اثر باکتری محرک رشد گیاه برگیاه‌پالایی یک خاک آهکی غنی شده با کادمیم به‌وسیله ذرت تحت تنش خشکی

شهرزاد کرمی ۱، جعفر یثربی ۲، و مهدی زارعی ۲
۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بخش علوم خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

۲ - استادیار بخش علوم خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

چکیده
آلودگی خاك‌های کشاورزی به فلزات سنگین از جمله کادمیم، یکی از مهمترین مسائل زیست محیطی است. روش‌های پالایش زیستی مقرون به صرفه تر بوده و خسارت کمتری را متوجه طبیعت می‌کند که لازمه آن انتخاب سویه‌ها و/یا انتخاب گیاهان مناسب با توانایی جذب بالای فلز و دارای زیتوده بالا می‌باشد. بدین منظور آزمایشی گلخانه ای بصورت فاکتوریل ۳×۴×۲ شامل دو سطح باکتری (با و بدون باکتری)، چهار سطح کادمیم (۵، ۱۰، ۲۰، و ۴۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک)، و سه سطح تنش خشکی (بدون تنش، ۸۰، و ۶۵ درصد رطوبت ظرفیت مزرعه) بود. با مایه‌زنی باکتری وزن خشک اندام هوایی ذرت افزایش اما غلظت و جذب کل کادمیم به‌وسیله اندام هوایی کاهش یافت. تنش خشکی سبب کاهش وزن خشک اندام هوایی و جذب کل کادمیم شد. افزایش سطوح کادمیم کاربردی نیز سبب کاهش وزن خشک ذرت شد اما غلظت کادمیم در خاک و جذب و غلظت آن در گیاه افزایش یافت.

واژه های کلیدی: فلزات سنگین، پالایش زیستی، ضریب زیستی انباشت، *Micrococcus yunnanensis*

مقدمه
گیاه‌پالایی یکی از روش‌های پالایش عناصر سنگین از خاک است که روشی نسبتاً آرام و با کارایی کم است و طی چهار فرآیند استخراج گیاهی، تثبیت گیاهی، تبخیر گیاهی، و تصفیه ریشه ای انجام می‌شود (خان، ۲۰۰۵). انتخاب سویه‌های مناسب و/یا انتخاب گیاهان مناسب با توانایی جذب بالای فلز و/یا دارای بیومس بالا برای بهینه سازی کارایی گیاه پالایی لازم است. برخلاف ترکیبات آلی، عناصر سنگین پایداری بیشتری داشته و تا مدت‌های طولانی در بدن جانداران یا در محیط باقی می‌مانند (کرمی و شمس الدین، ۲۰۱۰). کادمیم که به دلیل سمیت و تحرک زیاد در خاک، به عنوان یک آلوده کننده مهم در نظر گرفته می‌شود، یک عنصر غیر ضروری و سمی برای موجودات زنده به شمار می‌رود و در نتیجه بر رشد و عملکرد گیاه تأثیر منفی دارد (آلووی، ۱۹۹۵). خاک‌های آلوده عمدتاً از نظر مواد غذایی و جمعیت میکروب‌های مفید خاک فقیر می‌باشند. کاربرد باکتری‌های محرک رشد گیاه نه تنها با تأثیر بر قابلیت دسترسی عناصر و افزایش رشد گیاه، این مشکل را رفع می‌کنند، بلکه نقش عمده‌ای در سمیت زدایی و پالایش فلزات سنگین و آلاینده‌ها ایفا می‌کنند (ملک زاده و همکاران، ۲۰۱۲). ریزجانداران مقاوم در برابر فلزات سنگین، با ترشح مواد کلات کننده، اسیدی کردن محیط، حل کردن فسفات، و یا تغییرات پتانسیل رداکس، بر تحرک و زیست فراهمی فلزات سنگین اثر می‌گذارند (آیدریس و همکاران، ۲۰۰۴). این باکتری ها همچنین توانایی تولید آنزیمی به نام ۱- آمینو سیکلوپروپان ۱- کربوکسیلات دآمیناز (ACC deaminas) را دارند که سطح اتیلن را در گیاه کاهش داده و سبب افزایش مقاومت گیاه در برابر تنش‌های خشکی (آلوارز و همکاران، ۱۹۹۶) می‌شود. نتایج پژوهش‌های ملک زاده و همکاران (۲۰۱۲) نشان داد که مایه‌زنی باکتری‌های باسیلوس مایکوئیدز و میکروکوکوس روزئوس به یک خاک آلوده به کادمیم در مقایسه با نمونه‌های شاهد به صورت معنا داری زیتوده ذرت و همچنین جذب عناصر به‌وسیله اندام هوایی گیاه را افزایش داد. در نتیجه همزیستی و همکاری میکروب‌های مفید ریزوسفری با گیاهان می‌توانند توان مقاومت گیاه در برابر فلزات سنگین را افزایش داده و از این طریق سبب افزایش زیتوده گیاه و در نتیجه افزایش کارایی گیاه‌پالایی شود.

یک روش دیگر برای افزایش رشد گیاه، در اختیار داشتن آب کافی برای آبیاری است اما متاسفانه سطح گسترده‌ای از زمین‌های کشاورزی دچار تنش خشکی می‌باشند. کاهش تولید بر اثر کمبود آب برای بعضی گیاهان بسیار زیاد است. عزیزیان و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که تولید دانه و علوفه در ذرت با افزایش تنش خشکی کاهش معنا داری را از خود نشان داد. در شرایط تنش

خشکی توان گیاه‌پالایی و عملکرد ذرت و جذب کل کادمیم کاهش یافت و در رطوبت‌های بیشتر محتوای کادمیم جذب شده بیشتر و توانایی پالایش در مقادیر کمتر کادمیم در این شرایط بیشتر بود.

هدف از انجام پژوهش حاضر بررسی توانایی ذرت مایه زنی شده با باکتری محرک رشد گیاه برای پالایش عنصر کادمیم از خاک و تعیین میزان انباشت کادمیم در بخش هوایی گیاه و خاک و ضریب زیستی انباشت آن در ذرت تحت شرایط تنش خشکی است.

مواد و روش‌ها

آزمایشی گلخانه ای بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. تیمارها شامل دو سطح باکتری (با و بدون باکتری)، چهار سطح کادمیم (۵، ۱۰، ۲۰، و ۴۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک)، و سه سطح تنش خشکی (بدون تنش، ۸۰، و ۶۵ درصد رطوبت ظرفیت مزرعه) بود. به منظور جلوگیری از کمبودهای احتمالی و طبق نتایج آزمون خاک عناصر غذایی نیتروژن از منبع اوره (۱۵۰ میلی گرم در کیلوگرم خاک)، فسفر از منبع منو کلسیم فسفات (۲۰ میلی گرم در کیلوگرم خاک)، آهن از منبع سکسترین آهن (۵ میلی گرم در کیلوگرم خاک)، روی، مس، و منگنز از منبع سولفاتی (به ترتیب ۱۰، ۵/۲، و ۱۰ میلی گرم در کیلوگرم خاک) به صورت محلول به خاک گلدان ها (۳ کیلوگرمی) افزوده و سپس تیمارهای کادمیم از منبع سولفات کادمیم به آن‌ها اعمال شد. از بذرهای ذرت رقم HIDO و باکتری *Micrococcus yunnanensis* (باکتری گرم مثبت و دارای توانایی تولید سیدروفور و ویژگی حل کنندگی فسفات) استفاده گردید. مقدار ۲ میلی لیتر از محیط کشت حاوی 1×10^{8} CFU mL^{-1} باکتری به ازای هر بذر مایه‌زنی و بذرها با لایه‌ای از خاک پوشانده شد. پس از سپری شدن دو هفته و جوانه زدن و استقرار، تعداد گیاهان به سه عدد در هر گلدان تقلیل داده شد. پس از دو هفته تنش خشکی اعمال شد. بعد از ۸ هفته گیاهان از طوقه جدا شده و وزن آن‌ها پس از خشک کردن در آون با دمای ۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت، اندازه‌گیری شد. خاک گلدان‌ها نرم و از الک ۲ میلی‌متری عبور داده و ریشه‌های آن جدا شد. برای اندازه‌گیری غلظت عناصر در اندام هوایی، از روش خشک سوزانی استفاده و کادمیم خاک با DTPA (لیندزی و نورول، ۱۹۷۸) عصاره گیری و کادمیم آن‌ها بوسیله دستگاه جذب اتمی اندازه‌گیری شد. مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون دانکن و با کمک نرم افزار آماری SAS انجام شد.

برای اینکه گیاه‌پالایی مؤثر واقع شود، گیاهان باید علاوه بر زیتوده زیاد، دارای ظرفیت زیادی برای تجمع فلز در خود باشند. کارایی گیاه پالایی با ضریب زیستی انباشت (BCF) مشخص می‌شود (مارچایل و همکاران، ۲۰۰۴) که از رابطه زیر محاسبه می‌شود (معادله ۱).

$$\text{فاکتور زیستی غلظت کادمیم} = \frac{\text{غلظت کادمیم در اندام هوایی گیاه}}{\text{غلظت کادمیم در خاک}} \qquad (۱)$$

نتایج و بحث

مایه‌زنی باکتری سبب افزایش ۷/۸ درصدی وزن خشک اندام هوایی ذرت شد. مایه‌زنی باکتری تنها در سطوح ۵ و ۱۰ میلی‌گرم کادمیم در کیلوگرم خاک سبب افزایش معنا دار وزن خشک شد اما بین تیمارهای با و بدون باکتری در سایر سطوح تفاوت معنا داری وجود نداشت (جدول ۱). با افزایش سطح تنش خشکی کاهش معنا داری در میزان وزن خشک کلیه تیمارها مشاهده شد. طی تنش خشکی، تعداد روزنه‌ها و در نتیجه سنتز ماده خشک کاهش می‌یابد (عزیزیان و همکاران، ۲۰۱۱).

جدول ۱ - اثر مایه زنی باکتری، سطوح کادمیم و رطوبت خاک بر برخی از ویژگی های اندازه گیری شده

PGPR	سطوح کادمیم ($mg.kg^{-1}$)				رطوبت خاک			میانگین اثر باکتری
	۵	۱۰	۲۰	۴۰	FC	۸/۰ FC	۶۵/۰ FC	
	وزن خشک اندام هوایی ذرت ($g\ pot^{-1}$)							
B.*	۸۲/۸ BC**	۷۳/۸ CD	۹۶/۷ CD	۸۶/۷ D	۸/۱۲ B	۲۰/۸ D	۹۸/۳ E	۳۴/۸ B
B۱	۱۶/۱۰ A	۵۸/۹ AB	۵۹/۸ CD	۲۱/۸ CD	۹/۱۳ A	۵۸/۹ C	۹۱/۳ E	۱۴/۹ A
	غلظت کادمیم در اندام هوایی ذرت ($g\ g^{-1}$)							
B.	۹۷/۵ CD	۷۴/۶ C	۱/۱۱ A	۳/۱۱ A	۰۶/۷ B	۳۲/۹ A	۹۹/۹ A	۷۹/۸ A
B۱	۵۹/۴ D	۰۳/۵ D	۳۰/۵ D	۹۴/۸ B	۷۷/۶ BC	۴۳/۵ D	۶۹/۵ CD	۹۷/۵ B
	جذب کل کادمیم توسط ذرت ($g\ pot^{-1}$)							
B.	۹/۴۷ C	۵/۵۵ BC	۹/۸۱ A	۰/۸۵ A	۷/۸۸ A	۶/۷۴ B	۳/۳۹ D	۶/۶۷ A
B۱	۴/۵۶ BC	۲/۵۵ BC	۱/۴۴ C	۵/۶۶ B	۶/۹۵ A	۳/۵۰ C	۷/۲۰ E	۵/۵۵ B
	غلظت کادمیم قابل استخراج با DTPA در خاک($g\ g^{-1}$)							
B.	۸۱/۱ E	۵۹/۳ D	۸۲/۷ B	۰/۱۴ A	۹۰/۶ A	۹۰/۶ A	۶۵/۶ AB	۸۲/۶ A
B۱	۶۷/۱ E	۳۵/۳ D	۴۳/۶ C	۸/۱۳ A	۹۸/۵ B	۱۹/۶ AB	۷۹/۶ A	۳۲/۶ B
	ضریب زیستی انباشت (BCF) کادمیم در ذرت							

B.	۳۵/۳ A						
B_1	۷۵/۲ B	۵۱/۱ D	۸۲/۰ E	۶۴/۰ E	۰۰/۲ A	۲۱/۱ C	۰۸/۱ C	۴۳/۱ B
		۸۹/۱ C	۴۳/۱ D	۸۲/۰ E	۶۱/۱ B	۹۴/۱ AB	۰۷/۲ A	۸۷/۱ A

نشان دهنده رطوبت FC تیمار مایه زنی شده با باکتری می باشد و Bنشان دهنده تیمار بدون مایه زنی باکتری محرک رشد گیاه و B_1 . * .ظرفیت مزرعه است

با افزایش سطوح کادمیم کاربردی غلظت کادمیم در گیاه نیز افزایش یافت. با مایه‌زنی باکتری، کاهش معنا داری (۱/۳۲ درصد) در غلظت کادمیم گیاه در کلیه تیمارها (از مقدار ۷۹/۸ به مقدار ۹۷/۵ میکروگرم در هر گرم اندام هوایی ذرت) مشاهده شد. مقایسه تیمارهای با و بدون باکتری با یکدیگر نشان می‌دهد که مایه‌زنی باکتری در تنش های ۸۰ و ۶۵ درصد رطوبت ظرفیت مزرعه سبب کاهش غلظت کادمیم در اندام هوایی گیاه شده که بهتر است با توجه به جذب گیاه تفسیر شود زیرا وزن خشک اندام هوایی گیاه در این حالات کاهش قابل ملاحظه‌ای داشته است (جدول ۱).

در مقایسه تیمارهای مایه‌زنی شده و بدون مایه‌زنی باکتری، در سطوح ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک، تفاوت معنا داری در جذب کل کادمیم به‌وسیله اندام هوایی گیاه مشاهده نشد و مایه‌زنی تنها در سطوح بالای کادمیم یعنی در سطوح ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم کادمیم در کیلوگرم خاک مؤثر بوده است و موجب کاهش جذب کل کادمیم نسبت به شرایط بدون مایه‌زنی باکتری شده است. به نظر می‌رسد که باکتری در سطوح پایین کادمیم در «استخراج گیاهی» و در سطوح بالای کادمیم در «تثبیت گیاهی» نقش داشته است که هر دو از سازوکارهای پالایش گیاهی هستند. کاربرد باکتری در رطوبت های بیشتر، پاسخ بهتری داده است و با افزایش تنش خشکی کارایی باکتری نیز کم شده است. به طور کلی مایه‌زنی باکتری سبب کاهش ۸/۱۷ درصدی جذب کل کادمیم (از ۶/۶۷ به ۵/۵۵ میکروگرم در گلدان) شد (جدول ۱).

با افزایش سطوح کادمیم کاربردی در هر دو حالت با و بدون باکتری افزایش معنا داری در مقدار کادمیم خاک مشاهده شد و با افزایش تنش خشکی مقدار کادمیم باقی مانده در خاک با توجه به کاهش رشد گیاه افزایش یافت. کاربرد باکتری سبب کاهش ۳/۷ درصدی کادمیم خاک شد (جدول ۱).

با افزایش کادمیم در شرایط بدون مایه‌زنی باکتری، کاهش معنا داری در ضریب زیستی انباشت نسبت به سطح شاهد مشاهده شد. در شرایط آزمایش و با وجود تنش‌های کادمیم و خشکی، تیمارهای مایه‌زنی شده (۴۳/۱) کاهش ۵/۲۳ درصدی در مقدار ضریب زیستی انباشت، نسبت به شرایط بدون مایه‌زنی (۸۷/۱) از خود نشان دادند و باکتری مانع انباشت کادمیم در اندام هوایی گیاه شده است. مقدار ضریب زیستی انباشت در تیمارهای بدون مایه‌زنی باکتری تا سطح ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم کادمیم و در تیمارهای مایه‌زنی شده با باکتری تا سطح ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم کادمیم از عدد یک بالاتر بوده است (جدول ۱). با افزایش سطوح کادمیم کاربردی ضریب زیستی انباشت کاهش پیدا کرده و به نظر می‌رسد گیاه ذرت مانع انتقال کادمیم به اندام هوایی خود شده است که یکی از دلایل آن می‌تواند تثبیت گیاهی کادمیم باشد که به‌وسیله ریشه گیاه یا باکتری‌های همزیست با آن‌ها، قابلیت دسترسی آلاینده‌ها را کم یا متوقف می‌کند. از دلایل دیگر آن می‌تواند جذب کادمیم در دیواره سلولی از طریق ترسیب خارج سلولی یا برهمکنش‌های الکترواستاتیک و ایجاد پیوندهای کووالانسی و واندروالس با فلز کادمیم و برهمکنش‌های رداکس یا ترکیبی از این فرآیندها (گاوریلسکو، ۲۰۰۴) به‌وسیله باکتری مورد مطالعه باشد.

نتایج تجزیه واریانس اثر باکتری، تنش خشکی و کادمیم بر ویژگی‌های مختلف در جدول ۲ آورده شده است. اثرات اصلی هر یک از فاکتورها و اثر دوتایی باکتری و تنش خشکی بر وزن خشک ذرت معنادار بود اما اثر سه گانه باکتری، کادمیم و تنش خشکی بر وزن خشک ذرت معنا دار نبود. اثرات سه گانه باکتری، کادمیم و تنش خشکی بر غلظت و جذب کل کادمیم توسط اندام هوایی گیاه، غلظت کادمیم در خاک و ضریب زیستی انباشت کادمیم در سطح یک درصد معنا دار بود.

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر باکتری، تنش خشکی و کادمیم بر ویژگی های مختلف اندازه گیری شده

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		وزن خشک	غلظت کادمیم در اندام هوایی گیاه	جذب کادمیم توسط گیاه	غلظت کادمیم در خاک	ضریب زیستی انباشت
باکتری	۱	۳۳/۱۱**	۲۳/۱۴۳**	۲۴/۲۵۹۸**	۴۱/۴*	۵۲/۳**
کادمیم	۳	۶۶/۸**	۱۳/۸۹**	۱۱/۱۹۸۰**	۴۱/۵۲۵**	۴۶/۱۸**
تنش خشکی	۲	۷۹/۵۳۳**	۱۱/۵ ns	۲۳۱۷۸**	۴۶/۰ ns	۴۲/۰ ns
باکتری × کادمیم	۳	۷۸/۰ ns	۷۳/۱۸**	۸۶/۱۸۹۳**	۶۱/۱ ns	۱۸/۰ ns
باکتری × تنش خشکی	۲	۵۳/۳*	۲۳/۲۹**	۰۹/۱۶۵۰**	۹۱/۱ ns	۲/۳**
کادمیم × تنش خشکی	۶	۷۷/۰ ns	۵۷/۱۵**	۴۱/۱۱۸۶**	۶۲/۰ ns	۸۳/۰ **
باکتری × کادمیم × تنش خشکی	۶	۲۵/۰ ns	۰۳/۱۰**	۶۰/۱۳۴۶**	۷۰/۶ **	۰۱/۱ **
خطا	۴۸	۷۲/۰	۲	۵۷/۱۷۳	۷۳/۰	۱۶/۰
کل	۷۱	...	...	...	...	...

همانطور که شرح داده شد کاربرد باکتری سبب کاهش ۸/۱۷ درصدی جذب کل کادمیم به‌وسیله اندام هوایی ذرت و همچنین کاهش ۳/۷ درصدی کادمیم خاک شده است که نشان می‌دهد باکتری کادمیم را یا در اندام‌های خود و یا در ریشه گیاه تجمع داده و یا اینکه باکتری سبب شده که کادمیم خاک در شکل های شیمیایی با قابلیت جذب کمتر قرار گیرد زیرا تغییر در شکل شیمیایی ممکن است بر جذب گیاهی و کاهش یا افزایش سمیت فلز تأثیر بگذارد (خان، ۲۰۰۵). مایه زنی باکتری مورد مطالعه در سطوح بالای آلودگی نمی‌تواند روش چندان مؤثری برای کاهش آلودگی خاک باشد زیرا با تجزیه و پوسیده شدن ریشه ها در خاک، کادمیم استخراج شده مجدداً به خاک برمی‌گردد اما می‌تواند روش خوبی برای کاهش آلودگی محصول باشد.

منابع

Alloway B.J. ۱۹۹۵. Cadmium. In: Heavy Metal in Soils. B.J. Alloway (ed.) ۲nd ed. Blackie Academic and Professional, London. Pp: ۱۲۲-۱۵۱.

Alvarez M.I., Sueldo R.J. and Barassi C.A. ۱۹۹۶. Effect of Azospirillum on coleoptile growth in wheat seedlings under water stress. Cereal Research Communications. ۲۴: ۱۰۱-۱۰۷.

Azizian A., Amin S., Noshadi M., Maftoun M. and Emam Y. ۲۰۱۱. Phytoremediation potential of corn and oat for increased levels of soil cadmium under different irrigation intervals. Iran Agricultural Research. ۳۰: ۴۷-۶۰.

Gavrilescu M. ۲۰۰۴. Removal of heavy metals from the environment by biosorption. Engineering in Life Sciences. ۴(۳): ۲۱۹-۲۳۲.

Idris R., Trifonova R., Puschenreiter M., Wenzel W.W. and Sessitsch A. ۲۰۰۴. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator Thlaspi goesingense. Applied and Environmental Microbiology. ۷۰: ۲۶۶۷-۲۶۷۷.

Karami A. and Shamsuddin Z.H. ۲۰۱۰. Phytoremediation of heavy metals with several efficiency enhancer methods. African Journal of Biotechnology. ۹: ۳۶۸۹-۳۶۹۸.

Khan A.G. ۲۰۰۵. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. ۱۸: ۳۵۵-۳۶۴.

Lindsay W.L., and Norvell W.A. ۱۹۷۸. Development of a DTPA test for zinc, iron, manganese and copper. Soil Science Society of America Journal. ۴۲: ۴۲۱-۴۲۸.

Malekzadeh E., Alikhani H.A., Savaghebi Firoozabadi G.R. and Zarei M. ۲۰۱۲. Bioremediation of cadmium-contaminated soil through cultivation of maize inoculated with plant growth-promoting rhizobacteria. Bioremediation Journal. ۱۶(۴): ۲۰۴-۲۱۱.

Marchiol L., Sacco P., Assolari S. and Zebri G. ۲۰۰۴. Reclamation of polluted soil: phytoremediation potential of crop-related Brassica species. Water, Air, and Soil Pollution. ۱۵۸: ۳۴۵-۳۵۶.

Abstract

Contamination of agricultural soils with heavy metals such as cadmium (Cd) is one of the most important environmental issues. Bio-remediation methods are more economical and cause less damage to the nature. So it is necessary to choose strains and/or appropriate plants with the ability to uptake toxic metal and has high biomass. A greenhouse experiment was conducted with a ۲×۴×۳ factorial arranged design with three replications. Treatments consisted of two levels of bacteria (with and without inoculation), four levels of Cd (۵, ۱۰, ۲۰, and ۴۰ mg kg^{-1}), and three levels of drought stress (without stress, ۸۰, and ۶۵% of field capacity). Inoculation of bacteria increased dry weight of corn shoots but Cd uptake and its concentration reduced in aerial parts. Drought stress caused a reduction in shoot dry weight and total uptake of Cd. Increasing Cd levels caused a reduction in corn dry weight, but increased Cd concentration in the soil and its concentration and uptake by the plant.