Archive of SID

تنش‌های محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses in Crop Sciences
جلد دهم، شماره اول، بهار ۱۳۹۶
۱۷۱-۱۶۳
http://dx.doi.org/10.22077/escs.2017.539

اثر تنش ناشی از سطوح آلودگی سرب در گیاه یونجه در شرایط تلقیح با جدایه‌های همزیست

حسین بشارتی[1*]، اسماعیل معمار کوچه‌باغ[2]
۱. استاد مؤسسه تحقیقات آب‌وخاک کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
۲. کارشناس ارشد خاکشناسی (بیولوژی خاک).

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۲/۰۹؛ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۵/۲۴

چکیده

سرب یکی از عناصر سنگین آلاینده محیط‌زیست به‌ویژه خاک‌های کشاورزی می‌باشد. در اراضی زیر کشت لگوم‌ها آلودگی سرب می‌تواند در همزیستی بین گیاهان میزبان و باکتری‌های *ریزوبیوم*، تثبیت زیستی نیتروژن و درنهایت رشد و عملکرد گیاهان لگوم اثر سوء داشته باشد. در تحقیق حاضر ریشه یونجه حاوی گره از یونجه‌زارهای چند ساله اطراف کارخانه‌های سرب و روی جمع‌آوری و سپس باکتری‌های *ریزوبیوم* خالص سازی شدند. پژوهش در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد در دانشگاه زنجان انجام شد. مقاومت جدایه‌ها به آلودگی سرب در محیط کشت حاوی مقادیر مختلف کلرور سرب بررسی گردید. حداکثر غلظت سرب که در آن غلظت رشد جدایه‌ها قابل‌مشاهده بود، برای هریک از جدایه‌ها محاسبه و به‌عنوان شاخص **MRL** منظور گردید. بر اساس نتایج اندازه‌گیری مقاومت آن‌ها به سرب و نیز میزان کارایی آن‌ها، توان جدایه‌ها در تثبیت نیتروژن در خاک آلوده به سرب تعیین و پنج جدایه انتخاب و در آزمون گلخانه‌ای کشت یونجه (رقم همدانی) مورداستفاده قرار گرفتند. تیمارها شامل تلقیح با جدایه‌های *سینوریزوبیوم* در پنج سطح (N_6، N_{12}، N_{17}، N_{41}، N_{51} و شاهد) و غلظت سرب در پنج سطح (صفر، ۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم از منبع کلرور سرب) بودند. آزمایش گلخانه‌ای کشت یونجه به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار با هدف ارزیابی اثر سرب بر گره‌زایی و قدرت تثبیت نیتروژن باکتری‌های همزیست، انجام شد. نتایج نشان داد جدایه‌ها ازنظر میزان تحمل به سرب اختلاف معنی‌داری باهم داشته و به سه گروه حساس، نسبتاً حساس و مقاوم تفکیک شدند. کمترین وزن خشک بخش هوایی مربوط به شاهد و بیشترین مقدار آن مربوط به سویه‌های مقاوم **(N6, N12, N17, N41)** به فلز سنگین بود. با افزایش سطوح سرب در خاک، رشد و تثبیت نیتروژن و وزن خشک گیاه یونجه کاهش داشت، ولی در گیاهان تلقیح شده با سویه‌های مقاوم اثرات منفی سرب بر گیاه کمتر بود. در شاهد بدون باکتری، با افزایش سطوح سرب از صفر به ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، وزن خشک بخش هوایی یونجه حدود ۴۹ درصد کاهش داشت، درحالی‌که این کاهش در گیاهانی که با یکی از جدایه‌های مقاوم و کارایی زیاد تلقیح شده بودند به کمتر از ۷ درصد رسید. مقاومت یونجه به‌عنوان یک گیاه لگوم در مقابل تنش‌ها در مقایسه با باکتری‌های همزیست کمتر است، بااین‌وجود می‌توان با تلقیح باکتری‌های همزیست مناسب به گیاه میزبان اثرات نامطلوب عناصر سنگین بر گیاه را تا حدودی کاهش داد.

واژه‌های کلیدی: *گره‌زایی، تثبیت زیستی نیتروژن، عناصر سنگین*، خاک‌های آلوده، لگوم، گره ریشه‌ای.

مقدمه

یونجه (*Medicago sativa*) که یکی از بهترین نباتات علوفه‌ای است، سابقهٔ کشت آن به ابتدای تاریخ تمدن بشر برمی‌گردد و خاستگاه آن مرکز خاور نزدیک، آسیای صغیر، قفقاز، ایران و منطقه کوهستانی ترکمنستان بوده ولی مرکز جغرافیایی یونجه را غالباً کشور ایران می‌دانند (Yazdi-Samadi and Abdemishani, 1992). ویژگی‌هایی چون عملکرد مناسب، سازگاری با شرایط اقلیمی مختلف، خوش‌خوراکی برای دام‌ها، توانایی همزیستی تثبیت نیتروژن با *ریزوبیوم*‌ها باعث شده که کشت این گیاه به‌سرعت روبه توسعه باشد (Karimi, 1990).

* نگارنده پاسخگو: حسین بشارتی. پست الکترونیک: Besharati1350@yahoo.com.

www.SID.ir

Archive of SID

حاصلخیزی خاک یکی از عوامل مهم در تولید محصول است. نیتروژن یکی از عناصر پرمصرف موردنیاز یونجه می‌باشد که به‌مجرد تشکیل گره‌ها در روی ریشه، این گیاه قسمت اعظم نیتروژن موردنیاز خود را از هوا کسب می‌کند. مقدار نیتروژن تثبیت‌شده یونجه حدود ۶۰ تا ۵۰۰ کیلوگرم در هکتار در سال برآورد شده است (Sepehri et al., 2006). همزیستی باکتری‌های ریزوبیوم با گیاهان لگوم با تبادل پیام های مولکولی بین باکتری و گیاه همزیست آغاز می‌شود. رقم گیاه، سویه باکتری، شرایط خاک (عناصر سنگین در خاک، درجه حرارت، خشکی، تهویه، عناصر غذایی، شوری، نیترات و اسیدیته) از عوامل تأثیرگذار بر برقراری همزیستی می‌باشند (Sepehri et al., 2006).

سرب یکی از عناصر سنگین آلاینده محیط‌زیست به‌ویژه خاک‌های کشاورزی می‌باشد. امروزه سرب و آلیاژهای آن با فلزات دیگر، مصارف فراوانی در صنعت دارد. بخش عمده سربی که به خاک افزوده می‌شود به‌صورت کلرور و برومور سرب درآمده و پس از ترکیب با فسفات‌ها و کربنات‌ها از حلالیت آن کاسته شده و انتقال قابل‌توجهی در خاک نمی‌یابد، در ضمن یون دو ظرفیتی سرب در واکنش‌های تبادلی نیز شرکت کرده و از قابلیت کمی برای آبشویی و انتقال به آب زیرزمینی برخوردار است (Abdolvahabi, 1984). کارخانه‌های صنعتی که در تولیدات آن‌ها سرب به کار می‌برند و یا به نحوی از سرب استفاده می‌کنند و نیز انتشار سرب از اگزوز اتومبیل‌ها، از عوامل آلوده‌کننده محیط می‌باشند (Abdolvahabi, 1984). لذا آلودگی محیط ناشی از صنایع مذکور بیشتر در حوالی کارخانه‌های و یا در اثر ورود این مواد به رودخانه‌ها است، بدین سبب خطر آلودگی به‌طورجدی منحصر به جانداران محیط اطراف و کارکنان این صنایع می‌گردد (Abdolvahabi, 1984). قسمت اعظم سرب موجود در خاک به‌صورت نمک نسبتاً غیر محلول سولفات سرب بوده و دیگر نمک‌های آن‌که می‌توانند به‌وسیله آب نفوذی به عمق خاک منتقل شوند، درصد ناچیزی را تشکیل می‌دهد (Abdolvahabi, 1984).

کم شدن جمعیت میکروب‌های مفید در خاک‌های آلوده به سرب کنار جاده‌ها را نتیجه تغذیه این موجودات از مواد آلی خاک که حاوی سرب فراوانی به‌صورت کلاته می‌باشند، دانسته و گزارش کردند که نفوذ سرب به داخل پروتوپلاسم باکتری‌ها باعث مرگ آن‌ها می‌گردد (Tyler, 1981). گیاهان زراعی که برگ آن‌ها مورداستفاده غذایی قرار می‌گیرد، به علت وسعت زیاد برگ و تماس بیشتر با اتمسفر اطراف جاده حاوی مقدار زیادی سرب می‌باشند (Golchin, et al., 2007)، ولی این مقدار در گیاهانی که میوه آن‌ها استفاده می‌گردد، به‌مراتب کمتر است. اهمیت آلودگی این گیاهان به علت مصرف آن‌ها توسط دام‌ها، حشرات و پرندگان است، زیرا ورود سرب به زنجیره غذائی باعث سقط‌جنین در دام‌ها و مرگ‌ومیر پرندگان و حشرات بارور کننده می‌شود (Abdolvahabi, 1984).

تثبیت بیولوژیک نیتروژن به غلظت‌های کم فلزات سنگین در خاک حساس می‌باشد (Sepehri et al., 2006). در آزمایشی نتایج تأثیر کادمیم بر رشد یونجه و توان تثبیت نیتروژن توسط جدایه‌ها نشان داد کمترین مقدار عملکرد مربوط به شاهد و بیشترین مقدار آن مربوط به سویه‌های مقاوم به فلز سنگین بود (Memar Kouche-bagh and Besharati, 2012). بررسی خاک‌های آلوده به مس، روی و سرب نشان داده که در این خاک‌ها فرآیند تثبیت نیتروژن توسط باکتری‌های هتروتروف آزادزی کاهش می‌یابد (Letunova, 1985). همچنین حساسیت زیاد فرآیند تثبیت نیتروژن به فلزات سنگین در خاک‌های آلوده به لجن فاضلاب حاوی فلزات گزارش شده است (Borges and Wollum, 1981; Letunova, 1985; Skujins and Odens, 1986). ویتر و مارتنسون (Witter and Martenson, 1990) نشان دادند که آلودگی خاک با روی، سرب، نیکل، مس و کادمیم درنتیجه کاربرد لجن فاضلاب، فرآیند تثبیت نیتروژن توسط سیانوباکتری‌ها را به‌شدت کاهش می‌دهد. در تحقیقی نشان داده شد که فرآیندهای گره‌زایی و تثبیت نیتروژن گیاه شبدر سفید در خاک آلوده با کادمیم، روی و سرب به مقدار جزئی کاهش یافت (Rother et al., 1983). تحقیقات انجام‌شده در مورد اثرات فلزات سنگین بر سویا نشان داده که این فلزات سبب جلوگیری از تثبیت نیتروژن می‌شود (Borges and Wollum, 1981). در آزمایشی مشخص شد که تمام ۵۰ جدایه *سینوریزوبیوم ملیلوتی* جداشده از خاک‌های آلوده به فلز کادمیم، قادر به رشد در محیط‌های دارای غلظت‌های زیاد سرب، روی، نیکل و کادمیم بودند (Sepehri et al., 2006). در آزمایشی اثر کادمیم، مس، سرب، فلوئور و روی بر احیاء استیلن یونجه بررسی شد. فلوئور بدون تأثیر بود درحالی‌که ۴۲٪ کاهش با کاربرد ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر سرب و ۱۰۰ درصد کاهش در غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر

www.SID.ir

Archive of SID

کادمیم و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر مس، آرسنیک و روی مشاهده گردید (Porter and Sheridan, 1981).

بهره‌برداری از معادن سرب و روی و فعالیت کارخانه‌های وابسته در استان زنجان باعث انتشار عناصر سنگین ازجمله سرب در اراضی کشاورزی اطراف شده و در برخی یونجه‌زارهای این استان غلظت سرب بسیار زیاد گزارش شده است (Golchin et al., 2007). تاکنون وضعیت تثبیت بیولوژیک نیتروژن و در اراضی زیر کشت یونجه در خاک‌های آلوده اطراف معادن استان بررسی نشده است. لذا هدف از این پژوهش مطالعه اثرات آلودگی سرب بر باکتری‌های *ریزوبیوم* بومی همزیست با گیاه یونجه و تثبیت نیتروژن در این گیاه بود.

مواد و روش‌ها

تهیه جدایه‌های خالص باکتری همزیست یونجه و بررسی کارایی همزیستی آن‌ها

در پژوهش حاضر از مزارع یونجه اطراف معادن و کارخانه‌ها، گره‌های ریشه از بوته‌های سالم جمع‌آوری و باکتری‌های همزیست از گره‌های ریشه، در محیط کشت اختصاصی باکتری‌های *ریزوبیوم*[1] به روش پیشنهادی بک و همکاران (Beck et al., 1993) انجام شد. به‌منظور حصول اطمینان از همزیست بودن باکتری‌های جداسازی و خالص‌سازی شده با گیاه یونجه، آزمون آلودگی گیاه میزبان[2] صورت گرفت (Vincent, 1982). توان تثبیت نیتروژن جدایه‌های *ریزوبیومی* (جداسازی شده از ریشه گیاهان یونجه) در آزمایش گلخانه‌ای با لحاظ کردن شاهد بدون تلقیح باکتری و تیمار نیتروژنی (۳۵ و ۷۰ میلی‌گرم نیتروژن در کیلوگرم از منبع نیترات آمونیم) در گلدان‌های دو کیلوگرمی حاوی ماسه و پرلیت استریل (به نسبت ۹ به ۱) به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. پس از ۶۰ روز برداشت صورت گرفت و وضعیت گره‌بندی ریشه و وزن خشک قسمت هوایی هر گیاه اندازه‌گیری شد. میزان S.E.[3] جدایه‌ها محاسبه گردید (Memar Kouche-bagh and Besharati, 2012).

سنجش مقاومت جدایه‌ها به آلودگی سرب

برای ارزیابی مقاومت نسبی باکتری‌های *سینوریزوبیوم* به سرب از محیط کشت جامد H.M.[4] استفاده شد. مقادیر مختلف سرب (۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰، ۴۰۰، ۴۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) به شکل کلرور سرب به محیط کشت فوق اضافه گردید (Angel and Chaney, 1991). شایان‌ذکر است که محیط کشت HM شامل NaH_2PO_4 ۱۷۵ میلی‌گرم، NH_4Cl ۳۲۰ میلی‌گرم، $MgSO_4.7H_2O$ ۱۸۰ میلی‌گرم، $CaCl_2.2H_2O$ ۱۳ میلی‌گرم، $FeCl_3.6H_2O$ ۴ میلی‌گرم، Na_2SO_4 ۲۵۰ میلی‌گرم، MES ۱۱۰۰ میلی‌گرم، HEPES۱۳۰۰ میلی‌گرم و آب مقطر ۱۰۰۰ میلی‌لیتر می‌باشد. باکتری‌های موردنظر به‌صورت لکه‌گذاری در محیط‌های حاوی مقادیر مختلف سرب کشت شدند. پنج روز پس از انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد ظروف مورد بازبینی قرارگرفته و بر اساس میزان رشد و حالت کلنی در مقایسه با شاهد بدون سرب، باکتری‌ها به سه گروه مقاوم (رشد باکتری کامل و شبیه شاهد)، نسبتاً حساس (کاهش رشد باکتری نسبت به شاهد) و حساس (باکتری فاقد رشد) گروه‌بندی شدند.

بررسی اثر سرب بر توان گره‌زایی و تثبیت نیتروژن جدایه‌های سینوریزوبیوم

آزمایش گلخانه‌ای کشت یونجه به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار با هدف ارزیابی اثر سرب بر گره‌زایی و قدرت تثبیت نیتروژن باکتری‌های همزیست، انجام شد. پنج سطح سرب شامل صفر، ۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم به شکل کلرور سرب و تلقیح با پنج جدایه باکتری *سینوریزوبیوم* شامل N_6، N_{12}، N_{17}، N_{41}، N_{51} تیمارهای اعمال‌شده در کشت گلخانه‌ای یونجه بودند. شاهد بدون تلقیح و تیمار ۷۰ میلی‌گرم در کیلوگرم نیتروژن نیز به ترتیب به‌عنوان شاهد منفی و مثبت منظور شدند. باکتری‌های استفاده‌شده بر اساس مقاومت به سرب و میزان کارایی همزیستی انتخاب شدند (جدول ۳).

بذور یونجه رقم همدانی پس از ضدعفونی سطحی با محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد و جوانه‌زنی در گلدان‌ها

[1]. Yeast Mannitol Agar
[2]. Plant Infection Test
[3]. Symbiotic Efficiency
[4]. HEPES-MES

www.SID.ir

Archive of SID

کاشته شدند و هر بذر با یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون جدایه-های منتخب (با جمعیت 10^7 سلول باکتری در هر میلی‌لیتر) تلقیح گردید. شدت روشنایی اتاقک رشد ۱۰ تا ۱۲ هزار لوکس، طول روز ۱۲ تا ۱۶ ساعت، درجه حرارت روزانه ۲۸ و شبانه ۱۸ درجه سانتی‌گراد بود. ۹۰ روز بعد از کاشت، بوته‌های یونجه برداشت‌شده و وزن خشک بخش هوایی هر گیاه تعیین گردید. وضعیت گره‌بندی ریشه‌های گیاه بر اساس روش پیشنهادی وینسنت (Vincent, 1982) موردبررسی قرار گرفت. درصد نیتروژن بخش هوایی گیاه به روش کجلدال (Bremner and Mulvaney, 1982) اندازه‌گیری و مقدار نیتروژن جذب‌شده در اندام هوایی گیاه از حاصل‌ضرب غلظت نیتروژن در وزن خشک بخش هوایی به دست آمد. تجزیه‌وتحلیل آماری نتایج با استفاده از نرم‌افزار MSTAT-C انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت.

نتایج و بحث

تمام باکتری‌هایی که در این آزمایش موردبررسی قرارگرفته و در مراحل مختلف پژوهش از آن‌ها استفاده شد، بر روی سیستم ریشه‌ای میزبان گره ایجاد کردند و بین جدایه‌های *سینوریزوبیوم* ازنظر توان گره‌زایی بر روی ریشهٔ گیاه یونجه اختلاف معنی‌داری وجود داشت. بیشترین تعداد گره ۱۳ گره در بوته بوده و به جدایه‌های N_{41}، N_{43} و N_{51}، اختصاص داشت (Memar Kouche-bagh and Besharati, 2012) و سویه‌های N_1، N_3، N_{23}، دارای کمترین توان گره‌زایی بودند. همچنین نتایج ارزیابی مؤثر بودن همزیستی جدایه‌های *سینوریزوبیوم* نشان داد جدایه N_6 با ۱۵۲ درصد بیشترین و جدایه N_3 با ۲۹ درصد کمترین کارایی همزیستی را دارا بودند (Memar Kouche-bagh and Besharati. 2012). هشت جدایه (۱۷/۸ درصد از جدایه‌ها) بسیار مؤثر، ۱۷ جدایه (۳۷/۸ درصد از جدایه‌ها) مؤثر، هشت جدایه (۱۷/۸ درصد از جدایه‌ها) نسبتاً مؤثر و ۱۲ جدایه (۲۶/۷ درصد از جدایه‌ها) غیر مؤثر بودند (Memar Kouche-bagh, and Besharati, 2012).

به‌منظور ارزیابی مقاومت جدایه‌ها به آلودگی سرب، جدایه‌ها در محیط کشت جامد حاوی سطوح مختلف سرب کشت شدند و سپس بر اساس میزان رشد جدایه‌ها در مقایسه با شاهد (محیط فاقد سرب) میزان مقاومت جدایه‌ها ارزیابی گردید (Memar Kouche-bagh and Besharati, 2012). بر اساس نتایج رشد باکتری‌ها در محیط‌های حاوی سطوح متفاوت سرب، تعداد معدودی از آن‌ها تا بیشترین غلظت سرب بکار رفته در محیط کشت که معادل ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر بود مقاومت زیادی نشان داده و به‌خوبی رشد کردند (شکل ۱). شاخص MRL[1] (حداکثر غلظت سرب که در آن غلظت رشد جدایه‌ها قابل‌مشاهده بود) برای هر یک از جدایه‌ها و نیز نسبت سویه‌هایی که در سطوح مختلف سرب دارای رشد قابل‌مشاهده بودند، محاسبه گردید. لازم به ذکر است که برای محاسبه درصد سویه‌های دارای رشد قابل‌مشاهده در غلظت‌های مختلف سرب، نسبت تعداد جدایه‌های رشد کرده در محدوده مشخصی از غلظت سرب، بر تعداد کل جدایه‌های موردمطالعه تقسیم و حاصل به‌صورت درصد بیان گردید (شکل ۱). به‌طورکلی ۶/۷ درصد از باکتری‌ها که شامل جدایه‌های N12، N17 و N41 می‌باشند، دارای مقاومت بسیار زیادی ازنظر تحمل به سرب بوده و ازلحاظ رشد در محیط بیشترین سطوح سرب به‌کاررفته (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، هیچ‌گونه تفاوتی با شاهد نشان ندادند، این درحالی‌که بود که برخی جدایه‌ها دیگر در غلظت بیش از ۷۵ میلی‌گرم سرب در لیتر قادر به رشد نبودند. حدود ۶۴٪ جدایه‌ها دارای توانایی تحمل سطوح ۲۵ تا ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر سرب بودند. حدود ۳۰ درصد از جدایه‌ها توانایی تحمل تا سطح ۳۰۰ میلی‌گرم سرب بر لیتر را نشان دادند که مقاومت خوبی ازنظر تحمل سرب می‌باشد (شکل ۱).

به‌منظور ارزیابی اثر سمیت سرب بر تثبیت نیتروژن در گیاه یونجه از پنج جدایه برای تلقیح گیاهان در کشت گلخانه‌ای استفاده گردید. جدایه‌ها بر اساس نتایج اندازه‌گیری مقاومت آن‌ها به سرب و نیز میزان کارایی آن‌ها انتخاب شدند. انتخاب جدایه‌ها به نحوی بود که در بین جدایه‌های منتخب کارایی همزیستی و مقاومت به سرب دارای تنوع باشد. لذا جدایه‌ها از کارایی ۵۷ درصد تا ۱۳۹ را دارا بودند و ازنظر مقاومت هم از مقاوم تا نسبتاً حساس وجود داشت (جدول ۱).

تجزیه واریانس نتایج حاصل از اندازه‌گیری وزن خشک اندام هوایی، غلظت نیتروژن و جذب نیتروژن اندام هوایی نشان داد که اثر جدایه، سطوح سرب و نیز اثرات متقابل آن‌ها

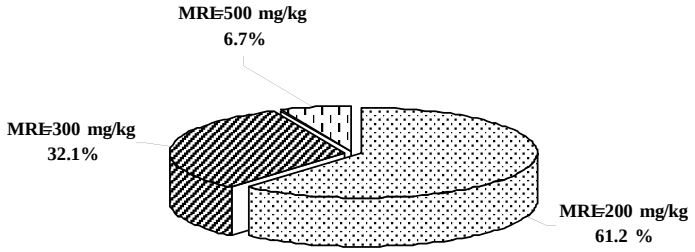
[1]. Maximum Resistant Level

www.SID.ir

Archive of SID

در سطح ۱ درصد بر شاخص‌های یادشده معنی‌دار می‌باشد (جدول ۲).

با افزایش سطوح سرب وزن خشک اندام هوایی گیاه یونجه به‌طور معنی‌دار کاهش یافت (جدول ۳). مقدار این شاخص در شاهد حداکثر و در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک، حداقل بود به‌طوری‌که این تیمار نسبت به شاهد ۲۲/۵ درصد کاهش نشان داد. علاوه بر وزن خشک اندام هوایی، غلظت نیتروژن و نیز جذب نیتروژن اندام هوایی گیاه یونجه با افزایش سطوح آلودگی سرب در گلدان‌ها به‌طور معنی‌دار کاهش داشت، به‌طوری‌که دو شاخص مذکور در سطح آلودگی ۱۰۰ میلی‌گرم سرب حداقل مقدار را دارا بودند (جدول ۳).



شکل ۱. درصد جدایه‌های دارای رشد قابل‌مشاهده در غلظت‌های مختلف سرب.

Fig. 1. Percentage of isolates which had visible growth at different Pb concentrations.

جدول ۱. مشخصات جدایه‌های *سینوریزوبیوم* مورداستفاده در آزمایش گلخانه‌ای کشت یونجه.

Table 1. Characteristics of Sinorhizobium used in alfalfa greenhouse test.

شماره جدایه Isolate No.	درصد کارایی همزیستی(SE) Symbiotic Effectiveness	درجه تحمل به سرب Degree of Tolerance to Pb
N_6	153 b	**Tolerate** مقاومa
N_{12}	57 e	**Tolerate** مقاومa
N_{17}	86 c	**Tolerate** مقاومa
N_{41}	139 a	**Tolerate** مقاومa
N_{51}	73 d	**partially sensetive** نسبتاً حساسb

جدول ۲. تجزیه واریانس اثر جدایه‌های *ریزوبیومی* و سرب بر وزن خشک، غلظت نیتروژن و مقدار جذب نیتروژن اندام هوایی یونجه.

Table 2. Analysis of variance of Rhizobium and Pb on dry weight, the concentration of nitrogen and N-uptake by alfalfa shoots.

			میانگین مربعات (MS)		
Sources of Variations	منابع تغییر	درجه آزادی Degree of Freedom	وزن خشک اندام هوایی Shoot Dry Weight	غلظت نیتروژن اندام هوایی Shoot N-Concentration	نیتروژن جذب اندام هوایی Shoot N-Uptake
Isolate	جدایه	6	0.427**	0.308**	3.033**
Pb	سرب	4	0.0550**	0.448**	0.009**
Isolate*Pb	جدایه × سرب	24	0.032**	0.081**	0.003**
Error	خطا	70	0.0001	0.006	0.001
C.V	ضریب تغییرات		1.77	2.88	3.32

Significant at 1% level ** معنی‌دار در سطح ۱ درصد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳. مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف سرب بر وزن خشک، غلظت نیتروژن و مقدار نیتروژن جذب‌شده در اندام هوایی گیاه یونجه.

Table 3. Comparison of the effects of lead on dry weight, the concentration of nitrogen and nitrogen absorbed in the shoots of alfalfa.

سرب (میلی‌گرم در کیلوگرم) Pb (mg kg^{-1})	شاخصهای اندازه‌گیری شده Measured indices: وزن خشک اندام هوایی (گرم در گلدان) Shoot Dry Weight (g pot^{-1})	غلظت نیتروژن در اندام هوایی (درصد) Shoot N-Concentration (%)	جذب نیتروژن اندام هوایی (میلی‌گرم در گلدان) Shoot N-Uptake (mg pot^{-1})
0	0.607 a	2.94 3 a	1.817 a
10	0.539 b	2.943 a	1.490 b
25	0.515 c	2.795 ab	1.453 b
50	0.502 d	2.70 b	1.456 b
100	0.471 e	2.614 c	1.223 c

در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، ازلحاظ آماری (روش دانکن) در سطح ۱ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

In each column, means with at least one common letter, are not significantly different at 1% level (Duncan Method).

مقایسه میانگین اثرات متقابل جدایه‌ها و سطوح سرب بر غلظت نیتروژن اندام هوایی نشان داد که با افزایش سطوح سرب، در مورد تمام جدایه‌ها، غلظت نیتروژن اندام هوایی گیاه کاهش یافت و این کاهش در اکثر موارد به لحاظ آماری معنی‌داری بود. بیشترین غلظت نیتروژن اندام هوایی (۳/۳٪) مربوط به شاهد (سطح صفر و پنج میلی‌گرم در کیلوگرم سرب و مصرف ۷۰ میلی‌گرم نیتروژن) و کمترین مقدار آن (۲/۴۳٪) متعلق به تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب و تلقیح با جدایه N6 بود. به‌طورکلی نتایج نشان داد که در جدایه‌های مقاوم به سرب (N12 و N17) تأثیر سطوح سرب بر غلظت نیتروژن اندام هوایی معنی‌دار نیست (جدول ۴).

به‌طورکلی اعمال سطوح مختلف سرب سبب کاهش محتوای نیتروژن اندام هوایی گیاه شده است؛ اما کاهش مقدار نیتروژن گیاه در تیمارهای تلقیح شده کمتر از شاهد (در شاهد با افزایش سطوح سرب از صفر به ۱۰۰ میلی‌گرم، نیتروژن اندام هوایی ۴۴ درصد درحالی‌که در تیمارهای تلقیح باکتری به‌طور متوسط ۳۳ درصد کاهش یافت) و نیز کمتر از تیمار نیتروژن بود (جدول ۵).

سطوح مختلف سرب باعث کاهش وزن خشک گیاه شده ولی این کاهش در جدایه‌های مختلف متفاوت بود، به‌طوری‌که بیشترین وزن خشک (۰/۸۱۲۵ گرم در گلدان) مربوط به گیاه تلقیح شده با جدایه N51 در سطح ۲۵ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم و کمترین مقدار آن (۰/۱۴۷۴ گرم در گلدان) در شاهد بدون تلقیح و سطح ۱۰۰ میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم مشاهده شد (جدول ۶).

جدول ۴. مقایسه میانگین اثرات متقابل سرب و جدایه‌های *ریزوبیومی* بر غلظت نیتروژن اندام هوایی (درصد).

Table 4. Comparison of the interactions between lead and Rhizobium on shoot nitrogen concentration (percent).

جدایه Isolate	سطوح مختلف سرب (میلی‌گرم در کیلوگرم)(mg.kg^{-1}) Levels of Pb				
	0	**5**	**25**	**50**	**100**
Blank	2.667 hijkl	2.968 def	3.000 cde	2.833 efgh	2.733 ghij
N_6	3.000 cde	2.767 ghi	2.467 mn	2.500 lmn	2.433 n
N_{12}	2.733 ghij	2.767 ghi	2.500 lmn	2.700 ghijk	2.633 ijklm
N_{17}	2.967 def	2.733 ghij	2.667 hijkl	2.800 fghi	2.533 klmn
N_{41}	3.033 bcd	3.200 ab	2.800 fghi	2.567 jklmn	2.567 jklmn
N_{51}	2.867defg	2.867 defg	3.167abc	2.633 ijklm	2.533 klmn
N_{70}	3.333 a	3.300 a	2.967 def	2.867 defg	2.867 defg

میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، ازلحاظ آماری (روش دانکن) در سطح احتمال ۱ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

In each column, means with at least one common letter, are not significantly different at 1% level (Duncan Method).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۵ .مقایسه میانگین اثرات متقابل سرب و جدایه‌های *ریزوبیومی* بر مقدار نیتروژن جذب‌شده در اندام هوایی (گرم در گلدان).

Table 5. Comparison of the interactions between lead and Rhizobium isolates on nitrogen uptake in the shoot (gram per pot).

جدایه	**Levels of Pb** ($mgkg^{-1}$) **سطوح مختلف سرب** (میلی‌گرم در کیلوگرم)				
Isolate	**0**	**5**	**25**	**50**	**100**
Blank	0.007 q	0.006 r	0.005 s	0.004 st	0.004 t
N_6	0.022 c	0.014 j	0.008 q	0.012 lm	0.015 i
N_{12}	0.011 mn	0.009 op	0.013 ki	0.014 ij	0.009 p
N_{17}	0.019 ef	0.016 h	0.019 de	0.019 de	0.014 ij
N_{41}	0.020 d	0.017 gh	0.014 ij	0.011 n	0.010 no
N_{51}	0.019 de	0.014 jk	0.025 ab	0.018 fg	0.013 jk
N-70	0.026 a	0.025 b	0.014 ij	0.020 d	0.017 h

میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، ازلحاظ آماری (روش دانکن) در سطح ۱ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

In each column, means with at least one common letter, are not significantly different at 1% level (Duncan Method).

جدول ۶. مقایسه میانگین اثرات متقابل سرب و جدایه‌های *ریزوبیومی* بر وزن خشک اندام هوایی یونجه.

Table 6. Comparison of the interactions between lead and rhizobium isolates on shoot dry weight of alfalfa.

جدایه	**Levels of Pb** ($mgkg^{-1}$) **سطوح مختلف سرب** (میلی‌گرم در کیلوگرم)				
Isolate	**0**	**5**	**25**	**50**	**100**
Blank	0.283 r	0.222 s	0.176 t	0.153 u	0.147 u
N6	0.741 cd	۰/۵۲۱۹m	0.325 q	0.500 n	0.645 h
N12	0.429 o	0.361 p	0.526 lm	0.551 k	0.349 p
N17	0.643 h	0.614 i	0.749 bc	0.710 ef	0.584 j
N41	0.677 g	0.541 klm	0.534 klm	0.445 o	0.425 o
N51	0.689 fg	۰/۴۸۹۸n	0.813 a	0.693 fg	0.549 kl
N-70	0.792 a	0.765 b	0.495 n	0.724 de	0.599 ij

میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، ازلحاظ آماری (روش دانکن) در سطح ۱ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

In each column, means with at least one common letter, are not significantly different at 1% level (Duncan Method).

از بین باکتری‌های موردمطالعه در این پژوهش که از اراضی آلوده به عناصر سنگین در استان زنجان جمع آوری شده بودند، حدود ۶۴٪ جدایه‌ها دارای توانایی تحمل تا غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر سرب، حدود ۳۰ درصد از جدایه‌ها توانایی تحمل تا سطح ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سرب و ۶/۷ درصد از آن‌ها نیز که شامل سویه‌های N12، N17 و N41 می‌باشند، دارای مقاومت بسیار زیادی ازنظر تحمل سرب بودند که تا آخرین سطح اعمال‌شده سرب (۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) رشد قابل‌ملاحظه‌ای داشتند و تفاوتی با شاهد نشان ندادند (شکل ۱). توانایی میکروارگانیسم‌ها جهت رشد و تکثیر در محیط‌های آلوده به فلزات سنگین به ویژگی‌های ژنتیکی و فیزیولوژیک آن‌ها بستگی دارد (Angel and Chaney, 1991). دلایل متعددی برای تحمل و مقاومت گروه‌های میکروبی به فلزات سنگین ارائه‌شده‌اند که ترشح پلی-ساکاریدهای برون سلولی، تولید برخی متابولیت‌های آلی با خاصیت کلات کنندگی، تولید پروتئین‌های درون‌سلولی، تغییر شکل شیمیایی فلزات سنگین توسط میکروب‌ها (اکسایش، احیا، متیلاسیون و دمتیلاسیون)، جذب زیستی فلز ازجمله این دلایل می‌باشند (Gadd, 1986, Gadd, 1986). تفاوت در مقاومت باکتری‌های *ریزوبیوم* به عناصر سنگین در برخی مطالعات قبلاً گزارش شده است (Memar Kouche-bagh and Besharati, 2012; Sepehri et al., 2006).

در پژوهش حاضر با افزایش سطوح سرب در خاک، رشد و تثبیت نیتروژن و وزن خشک گیاه یونجه کاهش نشان داد ولی در گیاهان تلقیح شده با سویه‌های مقاوم اثرات منفی سرب بر گیاه کمتر بود، به‌طوری‌که در شاهد بدون باکتری هنگامی‌که سطح سرب از صفر به ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم

www.SID.ir

Archive of SID

افزایش یافت وزن خشک بخش هوایی یونجه حدود ۴۹ درصد کاهش نشان داد، درحالی‌که این کاهش در خصوص گیاهانی که با یکی از جدایه‌های مناسب تلقیح شده بود به کمتر از ۷ درصد رسید.

آلودگی ناشی از فلزات سنگین در خاک رشد گیاه، باکتری و درنهایت همزیستی گیاه لگوم و باکتری‌های *ریزوبیوم* را با مشکل روبرو نموده و سبب کاهش تثبیت نیتروژن می‌گردد. البته مقاومت میکروارگانیسم‌های همزیست با گیاهان در برابر تنش‌های محیطی بیشتر از گیاهان میزبان آن‌ها می‌باشد (Zahran, 1999). تنش‌های محیطی مراحل اولیه همزیستی و انتقال پیام‌ها و سیگنال‌ها بین گیاه و باکتری *ریزوبیوم* را دچار اختلال می‌نماید (Hungria et al., 1991). در جدایه‌های مقاوم به فلزات سنگین به دلیل تحمل ذاتی آن‌ها به این فلزات، رشد گیاه بیش از باکتری تحت تأثیر آلودگی فلز سنگین قرار می‌گیرد، به‌عبارت‌دیگر کاهش حجم توده گیاهی بیشتر از کاهش تثبیت نیتروژن و انتقال آن از گره‌ها به بخش هوایی گیاه است (Ibekwe et al., 1995). سمیت ناشی از غلظت زیاد فلزات سنگین در خاک سبب جلوگیری رشد و توسعه ریشه می‌شود (Ibekwe, et al., 1996).

آنجل و چانی (Angel and Chaney, 1991) اظهار داشتند سمیت کادمیم بر گیاه یونجه بیشتر از *ریزوبیوم*‌های همزیست با آن است. نتایج این تحقیق نشان داد می‌توان با تلقیح باکتری‌های همزیست مناسب به گیاه میزبان اثرات نامطلوب عناصر سنگین بر گیاه را تا حدودی کاهش داد.

نتیجه‌گیری

بسیاری از اراضی زیر کشت یونجه در استان زنجان که در اطراف معادن و کارخانه‌های سرب و روی واقع‌شده‌اند، آلوده به عناصر سنگین ازجمله سرب می‌باشند. آلودگی سرب می‌تواند بر همزیستی بین گیاه یونجه و باکتری‌های همزیست آن (سینوریزوبیوم)، تثبیت زیستی نیتروژن و نهایتاً رشد گیاه اثر نامطلوب داشته باشد. تاکنون پژوهشی در این خصوص در این اراضی انجام نشده است. پژوهش حاضر نشان داد که با افزایش سطوح سرب، رشد و تثبیت نیتروژن و وزن خشک گیاه یونجه کاهش یافت ولی در تلقیح گیاهان با باکتری‌های همزیست که مقاوم به سرب بوده و کارایی بالایی نیز دارند می‌تواند اثرات نامطلوب سرب بر گیاه را تا حدودی کاهش دهد. به‌طوری‌که در گیاهان شاهد تلقیح نشده با باکتری (شاهد) با افزایش سطوح سرب از صفر به ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، وزن خشک بخش هوایی یونجه حدود ۴۹ درصد کاهش داشت، درحالی‌که این کاهش در گیاهانی که با یکی از جدایه‌های مقاوم و کارایی زیاد تلقیح شده بودند به کمتر از ۷ درصد رسید. با وجود آن‌که مقاومت گیاهان لگوم ازجمله یونجه در مقابل تنش‌ها در مقایسه با باکتری‌های همزیست کمتر است، ولی نتایج این تحقیق مشخص نمود که می‌توان با تلقیح باکتری‌های همزیست مناسب (مقاوم به سرب و با کارایی همزیستی بالا) به گیاه میزبان اثرات نامطلوب عناصر سنگین بر گیاه را تا حدودی کاهش داد.

منابع

Abdolvahabi, A. 1984. Distribiution of Pb in plant and soil. Tehran University Press, 127p. [In Persian].

Angel, J.S., Chaney, R.L., 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., Materon, L.A., Afandi, F., 1993. Practical *Rhizobium*–legume Technology Manual. Technical Manual. No.19. ICARDA, Aleppo.

Bremner, J.M., Mulvaney, C.S., 1982. Nitrogen total. pp. 595- 624. In: Page, A. L., Miller R. H., D. R. Keeney (eds.). Methods of soil analysis. Part 2. Chemical analysis. American Society of Agronomy Inc. and Soil Science Society of American Inc. Madison, W I.

Borges, A., Wollum, A., 1981. Effect of cadmium on symbiotic soybean plant. Journal of Environmental Quality. 10, 216-221.

Brockwell, J., 1981. A strategy for legume nodulation research in developing regions of the old world. Plant and Soil. 58, 367-382.

Eivazi, F., 2003. Nitrogen fixation of soybean and alfalfa on sew aye sludge an ended soils. Agriculture, Ecosystem and Environment. 30(1-2), 129-136.

Gadd, G.M., 1986. Immobilization of ions biosoiption, In: H. Eceles and S. Hunt (eds.),

www.SID.ir

Archive of SID

Soil Biology and Biochemistry, Vol. 37, Cheiohester, Ellis Horwood, PP: 135-147.

Gadd, G.M., 1986. Microbs in extreme environment. In: Heerbert, R.A., Codd, G.A., (eds.), A Comprehensive Treatise. London, Academic Press. pp. 83-110.

Golchin, A., Safavi, A., Atashnama, K., 2007. Zn and Pb Hyperaccumulator plant species native to Zanjan province. Proceeding of Soil, Environment and Sustainable development congress**.** Karaj**,** Iran. [In Persian with English Summary]**.**

Hungria, M., Josephand, C.M., Philips, D.A., 1991. *Rhizobium* nod-gene inducers exuded naturally from roots of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant Physiology. 97, 759-764.

Ibekwe, A.M., Angle, J.S., Chaney, R.L., Van Berkum, P., 1995. Sewage sludge and heavy metal effects on nodulation and nitrogen fixation in legumes. Journal of Environmental Quality. 24, 1199-1204.

Ibekwe, A.M., Angle, J.S, Chaney, R.L, Van Berkum, P., 1996. Sewage sludge and heavy metal effects on nodulation and nitrogen fixation in legumes. Journal of Environmental Quality. 25, 1032-1040.

Karimi, H. 1990. Cultivation and Breeding of Forage Crops. Tehran University Press. [In Persian].

Letunova, S.V., Umarov, M.M., Niyazova G.A., Melekhin, Y.I., 1985. Nitrogen fixation activity as a possible criterion for determining permissible concentration of heavy metals in soil. Soviet Soil Science. 17, 88-92.

Martenson, A.M., Witter, E., 1990. The influence of various soil amendments on nitrogen fixation microorganisms in a long-term field experiment with special reference to sewage sluge. Soil Biology and Biochemistry. 22, 977-982.

Memar Kouche-bagh, S., Besharati, H. 2012. Effects of Cd pollution alfalfa growth and nitrogen fixation of native isolates of *Sinorhizobium meliloti*. Iranian Journal of Soil Research (Soil and Water Science). 26(3), 289-301. [In Persian with English Summary].

Porter, J.R., Sheridan, R.P., 1981. Inhibition of nitrogen fixation in alfalfa by Arsenat, Heavy metals fluoride, and simulated acid rain. Plant Physiology. 68, 143-148.

Rother, J.A., Millbank, J.W., Thornton, I.. 1983. Nitrogen fixation by white clover (*Trifolium repens*) in grass land soils contaminated with cadmium, lead and zinc. Journal of Soil Science. 34, 127-136.

Sepehri, M., Saleh Rastin, N., Asadi Rahmani, H., Alikhani, H., 2006. Effects of soil pollution by cadmium on nodulation and nitrogen fixation ability of native strains of *Sinorhizobium meliloti*. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources, Water and Soil Science; 10 (1), 153-163. [In Persian with English Summary].

Skujins, J., Odens. 1986. Sensitivity of soil nitrogenasa to the presence of low concentration of metal ions, pp. 664-667. In: Bollag J.M. and G. Stotzky (eds.) Proceeding of the 4th International Symposium on Microbial Ecology, Ljubiliana.

Tyler, G., 1981. Heavy metals in soil biology and biochemistry. PP. 371-413. In: Paul, E.A., Ladd, J.N. (eds.). Soil Biochemistry, Toronto, Canada.

Vincent, J.M., 1982. Nitrogen fixation in legume. Academic Press.

Witter, E. 1992. Heavy metal concentration in agricultural soils critical to microorganisms. Report no. 4079. Swedish Environmental Protection Agency. Solana.

Yazdi-Samadi, B., Abdemishani, S., 1992. Crop plants breeding. Tehran University Press. [In Persian].

Zahran, H.H., 1999. *Rhizobium*-Legume symbiosis and nitrogen fixation under sever conditions and in an arid climate. Microbiological and Molecolar Biology. 63, 968-989.

www.SID.ir