پانزدهمین کنگره علوم خاک ایران
۶ تا ۸ شهریور ۱۳۹۶ محور مقاله: بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک

ارزیابی شاخص تنوع آنزیمی شانون پس از گیاه‌پالایی یک خاک آلوده به سرب

سیدسجاد حسینی[۱]، امیر لکزیان[۲]، اکرم حلاج‌نیا[۳]
[۱]دانشجو کارشناسی ارشد،[۲] استاد و [۳] استادیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده

ویژگی‌های زیستی خاک به عنوان شاخص‌های زیست محیطی مرتبط با کیفیت خاک برای ارزیابی کارایی فرآیندهای گیاه‌پالایی فلزات سنگین پیشنهاد شده‌اند. در این پژوهش شاخص تنوع آنزیمی شانون به منظور ارزیابی کیفیت خاک و همچنین موفقیت فرآیند استخراج گیاهی القایی با EDTA و اسیدسیتریک (CA) مورد بررسی قرار گرفت. تیمارهای آزمایشی شامل تیمار شاهد (بدون آلودگی به سرب و بدون عامل کلات کننده)، تیمار بدون عامل کلات کننده، EDTA3، EDTA5 (۳ و ۵ میلی‌مول EDTA در هر کیلوگرم خاک خشک)، CA3 و CA5 (۳ و ۵ میلی‌مول اسیدسیتریک (CA) در هر کیلوگرم خاک خشک) بودند. نتایج نشان داد که در خاک تحت کشت هر دو گیاه خردل هندی و آفتاب گردان کمترین مقدار شاخص تنوع آنزیمی شانون مربوط به تیمارهای بدون کلات و EDTA5 بود. همچنین نتایج نشان داد در خاک تحت کشت آفتاب گردان تیمارهای EDTA3، CA3 و CA5 و در خاک تحت کشت خردل هندی نیز تیمارهای CA5 و EDTA3 موجب افزایش معنی دار مقدار شاخص تنوع آنزیمی شانون نسبت به تیمار شاهد شدند.

واژه های کلیدی: استخراج گیاهی، سرب، عامل کلات کننده، فعالیت آنزیم

مقدمه

هدف نهایی از هرگونه فرآیند گیاه‌پالایی خاک تنها حذف فلزات سنگین از خاک (یا به جای آن کاهش فراهمی زیستی و تحرک فلزات سنگین) نیست بلکه بازگرداندن کیفیت خاک، به عنوان امری مهم‌تر، هم باید مورد توجه قرار گیرد (Epelde et al., 2009). کیفیت خاک/ سلامت خاک را "ظرفیت خاک برای انجام نقش‌های خود" یا "مطلوبیت عملکرد خاک برای یک هدف یا استفاده خاص" تعریف می‌کنند (Karlen et al., 2003). بنابراین مجموعه‌ای از شاخص‌های زیست محیطی مرتبط با کیفیت خاک که دربرگیرنده ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی خاک باشد برای ارزیابی کارایی فرآیندهای گیاه‌پالایی فلزات سنگین مورد نیاز است. بدون شک اطلاعات شیمیایی به تنهایی برای ارزیابی صحیح اثر آلاینده‌ها بر اکوسیستم خاک کافی نیستند زیرا آنها اثر آلاینده‌ها را بر موجودات زنده یا اثر متقابل میان آلاینده‌ها، ماتریکس خاک و موجودات زنده را در نظر نمی‌گیرند (Leitgib et al., 2007).

در سال‌های گذشته ویژگی‌های میکروبی خاک به طور فزاینده‌ای به عنوان شاخص‌های زیستی کیفیت خاک مورد استفاده قرار گرفته‌اند. زیرا شاخص‌های زیستی نسبت به تغییرات زیست محیطی حساسیت زیاد دارند و پاسخ سریع می‌دهند و علاوه بر این اطلاعاتی که همبستگی بالایی با فاکتورهای محیطی دارند ارائه می‌دهند (Mijangos et al., 2010). همچنین شاخص‌های زیستی رابطه ویژه‌ای با سلامت انسان دارند زیرا آنها اثر تغییرات زیست محیطی را بر عناصر اصلی زنجیره غذایی مورد بررسی قرار می‌دهند (Pandolfini et al., 1997).

به دلیل طبیعت غیریکنواخت و پویایی اکوسیستم خاک و همچنین تنوع گسترده‌ی مشکلات خاص و توجه روز افزون به مشکل خاک‌های آلوده و پاکسازی آنها، توصیه مجموعه‌ای از بهترین شاخص‌های معتبر برای همه موارد و شرایط بسیار دشوار است. در هر صورت ضروری است تاکید شود که ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی همواره باید در یک ارزیابی مناسب از کیفیت خاک لحاظ شوند. پس از آن در مورد ویژگی‌های زیستی بهتر است که همواره از اندازه‌گیری‌هایی که اطلاعاتی در مورد زیست توده، فعالیت و تنوع جمعیت میکروبی خاک فراهم می‌کنند استفاده شود (Gómez-Sagasti et al., 2012).

فعالیت آنزیم‌های خاک به عنوان شاخص‌های بیوشیمیایی معتبر برای بررسی اثر سوء فلزات سنگین بر محیط زیست خاک (Hinojosa et al., 2008) و همچنین پایش بازگرداندن کیفیت خاک بعد از فرآیندهای پاکسازی مختلف (Ciarkowska et al., 2014) در پژوهش‌های بسیاری مورد استفاده قرار گرفته‌اند. زیرا فعالیت آنزیم‌های خاک پاسخ سریع به درهم آمیختگی و یا تنش‌های موجود در خاک مثل آلودگی فلزات سنگین می‌دهند و همچنین اندازه‌گیری ساده و کم هزینه‌ای دارند (Dick et al., 1996). Naseby and Lynch (2002) بیان کردند که اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های خاک ابزاری مناسب برای ارزیابی وضعیت و شرایط محیط‌زیست خاک است. زیرا آنزیم‌های خاک (۱) فرآیندهای چرخه عناصر غذایی در خاک را کنترل می‌کنند، (۲) نقش مهمی در فراهمی عناصر غذایی برای ریزجانداران خاک و گیاهان دارند و (۳) شاخص‌های مناسبی برای ارزیابی تنوع عملکردی خاک هستند (Naseby and Lynch, 2002). Bending et al. (2004) با استفاده از فعالیت آنزیم‌های خاک تنوع عملکردی خاک را تحت عنوان شاخص تنوع آنزیمی شانون مورد اندازه‌گیری قرار دادند. آنها بیان داشتند که شاخص تنوع آنزیمی شانون به دست آمده از این روش نشان دهنده‌ی یکنواختی یا توزیع فعالیت آنزیمی خاک است. اخیرا شاخص تنوع آنزیمی شانون در چندین پژوهش به منظور ارزیابی اثرات آبیاری با پساب بر محیط‌زیست خاک و کارایی روش‌های پاکسازی مورد استفاده قرار گرفته است (Epelde et al., 2008; Heinze et al., 2014).

هدف از پژوهش حاضر بررسی شاخص تنوع آنزیمی شانون در یک خاک آلوده به سرب پس از پاکسازی به روش استخراج گیاهی القایی با EDTA و اسیدسیتریک (CA) بود.

مواد و روش‌ها

برای آلوده کردن خاک به سرب (۵۰۰ میلی‌گرم سرب در هر کیلوگرم خاک خشک) ابتدا مقادیر مناسب از نمک کلرید سرب ($PbCl_2$) محاسبه و به صورت جامد به خاک افزوده شد. برای اینکه خاک آلوده شده به تعادل برسد، به وسیله آب مقطر تا ۷۰ ٪ ظرفیت مزرعه مرطوب و برای یک ماه در این حد رطوبتی ثابت نگه داشته شد. پس از یک ماه خاک‌ها هوا خشک و کاملاً کوبیده و برای ریختن در گلدان آماده شدند. تیمارهای آزمایشی شامل تیمار شاهد (بدون آلودگی به سرب و بدون عامل کلات کننده)، تیمار بدون عامل کلات کننده، EDTA3 و EDTA5 (۳ و ۵ میلی‌مول EDTA در هر کیلوگرم خاک خشک)، CA3 و CA5 (۳ و ۵ میلی‌مول اسیدسیتریک (CA) در هر کیلوگرم خاک خشک) بودند. گیاهان مورد استفاده نیز شامل دو گیاه خردل هندی (*Brassica juncea*) و آفتاب‌گردان (*Helianthus annus*) بود. گلدان‌ها با ۳/۸ کیلوگرم خاک پر شد و بذر گیاه خردل هندی و آفتاب‌گردان به تعداد ۸ عدد درگلدان‌ها کاشته شد. پس از ظهور گیاهچه‌ها تعداد آنها در هر گلدان به ۳ عدد کاهش یافت. یک هفته قبل از برداشت گیاه، تیمارهای مورد نظر شامل بدون عامل کلات کننده یا سطح صفر (آب مقطر)، EDTA3، EDTA5، CA3، CA5 به صورت محلول در یک حجم مشخص به گلدان‌ها اعمال شدند.

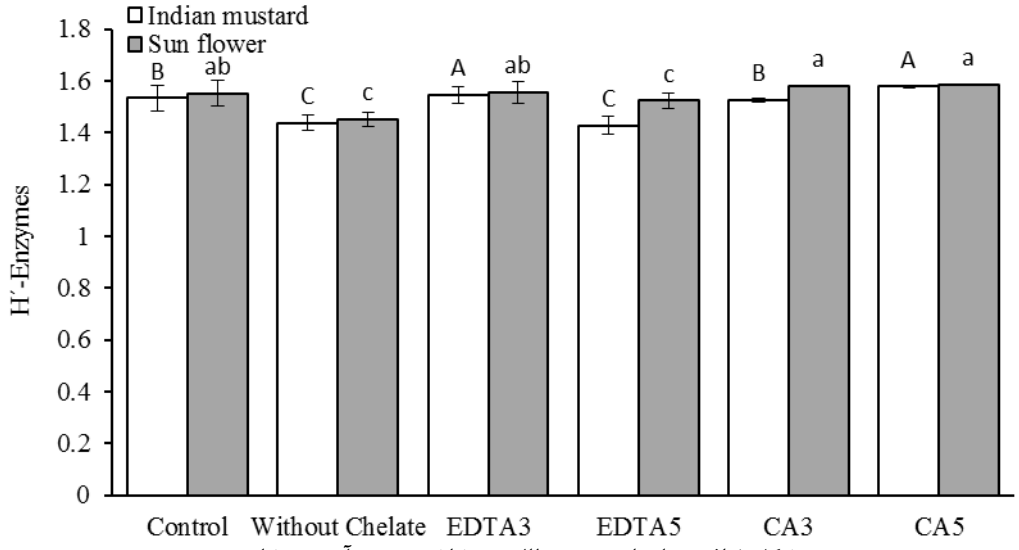
پس از برداشت اندام هوایی و قبل از برداشت ریشه گیاهان نمونه‌گیری از خاک نیز انجام شد. فعالیت آنزیم دهیدروژناز خاک با استفاده از بستره تری‌فنیل‌تترازولیوم کلرید (TTC) ۰/۶ درصد به روش اصلاح شده Thalmann (1966) تعیین شد. همچنین فعالیت آنزیم اوره‌آز خاک با استفاده از بستره اوره ۰/۲ مولار به روش Tabatabai and Bremner (1972) و فعالیت آنزیم فسفومونواستراز قلیایی خاک با استفاده از بستره پارانیتروفنیل فسفات ۰/۱۱۵ مولار به روش Tabatabai and Bremner (1969) تعیین شدند. برای محاسبه شاخص تنوع آنزیمی شانون از فرمول زیر استفاده شد (Tscherko et al., 2003):

$$H' = -\sum_{i=1}^{n} p_i \, log p_i$$

که در این معادله *pi* نسبت فعالیت یک آنزیم خاص به مجموع فعالیت همه آنزیم‌های اندازه‌گیری شده، *n* نشان دهنده تعداد فعالیت آنزیمی اندازه‌گیری شده و H' شاخص تنوع آنزیمی شانون است. با توجه به اینکه بزرگی مقادیر به دست آمده برای فعالیت‌های آنزیمی مختلف بسته به روشی که آنها تعیین می‌شوند به طور قابل توجهی متفاوت است در نتیجه برخی از فعالیت‌های آنزیمی با وزن بیشتری از دیگران در محاسبه شاخص تنوع آنزیمی شانون وارد می‌شوند. برای حل این مشکل با استفاده از روش‌های نمره‌دهی خطی مقادیر فعالیت آنزیم‌ها به مقادیر بدون بُعد بین صفر و یک تبدیل شدند و برای محاسبه شاخص تنوع آنزیمی شانون از این نمرات استفاده شد.

نتایج و بحث

شکل ۱ نشان دهنده شاخص تنوع آنزیمی شانون در تیمارهای مورد بررسی است. در ابتدا مهم است که تاکید شود، شاخص شانون به عنوان میانگینی از تنوع معمولاً برای برآورد تنوع جمعیت در یک اکوسیستم استفاده می‌شود (Heinze et al., 2014) و بیان کننده غنا و یکنواختی گونه‌ها است (Rodrıguez-Loinaz et al. 2008). Tscherko et al (2003) از این شاخص برای اندازه‌گیری تنوع عملکردی فعالیت‌های آنزیمی خاک در یخچال‌های طبیعی در مراحل مختلف جانشینی اکولوژیکی استفاده کردند. بنابراین در این پژوهش مقدار شاخص تنوع شانون تنها نشان دهنده تنوع (یکنواختی) فعالیت آنزیمی خاک است. همانطور که مشاهده می‌شود در تمام تیمارها مقدار شاخص تنوع آنزیمی شانون در خاک کشت شده با آفتاب‌گردان بیشتر از خاک کشت شده با خردل هندی بود. این موضوع احتمالاً به دلیل رشد و توسعه بیشتر ریشه گیاه آفتاب‌گردان نسبت به خردل هندی باشد که موجب افزایش سطوح کلونیزاسیون و ترشحات ریشه برای ریزجانداران خاک شده است.



شکل ۱. اثر تیمارهای مورد مطالعه بر شاخص تنوع آنزیمی شانون

ستون‌ها با حروف غیر مشابه دارای تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد هستند

به طور کلی نتایج نشان داد در خاک تحت کشت هر دو گیاه کمترین مقدار شاخص تنوع آنزیمی شانون مربوط به تیمارهای بدون کلات و EDTA5 بود. به عبارت دیگر آلودگی خاک به سرب و کاربرد EDTA در سطح ۵ میلی‌مول در کیلوگرم خاک موجب کاهش معنی‌دار شاخص تنوع آنزیمی شانون نسبت به تیمار شاهد (بدون آلودگی به سرب و بدون کلات) شد. همچنین نتایج نشان داد در خاک تحت کشت آفتاب گردان مقدار شاخص تنوع آنزیمی شانون در تیمارهای شاهد، EDTA3، CA3 و CA5 بیشترین مقدار بود و از لحاظ آماری تیمارهای مذکور تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند. در خاک تحت کشت خردل هندی نیز تیمارهای CA5 و EDTA3 موجب افزایش معنی‌دار مقدار شاخص تنوع آنزیمی شانون نسبت به تیمار شاهد شدند. این نتایج نشان می‌دهد که کاربرد CA در هر دو سطح و کاربرد EDTA در سطح ۳ میلی‌مول در کیلوگرم می‌تواند اثر منفی سرب بر تنوع فعالیت آنزیمی خاک را خنثی کند. Vigliotta et al (2016) نشان دادند که آلودگی خاک به فلزات سنگین تنوع زیستی باکتری‌ها و شاخص تنوع شانون را کاهش داد. همچنین آنها بیان کردند که کاربرد EDDS و به ویژه EDTA توانست اثر منفی آلودگی به فلزات سنگین بر شاخص تنوع شانون و تنوع زیستی باکتری‌ها را به طور قابل توجهی خنثی کند. افزایش شاخص تنوع شانون در اثر کاربرد عوامل کلات کننده احتمالاً به دلیل آزادسازی ترشحات ریشه و فاکتورهای رشد مورد نیاز باکتری‌ها باشد (Vigliotta et al. 2016). اگرچه EDTA در غلظت ۵ میلی‌مول در کیلوگرم برای ریزجانداران خاک سمی بود، احتمالاً کمپلکس شدن سرب با EDTA در غلظت‌های پایین (۳ میلی‌مول در کیلوگرم) از سمیت سرب و EDTA برای ریزجاندارن خاک کاسته است. به طورکلی می‌توان نتیجه گرفت از نظر اثرات جانبی زیست محیطی در خاک مورد مطالعه

استفاده از روش استخراج گیاهی القا شده با CA در هر دو سطح و EDTA در سطح ۳ میلی‌مول در کیلوگرم روش‌های مناسبی هستند.

منابع

Bending G.D., Turner M.K., Rayns F., Marx M.C. Wood M. 2004. Microbial and biochemical soil quality indicators and their potential for differentiating areas under contrasting agricultural management regimes. Soil Biology and Biochemistry, 36: 1785–1792.

Ciarkowska K., Sołek-Podwika K. and Wieczorek J. 2014. Enzyme activity as an indicator of soil-rehabilitation processes at a zinc and lead ore mining and processing area. Journal of Environment Management, 132: 250-256.

Dick R.P., Breakwell D.P., Turco R.F., Doran J.W. and Jones A.J. 1996. Soil enzyme activities and biodiversity measurements as integrative microbiological indicators. In: Doran J.W. and Jones A.J. (Ed.), Methods for assessing soil quality. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, 247-271.

Epelde L., Becerril J. M., Hernández-Allica J., Barrutia O., and Garbisu C. 2008. Functional diversity as indicator of the recovery of soil health derived from Thlaspi caerulescens growth and metal phytoextraction. Applied Soil Ecology, 39(3): 299-310.

Epelde L., Mijangos I., Becerril J.M. and Garbisu C. 2009. Soil microbial community as bioindicator of the recovery of soil functioning derived from metal phytoextraction with sorghum. Soil Biology and Biochemistry, 41(9): 1788-1794.

Gómez-Sagasti M.T., Alkorta I., Becerril J.M., Epelde L., Anza M. and Garbisu C. 2012. Microbial monitoring of the recovery of soil quality during heavy metal phytoremediation. Water, Air, & Soil Pollution, 223(6): 3249-3262.

Heinze S., Chen Y., El-Nahhal Y., Hadar Y., Jung R., Safi J., and Marschner B. 2014. Small scale stratification of microbial activity parameters in Mediterranean soils under freshwater and treated wastewater irrigation. Soil Biology and Biochemistry, 70: 193-204.

Hinojosa M.B., Carreira J.A., Rodríguez-Maroto J.M. and García-Ruíz R. 2008. Effects of pyrite sludge pollution on soil enzyme activities: ecological dose–response model. Science Total Environment, 396: 2. 89-99.

Karlen D.L., Ditzler C.A. and Andrews S.S. 2003. Soil quality: why and how?. Geoderma, 114(3): 145-156.

Leitgib L., Kálmán J. and Gruiz K. 2007. Comparison of bioassays by testing whole soil and their water extract from contaminated sites. Chemosphere, 66(3): 428-434.

Mijangos I., Albizu I., Epelde L., Amezaga I., Mendarte S. and Garbisu C. 2010. Effects of liming on soil properties and plant performance of temperate mountainous grasslands. Journal of Environmental Management, 91(10): 2066-2074.

Naseby D.C., Lynch J.M. 2002. Enzymes and microorganisms in the rhizosphere. In: Burns R.G., Dick R.P. (Eds.), Enzymes in the Environment. Marcel Dekker, New York, USA, 109–123.

Pandolfini T., Gremigni P. and Gabbrielli R. 1997. Biomonitoring of soil health by plants. In: Pankhurst C., Doube B.M. and Gupta V.V.S.R. (Ed.), Biological indicators of soil health. CAB International, New York, 325-347.

Rodriguez-Loinaz G., Onaindia M., Amezaga I., Mijangos I., and Garbisu C. 2008. Relationship between vegetation diversity and soil functional diversity in native mixed-oak forests. Soil Biology and Biochemistry, 40(1): 49-60.

Tabatabai M.A. and Bremner J.M. 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. Soil Biology and Biochemistry: 1(4), 301-307.

Tabatabai M.A. and Bremner J.M. 1972. Assay of urease activity in soils. Soil Biology and Biochemistry: 4(4), 479-487.

Thalmann A. 1966. The determination of the dehydrogenase activity in soil by means of TTC (triphenyltetrazolium). Soil Biology, 6: 46-49.

Tscherko D., Rustemeier J., Richter A., Wanek W., Kandeler E. 2003. Functional diversity of the soil microflora in primary succession across two glacier forelands in the central Alps. European Journal of Soil Science, 54: 685-696.

Vigliotta G., Matrella S., Cicatelli A., Guarino F., and Castiglione S. 2016. Effects of heavy metals and chelants on phytoremediation capacity and on rhizobacterial communities of maize. Journal of environmental management, 179: 93-102.

Assessment of Shannon enzyme diversity index after the phytoremediation of a lead contaminated soil

S.S.Hosseni[1], A.Lekzian[2] and A.Halajnia[3]
M.Sc. Graduate, Professor and Associate Prof respectively, Dept. of Soil Science and Engineering, Ferdowsi University of Mashhad

Abstract
Soil biological properties as environmental indicators of soil quality have been proposed to assess efficiency of heavy metal phytoremediation processes. In this research, the Shannon diversity index was explored to assess soil quality and also success of EDTA and citric acid (CA) induced phytoextraction. The treatments were including control (without lead and chelating agent), without chelating agent, EDTA3, EDTA5, CA3 and CA5. The results showed that the lowest Shannon diversity index was related to without chelating agent and EDTA5 treatments in soil planted with sun flower and Indian mustard. Also the results showed that EDTA3, CA3 and CA5 treatments of soil planted with sunflower and EDTA3 and CA5 treatments of soil planted with Indian mustard significantly increased Shannon diversity index in comparison to the control treatment.

Keywords: phytoextraction, lead, chelating agent, enzyme activity