش فلزات سنگین، عدم تأثیر معنی‌دار تیمارهای زیستی بر سرعت یا مدت‌زمان جوانه‌زنی گزارش شد (Pramila, 2022). این موضوع می‌تواند به حساسیت ذاتی مرحله جوانه‌زنی نسبت به شرایط فیزیولوژیک اولیه بذر و تأثیرات اولیه کادمیوم مربوط باشد، که با وجود اعمال تیمارهای بهبوددهنده، تغییر محسوسی مشاهده نشده است.

**میزان کلروفیل  $a$ :** اثر متقابل تیمار باکتری  $\times$  میکوریزا  $\times$  سدیم‌ادتا بر میزان کلروفیل  $a$  غیرمعنی‌دار بود، اما اثر تیمار باکتری  $\times$  میکوریزا و تیمار باکتری  $\times$  سدیم‌ادتا بر این صفت در سطح ۱ و ۰/۰۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۴). در اثر متقابل باکتری و میکوریزا، تیمار بدون باکتری  $\times$  میکوریزا با ۵/۶۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر بالاترین مقدار کلروفیل  $a$  را داشت که نسبت به تیمار شاهد ۱۳/۱ درصد افزایش نشان داد، تیمار باکتری سودوموناس فلورسنس  $\times$  بدون میکوریزا نیز نسبت به شاهد افزایش داشت. کمترین مقدار مربوط به تیمار باکتری سودوموناس فلورسنس  $\times$  میکوریزا بود که نسبت به شاهد ۲۱/۸ درصد کاهش نشان داد (شکل ۲a). کاهش کلروفیل  $a$  در این تیمار ممکن است ناشی از رقابت منفی بین

طول‌موج‌های مربوطه،  $V$  حجم محلول استخراج‌شده (میلی‌لیتر)،  $W$  وزن تر نمونه برگ (گرم)، اعداد ثابت (۱۲/۲۵، ۲/۷۹ و ...) ضرایب ویژه برای استون ۸۰ درصد بر اساس روش Lichenthaler و Wellburn (۱۹۸۳) هستند.

پس از بررسی وضعیت نرمال بودن داده‌ها و سایر مفروضات انجام آنالیز واریانس، آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS 9.4 انجام شد و برای مقایسه میانگین‌ها از روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن ( $P\text{-Value} \leq 0.05$ ) استفاده گردید.

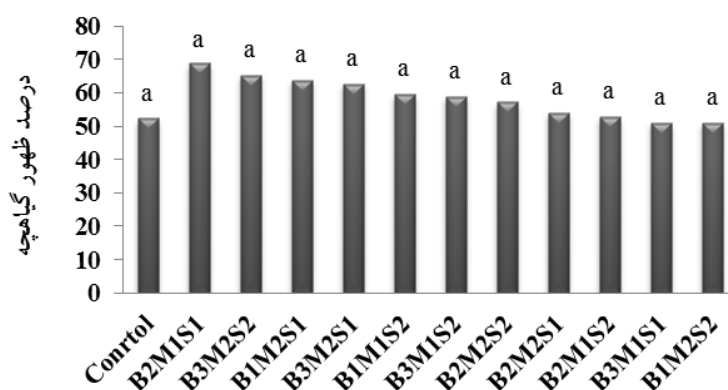
## نتایج و بحث

**درصد ظهور گیاهچه:** اثر متقابل سه‌گانه باکتری، میکوریزا و سدیم‌ادتا بر درصد ظهور گیاهچه در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). تیمار باکتری پانتوئه آگلومرانس  $\times$  بدون میکوریزا  $\times$  بدون سدیم‌ادتا با ۶۸/۹۴ درصد ظهور گیاهچه بالاترین درصد ظهور گیاهچه را داشت که ۳۱/۷۲ درصد نسبت به تیمار شاهد بیشتر بود. در مقابل، تیمار بدون باکتری  $\times$  میکوریزا  $\times$  سدیم‌ادتا با ۲۵/۹۵ درصد کمترین درصد ظهور گیاهچه را نشان داد (شکل ۱). این موضوع بیانگر آن است که علی‌رغم تفاوت عددی بین تیمارها، تفاوت آن‌ها در مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. اگر چه برخی ترکیب‌ها درصد ظهور گیاهچه بیشتری داشتند، اما به دلیل قرار گرفتن آن‌ها در گروه آماری مشابه، نمی‌توان با اطمینان آماری بین آن‌ها تمایزی قائل شد. این امر ممکن است به اثرات هم‌پوشان تیمارها و یا دامنه تغییرات محدود صفت مربوط باشد. به‌طورکلی، کاربرد هم‌زمان باکتری‌های محرک رشد و قارچ‌های میکوریزا در برخی ترکیب‌ها باعث بهبود نسبی درصد ظهور گیاهچه شد. تیمارهایی که فاقد سدیم‌ادتا بودند، در برخی موارد درصد ظهور گیاهچه بیشتری نشان دادند، که می‌تواند به تأثیر منفی احتمالی این ترکیب بر جوانه‌زنی بذر در شرایط تنش فلزات سنگین مرتبط باشد. این یافته‌ها با نتایج پژوهش‌های Ferioun و همکاران (۲۰۲۵) و Gong و همکاران (۲۰۲۴) هم‌راستا است، آنان نیز گزارش

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای آزمایشی بر درصد ظهور گیاهچه و میانگین زمان جوانه زنی بذر سورگوم علوفه‌ای تحت تنش کادمیوم

میانگین مربعات		درجه آزادی	منابع تغییرات
میانگین زمان جوانه زنی	درصد ظهور گیاهچه		
۰/۲۰۷۲ <sup>ns</sup>	۳۲/۰۷ <sup>ns</sup>	۲	باکتری
۰/۴۳۳۲ <sup>ns</sup>	۳۵/۳۴ <sup>ns</sup>	۱	مایکوریزا
۰/۰۴۶۹ <sup>ns</sup>	۲۲/۱۷ <sup>ns</sup>	۱	سدیم ادتا
۰/۱۵۸ <sup>ns</sup>	۲۰۱/۳۷ <sup>ns</sup>	۲	باکتری × مایکوریزا
۰/۱۷۱۵ <sup>ns</sup>	۱۴۳/۶۵ <sup>ns</sup>	۲	باکتری × سدیم ادتا
۰/۵۱۲۵ <sup>ns</sup>	۱۱/۴۸ <sup>ns</sup>	۱	مایکوریزا × سدیم ادتا
۰/۱۸۷۲ <sup>ns</sup>	۳۹۳/۸۶*	۲	باکتری × مایکوریزا × سدیم ادتا
۰/۳۷۲	۱۱۱/۶۵	۳۶	خطا
۱۶/۰۳	۱۸/۱۷		ضریب تغییرات (%)

ns, \*, \*\*, \*\*\* به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح ۰/۰۱، ۰/۰۵ و ۰/۰۱ درصد



تیمار باکتری × مایکوریزا × سدیم ادتا

شکل ۱- مقایسه میانگین اثر تیمارهای آزمایشی بر درصد ظهور گیاهچه سورگوم علوفه‌ای تحت تنش کادمیوم. Control (بدون باکتری، بدون مایکوریزا و بدون سدیم ادتا)، B1 (بدون باکتری)، B2 (باکتری پانتوئه آگلومرانس)، B3 (باکتری سودوموناس فلورسنس)، S1 (بدون سدیم ادتا)، S2 (با سدیم ادتا)، M1 (بدون مایکوریزا)، M2 (با مایکوریزا).

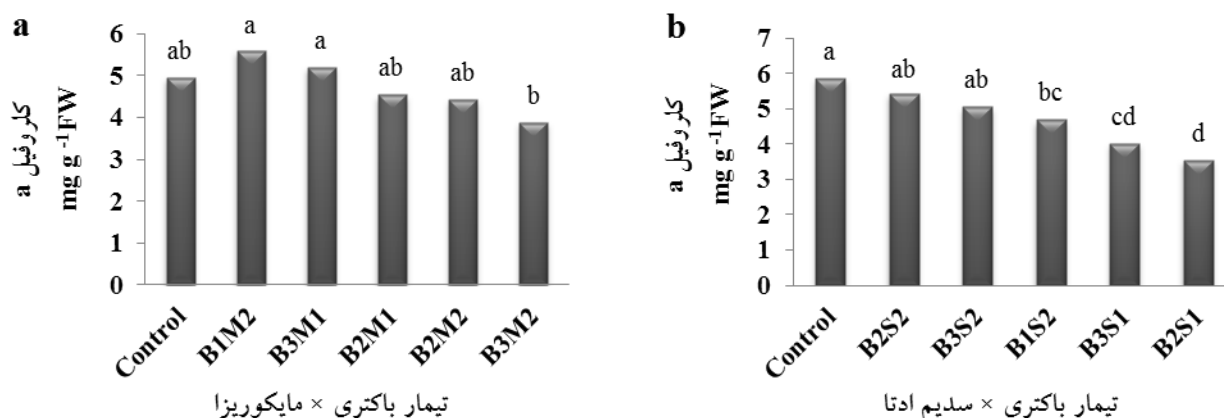
مقایسه اثر تیمارهای باکتری و سدیم ادتا تیمار شاهد با ۵/۸۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر بالاترین مقدار کلروفیل *a* را داشت (شکل ۲b). تیمار باکتری پانتوئه آگلومرانس × سدیم ادتا نسبت به شاهد ۷/۳۲ درصد کاهش نشان داد، همچنین تیمار باکتری سودوموناس فلورسنس × سدیم ادتا ۱۳/۸ درصد نسبت به شاهد کاهش داشت، کمترین مقدار مربوط به تیمار باکتری

مایکوریزا و باکتری سودوموناس فلورسنس باشد که کارایی هر یک را کاهش داده است (Shool and Shamshir, 2014). همچنین، کاربرد هم‌زمان آن‌ها ممکن است منجر به افزایش جذب کادمیوم و تشدید سمیت شود (You et al., 2023). در برخی شرایط، به جای اثر هم‌افزا، تعامل آن‌ها می‌تواند اثر آنتاگونیستی داشته باشد (Savastano and Bais, 2024). در

جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای آزمایشی بر میزان رنگیزه‌های فتوستنتزی سورگوم علفه‌ای تحت تنش کادمیوم

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		کلروفیل <i>a</i>	کلروفیل <i>b</i>	کارتنوئید کلروفیل کل
باکتری	۲	۰/۱۷۵۸*	۰/۲۰۳۷*	۰/۳۴۸۵**
مایکوریزا	۱	۰/۰۶۳۷ <sup>ns</sup>	۰/۴۰۲۱**	۰/۳۱۵۲*
سدیم‌ادتا	۱	۰/۲۸۸۵**	۰/۰۳۹۱ <sup>ns</sup>	۰/۱۱۶۳ <sup>ns</sup>
باکتری × مایکوریزا	۲	۰/۲۰۸۴**	۰/۲۳۸۶**	۰/۴۲۰۴**
باکتری × سدیم‌ادتا	۲	۰/۵۴۷۴***	۰/۳۲۸۰**	۰/۸۰۶۵***
مایکوریزا × سدیم‌ادتا	۱	۰/۰۴۳۹ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۸۶ <sup>ns</sup>	۰/۰۱۹۸ <sup>ns</sup>
باکتری × مایکوریزا × سدیم‌ادتا	۲	۰/۰۶۷۲ <sup>ns</sup>	۰/۲۸۶۴**	۰/۱۸۱۷ <sup>ns</sup>
خطا	۳۶	۰/۰۳۳۳	۰/۰۴۰۵	۰/۰۶۱۵
ضریب تغییرات (%)		۸/۷۹	۱۴/۰۸	۱۲/۹۳
		۹/۵۳		

ns, \*, \*\*, و \*\*\* به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح ۰.۵، ۱ و ۰.۰۱ درصد



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر تیمارهای آزمایشی بر میزان کلروفیل *a* در سورگوم علفه‌ای تحت تنش کادمیوم. Control در شکل a (بدون باکتری و بدون مایکوریزا)، Control در شکل b (بدون باکتری و بدون سدیم‌ادتا)، B1 (بدون باکتری)، B2 (باکتری پانتوئه آگلومرانس)، B3 (باکتری سودوموناس فلورسنس)، S1 (بدون سدیم‌ادتا)، S2 (با سدیم‌ادتا)، M1 (بدون مایکوریزا)، M2 (با مایکوریزا)

به بهبود محتوای کلروفیل شد. نتایج نشان می‌دهد که حضور مایکوریزا به تنهایی برای بهبود فتوستنتز و کلروفیل مؤثرتر است، درحالی‌که ترکیب باکتری‌های محرک رشد و سدیم‌ادتا می‌تواند به دلایل پیچیده‌ای منجر به افزایش استرس و کاهش کلروفیل شود. تیمارهای ترکیبی ممکن است به دلیل رقابت بین میکروارگانیسم‌ها، افزایش سمیت کادمیوم، یا اثرات منفی بر فیزیولوژی گیاه، باعث کاهش کلروفیل نسبت به شاهد شده باشند. گزارش کردند که کاربرد همزمان سدیم‌ادتا و

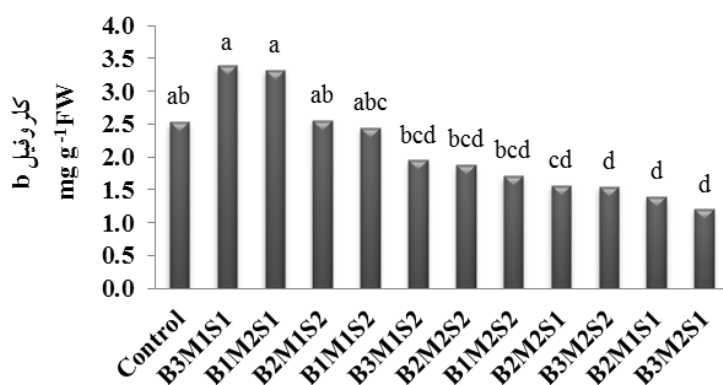
پانتوئه آگلومرانس × بدون سدیم‌ادتا که ۳۹/۵ درصد کاهش نسبت به تیمار شاهد نشان داد (شکل ۲b). نتایج این پژوهش نشان داد که حضور یا عدم حضور باکتری، مایکوریزا و سدیم‌ادتا به صورت ترکیبی می‌تواند اثرات متفاوتی بر میزان کلروفیل *a* در سورگوم داشته باشد. افزایش میزان کلروفیل *a* در برخی تیمارها را می‌توان به بهبود جذب عناصر غذایی، کاهش اثرات سمیت کادمیوم و بهبود فیزیولوژی گیاه نسبت داد. به‌طور خاص، حضور مایکوریزا بدون کاربرد باکتری منجر

شد که اثر همزمان باکتری‌های محرک رشد و مایکوریزا باعث افزایش معنی‌دار کلروفیل‌های فتوسنتزی تحت تنش کادمیوم شده است (Sabati *et al.*, 2020). اما ترکیبات متفاوت می‌توانند اثرات متغیری ایجاد کنند. در مطالعه دیگری Khan و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که تأثیر ترکیبی میکروارگانیزم‌ها و کلات‌کننده‌ها مانند ادتا در برخی شرایط باعث کاهش کلروفیل و در برخی شرایط افزایش آن می‌شود که بسته به شدت استرس و نوع ترکیب است.

**میزان کارتنوئید:** اثرات اصلی باکتری در سطح ۱ درصد، باکتری × مایکوریزا در سطح ۵ درصد و به‌ویژه برهم‌کنش باکتری × سدیم‌ادتا در سطح ۰/۰۱ درصد بر میزان کارتنوئید معنی‌دار بوده است، همچنین اثرات مایکوریزا × سدیم‌ادتا معنی‌دار در سطح ۱ درصد بوده است (جدول ۴). در اثر متقابل باکتری و سدیم‌ادتا بیشترین میزان کارتنوئید در تیمار باکتری پانتوئه آگلومرانس × سدیم‌ادتا با ۱/۳۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر مشاهده شد که نسبت به تیمار شاهد ۳/۱۳ درصد افزایش داشت، تیمار باکتری سودوموناس فلروسنس × سدیم‌ادتا و بدون سدیم‌ادتا، به ترتیب کاهش ۳۰/۴۷ و ۴۶/۸۸ درصد را نسبت به تیمار شاهد نشان دادند، که حاکی از تأثیر متفاوت ترکیب سدیم‌ادتا با باکتری سودوموناس است (شکل ۴a). در اثر متقابل باکتری و مایکوریزا، تیمار باکتری پانتوئه آگلومرانس × بدون مایکوریزا با ۱/۲۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر بالاترین میانگین کارتنوئید را داشت که ۱۰ درصد افزایش نسبت به شاهد افزایش داشته است، سایر تیمارها در این گروه تفاوت کمتری داشتند (شکل ۴b). در اثر متقابل مایکوریزا و سدیم‌ادتا، تیمار بدون مایکوریزا × سدیم‌ادتا با ۱/۱۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر بیشترین میزان کارتنوئید را داشت که ۳۹/۲۸ درصد افزایش نسبت به شاهد داشت (شکل ۴c). اثر مثبت ترکیب باکتری پانتوئه آگلومرانس × سدیم‌ادتا بر افزایش میزان کارتنوئید در گیاه سورگوم نشان می‌دهد که این ترکیب می‌تواند در کاهش آسیب‌های ناشی از تنش کادمیوم مؤثر باشد و سنتز کارتنوئید را تحریک کند. به‌علاوه، نتایج حاکی از آن است که گونه‌های مختلف باکتری، تأثیر متفاوتی بر میزان

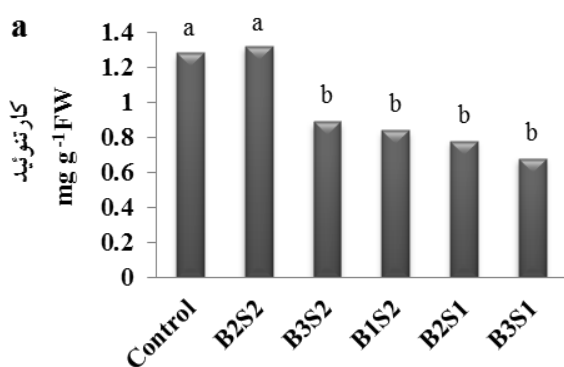
باکتری‌های محرک رشد در خاک آلوده به کادمیوم باعث افزایش جذب فلز سنگین توسط گیاه شده و در برخی شرایط منجر به افزایش سمیت و کاهش رشد گیاه می‌شود (Subasic *et al.*, 2023). ترکیب سدیم‌ادتا و باکتری‌ها در گیاهانی که در معرض فلزات سنگین هستند، ممکن است باعث افزایش استرس اکسیداتیو شود و سنتز کلروفیل را کاهش دهد (Amin *et al.*, 2023). تعاملات پیچیده بین سدیم‌ادتا و باکتری‌ها که منجر به کاهش کارایی گیاه پالایی می‌شود را Gupta و همکاران (۲۰۲۴) بیان کردند که برخی ترکیبات شیمیایی مانند سدیم‌ادتا در حضور باکتری‌ها می‌توانند باعث افزایش بیوفراهمی فلزات سنگین شده و در نتیجه سمیت را افزایش داده و اثرات مفید میکروارگانیزم‌ها را محدود کنند.

**میزان کلروفیل b:** اثر سه‌گانه تیمارهای آزمایشی بر میزان کلروفیل b در سورگوم علوفه‌ای تحت تنش کادمیوم، در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۴). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین میزان کلروفیل b در تیمار باکتری سودوموناس فلروسنس × بدون مایکوریزا × بدون سدیم‌ادتا با ۳/۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تر مشاهده شد که نسبت به تیمار شاهد حدود ۳۴/۴ درصد افزایش داشت، تیمار بدون باکتری × با مایکوریزا × بدون سدیم‌ادتا نیز اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد نداشت و حدود ۳۱/۲ درصد افزایش را نشان داد، کمترین میزان کلروفیل b در تیمار باکتری سودوموناس فلروسنس × مایکوریزا × بدون سدیم‌ادتا بود که نسبت به شاهد ۵۲/۶ درصد کاهش داشت (شکل ۳). ترکیب خاصی از باکتری سودوموناس فلروسنس و مایکوریزای مستقل یا عدم حضور سدیم‌ادتا، باعث افزایش میزان کلروفیل b در سورگوم تحت تنش کادمیوم شده است. این افزایش می‌تواند ناشی از اثرات مفید باکتری و مایکوریزا در بهبود جذب مواد مغذی و کاهش اثرات مضر کادمیوم بر ساختار کلروپلاست‌ها باشد. از طرفی، حضور همزمان مایکوریزا و سدیم‌ادتا در برخی ترکیبات باعث کاهش معنی‌دار میزان کلروفیل b شده است، احتمالاً به دلیل اثرات جانبی سدیم‌ادتا و افزایش استرس اکسیداتیو بوده است. در مطالعه‌ای بر روی گاوزبان (*Borago officinalis*) گزارش

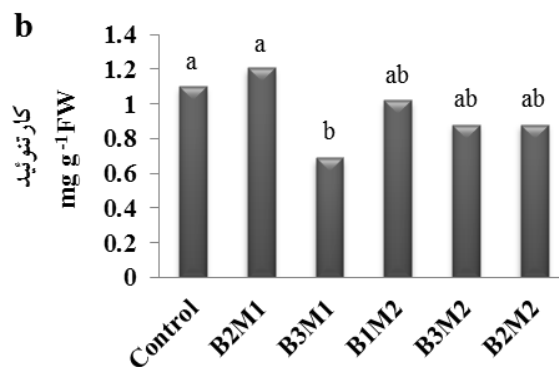


تیمار باکتری × مایکوریزا × سدیم ادتا

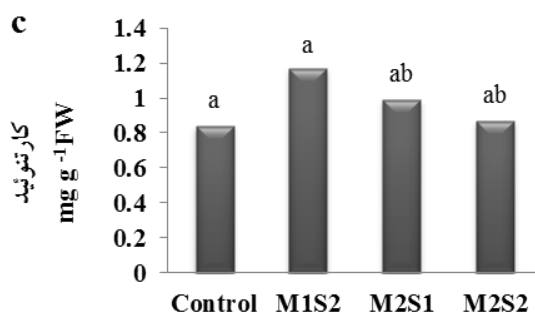
شکل ۳- مقایسه میانگین اثر تیمارهای آزمایشی بر میزان کلروفیل *b* در سورگوم علوفه‌ای تحت تنش کادمیوم. Control (بدون باکتری، بدون مایکوریزا و بدون سدیم‌ادتا)، B1 (بدون باکتری)، B2 (باکتری پانتوتنه آگلومرانس)، B3 (باکتری سودوموناس فلورسنس)، S1 (بدون سدیم‌ادتا)، S2 (با سدیم‌ادتا)، M1 (بدون مایکوریزا)، M2 (با مایکوریزا)



تیمار باکتری × سدیم ادتا



تیمار باکتری × مایکوریزا



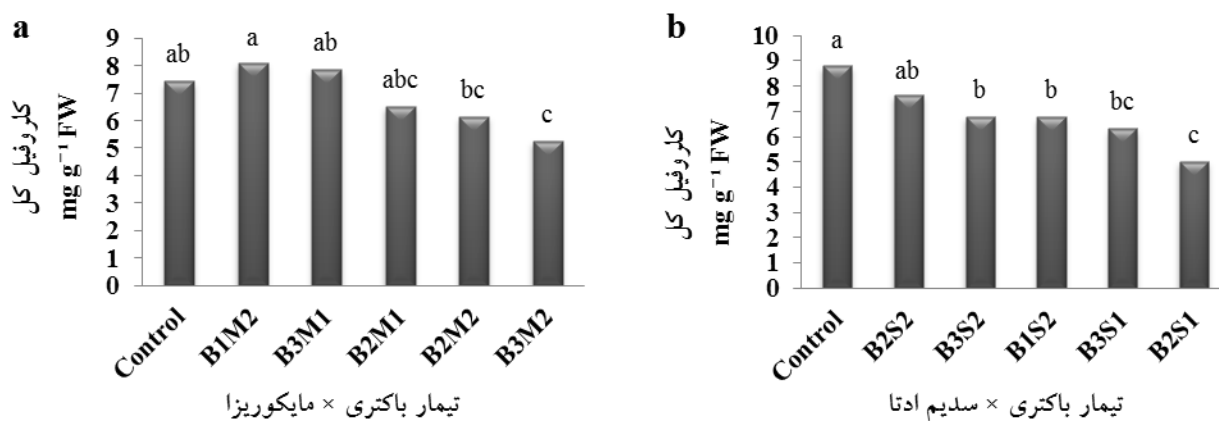
تیمار مایکوریزا × سدیم ادتا

شکل ۴- مقایسه میانگین اثر تیمارهای آزمایشی بر میزان کارتنوئید در سورگوم علوفه‌ای تحت تنش کادمیوم. Control در شکل a (بدون باکتری و بدون سدیم‌ادتا)، Control در شکل b (بدون باکتری و بدون مایکوریزا)، Control در شکل c (بدون مایکوریزا و بدون سدیم ادتا)، B1 (بدون باکتری)، B2 (باکتری پانتوتنه آگلومرانس)، B3 (باکتری سودوموناس فلورسنس)، S1 (بدون سدیم‌ادتا)، S2 (با سدیم‌ادتا)، M1 (بدون مایکوریزا)، M2 (با مایکوریزا)

هم‌کشت می‌تواند باعث افزایش جذب کادمیوم و بهبود رنگیزه‌های فتوسنتزی مانند کارتئونید در خردل هندی (*Brassica juncea*) شود. این شواهد علمی اهمیت انتخاب گونه‌های میکروبی مناسب و ترکیب بهینه آن‌ها با عوامل شیمیایی را در بهبود تحمل گیاهان تحت تنش فلزات سنگین تأیید می‌کند.

**میزان کلروفیل کل:** اثرات باکتری × مایکوریزا در سطح ۱ درصد و باکتری × سدیم‌ادتا در سطح احتمال ۰/۰۱ درصد بر میزان کلروفیل کل معنی‌دار بود (جدول ۴). در اثر متقابل باکتری و مایکوریزا مقدار کلروفیل کل در تیمار بدون باکتری × مایکوریزا با ۸/۱۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تر نسبت به تیمار شاهد ۹/۱۳ درصد افزایش داشته است، تیمار باکتری سودوموناس فلوروسنس × بدون مایکوریزا ۵/۶ درصد بیشتر از شاهد بود (شکل ۵a). این نتایج نشان داد که ترکیب مایکوریزا با انواع باکتری‌ها کمترین مقدار کلروفیل کل را داشته است و استفاده توأم باکتری و مایکوریزا تأثیر منفی بر میزان کلروفیل کل داشته است. در اثر برهم‌کنش باکتری و سدیم‌ادتا، بیشترین میزان کلروفیل کل در تیمار شاهد با ۸/۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر مشاهده شد که این مقدار از تمامی تیمارهای دارای سدیم‌ادتا بالاتر بود، تیمارهای دارای سدیم‌ادتا کاهش معنی‌داری نسبت به شاهد داشتند، به طوری که تیمار باکتری پانتوئه آگلومرانس × بدون سدیم‌ادتا حدود ۷۴/۹ درصد کاهش نسبت به شاهد نشان داد (شکل ۵b). به طور کلی نتایج نشان داد که تیمار مایکوریزا به‌تنهایی بالاترین میزان کلروفیل کل را در بین تیمارها تولید کرد. این موضوع تأیید می‌کند که مایکوریزا در غیاب باکتری‌ها نقش کلیدی در افزایش تحمل گیاه به تنش فلزات سنگین دارد. مایکوریزا از طریق افزایش جذب عناصر غذایی (مانند فسفر، منیزیم و روی) و کاهش انتقال کادمیوم به اندام هوایی، موجب کاهش استرس اکسیداتیو و حفظ ساختار کلروپلاست‌ها می‌شود (Zhao et al., 2024). در مقابل، ترکیب برخی باکتری‌ها با مایکوریزا (مانند باکتری سودوموناس فلوروسنس × مایکوریزا) منجر به کاهش میزان کلروفیل شد. این پدیده ممکن است ناشی از رقابت بین میکروارگانیسم‌ها

رنگیزه‌های فتوسنتزی دارند. به طور کلی، گونه باکتری، نوع ترکیب آن با سایر عوامل، و برهم‌کنش‌های متقابل، نقش کلیدی در تنظیم پاسخ‌های فیزیولوژیک گیاه ایفا می‌کنند. تیمارهای ترکیبی باکتری پانتوئه آگلومرانس و سدیم‌ادتا نسبت به سایر تیمارها عملکرد بهتری در افزایش کارتئونید نشان دادند، در حالی که ترکیب با باکتری سودوموناس فلوروسنس در برخی موارد اثر منفی داشت. این یافته‌ها اهمیت انتخاب دقیق گونه‌های میکروبی و نحوه ترکیب آن‌ها با عوامل شیمیایی را برای بهبود مقاومت سورگوم علوفه‌ای تحت تنش کادمیوم نشان می‌دهد. بر اساس گزارش Anwar و همکاران (۲۰۲۴) کاربرد باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن در گیاه گندم تحت تنش فلزات سنگین منجر به افزایش میزان کارتئونید و بهبود مقاومت به استرس شده است. در مطالعه‌ای بر روی سورگوم مشاهده شد که استفاده از مایکوریزا و کلانت‌کننده‌ها اثرات متفاوتی بر رنگیزه‌های فتوسنتزی دارد و تعامل باکتری‌ها می‌تواند اثرات مثبت یا منفی داشته باشد (Burak et al., 2024). کاربرد هم‌زمان باکتری‌های محرک رشد همراه با سدیم‌ادتا در آفتابگردان (*Helianthus annuus*) باعث افزایش قابل توجه کلروفیل و کارتئونید و کاهش استرس اکسیداتیو می‌شود (Ikram et al., 2024). همچنین طبق یافته‌های Sun و همکاران (۲۰۲۵) استفاده از باکتری‌های محرک رشد مانند آزوسپریلیوم و سودوموناس در گیاه تاج‌ریزی سیاه باعث تحریک تولید متابولیت‌های حفاظتی از جمله کارتئونیدها و بهبود جذب کادمیوم شده است. در مطالعه Kapoor و همکاران (۲۰۲۳) نیز اثر مثبت تیمارهای ترکیبی باکتری‌های محرک رشد و نانوذرات  $TiO_2$  بر افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کارتئونید در گندم گزارش شده است. از سوی دیگر، یافته‌های ما درباره اثر منفی باکتری سودوموناس فلوروسنس بر کارتئونیدها با نتایج مطالعه Al-Enazi و همکاران (۲۰۲۲) هماهنگ است که نشان داد این باکتری بدون حضور قارچ‌های همزیست می‌تواند باعث کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی در گیاه ماش شود. همچنین، براساس مطالعات Zhang و همکاران (۲۰۲۳) استفاده از باکتری‌های محرک رشد همراه با گیاهان



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر تیمارهای آزمایشی بر میزان کلروفیل کل سورگوم علوفه‌ای تحت تنش کادمیوم. Control در شکل a (بدون باکتری و بدون مایکوریزا)، Control در شکل b (بدون باکتری و بدون سدیم‌ادتا)، B1 (بدون باکتری)، B2 (باکتری پانتوئه آگلومرانس)، B3 (باکتری سودوموناس فلورسنس)، S1 (بدون سدیم‌ادتا)، S2 (با سدیم‌ادتا)، M1 (بدون مایکوریزا)، M2 (با مایکوریزا)

مقابله با تنش کادمیوم نبوده و حتی ممکن است حساسیت گیاه را افزایش داده باشد (Zaidi et al., 2012).

**فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز:** اثرات متقابل باکتری × مایکوریزا × سدیم‌ادتا در سطح ۱ درصد بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به‌طور معنی‌داری تأثیرگذار بود (جدول ۵).

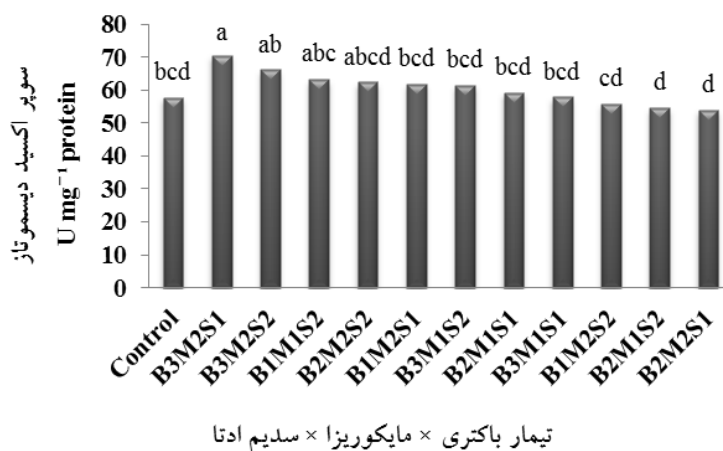
نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد بالاترین فعالیت سوپراکسید دیسموتاز مربوط به تیمار باکتری سودوموناس فلورسنس × مایکوریزا × بدون سدیم‌ادتا با ۷۰/۴۸ واحد فعالیت آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین بوده که نسبت به تیمار شاهد ۲۲/۱۷ درصد افزایش داشت، پایین‌ترین فعالیت مربوط به تیمار باکتری پانتوئه آگلومرانس × مایکوریزا × بدون سدیم‌ادتا بود که حدود ۶/۸ درصد کمتر از تیمار شاهد بود (شکل ۶). فعالیت این آنزیم در اکثر تیمارهای ترکیبی باکتری و مایکوریزا بالاتر از تیمارهای شاهد یا تیمارهای بدون باکتری مشاهده شده است که بیانگر نقش مثبت باکتری سودوموناس فلورسنس و مایکوریزا در افزایش توان آنتی‌اکسیدانی گیاه در شرایط تنش کادمیوم است. افزایش معنی‌دار فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در حضور باکتری سودوموناس فلورسنس و مایکوریزا بیانگر نقش هم‌افزایی این عوامل زیستی در افزایش

برای منابع غذایی یا فضا و نیز برهم‌خوردن تعادل ریزیزیستی در ریزوسفر باشد (Fester and Sawers, 2011). این اختلالات می‌توانند کارایی جذب مواد غذایی یا تحمل تنش را در گیاه کاهش دهند. باکتری سودوموناس فلورسنس در تیمار باکتری سودوموناس فلورسنس × بدون مایکوریزا نیز موجب افزایش معنی‌دار کلروفیل شد، که می‌تواند ناشی از افزایش فراهمی عناصر غذایی مورد نیاز برای سنتز کلروفیل از جمله آهن و منیزیم باشد. این باکتری همچنین با تولید ترکیبات تنظیم‌کننده رشد، می‌تواند از ساختار فتوسنتزی گیاه در برابر تنش محافظت کند (Glick, 2012). در رابطه با تأثیر سدیم‌ادتا، نتایج نشان داد که استفاده از این کلات‌کننده در تیمار باکتری باعث کاهش کلروفیل کل شد. علت این کاهش می‌تواند به عوامل زیر نسبت داده شود: افزایش جذب کادمیوم توسط گیاه و تجمع آن در اندام هوایی، آسیب به کلروپلاست‌ها و اختلال در فعالیت آنزیم‌های فتوسنتزی، کاهش دسترسی به ریزمغذی‌هایی مانند Fe، Zn و Mn به‌علت رقابت با ادتا (Wu et al., 2004). همچنین در تیمار باکتری پانتوئه آگلومرانس × بدون سدیم‌ادتا بدون مایکوریزا و بدون سدیم‌ادتا، کمترین مقدار کلروفیل مشاهده شد. این نتیجه بیانگر آن است که در غیاب مایکوریزا یا ترکیبات محافظ، باکتری به‌تنهایی قادر به

جدول ۵- نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای آزمایشی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و پروتئین محلول برگ سورگوم علوفه‌ای تحت تنش کادمیوم

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		سوپراکسید دیسموتاز	پراکسیداز	کاتالاز
پروتئین محلول برگ				
بakteri	۲	۱۷۲/۰۸**	۰/۰۲۴۸۰***	۰/۰۰۶۸۶۴*
مایکوریزا	۱	۹۱/۹۴ <sup>ns</sup>	۰/۰۲۴۰۹***	۰/۰۱۸۹۹۴**
سدیم ادتا	۱	۲/۴۴ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۰۵۸ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۰۶۱۹ <sup>ns</sup>
بakteri × مایکوریزا	۲	۱۱۱/۰۲*	۰/۰۲۸۲۵***	۰/۰۰۰۷۳۸ <sup>ns</sup>
بakteri × سدیم ادتا	۲	۵/۸۳ <sup>ns</sup>	۰/۰۱۱۸۶***	۰/۰۰۴۳۷۰ <sup>ns</sup>
مایکوریزا × سدیم ادتا	۱	۱۳/۴۵ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۸۵۳***	۰/۰۰۵۱۸۷ <sup>ns</sup>
بakteri × مایکوریزا × سدیم ادتا	۲	۱۷۶/۷۵**	۰/۱۳۳۸۲***	۰/۰۰۳۶۱۹ <sup>ns</sup>
خطا	۳۶	۲۶/۹۵	۰/۰۰۰۳۳	۰/۰۰۲۰۸۹
ضریب تغییرات (%)		۸/۵۹	۳/۰۰	۱۱/۵۸
				۱۰/۵۰

ns, \*, \*\*, و \*\*\* به ترتیب غیرمعنی دار و معنی دار در سطح ۰.۰۵، ۰.۰۱ و ۰.۰۰۱ درصد



تیمار باکتری × مایکوریزا × سدیم ادتا

شکل ۶- نتایج مقایسه میانگین اثر تیمارهای آزمایشی بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در سورگوم علوفه‌ای تحت تنش کادمیوم. Control (بدون باکتری، بدون مایکوریزا و بدون سدیم ادتا)، B1 (بدون باکتری)، B2 (باکتری پانتوئه آگلومرانس)، B3 (باکتری سودوموناس فلورسنس)، S1 (بدون سدیم ادتا)، S2 (با سدیم ادتا)، M1 (بدون مایکوریزا)، M2 (با مایکوریزا)

همکاران (۲۰۲۵) بر روی ذرت گزارش شده که باکتری‌های تثبیت‌کننده فسفره و مایکوریزا به‌طور همزمان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله سوپراکسید دیسموتاز را افزایش داده و موجب کاهش اثرات سمی کادمیوم می‌شوند. همچنین در مطالعه‌ای روی سورگوم بیان شد که کاربرد

مقاومت گیاه سورگوم به استرس اکسیداتیو ناشی از کادمیوم است. این افزایش فعالیت آنزیم SOD، یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، می‌تواند به کاهش آسیب‌های ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن کمک کند و عملکرد بهتر گیاه را تحت تنش فلزی تضمین نماید. در مطالعاتی مانند تحقیق Akplo و

باکتری‌های مفید و مایکوریزا باعث ارتقای فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها و بهبود تحمل گیاه تحت تنش فلزات سنگین می‌شود (Kchikich et al., 2025). با اینکه باکتری پانتوئه آگلومرانس در تثبیت نیتروژن مؤثر است، اما نقش آن در تحریک مستقیم سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی گیاه محدودتر از باکتری سودوموناس فلورسنس است. در نتیجه، اثر آن بر افزایش سوپراکسید دیسموتاز در شرایط تنش فلز سنگین ضعیف‌تر است. برخی گزارش‌ها نشان داده‌اند که باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن ممکن است با افزایش جذب نیتروژن و رشد ریشه، جذب فلزات سنگین را نیز افزایش دهند، که می‌تواند آسیب بیشتری به گیاه وارد کرده و نیاز به دفاع آنتی‌اکسیدانی را فراتر از توان گیاه افزایش دهد (Ma et al., 2011). در برخی ترکیب‌ها، باکتری پانتوئه آگلومرانس ممکن است با مایکوریزا یا سدیم‌ادتا هم‌افزایی مناسبی نداشته باشد یا حتی دچار رقابت منفی شود، که باعث کاهش تأثیر آن در فعال‌سازی سیستم دفاعی گیاه می‌شود.

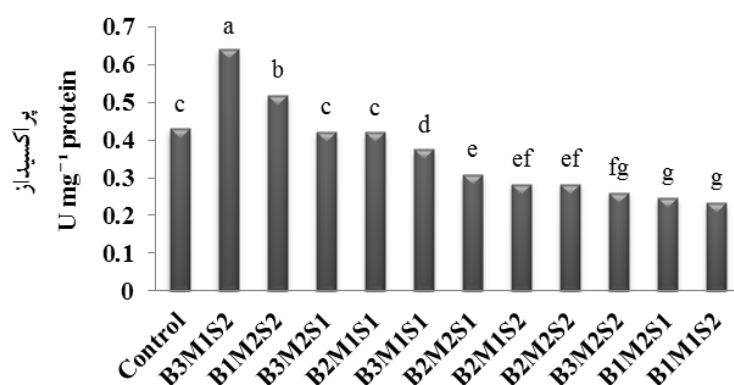
#### فعالیت آنزیم پراکسیداز: اثر متقابل سه گانه تیمارها بر

فعالیت آنزیم پراکسیداز در سطح احتمال ۰/۰۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۵). بیشترین فعالیت آنزیم پراکسیداز مربوط به تیمار باکتری سودوموناس فلورسنس × بدون مایکوریزا × سدیم‌ادتا با ۰/۶۴۳ واحد فعالیت آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین بود که نسبت به تیمار شاهد حدود ۴۹/۵ درصد افزایش معنی‌دار نشان داد، که حاکی از تحریک چشمگیر سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی گیاه توسط این ترکیب تیماری است. پس از آن، تیمار بدون باکتری × مایکوریزا × سدیم‌ادتا نسبت به شاهد حدود ۲۰/۹ درصد افزایش داشت (شکل ۷). این نتایج نشان می‌دهد که ترکیب برخی از عوامل زیستی با سدیم‌ادتا به‌ویژه سودوموناس فلورسنس توانسته است با کارایی بیشتری مسیرهای دفاعی گیاه را فعال کند. از سوی دیگر، کمترین فعالیت پراکسیداز در تیمار بدون باکتری × بدون مایکوریزا × سدیم‌ادتا مشاهده شد که ۴۵/۸ درصد کمتر از تیمار شاهد بود. این کاهش می‌تواند ناشی از تأثیر منفی سدیم‌ادتا به‌تنهایی بر گیاه در شرایطی باشد که هم‌افزایی با سایر محرک‌ها وجود

ندارد. در تحقیقی مشابه Kchikich و همکاران (۲۰۲۴) در گیاه لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) نشان دادند که کاربرد هم‌زمان مایکوریزا و سودوموناس موجب افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در پاسخ به تنش فلزات سنگین شده است. در مطالعه‌ای دیگر بر روی گیاه کلزا (*Brassica napus*) گزارش شد که تیمار ترکیبی مایکوریزا و باکتری در حضور کادمیوم به‌طور معنی‌داری فعالیت پراکسیداز را افزایش داده است (Nouralvandi et al., 2011). در ذرت (*Zea mays*) تحت تنش فلزات سنگین نشان داده شد که کاربرد توأم سودوموناس و سدیم‌ادتا باعث افزایش چشمگیر فعالیت آنتی‌اکسیدانی شده است (Piao et al., 2022). در گیاه گندم (*Triticum aestivum*)، با افزایش فعالیت آنزیم‌های دفاعی در اثر کاربرد محرک‌های زیستی، کاهش سمیت کادمیوم گزارش شد (Farhat et al., 2022). بنابراین، نتایج بیانگر این است که نوع باکتری مصرفی و تعامل آن با مایکوریزا و سدیم‌ادتا نقش کلیدی در تنظیم پاسخ آنتی‌اکسیدانی گیاه در شرایط تنش کادمیوم دارد، به‌طوری‌که ترکیب باکتری سودوموناس فلورسنس و سدیم‌ادتا بیشترین تحریک آنزیم پراکسیداز را به همراه دارد، درحالی‌که باکتری باکتری پانتوئه آگلومرانس در این زمینه اثر محدودتری نشان می‌دهد.

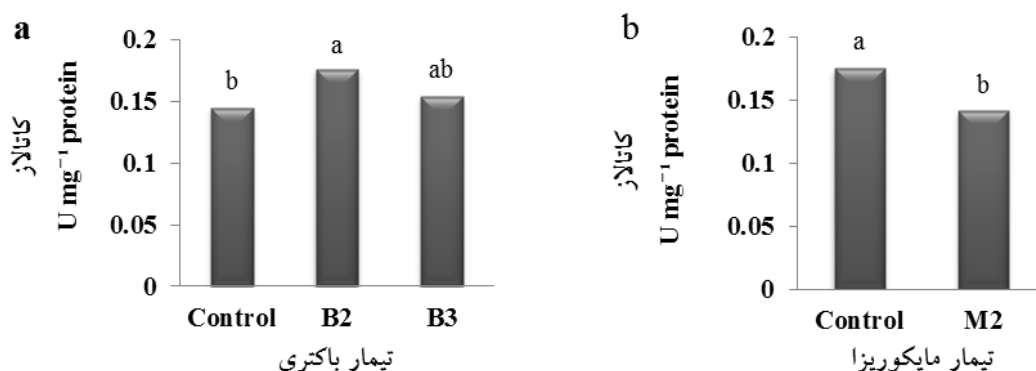
#### فعالیت آنزیم کاتالاز: اثر ساده باکتری در سطح ۵ درصد

و اثر مایکوریزا بر فعالیت آنزیم کاتالاز در سطح ۱ درصد معنی‌دار بودند (جدول ۵). در اثر ساده باکتری بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار باکتری پانتوئه آگلومرانس با ۰/۱۷۶ واحد فعالیت آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین مشاهده شد که نسبت به تیمار شاهد حدود ۲۱/۴ درصد افزایش معنی‌دار داشت، و تیمار سودوموناس فلورسنس نسبت به شاهد حدود ۶/۲ درصد افزایش نشان داد (شکل ۸a). در اثر ساده مایکوریزا تیمار شاهد با ۰/۱۷۵ واحد فعالیت آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین بیشترین فعالیت کاتالاز را داشت که نسبت به تیمار مایکوریزا حدود ۲۳/۲ درصد افزایش معنی‌دار نشان داد (شکل ۸b). این کاهش در حضور مایکوریزا معنی‌دار بوده و نشان می‌دهد که مایکوریزا در این شرایط خاص منجر به کاهش فعالیت کاتالاز



تیمار باکتری × مایکوریزا × سدیم ادتا

شکل ۷- مقایسه میانگین اثر تیمارهای آزمایشی بر فعالیت آنزیم پراکسیداز در سورگوم علوفه‌ای تحت تنش کادمیوم. Control (بدون باکتری، بدون مایکوریزا و بدون سدیم ادتا)، B1 (بدون باکتری)، B2 (باکتری پانتوئه آگلومرانس)، B3 (باکتری سودوموناس فلورسنس)، S1 (بدون سدیم ادتا)، S2 (با سدیم ادتا)، M1 (بدون مایکوریزا)، M2 (با مایکوریزا)

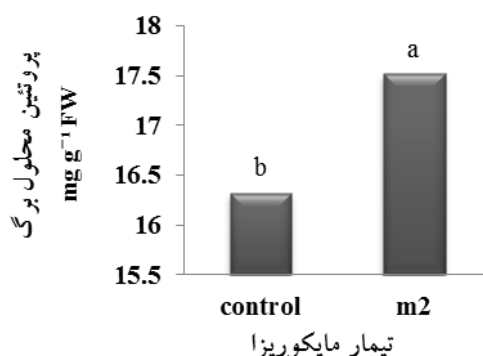


شکل ۸- مقایسه میانگین تیمار باکتری و تیمار مایکوریزا بر فعالیت آنزیم کاتالاز در سورگوم علوفه‌ای تحت تنش کادمیوم. Control در شکل a (بدون باکتری)، Control در شکل b (بدون مایکوریزا)، B2 (باکتری پانتوئه آگلومرانس)، B3 (باکتری سودوموناس فلورسنس)، M2 (مایکوریزا).

(۲۰۲۰) گزارش شد که تیمار سودوموناس فلورسنس در گیاه شوید (*Anethum graveolens*) باعث افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز تحت تنش فلزات سنگین شده است. همچنین در تحقیقی دیگر بر روی گیاه عدس (*Lnse culinaris*) نشان داده شد که تلقیح با آزوسپریلیوم موجب افزایش آنزیم‌های دفاعی شد، اگر چه پاسخ به مایکوریزا در شرایط تنش بسته به گونه گیاه و شدت تنش متغیر بود (Sun et al., 2025).

غلظت پروتئین محلول برگ: اثر ساده مایکوریزا بر میزان

شده است. قارچ‌های مایکوریزا با سازوکارهایی مانند کاهش جذب و انتقال کادمیوم به ریشه و برگ، تثبیت بخشی از فلز در ریزوسفر، تقویت سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی (گلوکاتیون، آسکوربات، ترکیبات فنولیک)، و تغییر جهت دفاع گیاه به سمت مسیرهای کم‌هزینه‌تر و مؤثرتر نظیر APX و GPX، سطح H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> را در بافت‌ها کاهش می‌دهند (Li et al., 2022). در مجموع داده‌های اولیه حاکی از برتری تیمار سودوموناس فلورسنس و عدم استفاده از مایکوریزا در افزایش کاتالاز می‌باشد. در پژوهشی توسط Rahbari و همکاران



شکل ۹- مقایسه میانگین اثر تیمار مایکوریزا بر غلظت پروتئین محلول برگ در سورگوم علوفه‌ای تحت تنش کادمیوم. Control (بدون مایکوریزا)، M2 (مایکوریزا).

نتایج این پژوهش نشان داد که ترکیب عوامل زیستی و شیمیایی می‌تواند نقش مهمی در بهبود سازوکارهای فیزیولوژیک و دفاعی گیاه سورگوم علوفه‌ای تحت تنش کادمیوم ایفا کند. هم‌افزایی بین باکتری‌های محرک رشد گیاه و قارچ مایکوریزا آربسکولار سبب افزایش کارایی فتوسنتزی، بهبود وضعیت تغذیه‌ای و تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه شد. در این میان، تلقیح با باکتری سودوموناس فلورسنس به‌ویژه در حضور مایکوریزا، موجب تحریک فعالیت آنزیم‌های دفاعی و افزایش تحمل گیاه نسبت به تنش فلزی گردید، درحالی‌که کاربرد سدیم‌ادتا می‌تواند با افزایش تحرک کادمیوم در خاک، باعث کاهش رنگیزه‌ها و افزایش استرس اکسیداتیو شده است. به‌طورکلی، یافته‌ها نشان می‌دهد که استفاده هدفمند از میکروارگانیسم‌های مفید به صورت منفرد یا ترکیبی، می‌تواند به‌عنوان راهکاری زیست‌سازگار و پایدار برای کاهش آثار سمی فلزات سنگین در خاک‌های آلوده مورد استفاده قرار گیرد. این نتایج کاربرد گسترده‌ای در مدیریت زیست‌پالایی، افزایش پایداری تولید علوفه در اراضی آلوده و کاهش خطر انتقال فلزات سنگین به زنجیره غذایی دارد. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که تلفیق فناوری‌های زیستی با مدیریت کودی و زیست‌محیطی خاک، رویکردی مؤثر برای بهبود سلامت خاک و افزایش مقاومت گیاهان زراعی در برابر آلودگی‌های فلزی است. یافته‌های این پژوهش می‌تواند به‌عنوان پایه‌ای برای توسعه کودهای زیستی ترکیبی و طراحی برنامه‌های بهبود

پروتئین محلول برگ در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود در حالی که اثر متقابل سه‌گانه و سایر برهم‌کنش‌ها در این صفت معنی‌دار نبودند (جدول ۵). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که تیمار مایکوریزا بالاترین میزان پروتئین محلول را با ۱۷/۵۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر داشت که نسبت به تیمار شاهد حدود ۷/۴ درصد افزایش معنی‌دار نشان داد (شکل ۹). تلقیح با مایکوریزا توانسته است در شرایط تنش کادمیوم، بیان پروتئین‌های محلول برگ را در گیاه سورگوم علوفه‌ای به‌طور مؤثری افزایش دهد. این موضوع می‌تواند ناشی از نقش مایکوریزا در بهبود وضعیت تغذیه‌ای گیاه و افزایش پایداری سلولی در مواجهه با استرس فلزی باشد. نتایج مشابهی در تحقیقات پیشین گزارش شده است، به‌عنوان نمونه، Mousavi و همکاران (۲۰۲۲) نشان دادند که استفاده از قارچ مایکوریزا در گیاه پنیرک (*Abelmoschus esculentus*) باعث افزایش معنی‌دار پروتئین محلول و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تحت تنش فلزات سنگین شده است. همچنین در مطالعه‌ای دیگر، Molina و همکاران (۲۰۲۰) گزارش کردند که مایکوریزا باعث تحریک سنتز پروتئین‌های محلول در گیاه سویا (*Glycine max*) تحت تنش کادمیوم گردید، یافته‌های این مطالعه با نتایج پژوهش حاضر در گیاه سورگوم هم‌راستا است و نقش مثبت مایکوریزا در بهبود مکانیسم‌های دفاعی گیاه را تأیید می‌کند.

نتیجه‌گیری

حاصل خیزی و پالایش زیستی خاک‌های آلوده به کادمیوم مورد استفاده پژوهشگران، کارشناسان محیط‌زیست و تولیدکنندگان علوفه قرار گیرد.

## منابع

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Akoto, R., Anning, A. K., & Belford, E. J. D. (2022). Effects of ethylenediaminetetraacetic acid-assisted phytoremediation on soil physicochemical and biological properties. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 19, 8995-9010. <https://doi.org/10.1007/s13762-021-03770-9>
- Akplo, T. M., Alladassi, F. K., Zoundji, M. C. C., Faye, A., Hernandez, M., Yemadje, P. L., Fagnibo, A. H., & Houngnandan, P. (2025). Phosphate solubilization and mobilization: Bacteria–mycorrhiza interactions. *Letters in Applied Microbiology*, 78(8), 105. <https://doi.org/10.1093/lambio/ovaf105>
- Alengebawy, A., Abdelkhalek, S. T., Qureshi, S. R., & Wang, M. Q. (2021). Heavy metals and pesticides toxicity in agricultural soil and plants: Ecological risks and human health implications. *Toxics*, 9(3), 42. <https://doi.org/10.3390/toxics9030042>
- Aliyat, F. Z., El Guilli, M., Nassiri, L., Lahlali, R., Ait Barka, E., & Ibjibijen, J. (2024). Elevating sorghum prosperity: Growth trends through phosphate-solubilizing bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi inoculation. *Agronomy*, 14(2), 370. <https://doi.org/10.3390/agronomy14020370>
- Al-Enazi, N. M., AlTami, M. S., & Alhomaidi, E. (2022). Unraveling the potential of pesticide-tolerant *Pseudomonas* sp. augmenting biological and physiological attributes of *Vigna radiata* (L.) under pesticide stress. *RSC Advances*, 12(28), 17765-17783. <https://doi.org/10.1039/D2RA02157C>
- Amouzegar, M., Abbaspour, A., & Asghari, H. R. (2022). Impact of phosphorus amendments on cadmium uptake by sunflower inoculated with *Rhizophagus irregularis* mycorrhizae in a contaminated soil. *Advances in Environmental Technology*, 5(2), 81-90. [In Persian with English abstract]. Retrieved from [https://aet.irost.ir/article\\_1184.html](https://aet.irost.ir/article_1184.html)
- Amin Kamal, M., Perveen, K., Khan, F., Sayyed, R. Z., Ong, G. H., Bhatt, S. C., Singh, J., & Qamar, M. O. (2023). Effect of different levels of EDTA on phytoextraction of heavy metal and growth of *Brassica juncea* L. *Frontiers in Microbiology*, 14, Article 1228117. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1228117>
- Anas, M., Falak, A., Hassan, S., Khattak, W. A., Saleem, M. H., Khan, K. A., et al. (2025). Microbial interactions and bacterial responses to metal stress in plants: Mechanisms, adaptations, and applications for sustainable agriculture. *Journal of Crop Health*, 77, 36. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10343-025-01108-w>
- Anwar, T., Qureshi, H., Siddiqi, E. H., Ullah, N., Naseem, M. T., & Soufan, W. (2024). Synergistic effects of gibberellic acid, biochar, and rhizobacteria on wheat growth under heavy metal and drought stress. *BMC Plant Biology*, 24, 1168. <https://doi.org/10.1186/s12870-024-05833-8>
- Begum, N., Ahanger, M. A., Su, Y., & Raza, S. (2023). Arbuscular mycorrhizal fungi improve cadmium tolerance in plants by modulating nutrient uptake and antioxidant defense. *Environmental and Experimental Botany*, 212, 105273. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2023.105273>
- Bouyoucos, G. J. (1962). Hydrometer method improved for making particle size analysis of soils. *Agronomy Journal*, 54, 464-465. <https://doi.org/10.2134/agronj1962.00021962005400050028x>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Burak, K., Yanardag, I. H., Gomez-Lopez, M. D., Faz, A., Yalcin, H., Sakin, E., & Yanardag, A. (2024). The effect of arbuscular mycorrhizal fungi on biological activity and biochemical properties of soil under vetch growing conditions in calcareous soils. *Heliyon*, 10(3), 24361. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e24361>
- Burlakoti, S., Devkota, A. R., Poudyal, S., & Kaundal, A. (2024). Beneficial plant–microbe interactions and stress tolerance in maize. *Applied Microbiology*, 4(3), 1000-1015. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol4030068>
- Chance, B., & Maehly, A. C. (1955). Assay of catalases and peroxidases. In: *Methods in Enzymology* (eds. Colowick, S. P. & Kaplan, N. O.) Pp. 764-775. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(55\)02300-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(55)02300-8)
- Dhindsa, R. S., Plumb-Dhindsa, P., & Thorpe, T. A. (1981). Leaf senescence: Correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany*, 32(1), 93-101. <https://doi.org/10.1093/jxb/32.1.93>
- Farhat, F., Arfan, M., Wang, X., Tariq, A., Kamran, M., Tabassum, H. N., et al. (2022). The impact of bio-stimulants on Cd-stressed wheat (*Triticum aestivum* L.): Insights into growth, chlorophyll fluorescence, Cd accumulation, and osmolyte regulation. *Frontiers in Plant Science*, 13, 850567. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.850567>

- Fasusi, O. A., Babalola, O. O., & Adejumo, T. O. (2023). Harnessing of plant growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystem sustainability. *CABI Agriculture and Bioscience*, 4, 26. <https://doi.org/10.1186/s43170-023-00168-0>
- Ferionun, M., Zouitane, I., Bouhraoua, S., Elouattassi, Y., Belahcen, D., Errabbani, A., Louahlia, S., Sayyed, R., & El Ghachtouli, N. (2025). Applying microbial biostimulants and drought-tolerant genotypes to enhance barley growth and yield under drought stress. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1494987. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1494987>
- Fester, T., & Sawers, R. J. H. (2011). Progress and challenges in agricultural application of arbuscular mycorrhizal fungi. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 30(6), 459-470. <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.605741>
- Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012, 963401. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>
- Goncharuk, E. A., & Zagoskina, N. V. (2023). Heavy metals, their phytotoxicity, and the role of phenolic antioxidants in plant stress responses with focus on cadmium. *Molecules*, 28(9), 3921. <https://doi.org/10.3390/molecules28093921>
- Gong, M., Kong, M., Huo, Q., He, J., He, J., Yan, Z., Lu, C., Jiang, Y., Song, J., Han, W., & Lv, G. (2024). Ultrasonic treatment can improve maize seed germination and abiotic stress resistance. *BMC Plant Biology*, 24, 758. <https://doi.org/10.1186/s12870-024-05474-x>
- Gorelova, S. V., Kolbas, A. P., Muratova, A. Yu., Frontasyeva, M. V., Zinicovscaia, I., & Okina, O. I. (2023). Prospects for the use of *Sorghum bicolor* for phytoremediation of soils contaminated with heavy metals in temperate climates. *Phytoremediation*, 263-301. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-17988-4\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-031-17988-4_13)
- Guarino, C., Marziano, M., Tartaglia, M., Prigioniero, A., Postiglione, A., Scarano, P., & Sciarrillo, R. (2020). *Poaceae* with PGPR bacteria and arbuscular mycorrhizae partnerships as a model system for plant microbiome manipulation for phytoremediation of petroleum hydrocarbons contaminated agricultural soils. *Agronomy*, 10(4), 547. <https://doi.org/10.3390/agronomy10040547>
- Gupta, R., Khan, F., Alqahtani, F. M., Hashem, M., & Ahmad, F. (2024). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) assisted bioremediation of heavy metal toxicity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 196, 2928-2956. <https://doi.org/10.1007/s12010-023-04545-3>
- Hassan, M. J., Raza, M. A., Rehman, S. U., Ansar, M., Gitari, H., Khan, I., Wajid, M., Ahmed, M., Shah, G. A., Peng, Y., & Li, Z. (2020). Effect of cadmium toxicity on growth, oxidative damage, antioxidant defense system and cadmium accumulation in two sorghum cultivars. *Plants*, 9(11), 1575. <https://doi.org/10.3390/plants9111575>
- Ikram, M., Ali, S., Rizwan, M., Rehman, M. Z. U., Qayyum, M. F., & Ok, Y. S. (2024). Influence of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on the growth and yield of sunflower (*Helianthus annuus* L.) under salt stress. *Journal of Crop Health*, 76, 1221-1234. <https://doi.org/10.1007/s10343-024-01006-7>
- Ivanov, A. A., & Kosobryukhov, A. A. (2020). *Plant Ecophysiology and Adaptation under Climate Change: Mechanisms and Perspectives I*. Springer. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-15-2156-0\\_15](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-15-2156-0_15)
- Kapoor, D., Yadav, S., Sharma, M. M. M., & Sharma, P. (2023). Interaction between metal nanoparticles and PGPR on the plant growth and development. In: *Nanomaterials and Nanocomposites Exposures to Plants: Response, Interaction, Phytotoxicity and Defense Mechanisms* (eds. Sharma, P., Kapoor, D., & Yadav, S.) Pp. 327-351. Singapore: Springer Nature Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-99-1234-5\\_14](https://doi.org/10.1007/978-981-99-1234-5_14)
- Kchikich, A., El Amraoui, B., Nhhala, N., Krid, A., Kchikich, A., Kounnoun, A., Ouahmane, L., Nhiri, M., & Nhiri, N. (2025). Mitigating heavy metals toxicity in sorghum using arbuscular mycorrhizal fungi: Enhancing photosynthesis and antioxidant defense. *Protoplasma*. <https://doi.org/10.1007/s00709-025-02095-5>
- Kchikich, A., El Amraoui, B., Nhhala, N., Krid, A., Kounnoun, A., Ouahmane, L., Nhiri, M., & Nhiri, N. (2024). Mitigating heavy metals toxicity in *Phaseolus vulgaris* using arbuscular mycorrhizal fungi and *Pseudomonas* spp.: Enhancing antioxidant defense and photosynthetic efficiency. *Protoplasma*, 261(3), 789-803. <https://doi.org/10.1007/s00709-024-01987-3>
- Khan, A. H. A., Butt, T. A., Mirza, C. R., Yousaf, S., Nawaz, I., & Iqbal, M. (2019). Combined application of selected heavy metals and EDTA reduced the growth of *Petunia hybrida* L. *Scientific Reports*, 9(1), 4138. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40309-3>
- Khanpour-Alikelayeh, E., & Partovinia, A. (2021). Synergistic and antagonistic effects of microbial co-culture on bioremediation of polluted environments. In: *Microbial Rejuvenation of Polluted Environment*. Pp. 229-265. Springer. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-7455-9\\_10](https://doi.org/10.1007/978-981-15-7455-9_10)
- Li, H., Wang, H., Zhao, J., Zhang, L., Li, Y., Wang, H., Teng, H., Yuan, Z., & Yuan, Z. (2022). Physio-biochemical and transcriptomic features of arbuscular mycorrhizal fungi relieving cadmium stress in wheat. *Antioxidants*, 11(12), 2390. <https://doi.org/10.3390/antiox11122390>
- Lichtenthaler, H. K., & Wellburn, A. R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, 11(5), 591-592. <https://doi.org/10.1042/bst0110591>
- Ma, Y., Rajkumar, M., Luo, Y., & Freitas, H. (2011). Inoculation of endophytic bacteria on host and non-host plants—Effects on plant growth and Ni uptake. *Journal of Hazardous Materials*, 195, 230-237. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.08.034>

- Mashabela, M. D., Piater, L. A., Dubery, I. A., Tugizimana, F., & Mhlongo, M. I. (2022). Rhizosphere tripartite interactions and PGPR-mediated metabolic reprogramming towards ISR and plant priming: A metabolomics review. *Biology*, *11*(3), 346. <https://doi.org/10.3390/biology11030346>
- Melini, F., Luziatelli, F., Bonini, P., Ficca, A. G., & Ruzzi, M. (2023). Optimization of the growth conditions through response surface methodology and metabolomics for maximizing the auxin production by *Pantoea agglomerans* C1. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1022248. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1022248>
- Molina, A. S., Lugo, M. A., Perez Chaca, M. V., Vargas-Gil, S., Zirulnik, F., Leporati, J., Ferrol, N., & Azcon-Aguilar, C. (2020). Effect of arbuscular mycorrhizal colonization on cadmium-mediated oxidative stress in *Glycine max* (L.) Merr. *Plants*, *9*(1), 108. <https://doi.org/10.3390/plants9010108>
- Mousavi, A., Pourakbar, L., & Moghaddam, S. S. (2022). Effects of malic acid and EDTA on oxidative stress and antioxidant enzymes of okra (*Abelmoschus esculentus* L.) exposed to cadmium stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *248*, 114320. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114320>
- Nouralvandi, T., Habibi, D., Mohamadvarzi, R., Rezaei, K., Sadeghi Shoa, M., & Baladi, M. (2011). The effect of lead and plant growth-promoting bacteria on the activity of catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase enzymes in *Brassica napus*. *Iranian Journal of Crop Science and Plant Breeding*, *7*(2), 1-12. <https://www.sid.ir/paper/471100/fa>
- Olzacki, M., Bosiacki, M., & Swierczynski, S. (2025). The effect of increasing doses of heavy metals on seed germination of selected ornamental plant species. *Agronomy*, *15*(6), 1262. <https://doi.org/10.3390/agronomy15061262>
- Piao, L., Wang, Y., Liu, X., Sun, G., Zhang, S., Yan, J., Chen, Y., Meng, Y., Li, M., & Gu, W. (2022). Exogenous hemin alleviated cadmium stress in maize (*Zea mays* L.) by enhancing leaf photosynthesis, AsA-GSH cycle and polyamine metabolism. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 993675. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.993675>
- Pramila, A. (2022). Germination study of the plants *Trigonella foenum-graecum* L. and *Vigna radiata* in heavy metal treated soil. *New Journal of Engineering and Scientific Research*, *2*(4), 45-52. <https://www.njesr.com/file.axd?file=/Dr.A.Pramila%20paper.pdf>
- Rahbari, A., Fatemi, H., & Esmaeilpour, B. (2020). The effect of different strains of *Pseudomonas fluorescens* on morphological, biochemical, and antioxidant enzyme factors of dill (*Anethum graveolens* L.) under lead stress. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, *36*(2), 227-244. <https://doi.org/10.22092/ijmapr.2020.128076.2656>
- Sabati, P., Yadavi, A., Salehi Amin, N., Naghihah, R., Ebrahimi, F., & Sadoor, G. (2020). Effect of arbuscular mycorrhizal fungi and PGPR on cadmium tolerance in *Borago officinalis*. *Plant Process and Function Journal*, *13*(60), 185-204. <https://www.sid.ir/paper/1509294/fa>
- Savastano, N., & Bais, H. (2024). Synergism or antagonism: Do arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting rhizobacteria work together to benefit plants? *International Journal of Plant Biology*, *15*(4), 944-958. <https://doi.org/10.3390/ijpb15040067>
- Shool, A., & Shamshiri, M. H. (2014). Effect of arbuscular mycorrhizal fungi and *Pseudomonas fluorescens* on chlorophyll fluorescence and photosynthetic pigments of pistachio seedlings (*Pistacia vera* cv. Qazvini) under four water regimes. *European Journal of Experimental Biology*, *4*(3), 1-7.
- Sterckeman, T. (2021). Arbuscular mycorrhizal fungi reduce cadmium accumulation in plants: Evidence and uncertainty. *Plant and Soil*, *468*, 37-43. <https://doi.org/10.1007/s11104-021-05126-1>
- Subasic, M., Samec, D., Selovic, A., & Karalija, E. (2023). Phytoremediation of cadmium polluted soils: Current status and approaches for enhancing. *Soil Systems*, *6*(1), 3. <https://www.mdpi.com/2571-8789/6/1/3>
- Sudhakar, P., Latha, P., & Reddy, P. V. (2018). Determination and Evaluation of Physiological and Biochemical Traits of Crop Plants. Khorramabad: Lorestan University Press.
- Sun, W., Shahrajabian, M. H., & Wang, N. (2025). A study of the different strains of the genus *Azospirillum* spp. on increasing productivity and stress resilience in plants. *Plants*, *14*(2), 267. <https://doi.org/10.3390/plants14020267>
- Timofeeva, A. M., Galyamova, M. R., & Sedykh, S. E. (2023). Plant growth-promoting soil bacteria: Nitrogen fixation, phosphate solubilization, siderophore production, and other biological activities. *Plants*, *12*(24), 4074. <https://doi.org/10.3390/plants12244074>
- Vindeirinho, J. M., Soares, H. M. V. M., & Soares, E. V. (2021). Modulation of siderophore production by *Pseudomonas fluorescens* through the manipulation of the culture medium composition. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *193*, 607-618. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03349-z>
- Wu, L. H., Luo, Y. M., Xing, X. R., & Christie, P. (2004). EDTA-enhanced phytoremediation of heavy metal contaminated soil with Indian mustard and associated potential leaching risk. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, *102*(3), 307-318. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2003.09.002>
- You, M., Wang, L., Zhou, G., Wang, Y., Wang, K., Zou, R., Cao, W., & Fan, H. (2023). Effects of microbial agents on cadmium uptake in *Solanum nigrum* L. and rhizosphere microbial communities in cadmium-contaminated soil. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 1106254. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1106254>

- Zaidi, A., Khan, M. S., Ahemad, M., & Oves, M. (2012). Plant growth promotion by phosphate-solubilizing bacteria. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 59(3), 267-288. <https://doi.org/10.1556/amicr.56.2009.3.6>
- Zeng, W., Xiang, D., Li, X., Gao, Q., Chen, Y., Wang, K., Qian, Y., Wang, L., Li, J., Mi, Q., Huang, H., Xu, L., Zhao, M., Zhang, Y., & Xiang, H. (2025). Effects of combined inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting rhizosphere bacteria on seedling growth and rhizosphere microecology. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1475485. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1475485>
- Zhang, Y., Wu, X., Tao, Y., Ke, T., Wu, W., Liao, K., Li, X., Zeng, Y., Chen, C., & Chen, L. (2023). Effect of plant growth-promoting rhizobacteria on oilseed rape (*Brassica juncea*) and phytoextraction of cadmium. *Journal of Soils and Sediments*, 23(9), 3472-3484. <https://doi.org/10.1007/s11368-023-03559-y>
- Zhao, S., Yan, L., Kamran, M., Liu, S., & Riaz, M. (2024). Arbuscular mycorrhizal fungi-assisted phytoremediation: A promising strategy for cadmium-contaminated soils. *Plants*, 13(23), 3289. <https://doi.org/10.3390/plants13233289>
- Zulfiqar, U., Jiang, W., Xiukang, W., Hussain, S., Ahmad, M., Maqsood, M. F., Ali, N., Ishfaq, M., Kaleem, M., Haider, F. U., Farooq, N., Naveed, M., Kucerik, J., Brtnicky, M., & Mustafa, A. (2022). Cadmium phytotoxicity, tolerance, and advanced remediation approaches in agricultural soils: A comprehensive review. *Frontiers in Plant Science*, 13, 773815. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.773815>

## The synergistic effects of a microbial consortium and sodium EDTA on cadmium detoxification and the antioxidant defense system in forage sorghum (*Sorghum bicolor* L.)

Farzad Rostami<sup>1</sup>, Hamid Reza Eisvand<sup>1\*</sup>, Mashallah Daneshvar<sup>1</sup>, Mohsen Saeedi<sup>2</sup>, Sajjad Rahimi-Moghadam<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

<sup>2</sup> Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran

### Abstract

The intensifying contamination of agricultural soils with cadmium has heightened the need for sustainable strategies to alleviate oxidative stress and improve the physiological performance of plants. Microbial consortia and chelating agents are among the emerging approaches considered effective for managing this stress. The aim of this study was to investigate the effects of plant growth-promoting bacteria (*Pantoea agglomerans* and *Pseudomonas fluorescens*), arbuscular mycorrhizal fungi, and sodium EDTA on growth indices, photosynthetic pigments, and antioxidant enzyme activities of forage sorghum (*Sorghum bicolor* L.) grown in soil contaminated with 40 mg kg<sup>-1</sup> cadmium sulfate. The experiment was conducted in a factorial arrangement based on a completely randomized design with four replications. Results showed that the triple interaction among bacterial inoculation, mycorrhizal symbiosis, and sodium EDTA was significant for seedling emergence percentage, chlorophyll *b* content, and antioxidant enzyme activities. The highest seedling emergence percentage was observed in the *P. agglomerans* × no mycorrhiza × no sodium EDTA treatment, showing a 31.72% increase compared with the control. Superoxide dismutase (SOD) activity increased by 22.17% in the *P. fluorescens* × mycorrhiza × no sodium EDTA treatment, while peroxidase (POD) activity was 49.5% higher in *P. fluorescens* × no mycorrhiza × sodium EDTA compared to the control. Mycorrhiza alone enhanced leaf soluble protein and total chlorophyll content by 7.4% and 9.13%, respectively. The highest carotenoid content was obtained in the *P. agglomerans* × sodium EDTA treatment, with a 3.13% increase over the control. Overall, the combination of *P. fluorescens* with mycorrhiza, without sodium EDTA, produced the most substantial improvements in the plant's defense mechanisms and the preservation of photosynthetic pigments. Therefore, the synergistic application of beneficial microorganisms can be proposed as a sustainable and eco-friendly strategy to mitigate cadmium toxicity and enhance the phytoremediation potential of forage sorghum.

**Keywords:** Bioremediation, Heavy Metals, Microbial Symbiosis, Oxidative Stress, Physiological Response, Rhizosphere

Received: Oct. 17, 2025; Revised: Dec. 11, 2025; Accepted: Dec. 28, 2025; Published Online: June. 02, 2026

\*Corresponding Author: eisvand.hr@lu.ac.ir



Copyright © 2025 Iranian Society of Plant Physiology, Published by Isfahan University of Technology press. This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.