

مقابله با تنش کادمیوم در یونجه با کاربرد زاد مایه باکتری های بومی مقاوم

بابک متشرع زاده^۱، غلامرضا ثواقبی^۱ و حسینعلی علیخانی^۱

۱- اعضاء هیات علمی گروه مهندسی علوم خاک دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی

دانشگاه تهران

moteshare@ut.ac.ir

خلاصه

کادمیوم جزو فلزات سنگین طبقه بندی می شود و از منابع مختلف به ویژه مصرف کودهای فسفوری با غلظت کادمیوم بالا، کاربرد فاضلاب های صنعتی، عملیات استخراج معدن، ذوب فلز و مواد مادری به خاک اضافه و موجب آلودگی محیط زیست می گردد. در این پژوهش، تاثیر زاد مایه مقاوم به فلزات سنگین و کادمیوم بر پاسخ یونجه با چهار سطح مختلف کادمیوم شامل کادمیوم شاهد (Cd0)، Cd50، Cd100 و Cd200 میلی گرم در کیلوگرم از منبع کلرید کادمیوم (CdCl₂.H₂O) و سه سطح زاد مایه شامل شاهد (B0)، *Bacillus mycoides* M1 (B1)، *Micrococcus roseus* M2 (B2)، در قالب یک آزمایش فاکتوریل با طرح پایه بلوک های کامل تصادفی با سه تکرار در یک خاک آهکی و در شرایط گلخانه، اجرا گردید. غلظت عناصر کادمیوم، آهن، روی، و منگنز در اندام هوایی و عملکرد ماده خشک اندازه گیری شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که کاربرد زاد مایه به طور معنی داری ($P < 0.05$) موجب افزایش کارایی گیاه پالایی کادمیوم شد. بیشترین غلظت کادمیوم در بین سه چین یونجه در چین اول مشاهده گردید و تیمارهای کادمیوم غلظت این عنصر در گیاه را افزایش داد. کاربرد زاد مایه موجب افزایش غلظت آهن، روی و منگنز در گیاه گردید که این امر می تواند در مقابله با تنش کادمیوم در گیاه موثر باشد. ضمناً کاهش سطح اتیلن تنشی نیز ممکن است صورت گرفته باشد. انجام تحقیقات بیشتر در این زمینه و در شرایط صحرایی، پیشنهاد می گردد.

کلمات کلیدی: یونجه، کادمیوم، زاد مایه، آلودگی خاک، گیاه پالایی

۱. مقدمه

امروزه آلودگی فلزات سنگین در خاک ها، یک مشکل عمده زیست محیطی محسوب می شود و بر سلامت انسان، موجودات زنده، تولیدات کشاورزی و زیست بوم اثر دارد (Ansari and Malik, 2007). آلودگی خاک به فلزات سنگین را می توان به روش های شیمیایی، فیزیکی و زیستی پالایش کرد (Yan-de et al., 2007). فناوری های پالایش آلودگی با محوریت گیاه با نام "گیاه پالایی" یا "پالایش سبز" با استفاده از گیاهان و برهمکنش مثبت وهمیاری با موجودات زنده خاک، آلاینده ها را از خاک و آب زیر زمینی آلوده به صورت درجا پالایش می کنند. با وجود مزایایی که برای استفاده از گیاهان در پالایش آلاینده های آلی و غیر آلی بر شمرده شده، برخی محدودیت ها نیز در کاربرد این روش در مقیاس وسیع نظیر عدم توان تولید زیست توده کافی ذکر شده است (Roch, 1997). به منظور فائق آمدن بر این مشکلات، فناوریهای جدید نظیر استفاده از باکتری های مقاوم و محرک رشد و تقویت سیستم ریشه ای و تولید زیست توده بیشتر توسط گیاهان مورد توجه قرار گرفته است (kuffner, 2007; Yan-de et al., 2008; Glick, 2003; Ansari and Malik, 2007). سنتز انواع هورمون های گیاهی نظیر اکسین ها و سیتوکنین ها نیز از جمله راه های تأثیر و تحریک رشد گیاه توسط باکتری محرک رشد است. از دیگر محاسن باکتری های محرک رشد، افزایش حلالیت مواد معدنی نظیر فسفات های آلی و معدنی و سهولت در جذب آن و تامین آنزیم های مورد نیاز گیاه است. در شرایط تنش فلزات سنگین، عموماً کمبود آهن در گیاهان بروز می کند که در این شرایط باکتری

^۱ - برترتیب استادیار، دانشیار و استادیار

با تشکیل کمپلکس سیدروفور-آهن می توانند نیاز گیاه را تامین کند. از میان پژوهش های انجام شده در زمینه گیاه پالایی و زیست پالایی به موارد زیر اشاره می گردد: محققین یونجه را بعنوان گیاه مناسبی برای استفاده در فناوری گیاه پالایی ذکر نموده اند (Dietz and Schnoor, 2001). Zhuang و همکاران (۲۰۰۷) گیاه جذبی سرب، روی و کادمیوم را در شش گونه گیاهی با قابلیت تولید زیست توده بالا (*Vertireria zizaniodes*، *Dianthus chinensis*، *Rumex K-1*، *Rumex crispus* و دو گونه از *Rumex acetosa*) با دو بیش اندوز (*Sedum alfredii* و *Viola boashanensis*) مقایسه کردند. نتایج حاصله نشان داد که *S. alfredii* و *V. boashanensis* به ترتیب ۲۸ و 6279 mg kg^{-1} کادمیوم و سرب را اندام هوایی خود جذب کرده اند. در بین گیاهان غیر بیش اندوز، بیشترین میزان جذب فلز در گیاه *R. crispus* با غلظت روی و کادمیوم به ترتیب $26/8$ و 16 mg kg^{-1} مشاهده شد که از این گونه می توان برای گیاه جذبی کادمیوم و روی استفاده کرد. تحقیقات پژوهشگران حاکی از آن است که کارایی گیاه پالایی تحت تأثیر زیست فراهمی فلزات سنگین در خاک قرار دارد و باکتری ها می توانند فلزات سنگین را به صورت قابل جذب در اختیار ریشه قرار دهند (Yan-de et al., 2007). در تحقیقی در هند، گزارش شد که باکتری های جدا شده از خاک مربوط به جنس های اینترو باکتر و سودوموناس برای پالایش فاضلاب های کارخانه ها از فلزات کادمیوم، روی، نیکل و سرب با موفقیت آزمایش گردید (Ansari and Malik, 2007). این باکتریها قادر به جذب مقادیر بالای فلزات فوق (کادمیوم تا ۲۰۰، روی تا ۴۰۰، نیکل تا ۸۰۰ و سرب تا 1600 mg l^{-1}) بودند. آتش نما و همکاران (۱۳۸۵) در بررسی تجمع برخی فلزات سنگین در سه گیاه علوفه ای یونجه، خلر و اسپرس گزارش دادند که گیاه یونجه در جذب و نگهداری فلزات سنگین در اندام های خود خصوصاً بخش هوایی استعداد بالایی دارد و بعد از یونجه، اسپرس و خلر حاوی بیشترین میزان کادمیوم و سرب در اندام هوایی خود بودند. در مجموع این پژوهش با هدف بررسی تاثیر زادمایه باکتری های بومی مقاوم بر کاهش تنش ناشی از کادمیوم، در دو مرحله کار آزمایشگاهی و گلخانه ای به اجرا در آمد.

۲. مواد و روش ها

در این تحقیق باکتری های مقاوم به فلزات سنگین از اراضی اطراف معدن سرب و روی شازند اراک جداسازی، خالص سازی و شناسایی گردید و دو جدایه باکتری بومی مقاوم به کادمیوم *Bacillus mycoides* M1 و *Micrococcus roseus* M2، بر اساس دستور العمل (Holt et al., 1994) Bergey، شناسایی و در آزمایش گلخانه ای مورد استفاده قرار گرفت. شرح مربوط به آزمایشهای بیولوژیک انجام گرفته بر روی این جدایه ها برای شناسایی خصوصیات باکتری های PGPR در مقاله Moteshare (2008) zadeh et al. به چاپ رسیده است. خاک مورد استفاده در کشت گلخانه ای از خاک مزرعه پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران واقع در کرج با نام علمی (Fine Loamy, Mixed, Xeric Haplocambids, Super active thermic) نمونه برداری و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی و غلظت عناصر در آن بر اساس روش های مرسوم آزمایشگاهی اندازه گیری شد (جدول یک). غلظت کادمیوم در خاک برای آزمایش گلخانه ای شامل تیمارهای شاهد (Cd0)، Cd50، Cd100 و Cd200 میلی گرم در کیلوگرم از منبع کلرید کادمیوم ($\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) و سه سطح زادمایه شامل B0 (شاهد)، B_1 (*Bacillus mycoides* M1) و B_2 (*Micrococcus roseus* M2) در سه چین یونجه (رقم همدانی) بود. در طول دوره داشت، آبیاری گلدهاها به صورت وزنی و در حد $10 \pm 7\%$ رطوبت مزرعه با آب مقطر انجام گرفت. پس از بیرون آمدن جوانه ها، گیاهچه ها در گلدان ها تنک شدند به گونه ای که در هر گلدان ۶ گیاهچه یونجه به طور کامل رشد کرد. سه چین یونجه در طول دوره ۱۴۰ روزه برداشت و پس از شستشو با آب مقطر و اندازه گیری وزن تر، در داخل پاکت های مخصوص قرار گرفت و در آون با دمای 70^0 سلسیوس خشک شد. سپس نمونه ها، آسیاب و غلظت فلزات کادمیوم، آهن، روی و منگنز در عصاره تهیه شده به روش هضم با اسید

نیتریک غلیظ با دستگاه ICP-OES مدل ICAP-۶۵۰۰ اندازه گیری شد (Madejon *et al.*, 2003). در نهایت داده های حاصل در قالب آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی در ۳ تکرار با نرم افزار SAS تجزیه واریانس شد و مقایسه میانگین ها با آزمون LSD در سطح یک درصد انجام گرفت.

۳. نتایج و بحث

در جدول یک خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مذکور قبل از اضافه کردن کادمیوم درج شده است. نتایج تجزیه خاک نشان داد که خاک مورد نظر دارای بافت و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی مناسبی برای استفاده در کشت گلخانه ای بود و از نظر غلظت اولیه فلزات سنگین محدودیتی وجود نداشت.

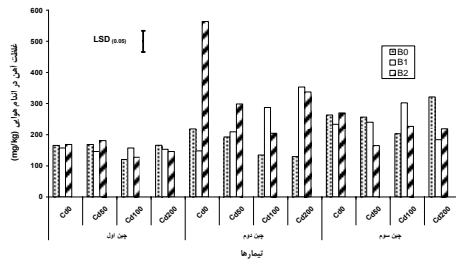
جدول ۱- مشخصات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در کشت گلخانه ای

مقدار	مشخصه	مقدار	مشخصه
۰,۰۸	نیتروژن کل (درصد)	Loam	بافت خاک
۱۷,۱۰	فسفر قابل جذب (mgkg ⁻¹)	۲۵,۰۰	درصد رس
۲۴۷,۰۰	پتاسیم قابل جذب (mgkg ⁻¹)	۳۶,۰۰	درصد سیلت
۰,۱۰	Cd(mgkg ⁻¹)*	۳۹,۰۰	درصد شن
۴,۲۸	Fe (mgkg ⁻¹) *	۷,۹۰	pH
۴,۰۶	Cu(mgkg ⁻¹)*	۴,۳۱	EC(dSm ⁻¹)
۸,۲۴	Mn(mgkg ⁻¹)*	۸,۹۰	%CaCO ₃
۰,۸۱	Zn(mgkg ⁻¹)*	۰,۸۴	%OC
۲۶,۰۰	CEC(cmolk ⁻¹)	۳۵,۶۰	%SP

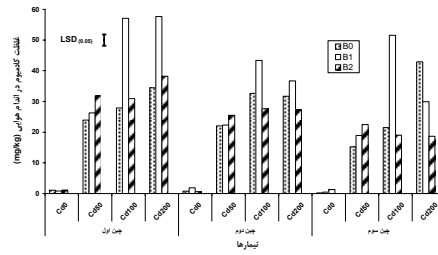
DTPA-Extractable *

در شکل های ۱ تا ۶، اثرات سه گانه (کادمیوم، باکتری و چین)، مورد مقایسه قرار گرفته اند. بر اساس نتایج ارائه شده در شکل یک زادمایه B1 دارای اثر بیشتری در افزایش جذب و کارایی گیاه پالایی کادمیوم بود. این زادمایه (*Bacillus mycooides* M1) به هر چهار فلز کادمیوم، سرب، روی و نیکل در مرحله آزمایشگاهی مقاوم بود. بر اساس اعلام Yan-de و همکاران (۲۰۰۷)، مقاومت به چند فلز (MMR)^۱ در باکتریها دارای اثر بیشتری از مقاومت به یک فلز است. همچنین کاربرد زاد مایه سبب افزایش غلظت آهن، منگنز و روی در گیاه گردید (شکل ۲، ۳ و ۴). مشاهده این نتایج با یافته های محققین دیگر نظیر Glick (۲۰۰۳) همخوانی داشت. بر این اساس زمانی که گیاهان در خاکهای آلوده به فلز رشد کنند ممکن است قادر به زنده ماندن در این شرایط (غلظت بالای فلزات در گیاه) باشند. دو اثر عمده این غلظت بالا در کاهش رشد گیاه عبارتند از: افزایش سنتز اتیلن تنشی در گیاه و کاهش غلظت آهن گیاه. در این حالت باکتری های محرک رشد می توانند برای رفع اثرات آلودگی فلزات به کار روند. این باکتری ها دو راه اثر متفاوت دارند: باکتری های محرک رشد با ترشح آنزیم ACC دآمیناز تنش اتیلن را کاهش می دهند. علاوه بر این قادر به استفاده و جذب ترکیبات سیدروفور و آهن خواهند بود. همچنین با کاربرد زاد مایه، جذب کادمیوم نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی داری یافت (شکل ۵). در تحقیقی، ۱۰ جدایه باکتری از ریزوسفر بید در خاک های آلوده به فلزات سنگین جدا و خصوصیات گیاه جذبی آنها بررسی شد (Kuffner *et al.*, 2008). با توجه به مقاومت این جدایه ها و توان تولید سیدروفور و اکسین،

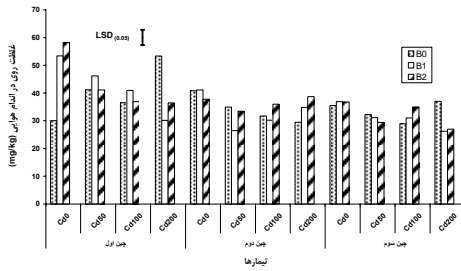
¹ -Multiple Metal Resistance



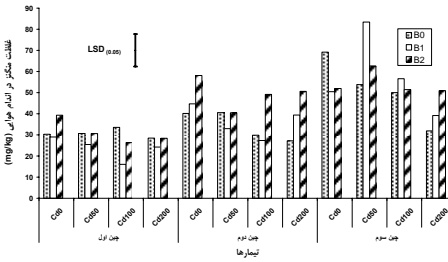
شکل ۲- تاثیر تیمارها بر غلظت آهن اندام هوایی یونجه



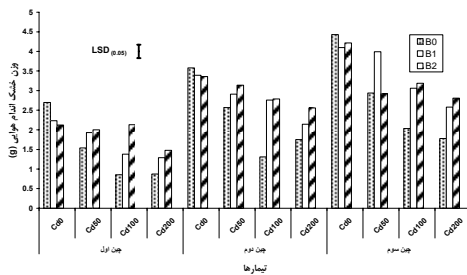
شکل ۱- تاثیر تیمارها بر غلظت کادمیوم در اندام هوایی یونجه



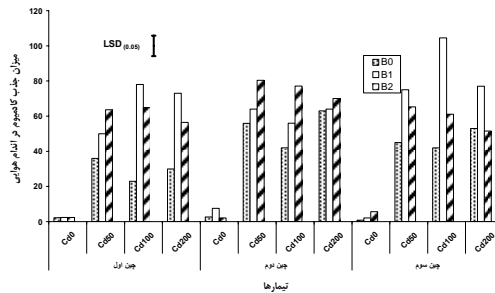
شکل ۴- تاثیر تیمارها بر غلظت روی اندام هوایی یونجه



شکل ۳- تاثیر تیمارها بر غلظت منگنز در اندام هوایی یونجه



شکل ۶- تاثیر تیمارها بر وزن خشک اندام هوایی در یونجه



شکل ۵- تاثیر تیمارها بر جذب کادمیوم ($\mu\text{g/Pot}$) در یونجه

این باکتری ها توان مناسبی برای افزایش کارایی گیاه پالایی داشتند. نکته دیگر آنکه کاربرد زادمایه سبب کاهش اثرات تنشی فلز در گیاه گردید و تیمارهای با کاربرد زادمایه نسبت به شاهد، وزن خشک بیشتری داشتند (شکل ۶). در تایید نتایج حاصله میتوان به گزارش Erakhrumen and Agbontalor (۲۰۰۷)، در استفاده از یونجه برای پالایش خاک آلوده اشاره کرد.

۴. نتیجه گیری

در مجموع با در نظر گرفتن تولید زیست توده بالا در یونجه و اثرات مفید باکتری های بومی مقاوم به فلزات سنگین و محرک رشد (از طریق تاثیر مستقیم و غیر مستقیم) بر رشد ریشه و تحریک رشد از طریق تولید سیدروفور و تامین آهن و فسفر و سایر عناصر غذایی و مقابله با تنش فلزات با تولید آنزیم ACC دآمیناز و کاهش اتیلن تنشی، می توان امیدوار بود که با تداوم تحقیقات، به گام های عملی در استفاده از باکتری و گیاه برای رفع آلودگی های محیطی دست یافت.

۵. قدردانی

بخشی از هزینه های انجام این طرح توسط قطب علمی بهبود کیفیت خاک برای تغذیه متعادل گیاه دانشگاه تهران تامین شده که بدینوسیله سپاسگزاری می گردد.

۶. فهرست منابع

۱. آتش نما، ک.، گلچین، ا. و اسماعیلی، م. ۱۳۸۵. میزان تجمع برخی فلزات سنگین در سه گیاه علوفه ای یونجه، خلر و اسپرس. مجموعه مقالات همایش خاک، محیط زیست و توسعه پایدار، دانشگاه تهران، کرج. ایران. ۱۷-۱۸ آبان. ۳۰۴-۳۰۳.

2. Ansari, M. I. and A. Malik. 2007. Biosorption of nickel and cadmium by metal resistant bacterial isolates from agricultural soil irrigated with industrial wastewater. *Bioresource Techn.* 98: 3149-3153.
3. Dietz, A. C. and J. L. Schnoor. 2001. Advances in phytoremediation. *Environmental Health Perspectives*, 109: 163-168.
4. Erakhrumen, A. and A. Agbontalor. 2007. Phytoremediation: an environmentally sound technology for pollution prevention, control and remediation in developing countries, *Educational Research and Reviews*, 7: 151-156.
5. Ghosh, M. and S.P. Singh. 2005. A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its byproducts. *Applied Ecology and Environmental Research*, 3(1): 1-18.
6. Glick, B. R. 2003. Phytoremediation: Synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnology Advances*, 21: 383-393.
7. Holt, J. G., N. R. Kreig, P.H.A. Sneath, J. T. Staley and S. T. Williams. 1994. Bergeys manual of determinative bacteriology, Ninth ed. Baltimore, maryland: Williams and Wilkins.
8. Kuffner, M., M. Puschenreiter, G. Wieshammer, M. Gorfer and A. Sessitsch, 2008. Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows, *Plant Soil*, 304: 35-44.
9. Madejon, P., J. M. Murillo, T. Maranon, F. Cabrera and M. A. Soriano. 2003. Trace element and nutrient accumulation in sunflower plants two years after the Aznalcollar mine spill. *The Science of the total Environment*, 307: 239-257.
10. Moteshare zadeh, B., Gh. R. Savaghebi, H. A. Alikhani, and H. M. Hosseini. 2008. Effect of Sunflower and Amaranthus Culture and Application of Inoculants on Phytoremediation of the Soils Contaminated with Cadmium, *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 4 (1): 93-103.
11. Rock, S. 1997. Phytoremediation of petroleum in soil and groundwater. In: Kostecki PT, Calabrese EJ(eds.) 12th Annual conference on contaminated soil-analysis, site assessment October 20-23, Amherst, MA.
12. Weber, O., R.W. Scholz, R. Bvhlmann and D. Grasmuck. 2001. Risk perception of heavy metal soil contamination and attitudes toward decontamination strategies. *Risk Anal.*, 21(5): 967-977.
13. Yan-de, J., H. Zhen-li and Y. Xiao. 2007. Role of soil rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *J. Zhejiang Univ. Sci.*, 8(3): 197-207.
14. Zhuang, P., Q. W. Yang., H.B. Wang and W. S. Shu. 2007. Phytoextraction of heavy metals by Eight plant species in the field, *Water Air Soil Pollut.*, 184: 235-242.