پانزدهمین کنگره علوم خاک ایران
۶ تا ۸ شهریور ۱۳۹۶ محور مقاله: آلودگی خاک

اثر باکتری‌های محرک رشد گیاه و زمان‌های کاربرد لیگاند EDTA بر ویژگی‌های رویشی گیاه ذرت در یک خاک آلوده به مس و آرسنیک

آذر نصیرزاده [۱]، محسن حمیدپور[۲]، پیمان عباس‌زاده دهجی[۳]، عبدالرضا اخگر[۲]
۱-دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه ولیعصر (عج) رفسنجان، ۲- دانشیار عضو هیئت علمی دانشگاه ولیعصر (عج) رفسنجان،
۳-استادیار عضو هیئت علمی دانشگاه ولیعصر (عج) رفسنجان

چکیده

در این پژوهش اثر باکتری‌های محرک رشد و زمان‌های مختلف کاربرد لیگاند EDTA بر خواص رویشی گیاه ذرت در یک خاک آلوده به مس و آرسنیک، در آزمایشی با طرح کاملا تصادفی با سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. تیمارها شامل باکتری‌های محرک رشد گیاه در چهار سطح (بدون تلقیح و تلقیح با جدایه‌های *سودوموناس* (A2 وA5) و جدایه *استنو تروفومنس* (A22)) و تیمار لیگاند (۵/۱ میلی‌مولار لیگاند در کیلوگرم خاک) در چهار زمان (۲۰، ۳۵ و ۴۵ روز بعد از کاشت) بود. تیمار شاهد (بدون باکتری و لیگاند) نیز در نظر گرفته شد. تلقیح باکتری در هنگام کشت صورت گرفت. بعد از گذشت ۶۰ روز گیاه برداشت شد. نتایج نشان داد که اثر متقابل کاربرد لیگاند و باکتری بر میزان سطح برگ گیاه معنی‌دار بوده به‌طوری که کاربرد لیگاند در زمان اول در تمامی تیمارهای باکتری باعث کاهش این صفت شد. همچنین اثر اصلی زمان‌های کاربرد لیگاند بر مقدار وزن خشک ریشه و اندام‌هوایی و شاخص سبزینگی معنی‌دار بوده و تیمار کاربرد لیگاند در زمان اول باعث کاهش این صفات گردید.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های محرک رشد، گیاه‌پالایی، لیگاند آلی EDTA

مقدمه

ورود فلزات سنگین به خاک که عمدتا از طریق فعالیت‌های انسانی نظیر معدنکاری، استخراج، ذوب فلزات، کاربرد کودها و آفت‌کش‌ها رخ می‌دهد (Gavrilescu, 2004)، آلودگی بسیاری از خاک‌ها را به دنبال داشته است. به‌طوری که شدت آلودگی خاک به سرعت افزایش می‌یابد (Aranfalk *et al*., 1996). گیاه‌پالایی[1] یکی از روش‌های زیست‌پالایی خاک است که در دهه‌های اخیرمورد توجه زیادی قرار گرفته است. گیاه‌پالایی به کاربرد گیاهان به تنهایی و یا به همراه میکروارگانیسم‌های خاک برای تجزیه، نگه‌داری ویا تثبیت آلاینده‌های گوناگون موجود در منطقه گفته می‌شود (خداوردی لو و همایی، ۱۳۸۶). گیاه‌پالایی به عنوان یک روش مورد قبول برای انتقال و یا غیر فعال کردن فلزات در خاک‌های آلوده توصیه می‌شد. کارایی گیاهان استفاده شده در این روش در صورت همزیستی با میکروارگانیسم‌های مفید خاکزی می‌تواند تشدید شود (Gohre and Paszkowski, ۲۰۰۶).

میکروارگانیسم‌های ریزوسفری می‌توانند در شرایط تنش، تولید زیست‌توده و تحمل گیاه به فلزات سنگین را افزایش دهند (Sheng and Xia, 2006). باکتری‌ها ممکن است رشد گیاه را بوسیله‌ی تولید سیدروفور، سنتز هورمون‌های گیاهی،تولید آنزیم‌های مختلف و حل‌کنندگی فسفات‌ها، تحریک کنند (Verma *et al*., 2001). تولید ACC-دآمیناز، آنزیمی که سطوح اتیلن را در گیاه تنظیم می‌کند ممکن است به افزایش مقاومت گیاه نسبت به سمیت عناصر سنگین کمک کند.

EDTA یکی از موثرترین کلات کننده‌هایی است که در گیاه‌پالایی استفاده می‌شود.کارایی گیاهان در این روش در صورت همزیستی با میکروارگانیسم های مفید خاکزی می تواند افزایش یابد.

[1] Phytoremediation

با وجود اینکه تحقیقات زیادی درمورد پالایش خاک‌های آلوده به عناصر سنگین توسط گیاهان مختلف و همچنین اثر باکتری‌های محرک رشد گیاه بر گیاه‌پالایی انجام پذیرفته، اطلاعات کمی درباره برهمکنش عوامل کلات‌کننده و باکتری‌های محرک رشد برخواص رویشی گیاه در خاک‌های آلوده وجود دارد. لذا، هدف از این پژوهش بررسی نقش باکتری‌های محرک رشد و زمان‌های مختلف کاربرد لیگاند آلی EDTA بر خواص رویشی گیاه ذرت در یک خاک آلوده به مس و آرسنیک بود.

مواد و روش‌ها

آزمایش گلخانه‌ای به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار اجرا شد. تیمارها شامل باکتری‌های محرک رشد گیاه در چهار سطح (بدون تلقیح و تلقیح با جدایه‌های *سودوموناس* (A2 وA5) و جدایه *استنوتروفومنس*(A22)) و تیمار لیگاند (۵/۱ میلی‌مولار لیگاند در کیلوگرم خاک) در زمان‌های (۲۰، ۳۵ و ۴۵ روز بعد ازکاشت) بود. یک نمونه خاک آلوده به عناصر سنگین تهیه شد. نمونه‌های خاک بعد از هوا خشک شدن از الک دو میلی‌متری عبور داده و سپس خاک آماده به داخل گلدان‌های یک کیلوگرمی منتقل شدند. در هر گلدان تعداد هفت عدد بذر ذرت سینگل کراس ۷۰۴ جوانه‌دارشده کشت شد. مقدار ۱۰۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی در هنگام کشت به بذرها اضافه گردید. آبیاری گلدان‌ها با ۷۰ درصد ظرفیت زراعی و به‌صورت یک روز در میان انجام گرفت. تیمار لیگاند EDTA در زمان‌های ۲۰، ۳۵ و ۴۵ روز بعد از کشت به گلدان‌های موردنظر به‌صورت محلول در آب آبیاری اضافه شد و بعد از گذشت ۶۰ روز از کاشت، گیاهان برداشت شدند. صفات رویشی مورد نظر شامل سطح برگ به‌وسیله دستگاه سنجش سطح برگ (Leaf Area Meter-C1-202, USA)، وزن خشک ریشه و اندام‌هوایی بعد از خشک شدن نمونه‌ها در آون به‌وسیله ترازو و شاخص سبزینگی برگ (SPAD) که نشان دهنده میزان کلروفیل می‌باشد با استفاده از دستگاه SPAD-502 بعد از برداشت گیاه اندازه‌گیری شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱)، نشان داد که اثر متقابل کاربرد زمان‌های مختلف لیگاند EDTA و جدایه‌های باکتری در سطح احتمال ۵ درصد بر میزان سطح برگ گیاه ذرت اثر معنی داری داشته است. با توجه به نتایج مقایسه میانگین (شکل ۱) مشاهده شد که کاربرد لیگاند EDTA در زمان اول (بیست روز بعد از کشت، T1) در تمامی تیمارهای باکتری و شاهد بیشترین کاهش را در سطح برگ گیاه ذرت داشت، که می‌توان دلیل این امر را افزایش انحلال و جذب فلزات توسط لیگاند، همچنین سن کم بوته‌ها و عدم مقاومت آنها نسبت به سمیت فلزات سنگین دانست. در سایر تیمارها به دلیل کاربرد باکتری، افزایش سن و مقاومت گیاه نسبت به سمیت فلزات، میزان کاهش سطح برگ کمتر بود. به عبارتی گیاه توانایی مقابله با تنش سمیت فلزات سنگین را با کمک صفات رشدی باکتری‌ها کسب کرده است. بیشترین میزان سطح برگ مربوط به جدایه A22 در زمان سوم کاربرد لیگاند (T3) و جدایه A5 در زمان دوم کاربرد لیگاند (T2) می‌باشد.

در اکثر مطالعات مربوط به کاربرد لیگاند EDTA، گزارش شده است که کاربرد این لیگاند منجر به کاهش رشد گیاه و در نتیجه کاهش سطح برگ گیاه می‌گردد (Suthar *et al*., 2014, Pereira *et al*., 2007). این موضوع به دلیل سمیت ناشی از حلالیت فلزات سنگین در خاک و افزایش تجمع آن در گیاه می‌باشد.

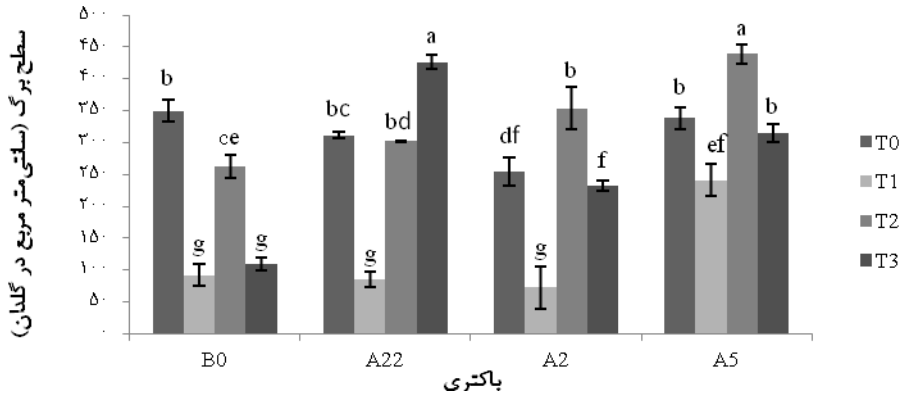
نتایج تجزیه واریانس نشان داد که فقط اثر اصلی زمان کاربرد لیگاند، بر شاخص سبزینگی برگ گیاه ذرت اثر معنی دار داشته است (جدول ۱). براساس نتایج مقایسه میانگین مشاهده شد که کاربرد لیگاند در زمان اول (بیست روز بعد از کشت)، به‌طور قابل توجهی شاخص سبزینگی گیاه را کاهش داده است. که این کاهش برابر با ۴۵ درصد نسبت به نمونه شاهد بود. همچنین کاربرد لیگاند در زمان دوم (۳۵ روز بعد از کشت) نیز باعث کاهش معنی‌دار شاخص سبزینگی نسبت به نمونه شاهد شده است (شکل ۲).

شاخص سبزینگی رابطه مستقیمی با مقدار کلروفیل برگ دارد. لیگاند EDTA با فلزات تشکیل کمپلکس داده و باعث افزایش حلالیت و جذب آن‌ها می‌شود، در نتیجه باعث سمیت عناصر سنگین در گیاه ذرت شده است. گزارش شده است فلزات

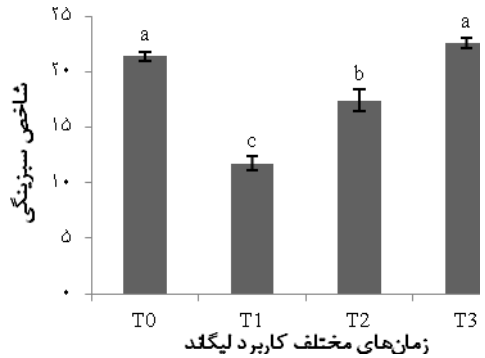
سنگین به علت جایگزینی با منیزیوم موجود در مرکز حلقه پورفینی، مقدار کلروفیل‌های برخی گیاهان را کاهش می‌دهند (Kupper *et al.*, 1996).

بر طبق نتایج حاصله از جدول تجزیه واریانس (جدول ۱)، تنها اثر اصلی کاربرد لیگاند در زمان‌های مختلف، تاثیر معنی‌داری بر وزن خشک ریشه و اندام‌هوایی داشت. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که کاربرد ۵/۱ میلی‌مولار لیگاند در زمان اول (۲۰ روز بعد از کشت، T1)، باعث کاهش ۴۸ درصدی وزن خشک ریشه نسبت به نمونه شاهد شد (شکل ۳- الف و ب). با توجه به شکل ۳ مشاهده شد که با کاربرد لیگاند در زمان‌های ۳۰ و ۴۵روز بعد از کشت گیاه وزن خشک اندام‌هوایی و ریشه گیاه نسبت به زمان کاربرد ۲۰ روز بعد از کشت گیاه به‌طور معنی‌داری بیشتر بود.

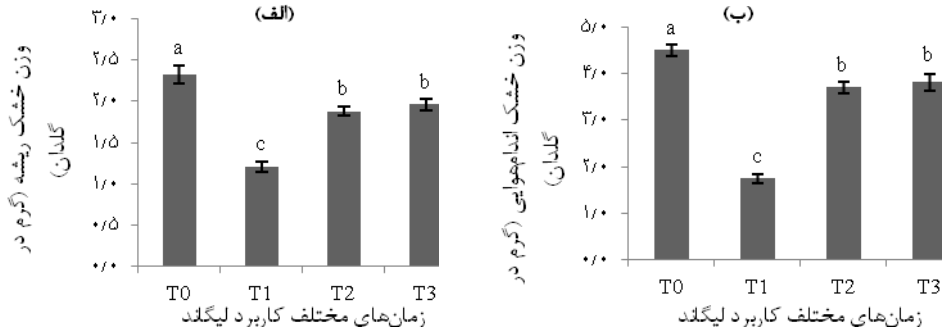
با کاربرد لیگاند در زمان‌های کمتری قبل از برداشت گیاه می‌توان از کاهش وزن گیاه جلوگیری نمود. کمترین وزن خشک اندام‌هوایی و ریشه مربوط به کاربرد ۵/۱ میلی‌مولار لیگاند در زمان اول (۲۰ روز بعد از کشت، T1) بود. این امر به دلیل افزایش غلظت فلز سنگین مس و آرسنیک بوده که در نتیجه کاربرد EDTA منجر به ایجاد مسمومیت و کاهش رشد گیاه و تولید ماده خشک کم تر شده است. محققان گزارش نمودند که مقدار وزن خشک اندام‌هوایی و ریشه گیاه ذرت با کاربرد لیگاند EDTA به دلیل سمیت لیگاند و تشکیل کمپلکس‌های محلول لیگاند- فلز، کاهش یافت (Chen and Cutrignt, 2001).



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر کاربرد زمان‌های مختلف لیگاند EDTA و جدایه‌های باکتری بر سطح برگ گیاه ذرت



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر کاربرد زمان‌های مختلف لیگاند EDTA و جدایه‌های باکتری بر شاخص سبزینگی گیاه ذرت



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر کاربرد زمان‌های مختلف لیگاند EDTA بر وزن خشک ریشه (الف) و اندام‌هوایی (ب)

(T0: عدم کاربرد لیگاند، T1، T2 و T3 به‌ترتیب کاربرد لیگاند ۲۰، ۳۵ و ۴۵ روز بعد از کشت)

میانگین‌های دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات رویشی گیاه ذرت

منابع تغییرات	درجه آزادی	SPAD	سطح برگ	وزن خشک	
				اندام‌هوایی	ریشه
باکتری	۳	۶/۸۷^{ns}	۴۱۱۹۴/۱۳۵**	۰/۲۹۰^{ns}	۰/۱۱۱^{ns}
زمان کاربرد لیگاند	۳	۴۳۰/۶۸**	۹۱۳۸۵/۸۸۹**	۸/۵۱۲**	۱/۸۹۹**
باکتری*لیگاند	۹	۴/۷^{ns}	۱۸۱۷۳/۶۵۸**	۰/۱۴۹^{ns}	۰/۰۷۶^{ns}
خطا	۳۰	۵/۰۰۲	۸۱۶/۳۳۱	۰/۲۰۳	۰/۰۶۴
ضریب تغییرات		۱۳/۸۲	۱۰/۶۶	۱۳/۱۷	۱۴/۴۵

ns، ** به ترتیب نشان دهنده عدم معنی‌داری و معنی‌داری در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن

منابع

خداوردی لو، ح. و همایی، م .۱۳۸۶. مدل‌سازی پالایش سبز خاک‌های آلوده به سرب و کادمیوم. مجله علوم وفنون و منابع طبیعی، جلد یازده، شماره ۲۴، صفحه ۴۱۷ تا ۴۲۶.

Aranfalk, P., Wasay, S. A. and Tokunga, S. 1996. A Comparatives study of Cd, Cr (III), Cr (IV), Hg and Pb uptake by minerals and soil materials. Water, Air and Soil Pollution, 87: 131-148.

Chen,H.,&Cutright, T. 2001. EDTAand HEDTAeffects on Cd, Cr and Ni uptake by Helianthus annus. Chemosphere, 45, 21–28.

Gavrilescu, M. 2004. Removal of heavy metals from the enviornment by biosorption. Engineering in Life Sciences, 3: 219-232.

Gohre V. and Paszkowski U. 200۶. Contribution of the arbuscularmycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. Planta. 22۳: ۱۱۱۵-۱۱22.

Kupper, H., Kiipper, F. and Spiller, M. 1996. Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. Journal of Experimental Botany, 47: 259-266.

Pereira, B. F. F., De Abreu, C. A., Romeiro, S., Lagoa, A. M. M. A. and Paz- Gonzalez, A. 2007. Pb-phytoextraction by *maize* in a Pb-EDTA treated oxisol. Scientia Agricola, 64: 52-60.

Sheng, X. F., Xia, J. J. 2006. Improvement of rape (*Brassica napus*) plant growth and cadmium uptake by cadmium-resistant bacteria. Chemosphere, 64: 1036–1042.

Suthar, V., Memon, K. S. and Mahmood-ul-Hassan, M. 2014. EDTA-enhanced phytoremediation of contaminated calcareous soils: heavy metal bioavailability, extractability, and uptake by maize and sesbania. Environmental Monitoring and Assessment, 186: 3957-3968.

Verma, S. C., Ladha, J. K., Tripathi, A. K. 2001. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. Journal of Biotechnology, 91: 127–141.

The effect of plant growth promoting bacteria and application time's ligand EDTA on growth characteristics of corn in a copper and arsenic contaminated soil

A. nasirzadeh[1], M. hamidpour[2], P. abbaszadeh dahaji[3], A. akhgar[2]
[1]M.Sc. student, Dept. of Soil Science, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, [2]Associate Prof., Dept. of Soil Science, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, [3]Assistant Prof., Dept. of Soil Science, Vali-e-Asr University of Rafsanjan
azarnasirzadeh21@yahoo.com

Abstract:
This study aimed to investigate the effect of plant growth promoting rhizibactrai (PGPRs) and application time of organic ligands EDTA on some vegetative characteristics of corn in a contaminated soil. A greenhouse factorial-experiment in a completely randomized design with three replications was performed. Treatments were included 3 levels of plant growth promoting bacteria (without bacteria (A0) and inoculated with a Stenotrophomonas isolate and 2 fluorescent Pseudomonads isolates (A2 and A5) and time of application of EDTA at 20, 30 and 45 days after corn planting. Results showed that interactive effects of application of bacteria and ligand EDTA on leaf area were significant.
Application of EDTA, 20 days after corn planting decreased leaf area in all un-inoculated and innocolated plants. While, in inoculated plants with Stenotrophomonas isolate (A22), application of EDTA 35 days after corn planting increased plant leaf area. Results showed that 20 days after addition of 1.5 mM EDTA per kg soil, plant biomass and greenness index were decreased.

Key word: EDTA, PGPR, Phytoremediation