نشریه مدیریت خاک و تولید پایدار
جلد چهارم، شماره اول، ۱۳۹۳
http://ejsms.gau.ac.ir

تأثیر آلودگی سربی (Pb) بر کیفیت بیولوژیک خاک تحت پوشش گیاهی گل‌گندم (*Centaurea cyanus*)

اکبر کریمی[1] و *حبیب خداوردی‌لو[2]

[1]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه علوم خاک دانشگاه ارومیه، [2]دانشیار گروه علوم خاک، دانشگاه ارومیه

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۸/۷ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۷/۱۱

چکیده

فلزات سنگین از جمله سرب (Pb) از راه‌های گوناگون به خاک راه یافته و کیفیت خاک را تحت تأثیر قرار می‌دهند. فلزات سنگین موجب کاهش جمعیّت، فعالیّت و کارآیی میکروب‌های خاک می‌شوند. هدف از این پژوهش، بررسی تأثیر آلودگی سربی خاک بر جمعیّت، فعالیّت و کارآیی ریزسازواره‌ها در یک خاک استریل مایه‌زنی شده با گونه‌هایی از قارچ‌های میکوریز آربوسکولار از جنس *گلوموس* شامل *G. intraradices*، *G. mosseae* و *G. fasciculatum* و باکتری‌هایی از جنس *سودوموناس* شامل *P. putida*، *P. fluorescens* و *P. aeruginosa* بود. غلظت‌های مختلف سرب (صفر، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) به‌طور یکنواختی به خاک استریل شده اضافه گردید و پس از مایه‌زنی خاک با میکروب‌ها، کاشت گل گندم (*Centaurea cyanus*) انجام گرفت. این پژوهش در شرایط گلخانه‌ای، در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی و در سه تکرار اجرا گردید. نتایج نشان داد با افزایش غلظت سرب در خاک، فراوانی باکتری‌های خاک، درصد کلنیزاسیون ریشه، عملکرد ریشه، تنفس میکروبی خاک، تنفس برانگیخته با سوبسترا و کربن زیست‌توده میکروبی در هر دو تیمار میکروبی به‌طور معنی‌داری ($P\leq ۰/۰۵$) کاهش یافت. در هر دو تیمار میکروبی با افزایش غلظت سرب در خاک ضریب متابولیکی (qCO_2) افزایش یافت. با این حال، این افزایش در تیمار باکتریایی بیش‌تر از تیمار میکوریز بود. نتایج بیانگر بیش‌تر بودن تأثیر آلودگی سربی بر باکتری‌ها

*مسئول مکاتبه: h.khodaverdiloo@urmia.ac.ir

و مقاوم‌تر بودن قارچ‌های میکوریز در برابر آلودگی بود. بنابراین، آلودگی سربی خاک با کاهش رشد گیاه و کاهش جمعیّت، فعالیّت و کارآیی میکروبی خاک سبب افت کیفیت بیولوژیکی خاک می‌شود.

واژه‌های کلیدی: جمعیّت میکروبی، ریزوسفر، سرب، فعالیّت میکروبی، کیفیت بیولوژیکی خاک

مقدمه

در دهه‌های اخیر افزایش فعالیّت‌های بشری از جمله کان‌کنی، استخراج و ذوب فلزات، مصرف کودهای شیمیایی و کاربرد لجن و پساب در کشاورزی سبب افزایش آلودگی خاک‌ها به فلزات سنگین شده است (اسلام و ویل، ٢٠٠٠). فلزات سنگین در خاک افزون بر ایجاد سمیت برای گیاهان، برای ریزسازواره نیز سمی بوده و با ایجاد اختلال در فعالیّت آن‌ها، بر کیفیت بیولوژیک خاک تأثیر می‌گذارند (گاورلسکیو، ٢٠٠٤). سرب یکی از سمی‌ترین فلزات سنگین است که می‌تواند فعالیّت میکروبی خاک را مختل کرده و در نتیجه عملکرد و کارآیی میکروب‌های خاک را بکاهد (لندی و همکاران، ٢٠٠٠).

نتایج پژوهش‌های گوناگون نشان داده که جمعیّت و فعالیّت قارچ‌های میکوریز (بات، ١٩٨٩) و باکتری‌ها (ساندا و همکاران، ١٩٩٩) در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین تحت تأثیر قرار می‌گیرد. برای نمونه، زارعی و همکاران (٢٠١٠) گزارش کردند افزایش آلودگی خاک به فلزات سنگین سرب و روی، تعداد اسپورهای میکوریز آربوسکولار، کلنیزاسیون میکوریز و تعداد گونه‌های میکوریز همزیست با ریشه‌های گیاه *Veronico rechingeri* را کاهش می‌دهد. همچنین نتایج پژوهش‌های آنیانیو و نواچیوکیو (٢٠١١) نشان داد آلودگی سربی خاک تنوع و فراوانی باکتری‌های خاک را به‌طور معنی‌داری کاهش داد. جمعیّت و فعالیّت میکروبی خاک معیاری مناسب برای ارزیابی کیفیت و سلامت خاک است (بات، ١٩٨٩). تنفس میکروبی و تنفس برانگیخته با سوبسترا[1] (SIR) از مهم‌ترین شاخص‌های بیولوژیکی کیفیت خاک می‌باشند که به تنش‌های خاک ازجمله تنش فلزات‌سنگین حساسند (دای و همکاران، ٢٠٠٤؛ گای و همکاران، ٢٠١١). فرآیند تنفس میکروبی خاک، با جذب اکسیژن و آزادسازی دی‌اکسیدکربن توسط سلول‌های میکوریزی، باکتری‌ها و پروتوزوآهای خاک انجام می‌گیرد (مایر و

1- Substrate Induced Respiration

همکاران، ۲۰۰۰). تنفس میکروبی یا معدنی شدن کربن آلی خاک نه‌تنها نشان دهنده وضعیّت و فعالیّت میکروبی خاک است بلکه بیانگر روند، تعادل و چگونگی تجزیه ماده آلی و چرخه برخی عناصر غذایی خاک نیز می‌باشد (نانی پیری، ۱۹۹٤). تنفس برانگیخته با سوبسترا میزان کربن متصاعد شده از تنفس میکروبی پس از افزودن سوبسترای قابل تجزیه مانند گلوکز می‌باشد و نشان‌دهنده جمعیّت فعال میکروبی خاک است (لیو و ژیو، ۲۰۰٦).

بر پایه نتایج مطالعات گوناگون، فلزات سنگین با ایجاد کمپلکس با سوبسترای موردنیاز آنزیم‌ها و خارج نمودن آن از دسترس میکروب‌های خاک و یا با از بین بردن ریزسازواره‌های تجزیه کننده ماده آلی، تنفس خاک و فعالیّت‌های میکروبی را می‌کاهند (لندی و همکاران، ۲۰۰۰؛ نواچیوکیو و پولفارد، ۲۰۱۱). برای نمونه، ورما و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند با افزایش سطوح سرب در خاک مقدار تنفس میکروبی خاک کاهش می‌یابد.

خان و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که همبستگی معنی‌داری میان غلظت فلزات سنگین در خاک و مقدار کربن زیست‌توده میکروبی (MBC)[1] وجود دارد. نتایج بیش‌تر پژوهش‌ها نشان داده است MBC، که ۱ تا ٤ درصد کل کربن خاک را تشکیل می‌دهد، در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین کاهش می‌یابد (خان و همکاران، ۲۰۱۰؛ نواچیوکیو و پولفارد، ۲۰۱۱). برای نمونه، خان و همکاران (۲۰۱۰) با انجام پژوهشی نشان دادند که مقدار کربن زیست‌توده میکروبی در خاک‌های آلوده به سرب مورد آزمون کاهش یافت.

اندرسون و دامچ (۱۹۹۰) شاخص ضریب متابولیکی (qCO_2) را به‌منظور ارزیابی تأثیر تنش ناشی از آلودگی‌های مختلف بر نیاز انرژی ریزسازواره‌های خاک ارایه کردند. شاخص qCO_2، مقدار تنفس خاک (کربن تجزیه شده برای تولید انرژی) به ازای هر واحد زیست‌توده میکروبی (کربن مصرف شده برای رشد و تشکیل سلول‌های جدید) در واحد زمان است. این شاخص در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین تغییر می‌کند، زیرا در این خاک‌ها فعالیّت متابولیکی و بازده مصرف کربن توسط میکروب‌ها تغییر می‌یابد (بات، ۱۹۸۹). همچنین، از آن‌جاکه فعالیّت میکروبی در خاک، متأثر از زیست‌توده و تراوشات ریشه‌ای گیاهان است، کاهش تراوشات ریشه‌ای موجب کاهش رشد و فعالیّت میکروبی

1- Microbial Biomass Carbon

خاک می‌شود. زیرا آزاد شدن ترکیبات آلی از ریشه عامل مهمی در فراهمی کربن در محیط ریزوسفر است (بات، ١٩٨٩).

بررسی منابع نشان داد تأثیر فلزات سنگین بر فراوانی و فعالیّت میکروب‌ها در خاک‌های ایران چندان مورد توجه قرار نگرفته است و پژوهش‌های اندکی در این زمینه انجام شده است. بنابراین این پژوهش به‌منظور مطالعه تأثیر آلودگی سربی خاک بر برخی شاخص‌های بیولوژیک کیفیت خاک مانند فراوانی، کارآیی و فعالیّت میکروبی در یک خاک استریل مایه‌زنی شده با زادمایه قارچ‌های میکوریز جنس *گلوموس* (*G. intraradices*، *G. mosseae* و *G. fasciculatum*) و باکتری‌های *سودوموناس* (*P. putida*، *P. fluorescens* و *P. aeruginosa*) تحت پوشش گیاهی گل‌گندم (*Centaurea cyanus*) انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری، اندازه‌گیری ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی و آلوده کردن خاک: خاک موردنیاز از سری Fine, mixed, mesic Typic Halaquepts Inceptisols واقع در استان آذربایجان غربی نمونه‌برداری شد. این خاک پس از هوا خشک شدن به دو بخش تقسیم گردید. یک بخش آن برای انجام آزمایش‌های فیزیکی و شیمیایی از الک دو میلی‌متری عبور داده شد. برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک به روش‌های استاندارد (کارتر و گری گوریچ، ٢٠٠٨) اندازه‌گیری شد. بخش دیگر خاک پس از عبور از الک پنج میلی‌متری با غلظت‌های مختلف سرب شامل صفر، ٢٥٠، ٥٠٠ و ١٠٠٠ میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم خاک آلوده شد. برای آلوده کردن خاک، ابتدا مقدار لازم نیترات‌سرب $Pb(NO_3)_2$ برای آلوده کردن جرم مشخصی از خاک محاسبه شد. سپس، جرم محاسبه شده نمک به یک کیلوگرم از خاک افزوده و به‌طور کامل با آن مخلوط گردید تا پیش‌ماده‌ای همگن به‌دست آید. اختلاف مقدار نیتروژن افزوده شده به خاک توسط نمک نیترات سرب در هر تیمار نسبت به تیماری که بیشترین دریافت نیتروژن را داشت (١٠٠٠ میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم خاک)، با افزودن مقادیر محاسبه شده اوره به آن تیمار تصحیح گردید. در مرحله بعد این پیش‌ماده آلوده به‌طور کامل با توده خاک مخلوط گردید. بر پایه مطالعات پیشین (خداوردی‌لو و همکاران، ٢٠١٢)، خاک آلوده به‌مدت پنج

ماه در معرض تناوب‌های تر و خشک شدن و به‌مدت ۱۸ ماه دیگر در شرایط هواخشک قرار گرفت تا توزیع سرب در خاک به شرایط آلودگی درازمدت و طبیعی نزدیک‌تر شود.

مایه‌زنی میکروبی: نمونه‌های خاک آلوده شده در دو نوبت در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۵ بار در داخل کیسه‌های کنفی در اتوکلاو استریل شدند. عمل استریل سطحی گلدان‌ها نیز با استفاده از الکل ۷۰ درصد انجام گردید. خاک‌های استریل به گلدان‌هایی با ظرفیت ۲/۵ کیلوگرم منتقل گردید. برای اعمال تیمارهای میکروبی، در تیمار مربوط به میکوریز آربوسکولار قبل از کشت، در زیر بذرها مقدار ۲۵ گرم از زادمایه به‌صورت لایه‌ای به ضخامت تقریبی ۲ سانتی‌متر، در عمق ۳ سانتی‌متری خاک، اضافه شد. تیمار میکوریز شامل مخلوطی از زادمایه میکوریز جنس *گلوموس* شامل گونه‌های *G. intraradices*، *G. mosseae* و *G. fasciculatum* بود. تعداد کل اسپورهای میکوریز زادمایه، ۲۵۰ اسپور در هر ۵۰ گرم زادمایه بود. برای تیمار باکتریایی، ۱۵ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع Nutrient Broth دارای باکتری‌ها به گلدان‌ها مایه‌زنی گردید. تیمار باکتریایی شامل ترکیبی از باکتری‌های جنس *سودوموناس* شامل گونه‌های *P. putida*، *P. fluorescens* و *P. aeruginosa* بود که به‌مدت ٤٨ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور در محیط کشت مایع Nutrient Broth رشد کرده بودند. جمعیّت این باکتری‌ها حدود ($۲/٦\times۱۰^{۸}$ CFU ml^{-1}) بود. گونه‌های میکوریز و باکتری از بانک میکروبی بخش بیولوژی خاک، مؤسسه پژوهش‌های خاک و آب کشور تهیه شدند. این پژوهش در شرایط گلخانه در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی و در ۳ تکرار انجام شد.

کشت گلخانه‌ای: پس از رساندن رطوبت گلدان‌ها به ظرفیت زراعی و اعمال تیمارها در هر گلدان ٦ تا ۸ بذر گیاه گل‌گندم (*Centaurea cyanus*) با فواصل منظم در گلدان‌های موردنظر کشت و گلدان‌ها به گلخانه با دمای حداقل ۱۵ و حداکثر ۳۰ درجه سانتی‌گراد منتقل گردیدند. پس از جوانه‌زدن بذرها، بوته‌های سالم‌تر و قوی‌تر (۳ بوته) در هر گلدان نگه‌داری شدند. گلدان‌ها در شرایط گلخانه با دمای حداقل ۱۵ و حداکثر ۳۰ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند. در پایان ماه پنجم رشد، بخش هوایی گیاهان از رویه خاک بریده شد. ریشه گیاهان نیز به آرامی از خاک گلدان‌ها جدا و پس از شستشو با آب مقطر و خشک کردن، به درون پاکت‌های کاغذی منتقل گردیدند. مقداری (حدود یک گرم) از ریشه‌های ریز و ظریف برای رنگ‌آمیزی و تعیین درصد کلنیزاسیون ریشه در محلول اتانول

٥٠ درصد نگه‌داری شدند. بقیه ریشه‌ها به‌مدت ٧٢ ساعت در آون در دمای ٧٠ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس عملکرد ماده‌خشک ریشه اندازه‌گیری گردید.

اندازه‌گیری شاخص‌های میکروبی: برای اندازه‌گیری شاخص‌های میکروبی خاک، خاک ریزوسفری به آرامی از ریشه‌های گیاهان جدا گردید. خاک نمونه‌برداری شده به آزمایشگاه منتقل و در یخچال نگه‌داری شد. به‌منظور بررسی تأثیر آلودگی سربی بر جمعیّت و فعالیّت میکروب‌های خاک، فراوانی باکتری‌های خاک، درصد کلنیزاسیون ریشه، تنفس میکروبی پایه، تنفس برانگیخته با سوبسترا و کربن زیست‌توده میکروبی خاک اندازه‌گیری شد. بدین منظور فراوانی باکتری‌ها به روش تهیه سری‌های رقت از محلول خاک و کشت در محیط غذایی استریل شده Nutrient Agar و در نهایت شمارش کلنی‌ها در پتری‌دیش‌ها، تعیین شد (چن و همکاران، ٢٠٠٦).

درصد کلنیزاسیون ریشه توسط میکوریز با روش رنگ‌آمیزی با محلول رنگی تریپان بلو و شمارش خطوط تلاقی شبکه اندازه‌گیری شد (گیووانیتی و موسی، ١٩٨٠).

تنفس میکروبی با روش گردآوری CO_2 آزاد شده در هیدروکسید سدیم و تیتراسیون برگشتی مقدار باقی‌مانده آن با اسیدکلریدریک، تعیین گردید (اندرسون، ١٩٨٢). برای اندازه‌گیری تنفس برانگیخته با سوبسترا ٥٠ گرم از نمونه‌های خاک توزین و در ظروف شیشه‌ای درب‌دار ویژه ریخته شد. یک میلی‌لیتر گلوکز یک درصد به‌عنوان سوبسترا به هر کدام از ظروف افزوده و بلافاصله لوله آزمایشی دارای ١٠ میلی‌لیتر محلول NaOH ٠/١ نرمال درون ظروف قرار داده شد. درب ظروف محکم بسته شد و به‌مدت ٦ ساعت در انکوباتور با دمای ٢٥ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از ٦ ساعت نمونه‌ها با استفاده از HCl ٠/١ نرمال تیتر گردید. مقدار CO_2 آزاد شده محاسبه و میزان تنفس برانگیخته با سوبسترا ($mg\ CO_2\text{-}C\ g^{-1}\ day^{-1}$) برآورد شد (آلیف و نانی پیری، ١٩٩٥).

کربن زیست‌توده میکروبی با روش تدخین- استخراج اندازه‌گیری شد (جینکسون و لاد، ١٩٨١). به‌این ترتیب که ١٠٠ گرم از هر نمونه خاک ریزوسفری با کلروفرم به‌مدت ٢٤ ساعت تدخین (گازدهی) شده و با محلول سولفات پتاسیم، استخراج شد. از اختلاف مقدار کربن نمونه‌های تدخین شده و تدخین نشده مقدار MBC محاسبه شد. سپس برای ارزیابی تأثیر تنش آلودگی سربی خاک بر نیاز انرژی میکروب‌های خاک، ضریب متابولیکی با استفاده از رابطه (١) محاسبه گردید (چنگ و همکاران، ١٩٩٣):

$$qCO_2 = \frac{BR}{MBC} \qquad (۱)$$

که در آن qCO_2 ضریب متابولیکی (mg CO_2 -C mg^{-1} MBC day^{-1})، BR تنفس میکروبی پایه (mg CO_2 -C g^{-1} day^{-1}) و MBC کربن زیست‌توده میکروبی (mg CO_2-C kg^{-1}) است.

همچنین، شاخص دسترسی به کربن با استفاده از رابطه (۲) محاسبه شد (چنگ و همکاران، ۱۹۹۳):

$$CAI = \frac{BR}{SIR} \qquad (۲)$$

CAI شاخص دسترسی به کربن و SIR تنفس برانگیخته با سوبسترا (mg CO_2-C g^{-1} day^{-1}) است.

این پژوهش در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی انجام شد. تجزیه آماری داده‌ها با نرم‌افزار SAS، مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد و رسم نمودارها در محیط Excel انجام گرفت.

نتایج و بحث

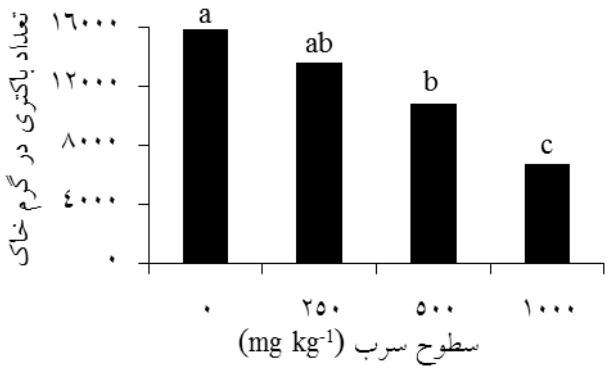
جدول (۱) برخی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک مورد مطالعه را نشان می‌دهد. این خـاک دارای بافتی متوسط، pH آن در محدوده خاک‌های آهکی، کمی شور، غیر سدیمی و با توجه به حدود مجـاز گزارش شده در منابع (کارینی، ۱۹۹۵)، غیرآلوده به فلزات سنگین بود.

جدول ١- برخی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک مورد مطالعه.

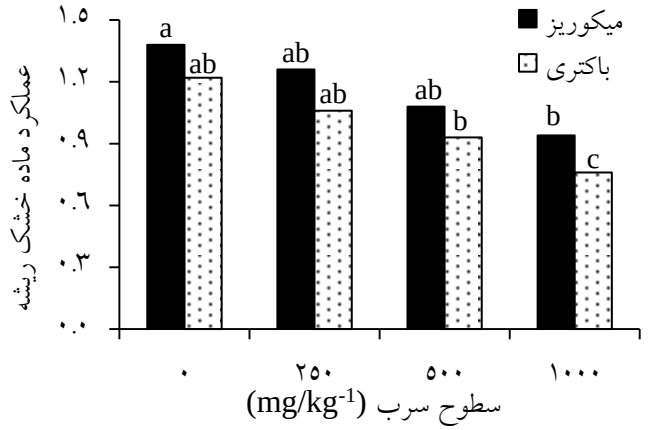
ویژگی	واحد	مقدار
شن	(گرم بر کیلوگرم)	٣٢٣
سیلت		٤٠٣
رس		٢٧٤
مواد آلی		٢٦/٩
کلاس بافتی خاک		لوم
ظرفیت تبادل کاتیونی	$(cmol_c kg^{-1})$	٢٢/١
هدایت الکتریکی عصاره اشباع	(دسی‌زیمنس بر متر)	٢/٥
درصد سدیم تبادلی	(درصد)	٣
کربنات کلسیم معادل		٣٠/٥
pH		٨/١
کلسیم محلول	(میلی‌گرم بر کیلوگرم)	١/٢
منیزیم محلول		٠/٤
سدیم محلول		٢٣/٨
پتاسیم محلول		٠/٠
کربنات محلول		٠/٨
بی‌کربنات محلول		٥/٦
کلر محلول		١٥/٢
سولفات محلول		٣/٨
کل سرب	(میلی‌گرم بر کیلوگرم)	٢١/٤٢
کل کادمیم		١/٤٧
کل آهن		٢٩٥/٥
کل روی		٦٢
کل مس		١٤/١١

نتایج نشان داد فراوانی باکتری‌های ریزوسفری خاک با افزایش شدت آلودگی سربی خاک تا ٢٥٠ میلی‌گرم بر کیلوگرم تغییر معنی‌داری ($P\leq$٠/٠٥) نکرد. با این حال، در غلظت‌های بالاتر (٥٠٠ و ١٠٠٠ میلی‌گرم بر کیلوگرم) فراوانی باکتری‌ها به‌طور معنی‌داری ($P\leq$٠/٠٥) کاهش یافت (شکل ١). کاهش

فراوانی باکتری‌ها در اثر آلودگی سربی خاک را می‌توان به تخریب DNA و RNA، مهار سنتز پروتئین، جلوگیری از فرآیندهای آنزیمی و مهار تقسیم سلولی باکتری‌ها نسبت داد (مایر و همکاران، ۲۰۰۰). همچنین با افزایش غلظت سرب در خاک عملکرد ریشه گیاه کاهش یافت (شکل ۲). نتایج نشان می‌دهد که با کاهش عملکرد ریشه به‌طور معمول ترشحات ریشه‌ای کاهش می‌یابد (مایر و همکاران، ۲۰۰۰). بنابراین یکی دیگر از دلایل کاهش فراوانی باکتری‌های خاک، احتمالاً کاهش ترشحات ریشه گیاه می‌باشد. این نتایج با نتایج بسیاری از پژوهش‌گران مشابه بود. برای نمونه، آنیانیو و نواچیوکیو (۲۰۱۱) با انجام پژوهشی نشان دادند آلودگی سربی خاک، تنوع و فراوانی باکتری‌های خاک را به‌گونه‌ای چشم‌گیر کاهش می‌دهد.



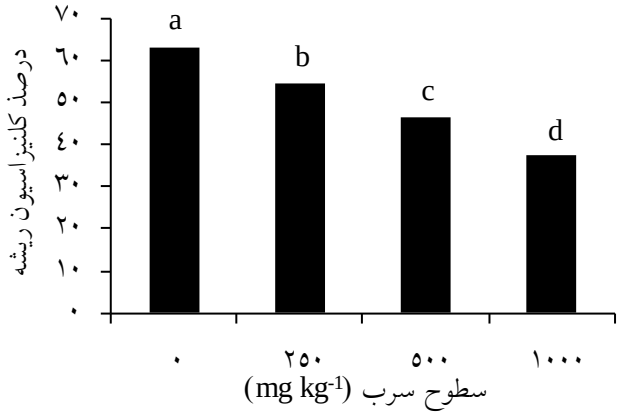
شکل ۱- فراوانی باکتری‌های ریزوسفری در سطوح مختلف سرب در خاک.



شکل ۲- عملکرد ماده خشک ریشه گیاه در سطوح مختلف سرب در خاک.

چاودری و خان (۲۰۰۲) نیز با بررسی تأثیر آلودگی فلزات سنگین خاک بر جمعیّت ریزوبیوم‌های خاک، گزارش کردند که افزایش غلظت این فلزات در خاک، جمعیّت ریزوبیوم‌های خاک را کاهش داد.

درصد کلنیزاسیون ریشه گیاه گل گندم با افزایش غلظت سرب در خاک به‌طور معنی‌داری ($P\leq ۰/۰۵$) کاهش یافت (شکل ۳). کاهش کلنیزاسیون ریشه در شرایط تنش فلزات سنگین به‌عنوان یک راهکار سازگاری در شرایط سمیت فلزات‌سنگین معرفی شده است (اوده و همکاران، ۲۰۰۲؛ نوواک، ۲۰۰۷). تاکنون دلایل گوناگونی برای کاهش درصد کلنیزاسیون ریشه در اثر تنش فلزات سنگین گزارش شده است. برخی پژوهش‌گران کاهش کلنیزاسیون ریشه را راهکاری برای محدود کردن جذب اضافی برخی از فلزات سنگین از طریق ریسه‌های میکوریز و یا به‌دلیل اثرات متقابل میکوریز و گیاه در سطوح بالای فلز سنگین گزارش کرده‌اند (اوده و همکاران، ۲۰۱۰). در حالی‌که برخی دیگر کاهش کلنیزاسیون ریشه‌ها را در نتیجه اثرات سمی فلزات‌سنگین بر روی اندام‌های میکوریز آربوسکولار بیان نموده‌اند (آریاگادا و همکاران، ۲۰۰۵). نتایج این پژوهش با نتایج سایرین نیز همخوانی داشت. برای نمونه، آریاگادا و همکاران (۲۰۰۵) با انجام پژوهشی نشان دادند که کلنیزاسیون میکوریز همزیست با گیاه *اکالیپتوس* در خاک‌های آلوده به سرب کاهش می‌یابد. نتایج پژوهش آووتوی و همکاران (۲۰۰۹) نیز نشان داد توانایی کلنیزاسیون میکوریز آربوسکولار در خاک‌های آلوده به سرب کاهش می‌یابد.



شکل ۳- درصد کلنیزاسیون ریشه گیاه در سطوح مختلف سرب در خاک.

روند تغییرات شدت تنفس میکروبی پایه خاک با افزایش سطوح سرب در خاک در تیمار میکوریز و باکتری مشابه بود (جدول ۲). به‌این ترتیب که با افزایش غلظت سرب در خاک، تنفس میکروبی پایه به‌طور معنی‌داری (P≤۰/۰۵) کاهش یافت. همچنین تنفس میکروبی در ریزوسفر گل‌گندم در تمامی سطوح سرب در خاک، در تیمار میکوریز به‌طور معنی‌داری (P≤۰/۰۵) بیش‌تر از تیمار باکتری بود. فلزات‌سنگین با ایجاد کمپلکس با سوبسترای موردنیاز آنزیم‌ها و خارج نمودن سوبسترا از دسترس ریزسازواره و یا با از بین بردن ریزسازواره سبب کاهش تنفس خاک می‌شوند (لندی و همکاران، ۲۰۰۰). بیش‌تر بودن مقادیر تنفس میکروبی در تیمار میکوریز نسبت به تیمار باکتری احتمالاً به‌این دلیل است که متابولیسم تنفسی در میکوریز بیش‌تر از باکتری‌هاست. همچنین در خاک‌های آلوده به فلزات‌سنگین میزان تحمل میکوریز نسبت به باکتری‌ها بیش‌تر است (لندی و همکاران، ۲۰۰۰).

جدول ٢- مقایسه میانگین شاخص‌های میکروبی در سطوح مختلف آلودگی سربی خاک در تیمارهای باکتری و میکوریز.

میکروب	کل سرب افزوده شده به خاک (میلی‌گرم بر کیلوگرم)			
	صفر	٢٥٠	٥٠٠	١٠٠٠
	تنفس میکروبی ($mg\ CO_2\text{-}C\ g^{-1}\ day^{-1}$)			
باکتری	٠/٢٣ ± ٠/٠١ ^{a,b}	٠/١٤ ± ٠/٠١ ^{b,b}	٠/١٠ ± ٠/٠١ ^{c,b}	٠/٠٧ ± ٠/٠١ ^{d,b}
میکوریز	٠/٢٩ ± ٠/٠١ ^{a,a}	٠/٢٠ ± ٠/٠٢ ^{b,a}	٠/١٥ ± ٠/٠٢ ^{c,a}	٠/١٠ ± ٠/٠١ ^{d,a}
	تنفس برانگیخته یا سوبسترا ($mg\ CO_2\text{-}C\ g^{-1}\ day^{-1}$)			
باکتری	٠/٢٧ ± ٠/٠٢ ^{a,a}	٠/٢٣ ± ٠/٠٢ ^{ab,a}	٠/١٩ ± ٠/٠١ ^{b,a}	٠/١٦ ± ٠/٠٢ ^{c,a}
میکوریز	٠/٣٢ ± ٠/٠٢ ^{a,a}	٠/٢٠ ± ٠/٠٢ ^{a,a}	٠/٢٦ ± ٠/٠٤ ^{b,a}	٠/٢٠ ± ٠/٠٢ ^{b,a}
	کربن زیست‌توده میکروبی ($mg\ CO_2\text{-}C\ kg^{-1}$)			
باکتری	٤٦/٠٣ ± ٢/٠ ^{a,b}	٢٦/٠٢ ± ٢/٠ ^{b,b}	١٦/٦٨ ± ٣/١ ^{c,b}	٨/٠١ ± ١/٠ ^{d,b}
میکوریز	٦١/٣٥ ± ٢/٠ ^{a,a}	٤٢/٠٢ ± ٢/٠ ^{b,a}	٣٠/٠٢ ± ١/٠ ^{c,a}	٢٠/٠١ ± ١/٢ ^{d,a}
	qCO_2 ($mg\ CO_2\text{-}C\ mg^{-1}\ MBC\ day^{-1}$)			
باکتری	٠/٠٠٤٩ ± ٠/٠٠ ^{a,a}	٠/٠٠٥٦ ± ٠/٠٠ ^{ab,a}	٠/٠٠٦٢ ± ٠/٠٠ ^{ab,a}	٠/٠٠٩٦ ± ٠/٠٠ ^{a,a}
میکوریز	٠/٠٠٤٧ ± ٠/٠٠ ^{a,a}	٠/٠٠٤٨ ± ٠/٠٠ ^{a,a}	٠/٠٠٥١ ± ٠/٠٠ ^{a,a}	٠/٠٠٥٣ ± ٠/٠٠ ^{a,a}
	قابلیت دسترسی به کربن (CAI)			
باکتری	٠/٨١ ± ٠/٠٧ ^{a,a}	٠/٦١ ± ٠/٠٤ ^{ab,a}	٠/٥٢ ± ٠/٠٩ ^{b,a}	٠/٤٥ ± ٠/٠٩ ^{b,a}
میکوریز	٠/٨٢ ± ٠/١٠ ^{a,a}	٠/٧١ ± ٠/١٠ ^{a,a}	٠/٥٧ ± ٠/٠٩ ^{b,a}	٠/٥٤ ± ٠/١١ ^{b,a}

حروف بالانویس اول و دوم بر روی هر عدد به‌ترتیب نشان دهنده اختلاف آماری ($P\leq ٠/٠٥$) در هر ردیف و هر ستون می‌باشند.

میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری ($P\leq ٠/٠٥$) ندارند.

اعداد مقابل داده‌ها انحراف معیار داده‌ها در ٣ تکرار را نشان می‌دهند.

با افزایش غلظت سرب از صفر به ٢٥٠ میلی‌گرم بر کیلوگرم تغییر معنی‌داری ($P\leq ٠/٠٥$) در SIR مشاهده نشد. (جدول ٢). اما در غلظت‌های ٥٠٠ و ١٠٠٠، SIR در ریزوسفر گیاه گل گندم به‌طور معنی‌داری ($P\leq ٠/٠٥$) کاهش یافت. با توجه به SIR می‌توان به جمعیّت میکروبی فعال خاک پی برد. آلودگی سربی خاک سبب کاهش SIR شد، که این کاهش در غلظت‌های ٥٠٠ و ١٠٠٠ میلی‌گرم بر کیلوگرم نمایان‌تر بود. این نتایج بیانگر آن است که سوبسترای اضافه شده به خاک (گلوکز) در غلظت‌های ٥٠٠ و ١٠٠٠ میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم خاک با وجود کاهش فراوانی میکوریزها و

باکتری‌ها، برای آن‌ها به‌سهولت قابل دسترس نبوده است و سرب سبب ایجاد تأخیر در رشد نمایی میکروب‌های فعال خاک می‌شود (لندی و همکاران، ۲۰۰۰).

سرب یکی از خطرناک‌ترین فلزات سنگین است که حتی در غلظت‌های کم برای ریزسازواره‌های خاک سمّی است (کمال الدین و همکاران، ۲۰۰۳). کاهش تنفس میکروبی ناشی از آلودگی سرب توسط برخی پژوهش‌گران نیز گزارش شده است. برای مثال ورما و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند آلودگی سربی خاک، فعالیّت میکروبی خاک از جمله تنفس میکروبی خاک را کاهش می‌دهد. به‌طور مشابه گای و همکاران (۲۰۱۰) دریافتند سمیت سرب در خاک سبب کاهش تنفس میکروبی خاک می‌شود. همچنین نتایج پژوهش نواچیوکیو و پولفورد (۲۰۱۱) نشان داد تنفس میکروبی خاک در خاک‌های آلوده به سرب، مس و روی کاهش می‌یابد.

کربن زیست‌توده میکروبی با افزایش سطوح سرب در خاک تحت پوشش گیاهی گل گندم و در هر دو تیمار میکوریز و باکتری با افزایش غلظت سرب در خاک به‌طور معنی‌داری ($P\leq ۰/۰۵$) کاهش یافت (جدول ۲). کربن زیست‌توده میکروبی در خاک ریزوسفری گل گندم در تیمار میکوریز به‌طور معنی‌داری ($P\leq ۰/۰۵$) بیش‌تراز تیمار باکتری بود. کاهش کربن زیست‌توده میکروبی در خاک با افزایش غلظت سرب در خاک، در هر دو تیمار میکوریز و باکتری، احتمالاً به‌این دلیل است که این میکوریز و باکتری‌ها در شرایط آلودگی سربی خاک برای تحمل شرایط نامطلوب ایجاد شده به انرژی بیش‌تری نیاز دارند. به‌همین دلیل درصد بیش‌تری از انرژی هدر می‌رود و کربن کم‌تری در ترکیبات آلی ساخته می‌شود (پاپا و همکاران، ۲۰۱۰).

کاهش همزمان تنفس ناشی از سوبسترا و کربن زیست‌توده میکروبی (جدول ۲) در اثر افزایش غلظت سرب در خاک نشان می‌دهد که سهم میکروب‌های فعال از زیست‌توده کل با افزایش غلظت سرب در خاک کاهش می‌یابد. به بیان ساده‌تر، میکروب‌های جوان خاک به‌دلیل حساسیت بیش‌تر و بردباری کم‌تر در غلظت‌های بالای سرب زودتر از بین می‌روند. چرا که تنفس ناشی از سوبسترا نشان‌دهنده جمعیّت فعال میکروبی از نظر متابولیکی می‌باشد (پاپا و همکاران، ۲۰۱۰). نتایج این پژوهش مشابه با نتایج خان و همکاران (۲۰۱۰) می‌باشد. که بیان‌گر کاهش کربن زیست‌توده میکروبی خاک در اثر آلودگی سربی خاک بود.

مقادیر شاخص قابلیت دسترسی به کربن در هر دو تیمار میکوریز و باکتری در غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب در خاک به‌طور معنی‌داری ($P\leq ۰/۰۵$) کاهش یافت (جدول ۲). این

احتمالا به‌دلیل کاهش زیست‌توده ریشه گیاهان و در نتیجه کاهش احتمالی ترشحات ریشه در اثر افزایش غلظت سرب در خاک بود (شکل ٢). ریشه‌ها مهم‌ترین منبع تولیدکننده کربن برای میکروب‌های خاک به‌ویژه هتروتروف‌ها می‌باشند و هرگونه کاهش در تراوشات ریشه‌ای موجب کاهش فعالیّت میکروبی خاک می‌شود. زیرا آزاد شدن ترکیبات آلی از ریشه عامل مهمی در فراهم کردن کربن در محیط ریزوسفر است. (دای و همکاران، ٢٠٠٤). مقادیر CAI در تیمار میکوریز بیش‌تر از تیمار باکتری بود هر چند که این اختلاف معنی‌دار ($P\leq ٠/٠٥$) نبود. دلیل این امر احتمالاً زیست‌توده بیش‌تر ریشه (شکل ٢) و در نتیجه ترشحات بیش‌تر ریشه در تیمار میکوریز بود.

شاخص ضریب متابولیکی با افزایش سطوح سرب در خاک در هر دو تیمار باکتری و میکوریز افزایش یافت (جدول ٢). qCO_2 مقدار تنفس خاک به ازای هر واحد زیست‌توده میکروبی در واحد زمان است. این شاخص در خاک‌های آلوده به فلزات‌سنگین تغییر می‌کند، چون در این خاک‌ها فعالیّت متابولیکی و بازده مصرف کربن توسط میکروب‌ها تغییر می‌کند (بات، ١٩٨٩). به‌این ترتیب که میکروب‌های خاک در شرایط تنش به ازای هر واحد سوبسترای اضافه شده کربن کم‌تری را صرف تشکیل زیست‌توده جدید می‌کنند و اغلب آن را برای تأمین انرژی لازم برای ادامه حیات به‌کمک تنفس مصرف می‌کنند (لندی و همکاران، ٢٠٠٠). بنابراین افزایش qCO_2 با افزایش غلظت سرب در خاک نشان می‌دهد که کارآیی متابولیکی میکوریزها و باکتری‌ها در تبدیل سوبسترای آلی به زیست‌توده جدید کاهش یافته و قسمت بیش‌تر کربن برای تأمین انرژی مصرف شده است (لندی و همکاران، ٢٠٠٠). مقادیر ضریب متابولیکی در تیمار میکوریز کم‌تر از تیمار باکتری بود. این امر به‌این دلیل است که میکوریزها حدود ٤٤ درصد کربن قابل تجزیه را در داخل زیست‌توده خود تثبیت می‌کنند، در حالی‌که باکتری‌ها ٣٢ درصد کربن را در زیست‌توده خود تثبیت می‌کنند. بنابراین میکوریزها دارای راندمان بیش‌تری در تبدیل کربن به زیست‌توده هستند و مقدار ضریب متابولیکی کم‌تری دارند (اسلام و ویل، ٢٠٠٠).

نتیجه‌گیری

در این پژوهش نتایج به‌دست آمده از بررسی تأثیر آلودگی سربی خاک بر کیفیت بیولوژیکی خاک نشان داد که افزایش سطوح آلودگی سربی خاک از یک سو با کاهش زیست‌توده ریشه گل‌گندم و از سویی دیگر با ایجاد سمیت برای میکوریزها و باکتری‌ها و کاهش فراوانی آن‌ها، سبب کاهش در شدت

تنفس میکروبی و کربن زیست‌توده میکروبی می‌شود. داده‌های مربوط به مقادیر قابلیت دسترسی به کربن نیز این نتایج را تأیید می‌کند زیرا که با افزایش سطوح سرب در خاک مقادیر این شاخص کاهش یافت که این مطلب نشان دهنده محدودیت کربن برای تنفس میکروبی است. به‌طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد که افزایش سطوح سرب در خاک حتی در حضور گیاه گل‌گندم، برای جمعیّت میکروبی خاک سمیت ایجاد نموده و جمعیّت و فعالیّت میکوریزها و باکتری‌ها را در خاک کاهش می‌دهد که از این میان باکتری‌ها نسبت به میکوریزها در برابر آلودگی سربی بردباری کم‌تری نشان دادند.

منابع

1. Alef, K., and Nannipieri, P. 1995. Methods in applied soil microbiology and biochemistry. Academic Press. London. 608p.
2. Anderson, J.P.E. 1982. Soil respiration. P831-871, In: A.L., and R.H. Mille (Eds.), Methods of Soil Analysis. Part 2, Chemical and microbiological properties, American Society of Agronomy, Madison. WI.
3. Anderson, T.H., and Domsch, K.H. 1990. Application of eco-physiological quotients (qCO_2 and qD) on microbial biomass from soils of different cropping histories. Soil Biol. Biochem. 22: 251-255.
4. Anyanwu, C.U., and Nwachukwu, O.N. 2011. Heavy metal resistance in bacteria isolated from contaminated and uncontaminated soils. Int. J. Res. Chem. Environ. 1(1): 173-178.
5. Arriagada, C.A., Herrera, M.A., and Ocampo, J.A. 2005. Contribution of arbuscular mycorrhizal and saprobe fungi to the tolerance of *Eucalyptus globulus* to Pb. Water Air Soil Pollut. 166: 31-47.
6. Awotoye, O.O., Adewole, M.B., Salami, A.O., and Ohiembor, M.O. 2009. Arbuscular mycorrhiza contribution to the growth performance and heavy metal uptake of *Helianthus annuus LINN* in pot culture. Afr. J. Environ. Sci. Technol. 3: 157-163.
7. Baath, E. 1989. Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations. Water Air Soil Pollut. 47: 335-379.
8. Cariny, T. 1995. The reuse of contaminated land. John Wiley and Sons Ltd. Publisher. 219p.
9. Carter, M.R., and Gregorich, E.G. 2008. Soil sampling and methods of analysis (2nd ed). CRC Press. Boca Raton. FL. 1204p.
10. Chaudhry, T.M., and Khan, A.G. 2002. Role of symbiotic organisms in sustainable plant growth on heavy metal contaminated Industrial Sites. P270-279, In: Rajak, R.C. Ed Biotechnology of Microbes and Sustainable Utilization Scientific Publishers, Jodhpur, India.

11.Chen, Y., Zhu, G., and Smith, F.A. 2006. Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation on uranium and arsenic accumulation by Chinese brake fern *(Pterisvittata L.)* from a uranium mining-impacted soil. Chemosphere. 62: 1464–1473.
12.Cheng, W., Coleman, D.C., Carroll, C.R., and Hoffman, C.A. 1993. In situ measurements of root respiration and soluble carbon concentrations in the rhizosphere. Soil Biol. Biochem. 25: 1189-1196.
13.Dai, J., Becquer, T., Rouiller, J.H., Reversat, G., Bernhard-Reversat, F., Nahmani, J., and Lavelle, P. 2004. Influence of heavy metals on C. and N mineralization and microbial biomass in Zn, Pb, Cu and Cd contaminated soils. Appl. Soil Ecol. 25: 99-109.
14.Gai, N., Yang, Y., Li, T., Yao, J., Wang, F., and Chen, H. 2011. Effect of lead contamination on soil microbial activity measured by microcalorimetry. Chin. J. Chem. 29: 1541-1547.
15.Gavrilescu, M. 2004. Removal of heavy metals from the environment by biosorption. Eng. Life Sci. 4, 3: 219-232.
16.Giovannetti, M., and Mosse, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscularmycorrhizal infection in roots. New Phytol. 84: 489-500.
17.Islam, K.R., and Weil, R.R. 2000. Soil quality indicator properties in mid-Atlantic soils as influenced by conservation management. J. Soil Water Conserv. 54: 69-78.
18.Jenkinson, D.S., and Ladd, J.N. 1981. Microbial biomass in soil measurement and turnover, P415-471, In: Paul E.A., Ladd, J.N. (Eds). Soil Biochemistry, Marcel Dekker, Inc., NY.
19.Kamaludeen, S.P.B., Megharaj, M., Naidu, R., Singleton, I., Juhasz, A., Hawke, B.G., and Sethunathan, N. 2003. Microbial activity and phospholipids fatty acid pattern in long-term tannery waste contaminated soils. Ecotoxicol. Environ. Saf. 56: 302–310.
20.Khan, S., Hesham, H., Qiao, M., Rehman, Sh., and J. He. 2010. Effects of Cd and Pb on soil microbial community structure and activities. Environ. Sci. Pollut. Res. 17: 288–296.
21.Khodaverdiloo, H., Rahmanian, M., Rezapour, S., Ghorbani Dashtaki, Sh., Hadi, H., and Han, F.X. 2012. Effect of wetting-drying cycles on redistribution of lead in some semi-arid zone soils spiked with a lead salt. Pedosphere. 22: 304–313.
22.Landi, L., Renella, G., Moreno, J.L., Falchini, L., and Nannipieri, P. 2000. Influence of cadmium on the metabolic quotient, l-D-glutamic acid respiration ratio and enzyme activity: microbial biomass ratio under laboratory conditions. Biol. Fertil. Soils. 32: 8-16.
23.Luo, Y.Q., and Zhou X. 2006. Soil respiration and the environment. Academic Press, Elsevier, 334p.

24.Maier, R.M., Papper, L.L., and Gebra, C.P. 2000. Environmental microbiology. Academic Press. San Diego, CA.
25.Nannipieri, P. 1994. The potential use of soil enzymes as indicators of productivity, sustainability and pollution. P238-244, In: Pankhurst, C.E., Doube. B.M., Gupta, V.V.S.R., Grace. P.R. (Eds). Soil Biota: Management in Sustainable Farming Systems. CSIRO Publications, Melbourne, Australia.
26.Nowak, J. 2007. Effects of cadmium and lead concentration and arbuscular mycorrhiza on growth, flowering and heavy metal accumulation in scarlet sage (*Salvia Splendens Seelo 'Torreador'*). Acta Agrobotanica, 60: 79–83.
27.Nwachukwu, O.I., and Pulford, I.D. 2011. Microbial respiration as an indication of metal toxicity in contaminated organic materials and soil. Hazard. Mater. 185: 1140–1147.
28.Oudeh, M., Khan, M., and Scullion, J. 2002. Plant accumulation of potentially toxic elements in sewage sludge as affected by soil organic matter level and mycorrhizal fungi. Environ. Pollut. 6: 293–300.
29.Papa, S., Bartoli Pellegrino, G., and Fioretto, A.A. 2010. Microbial activities and trace element contents in an urban. Soil Environ. 165: 193–203.
30.Sandaa, R.A., Torsvik, V., and Enger, A. 1999. Analysis of bacterial communities in heavy metal-contaminated soils at different levels of resolution. FEMS Microbiol. Ecol. 30: 237-51.
31.Verma, R.K., Yadav, D.V., Singh, C.P., Suman, A., and Gaur, A. 2010. Effect of heavy metals on soil respiration during decomposition of sugarcane *(Saccharum officinarum L.)* trash in different soils. Plant Soil Environ. 56: 76–81.
32.Zarei, M., Wubet, T., Schafer, S.H., Savaghebi, G.R. Salehi Jouzani, G., Khayam Nekouei, M., and Buscot, F. 2010. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in relation to soil chemical properties and heavy metal contamination. Environ. Pollut. 158: 2757-2765.

J. of Soil Management and Sustainable Production, Vol. 4(1), 2014
http://ejsms.gau.ac.ir

Soil biologic quality as influenced by lead (Pb) contamination under Centaurea (*Centaurea cyanus*) vegetation

A. Karimi[1] and *H. Khodaverdiloo[2]
[1]M.Sc. Graduated Student, Dept. of Soil Science, Urmia University,
[2]Associate Prof., Dept. of Soil Science, Urmia University
Received: 10/28/2012 ; Accepted: 10/03/2013

Abstract

Heavy metals (HMs) such as lead (Pb) enter the soil through various pathways and affect soil quality. HMs decline population, activity, and efficiency of soil microorganisms. The objective of this study was to evaluate the effect of soil Pb contamination on population, activity and functionality of microbes in a sterilized soil inoculated with species of *Glomus* fungi including *G. intraradices*, *G. mosseae* and *G. fasciculatum* and species of Pseudomonads bacteria including *P. putida*, *P. fluorescens*, and *P. aeruginosa*. Various concentrations of Pb (0, 250, 500 and 1000 mg Pb kg^{-1} soil) were uniformly added to the sterilized soil and after soil inoculation with the microbes Centaurea (*Centaurea cyanus*) was grown. This study was carried out under greenhouse condition as a randomized complete block design and in three replications. Results showed that soil bacterial population, root colonization, root dry weight substrate induced respiration and microbial carbon biomass decreased significantly ($P \leq 0.05$) as soil Pb concentration increased. Metabolic quotient (qCO_2) increased by increasing the soil Pb concentration for both the microbial treatments. However, this increase was higher in the bacterial treatment compared to fungal treatment. Results indicated higher effect of Pb contamination on the bacteria and the fungi were more tolerant. Therefore, soil Pb contamination with decreasing the growth of plant and declining of population, activity and functionality of soil microbes results in degradation of soil biological quality.

***Keywords**:* Microbial activity, Microbial population, Pb, Rhizosphere, Soil biological quality

* Corresponding Authors; Email: h.khodaverdiloo@urmia.ac.ir