اثرات آلودگی خاک به کادمیم، سرب و روی بر تثبیت نیتروژن سویه‌های بومی سینوریزوبیوم ملیلوتی و عملکرد یونجه

اسماعیل معمار کوچه‌باغ[1]، داریوش شانه‌بندی[2]، احمد گلچین[3]، حسین بشارتی[4]

1- فارغ التحصیل کارشناسی ارشد خاکشناسی دانشگاه زنجان، زنجان، دانشکده کشاورزی، گروه خاکشناسی

2- فارغ التحصیل کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه پیام نور، کرج، دانشگاه پیام نور، گروه مهندسی بیوتکنولوژی

3- مدیر گروه خاکشناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان، زنجان، دانشکده کشاورزی، گروه خاکشناسی

4- رئیس موسسه تحقیقات خاک و آب تهران، کرج، میدان استاندارد، جاده مشکین دشت بعد از رزکان نو، بلوار امام خمینی

smaeil_memar@yahoo.com

چکیده

فلزات سنگین به دلیل آثار بازدارنده‌ای که بر رشد و فعالیت باکتری‌های ریزوبیوم و گیاهان لگوم میزبان آنها دارند، گره‌بندی و تثبیت نیتروژن سیستم‌های همزیستی را تحت تأثیر قرار می‌دهند. هدف این تحقیق جداسازی سویه‌های مقاوم سینوریزوبیوم ملیلوتی به کادمیم، سرب و روی جهت تولید مایه تلقیح برای مناطق آلوده و تأثیر این فلزات بر توان همزیستی سویه‌های بومی عملکرد یونجه می‌باشد. پس از جداسازی و بررسی مقاومت سویه‌ها به فلزات سنگین، تعیین توان همزیستی سویه‌های سینوریزوبیوم ملیلوتی صورت گرفت S_{41} بر اساس توان تثبیت و میزان تحمل به هر سه فلز سنگین مؤثرترین سویه معرفی گردید.

کلمات کلیدی: سینوریزوبیوم ملیلوتی، فلزات سنگین، یونجه

مقدمه

مطالعه محققان مختلف در داخل کشور نشان می‌دهد که تشدید فعالیتهای صنعتی در کشور از یکسو و عدم رعایت مسائل و استانداردهای زیست محیطی از طرف بعضی صاحبان صنایع از سوی دیگر موجبات آلودگی محیط زیست بعضی از مناطق کشور را فراهم ساخته است (گلچین، 1382). ورود آلاینده‌هایی چون کادمیم، سرب و روی به خاک سبب حذف تدریجی بسیاری از موجودات مفید زیستگاه‌ها شده، درنتیجه تنوع زیستی که شرط اصلی پویایی، خود تنظیمی، تعادل و پایداری اکوسیستم خاک است به آسیبی غیر قابل جبران دچار می‌گردد (Angle, 1991).

توجه به نقش ریزوبیوم‌ها در ارتقاء سطح حاصلخیزی خاک به دلیل امکان برقراری رابطهٔ همزیستی با گیاهان خانوادهٔ لگومینوز جهت تثبیت نیتروژن می‌باشد. توان مقاومت در برابر تنش‌های محیطی مانند شوری، خشکی و آلودگی خاک به سموم و فلزات سنگین از جمله مشخصات مطلوب برخی سویه‌های ریزوبیومی محسوب می‌شود که می‌تواند به عنوان مبنایی جهت انتخاب آنها برای شرایط محیطی خاص قرار گیرد (Zahran, 1999).

با توجه به آلودگی بسیاری از اراضی کشاورزی استان زنجان به فلزات سنگین که ناشی از فعالیت کارخانه‌های فرآوری سرب و روی می‌باشد، تأثیر این آلودگی بر عملکرد یونجه و فرآیند تثبیت بیولوژیک ازت در یونجه‌زارهای استان معلوم نبوده و این تحقیق با هدف بررسی اثرات آلودگی خاک با کادمیم، سرب و روی بر سویه‌های بومی و مشخصات همزیستی آنها نظیر توان گره‌زایی و تثبیت نیتروژن مولکولی و نیز شناخت و معرفی سویه‌های مقاوم انجام گرفت.

مواد و روشها

به علت قرار گرفتن تعداد زیادی از مزارع استان زنجان در نزدیکی کارخانجات، بسیاری از مزارع یونجه این استان آلوده به فلزات سنگین می‌باشند. پس از تهیه نمونه‌های گره از گیاه یونجه، جداسازی و خالص‌سازی جدایه‌های

سینوریزوبیوم ملیلوتی از گره‌های ریشه‌ای یونجه انجام و 45 سویه باکتری از آنها جدا گردید. بررسی وضعیت گره‌بندی بوته‌ها، تعداد، اندازه و موقعیت قرار گرفتن گره‌ها در روی سیستم ریشه‌ای مطابق جدول پیشنهادی وین‌سنت (1982) انجام شد. جهت اطمینان از همزیست بودن جدایه‌ها، آزمایش ایجاد گره روی سیستم ریشه‌ای گیاه میزبان انجام گرفت. در مرحله بعد، برای بررسی توان تثبیت نیتروژن سویه‌های ریزوبیومی آزمایش گلخانه‌ای با استفاده از 45 سویه ریزوبیوم به همراه تیمار شاهد بدون باکتری و تیمار نیتروژنی 70 میلی‌گرم در کیلوگرم نیتروژن انجام گردید و کارایی همزیستی سویه‌ها (S.E.)[1] محاسبه گردید. مقاومت نسبی 45 سویه در سطوح مختلف کادمیم، سرب و روی بطور جداگانه با استفاده از محیط کشت جامد H.M.[2] تعیین و بر اساس میزان تحملی که در برابر این سه فلز سنگین از خود نشان دادند در یکی از گروه‌های مقاوم، نسبتاً حساس و حساس قرار گرفتند (Beck *et al*, 1993). در مرحله دیگر جهت بررسی تأثیر سطوح مختلف فلزات سنگین بر رشد، توان گره‌زایی و تثبیت نیتروژن سویه‌های سینوریزوبیوم ملیلوتی، آزمایش گلخانه‌ای کشت یونجه به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با 3 تکرار انجام شد. فاکتورها شامل 5 سطح کادمیم (0، 2، 10، 20 و 30)، 5 سطح سرب (0، 5، 25، 50 و 100) و 5 سطح روی (0، 5، 10، 25 و 50) میلی‌گرم فلز سنگین در کیلوگرم خاک، تلقیح با 5 سویه باکتری، شاهد بدون تلقیح و تیمار 70 میلی‌گرم در کیلوگرم نیتروژن بودند. درصد نیتروژن بخش هوایی گیاه به روش کجلدال اندازه‌گیری و بر اساس آن مقدار کل نیتروژن جذب شده در اندام هوایی محاسبه گردید. تجزیه و تحلیل آماری نتایج با نرم افزارهای SPSS و Mststc انجام و مقایسه میانگین ها با آزمون دانکن صورت گرفت (Vincent, 1982).

نتیجه‌گیری

با مطالعه میکروسکوپی سویه‌های ریزوبیومی، فرم تیپیک سویه‌های این باکتری، میله‌ای کوتاه، گرم منفی و فاقد اسپور مشاهده و مورد تأیید قرار گرفت. تشخیص نهایی هر گونهٔ ریزوبیوم بر اساس توان برقراری همزیستی روی سیستم ریشه‌ای گیاه میزبان صورت می‌گیرد. نتایج نشانگر وجود اختلاف نسبتاً زیاد در بین سویه‌های سینوریزوبیوم ملیلوتی از نظر توان گره‌زایی بر روی ریشهٔ گیاه یونجه است. بیشترین تعداد گره به ترتیب در سویه‌های S_{41}، S_{51} و S_6 مشاهده شد و سویه‌های S_{66}، S_{63} وS_{23} دارای کمترین توان گره‌زایی بودند، به طوریکه تعداد گره‌های ایجاد شده توسط این سویه‌ها 70 درصد کمتر از سویه‌های برتر از نظر این صفت بود. با توجه به نتایج آزمایش بررسی توان همزیستی سویه‌ها مشخص می‌شود که تمام سویه‌هایی که در شرایط طبیعی زیستگاه خود بر روی ریشه‌های گیاهان میزبان قادر به ایجاد گره‌های مؤثر بوده‌اند، در شرایط آزمایشگاهی نیز راندمان همزیستی بالایی داشته‌اند (سویه‌هایS_{41}، S_{51}، S_6 و S_{43}). نتیجه کلی حاصل از این آزمایش نشان داد که اولاً کارایی همزیستی در سویه‌های مختلف سینوریزوبیوم ملیلوتی در ارتباط با گیاه یونجه متفاوت است که این نتیجه با بسیاری از گزارشهای علمی مطابقت دارد (Marschner, 1995). علاوه بر شرایط محیطی مناسب و عدم وجود عوامل بازدارنده در یک محیط، خصوصیات ژنتیکی نیز عملاً تعیین کنندهٔ توان یک سویهٔ معین ریزوبیوم در برقراری رابطهٔ همزیستی مؤثر با گیاه میزبان می‌باشد (Marschner, 1995). در همزیستی ریزوبیوم- لگومینوز، افزایش غلظت فلز سنگین در خاک، رشد گیاه، باکتری و به دنبال آن توان همزیستی گیاه و باکتری کاهش می‌یابد (Rossbach *et al*, 2008). بطورکلی کاهش حجم تودهٔ گیاهی در اثر آلودگی عناصر سنگین، بیشتر از کاهش میزان تثبیت نیتروژن و انتقال آن از گره‌ها به بخش‌های هوایی است. این مطلب را می‌توان به وضوح در نتایج تحقیق مشاهده کرد، به طوریکه با افزایش سطوح کادمیم، سرب و روی، وزن خشک و همچنین غلظت

1 .Symbiotic Efficiency
2. HEPES-MES

نیتروژن اندام هوایی گیاه یونجه کاهش یافت. تمام سویه‌های مورد مطالعه سبب افزایش وزن خشک اندام هوایی گیاه نسبت به تیمار شاهد (بدون تلقیح با باکتری سینوریزوبیوم ملیلوتی و دریافت کود نیتروژنی) گردیدند. سویه‌های S_6 و S_{41} با افزایشی به ترتیب برابر با 450% و 383% نسبت به شاهد مؤثرترین سویه‌ها در افزایش وزن خشک یونجه بودند. بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس، اثر تیمارهای مختلف بر کارآیی همزیستی در سطح 1 درصد معنی‌دار شده است.

جدول 1- تجزیه واریانس اثر سویه‌های ریزوبیومی بر صفات ارزیابی شده در آزمون توان تثبیت نیتروژن مولکولی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات(MS)	
		وزن خشک اندام هوایی	کارایی همزیستی (S.E.)
سویه باکتری یا سطح نیتروژن	47	1/636 **	137691/667 **
(خطای آزمایش)	96	0/002	173/333
جمع کل	143		
C.V		1/28	2/80

** معنی‌دار در سطح 1 درصد

سویه‌های S_6 و S_{41} که از نظر تأثیر بر وزن خشک بخش هوایی گیاه برترین سویه‌ها بودند، از لحاظ کارآیی همزیستی (به ترتیب 152% و 139%) نیز به عنوان سویه‌های برتر ظاهر شدند.

به طور کلی فلزات سنگین دارای تأثیر منفی بر رشد میکروارگانیسم‌ها بوده و سبب کاهش تعداد و فعالیت آنها می‌شود (Rossbach *et al*, 2008). بررسی تأثیر فلزات سنگین بر سویه‌های سینوریزوبیوم ملیلوتی نشان داد که میزان رشد سویه‌ها در سطوح مختلف کادمیم، سرب و روی متفاوت می‌باشد، بطوریکه برخی از سویه‌ها در بالاترین سطح اعمال شده از این فلزات به خوبی رشد کردند در حالیکه سویه‌های دیگر حتی در غلظت‌های پایین قادر به رشد نبودند. در جدول زیر نتایج مربوط به بررسی میزان تحمل 5 سویه برتر سینوریزوبیوم ملیلوتی به سطوح مختلف فلزات سنگین نشان داده شده است.

جدول 2- میزان تحمل سویه‌های سینوریزوبیوم ملیلوتی به سطوح مختلف کادمیم، سرب و روی

ردیف	سویه	میزان مقاومت به فلزات سنگین														
		Cd ($mg\ l^{-1}$)					Pb ($mg\ l^{-1}$)					Zn ($mg\ l^{-1}$)				
		60	70	80	90	100	100	200	300	400	500	50	100	150	200	250
1	S_6	PS	PS	PS	S	S	T	T	PS	S	S	T	T	PS	S	S
2	S_{41}	T	T	T	T	T	T	T	T	T	PS	T	T	T	T	PS
3	S_{51}	PS	PS	PS	S	S	T	T	PS	PS	S	T	T	S	S	S
4	S_{54}	PS	PS	PS	S	S	T	PS	S	S	S	T	T	T	T	S
5	S_{58}	PS	PS	PS	S	S	PS	S	S	S	S	ps	S	S	S	S

P.S.: Partially Sensitive S: Sensitive T: Tolerant

با در نظر گرفتن کلیه سطوح فلزات سنگین (کادمیم، سرب و روی)، سویه S_{41} به عنوان مقاومترین سویه از نظر تحمل به هر سه فلز سنگین با کارایی همزیستی به ترتیب بسیار مؤثر، (139%) شناخته شد.

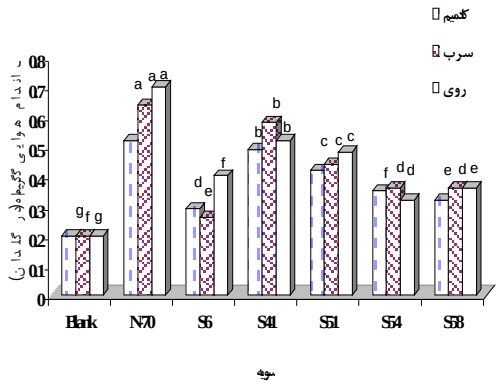
در سیستم‌های همزیستی ریزوبیوم- لگومینوز، در اثر افزایش فلزات سنگین در خاک، رشد گیاه، باکتری و به دنبال آن توان همزیستی گیاه و باکتری کاهش می‌یابد و این امر سبب کاهش در میزان نیتروژن تثبیت شده و انتقال آن از

گره‌ها به بخش‌های هوایی گیاه می‌شود (Sabine, 1992). به دلیل تحمل ذاتی سویه‌ها به فلزات سنگین که آن نیز به خاطر تفاوت ژنتیکی سویه‌های ریزوبیومی می‌باشد، رشد گیاه بیش از فعالیت باکتری جهت تثبیت نیتروژن تحت تأثیر قرار می‌گیرد (Angle *et al*, 1991).

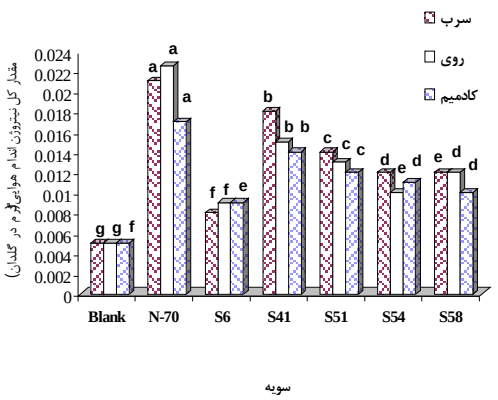
با افزایش غلظت فلزات سنگین، از وزن خشک اندام هوایی بطور معنی‌داری کاسته شد. در شکل 1 مقایسه اثر سویه‌های مختلف سینوریزوبیوم ملیلوتی بر وزن خشک اندام هوایی گیاه نشان داد که بین تمامی سویه‌ها با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری وجود دارد که کمترین مقدار عملکرد مربوط به تیمار شاهد و بیشترین مقدار آن در گیاهان تلقیح شده با سویه‌های مقاوم و دارای کارایی همزیستی بالا بود. مقایسه سطوح فلزات سنگین بیانگر آن است که با افزایش مقدار این فلزات، مقدار نیتروژن اندام هوایی گیاه کاهش می‌یابد.

شکل 2 بیانگر اختلاف تأثیر سویه‌های مختلف سینوریزوبیوم ملیلوتی در سطوح مختلف کادمیم، سرب و روی بر مقدار کل نیتروژن هوایی می‌باشد، به طوریکه بیشترین مقدار آن مربوط به سویه S_{41} با کارآیی همزیستی بالا و حداکثر توان مقاومت در برابر هر سه فلز سنگین و کمترین مقدار مربوط به تیمار شاهد می‌باشد.

بنابراین با توجه به نتایج جداول و مقایسه سویه‌های مختلف می‌توان سویه S_{41} را به عنوان برترین سویه که توانایی بسیار بالایی برای برقراری همزیستی در خاکهای آلوده به عناصر سنگین دارد، معرفی نمود



شکل1- اثر سویه بر وزن خشک اندام هوایی گیاه یونجه



شکل2- اثر سویه بر مقدار کل نیتروژن اندام هوایی یونجه

منابع

گلچین، ا. 1382. فعالیتهای صنعتی و آلودگی‌های خاک‌های کشاورزی به فلزات سنگین. مجموعه مقالات هشتمین کنگره علوم خاک ایران، دانشگاه گیلان، رشت. صفحه 779-776.

Angle, J. S. and R. L. Chaney. 1991. Heavy metal effects on soil population and heavy metal tolerance of *Rhizobium meliloti*, nodulation and growth of alfalfa. Water, Air and Soil Pollution 57-58: 597-604.

Beck, D.P., L.A. Materun and F. Afandi. 1993. Practical Rhizobium legume Technology Manual. Technical manual, no: 19, ICARDA.

Marschner, H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, San Diego, CA

Rossbach, S., Mai, Danielle J., Carter, Eric L., Sauviac, Laurent, Capela, Delphine, Bruand, Claude, de Bruijn, Frans J. 2008. "Response of *Sinorhizobium meliloti* to Elevated

Concentrations of Cadmium and Zinc." Applied and Environmental Microbiology 74: 4218- 4221.

Sabine, E., P. Steve, S.P. Mc Grath and K.E. Giller. 1992. Assessment of free-living nitrogen fixation activity as a biological indicator of heavy metal toxicity in soil. Soil Biology and Biochemistry, 24: 601-606.

Vincent, J.M. 1982. Nitrogen Fixation in Legume. Academic press, London.

Zahran, H. H. 1999. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 63: 968-989