نشریه دانش آب و خاک / جلد23 شماره2 صفحه‌های 111 تا 124/ سال 1392

روند تغییرات کربن زیتوده، شناسه‌های اکوفیزیولوژیک، تنفس پایه و برانگیخته خاک در انکوباسیون با سطوح گوناگون سرب

ناصر شیرزاده[1*]، ناصر علی‌اصغرزاد[2]و نصرت‌اله نجفی[3]

تاریخ دریافت: 90/09/28 تاریخ پذیرش: 91/05/01

[1]-کارشناس ارشد بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، گروه علوم خاک، دانشگاه تبریز

[2]-استاد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

[3]-دانشیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

[*]مسئول مکاتبه: Email: N.shirzad.agr@gmail.com

چکیده

فلزهای سنگین پیامدهای جبران‌ناپذیری بر بوم‌شناسی میکروبی خاک دارند و در پژوهش‌های گوناگونی پیامد فلزهای سنگین بر ویژگی‌های میکروبی خاک بررسی شده است. در این پژوهش برخی شناسه‌های میکروبی برای بررسی پیامدهای زیانبار سرب و روند تغییرات آنها طی شش ماه انکوباسیون خاک با سطوح گوناگون سرب بر سلامت خاک اندازه‌گیری شدند. سطوح گوناگون سرب شامل 0، 100، 200، 300، 400 و 500 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم خاک از نمک نیترات سرب به خاک افزوده شد و در دوره‌های انکوباسیون 3، 15، 30، 90 و 180 روز، کربن زیتوده، تنفس پایه، تنفس برانگیخته و دو شاخص اکوفیزیولوژیک (بهر میکروبی و بهر متابولیک) به‌عنوان شناسه‌های بسیار حساس زیستی در برابر آلاینده‌ها اندازه‌گیری شدند. در روزهای نخست و در سطوح پایین سرب، تنفس برانگیخته ابتدا افزایش نشان داد ولی با افزایش غلظت سرب، این شاخص نیز مانند دیگر شناسه‌ها کاهش یافت. با گذشت زمان سطوح پایین‌تر سرب نیز باعث کاهش معنی‌دار تنفس برانگیخته شد. در پایان انکوباسیون، در نتیجه القای تحمل در ریزجانداران خاک، با وجود کاهش منابع کربن در دسترس ریزجانداران، تنفس میکروبی وکربن زیتوده خاک در برابر روز 90 بیشتر بود. بر پایه یافته‌های این پژوهش، محدوده غلظت‌های 100 تا 300 میلی‌گرم سرب افزوده شده بر کیلوگرم خاک، محدوده غلظت بحرانی سرب خاک برای شناسه‌های کیفی بررسی شده است، به‌گونه‌ای که در غلظت‌های بالاتر از آن، پیامدهای زیانبار سرب به‌گونه معنی‌داری نمایان شد.

واژه‌های کلیدی: آلودگی سرب، تنفس میکروبی خاک، شناسه‌های اکوفیزیولوژیک، کیفیت خاک.

Changes in Microbial Biomass Carbon, Ecophysiological indices, Basal Induced Respiration of Soil After Incubation with -Respiration and Substrate Levels Different Lead

N Shirzadeh[1*], N Ali-Asgharzad[2] and N Najafi[3]

Received: 19 December 2011 Accepted: 22 July 2012
[1-]M.Sc. Student, Soil Biol. and Biotecnol., Faculty of Agric., Univ. of Tabriz, Iran.
[2]-Prof., Dept. of Soil Sci., Faculty of Agric., Univ. of Tabriz, Iran.
[3]-Assoc. Prof., Dept. of Soil Sci., Faculty of Agric., Univ. of Tabriz, Iran.
[*]corresponding Author Email: N.shirzad.agr@gmail.com

Abstract

Heavy metals have adverse effects on soil microbial ecology. Impact of heavy metals on microbial populations has been investigated worldwide. In this study, some microbial indices were determined to evaluate the negative effects of lead on soil health during the six-month incubation of soil with different levels of lead. Lead was added to the soil at rates of 0, 100, 200, 300, 400 and 500 $mgkg^{-1}$ as $Pb(NO_3)_2$. Microbial biomass carbon, basal respiration, substrate induced respiration and two ecophysiological indices (metabolic quotient and microbial quotient) were measured as the most sensitive biological indices of soil against the pollutant after incubation times of 3, 15, 30, 90 and 180 days. In initial days of incubation and in low levels of lead, substrate induced respiration was increased. But this index was decreased by the increment of lead pollution level. By increasing the incubation time, low levels of lead also decreased substrate induced respiration. At 180 days of incubation despite of decreasing in available carbon sources, increment in some of indices such as microbial respiration and microbial biomass carbon were observed as a result of community tolerance induction. Based on our results, Pb concentration range of 100-300 $mgPbkg^{-1}$ soil can be considered as critical range of Pb for quality indices in this soil at which negative effect was markedly observed.

Keywords: Ecophysiological indices, Lead contamination, Soil microbial respiration, Soil quality.

مقدمه

با پیشرفت سریع صنایع گوناگون مانند معدن‌کاوی، ذوب فلزها، ساخت کود، ساخت آفت‌کش‌ها و صنایع پتروشیمی، فلزهای موجود در پساب این صنایع به‌گونه مستقیم و غیرمستقیم به‌گونه فزاینده‌ای وارد محیط زیست شده‌اند (انصاری و مالک 2007). فعالیت‌های صنعتی و کشاورزی منجر به انتشار فلزهای سنگین در محیط و آلودگی خاک، آبهای زیرزمینی، رسوبات و آبهای سطحی می‌شوند (بهره‌مند و همکاران 1381). فلزهای سنگین حتی در غلظت‌های کم، سمی، سرطان‌زا و یا جهش‌زا هستند (گله‌دار 1387).

فلزهای سنگین بیشتر از راه تغییر تنوع گونه‌ای و فعالیت ریزجانداران، بر بوم‌شناسی میکروبی خاک مؤثر واقع می‌شوند (فروستگارد و بات 1996). اندازه‌گیری کمّی ویژگی‌های بیولوژیک خاک مانند کربن زیتوده، تنفس، فعالیت‌های آنزیمی و ATP برای بررسی پیامد فلزهای سنگین بر میکروفلورای خاک می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند (بروکس و همکاران 1986، بابیچ و استوتزکی 1985).

ریزجانداران خاک کارکرد ویژه‌ای در چرخه عناصر غذایی و تغذیه گیاه، پیدایش و نگهداری ساختمان خاک، سم‌زدایی مواد شیمیایی زیانبار، کاهش بیماری‌های گیاهی و رشد گیاه دارند (فیلیپ 2002). زیتوده میکروبی خاک کارکرد ویژه‌ای در تجزیه مواد آلی، چرخه عناصر و پایداری اکوسیستم دارد و به غلظت آلاینده‌ها در خاک حساس است. با رسیدن آلاینده‌ها به اکوسیستم خاک، ریزجانداران خاک به شدت تحت تأثیر قرار می‌گیرند در حالی که تغییرات قابل توجهی در میزان مواد آلی خاک دیده نمی‌شود، لذا شناسه‌های اکوفیزیولوژیک[1] جهت بررسی این تغییرات مطرح می‌شوند. افزون بر ارزیابی کمی زیتوده میکروبی، بررسی چگونگی حالت فیزیولوژیک جمعیت میکروبی نیز اهمیت زیادی دارد. حالت فیزیولوژیک ریزجانداران خاک بستگی به وضعیت تغذیه‌ای، نوع خاک، آب و هواو پیامد آلاینده‌ها در خاک دارد. مقالات کمی در باره حالت‌های فیزیولوژیکی ریزجانداران خاک ارائه شده است. بهر متابولیک[2] و بهر میکروبی[3] از گروه شناسه‌های اکوفیزیولوژیک هستند که برای بررسی وضعیت ریزجانداران خاک ارزیابی می‌شوند

بهر متابولیک برای ارزیابی پیامد کیفی ویژگی‌ها و تیمارهای گوناگون بر زیتوده خاک به کار رفته و همچنین معیار غیرمستقیمی از کارایی انرژی میکروبی است یا به سخن دیگر بهر متابولیک عبارت از CO_2 حاصل از تنفس میکروبی در واحد وزن زیتوده میکروبی خاک است. تغییرات بهر متابولیک بستگی به تغییرات ترکیب جمعیتی یا به تغییرات بستره و پیش‌ماده‌ای که یک جمعیت غیرقابل تغییر استفاده می‌کند یا هر دو دارد. گزارش‌های انجام شده روی پاسخ بهر متابولیک به آلودگی فلزهای سنگین ناهمخوانی دارند. برخی از پژوهشگران افزایش بهر متابولیک (بروکس و همکاران 1986) و برخی دیگر کاهش بهر متابولیک (بات و همکاران 1991) را با افزایش آلودگی گزارش کرده‌اند. این شناسه در خاک‌های آلوده شده با فلزهای سنگین بیشتر از خاک‌های غیرآلوده گزارش شده است (شاندر و بروکس 1991). هر چه بهر متابولیک کمتر باشد، چرخه‌های میکروبی کارآمدتر هستند. تنش‌هایی مانند کاربرد علف‌کشها سبب افزایش بهر متابولیک می‌شود. همچنین بهر متابولیک کارایی مصرف سوبسترای بومی خاک توسط جامعه میکروبی را نشان می‌دهد (اندرسون و دامش 1990) و می‌تواند شناسه حساسی برای نشان دادن سمیت فلزهای سنگین تحت شرایط طبیعی باشد (واردل و گانی 1995).

بهر میکروبی یا نسبت کربن میکروبی به کربن آلی خاک، می‌تواند شناسه‌ای حساس برای بررسی کیفیت خاک باشد. این نسبت رابطه کربن میکروبی و کربن آلی را نشان می‌دهد و به کمک آن می‌توان دینامیک کربن در خاک را بررسی کرد. با اینکه کربن زیتوده ارتباط نزدیکی با مقدار ماده آلی دارد، ولی زیتوده از طرفی تحت تأثیر زیست‌فراهمی بستره تجزیه‌پذیر و از طرف دیگر تحت تأثیر محیط شیمیایی و ساختار فیزیکی (نقش حفاظتی) می‌باشد و عواملی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها بر روی آن تأثیر بسیار منفی دارند، در حالی که این مواد تأثیر چندانی بر مقدار مواد آلی خاک ندارند. بهر میکروبی با آلوده شدن خاک کاهش می‌یابد (بروکس 1995). در بوم‌شناسی میکروبی، تنفس پایه و تنفس برانگیخته به خوبی شناخته شده و به‌گونه

[1] Ecophysiological indices
[2] Metabolic quotient
[3] Microbial quotient

وسیعی برای اندازه‌گیری و ارزیابی فعالیت میکروبی خاک بکار رفته‌اند. افزون بر این، تنفس برانگیخته یکی از روش‌های پایه‌ای برای برآورد کمی زیتوده میکروبی خاک به‌عنوان بخش بسیار فعال و ناپایدار کربن آلی خاک بررسی شده است. تنفس می‌تواند نشان‌دهنده شدت آلودگی خاک باشد که در آن سطوح مصرفی اکسیژن یا دی‌اکسیدکربن رها شده از یک وزن ویژه خاک اندازه‌گیری می‌شود.

هدف از این پژوهش بررسی پیامد آلودگی سرب بر برخی شناسه‌های زیستی خاک و تغییرات تحمل ریزجاندارن خاک مورد آزمایش در دوره‌های پس از آلودگی خاک و همچنین تعیین غلظت بحرانی سرب افزوده شده برای شناسه‌های زیستی است.

مواد و روش‌ها

خاک آزمایش شده

نمونه‌های خاک از عمق 0 تا 20 سانتی‌متری از ایستگاه تحقیقاتی خلعت‌پوشان تبریز برداشته شد و برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مانند بافت، pH، EC، کربنات کلسیم معادل، کربن آلی و مقدار فسفر فراهم اندازه‌گیری شد. pH و EC در عصاره گل اشباع، کربنات کلسیم معادل به روش تیتراسیون برگشتی (لوپرت و سوارز 1996)، تعیین بافت به روش هیدرومتر (گی و بادر 1986)، کربن آلی به روش والکلی بلک (نلسون و سامرز 1982) و فسفر فراهم خاک به روش اولسن و سامرز (1982) اندازه‌گیری گردید.

اعمال تیمارها

حدود 2 کیلوگرم خاک گذرانده شده از الک چهار میلی‌متری در گلدان‌های پلاستیکی ریخته شد. پس از اندازه‌گیری رطوبت ظرفیت مزرعه‌ای (معادل 25 KPa) با دستگاه صفحه فشاری، رطوبت خاک به 50 درصد ظرفیت مزرعه رسانده شده و به مدت 14 روز در دمای 25 درجه سلسیوس انکوباسیون گردید. با این کار فعالیت‌های میکروبی به تعادل می‌رسند (لیاو و همکاران 2005). سطوح گوناگون سرب شامل 0، 100، 200، 300، 400 و 500 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم خاک از نمک نیترات سرب در دو تکرار به خاک گلدان‌ها افزوده شده و برای ایجاد غلظت‌های برابر نیترات و جلوگیری از پیامدهای سطوح نابرابر نیترات، نیترات کلسیم در غلظت‌های وارونه بالا به گلدان‌ها افزوده شد و نمونه‌ها به مدت 180 روز در دمای 25 درجه سلسیوس و رطوبت 70 درصد ظرفیت مزرعه انکوباسیون گردیدند (دیاز-راوینا و بات 1996). در زمانهای 3، 15، 30، 90 و 180 روز از انکوباسیون، در نمونه‌های تیمار شده با سرب شناسه‌های میکروبی اندازه‌گیری شدند.

اندازه‌گیری شناسه‌های میکروبی

برای اندازه‌گیری کربن زیتوده خاک از روش تدخین- استخراج[1] (اسپارلینگ و وست 1988) بهره‌گیری شد. در آغاز، خاک مرطوب مزرعه با کلروفرم به مدت 24 ساعت در درون دسیکاتور تدخین شد. سپس خاک تدخین شده، با محلول عصاره‌گیر سولفات پتاسیم نیم مولار به مدت 30 دقیقه تکان داده شده و عصاره‌گیری شد. همین کار با خاک شاهد (تدخین نشده) هم انجام شد. کربن آلی عصاره‌ها به روش والکلی بلک (نلسون و سامرز 1982) اندازه‌گیری شد که در آن راندمان بازیابی کربن زیتوده 35% بود و از روی تفاوت کربن آلی استخراج شده از خاک نمونه‌ها (تدخین شده) و خاک شاهد (تدخین نشده) مقدار کربن زیتوده میکروبی بر پایه $mgC_{mic}100g^{-1}dm$ برآورد شد.

بهر متابولیک از بخش کردن کربن آزاد شده از تنفس پایه بر کربن زیتوده، بر پایه $mgCO_2\text{-}Cg^{-1}C_{mic}h^{-1}$ و بهر میکروبی از بخش کردن کربن میکروبی بر کربن آلی خاک به دست آمد (مارتنز 1991).

برای پایه با بهره‌گیری از روش ایزرمایر (1952) بهبود یافته توسط جاجی (1976)، نمونه خاک مرطوب مزرعه به درون ظروف شیشه‌ای مخصوص در چهار تکرار ریخته شد و در کنار محلول هیدروکسید سدیم

[1] Fumigation extraction

0/1 مولار به مدت 5 روز در دمای 25 درجه انکوباسیون گردید. پس از پایان انکوباسیون، بالون‌های دارای سود با HCl 0/1 مولار تیترشدند و مقدار تنفس پایه بر پایه $mgCO_2g^{-1}dm24h^{-1}$ برآورد شد. برای اندازه‌گیری تنفس برانگیخته با بهره‌گیری از روش ایزرمایر (1952)، 80 میلی‌گرم گلوکز به 20 گرم خاک افزوده شده و نمونه‌ها به مدت 14 ساعت در درون ظروف سربسته (همانند اندازه‌گیری تنفس پایه) انکوباسیون شدند و مقدار CO_2 رها شده بر اثر تنفس ریزجانداران خاک بر پایه $mgCO_2g^{-1}dmh^{-1}$ برآورد شد.

طرح آزمایش و آزمون‌های آماری

آزمایش به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی و در چهار تکرار شامل سرب در شش سطح و زمان انکوباسیون در پنج سطح انجام شد. داده‌های بدست آمده از آزمایش‌ها با بهره‌گیری از نرم‌افزارهای MSTATC و SPSS تجزیه و تحلیل شده و مقایسه میانگین‌ها با بهره‌گیری از آزمون چنددامنه‌ای دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

ویژگی‌های فیزیکی وشیمیایی

برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک بررسی شده در جدول 1 آمده است.

جدول1-برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد آزمایش

PH	8/28
$EC(dSm^{-1})$	./698
کربنات کلسیم معادل(%)	8/5
فسفر فراهم (mgkg-1)	5/6
کربن آلی(%)	0/85

پیامد فلزهای سنگین در ایجاد تحمل ریزجانداران خاک بستگی به زیست‌فراهمی آنها برای ریزجانداران دارد. وانگ و همکاران (2007) رابطه منفی بین فعالیت و تنوع باکتری‌ها با فلزات سنگین قابل استخراج با نیترات آمونیوم را گزارش کردند. همچنین دیاز-راوینا و همکاران (2007) گزارش کردند که تأثیر فلزات سنگین در ایجاد تحمل در ریزجانداران بستگی به زیست‌فراهمی آنها دارد. بنابراین باید فراهمی سرب برای ریزجانداران خاک آزمون شود. میزان سرب فراهم خاک بررسی شده بازمان کاهش یافته و در زمان 30 روز پس از انکوباسیون به تعادل نسبی می‌رسد (علی‌اصغرزاد و همکاران 2011). میزان سرب فراهم در جدول 2 آمده است.

جدول2-میانگین سرب فراهم، 30 روز پس از انکوباسیون در سطوح گوناگون سرب افزوده شده

سرب افزوده شده ($mgkg^{-1}$)	سرب فراهم ($mgkg^{-1}$)	درصد سرب فراهم
0	0	0
100	30/19	30/19
200	81/14	40/57
300	136/59	45/53
400	199/65	49/91
500	261/55	52/31

شناسه‌های میکروبی

بر پایه نتایج تجزیه واریانس در همه شناسه‌های میکروبی بررسی شده، اثرهای اصلی و متقابل سرب و زمان انکوباسیون در سطح احتمال 1% معنی‌دار بودند. نتایج تجزیه واریانس در جدول 3 آمده است.

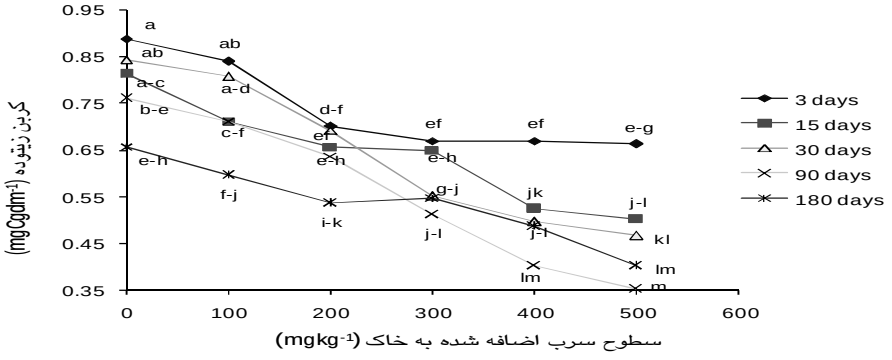
جدول3- تجزیه واریانس پیامد سطوح آلودگی و دوره‌های انکوباسیون بر بهر متابولیک، بهر میکروبی، تنفس پایه، تنفس برانگیخته و کربن زیتوده

منبع تغییر	درجه آزادی	بهر متابولیک	بهر میکروبی	تنفس پایه	تنفس برانگیخته	کربن زیتوده
سطوح سرب	5	2/28**	64/69**	59/24**	206/16**	64/69**
دوره انکوباسیون	4	5/65**	32/18**	12/44**	297/93**	32/18**
سطوح سرب × دوره انکوباسیون	20	3/68**	2/093**	4/69**	30/29**	2/09**
خطای آزمایشی	90	0/069	0/077	0/0001	0/040	0/005
ضریب تغییرات %	-	12/91	10/94	1/92	7/43	10/93

** معنی‌دار در سطح احتمال 1%

کربن زیتوده

پس از 3 روز، در غلظت $200\ mgPbkg^{-1}$، کربن زیتوده به‌گونه معنی‌داری در برابر شاهد کاهش یافت (21 درصد کاهش) که این می‌تواند نشان‌دهنده از بین رفتن گونه‌های حساس میکروبی باشد. در غلظت‌های بالاتر از $200\ mgPbkg^{-1}$، تغییرات معنی‌داری در اندازه کربن زیتوده دیده نشد و تا غلظت $500\ mgPbkg^{-1}$، کربن زیتوده ثابت ماند. از آنجایی که اکثر شناسه‌های میکروبی اندازه‌گیری شده در غلظت‌های بالای سرب در روز سوم کاهش یافتند و انتظار این بود که کربن زیتوده هم کاهش یابد؛ لذا، با توجه به روش اندازه‌گیری کربن زیتوده، در روز سوم شاید در غلظت‌های بالاتر ریزجانداران کشته شده باشند ولی اندوخته کربن آلی یاخته‌ای آنها رها نشده باشد. پس از 15 روز، کربن زیتوده در غلظت $400\ mgPbkg^{-1}$ در برابر نمونه شاهد به‌گونه معنی‌داری کاهش یافت (36 درصد کاهش) و در غلظت‌های 400 و $500\ mgPbkg^{-1}$ اندازه کربن میکروبی به‌گونه معنی‌داری کمتر از روز سوم بود که نشان دهنده رها شدن اندوخته کربن آلی یاخته ریزجانداران در برابر سطوح بالای سرب است. کیلی و همکاران (1999) 47 درصد کاهش در زیتوده میکروبی و 95 درصد کاهش در فعالیت آنزیم دهیدروژناز را بعد از 15 روز انکوباسیون خاک با روی (Zn) گزارش کردند. پس از 30 روز، همانند دوره‌های قبل، کربن زیتوده در غلظت $200\ mgPbkg^{-1}$ به‌گونه معنی‌داری کاهش یافت (18 درصد کاهش) و با افزایش غلظت سرب، تا $500\ mgPbkg^{-1}$ کاهش بیشتر شد. در این دوره اندازه کربن زیتوده در غلظت‌های 300، 400 و $500\ mgPbkg^{-1}$ در برابر روز سوم به‌گونه معنی‌داری کمتر بود (شکل 1).



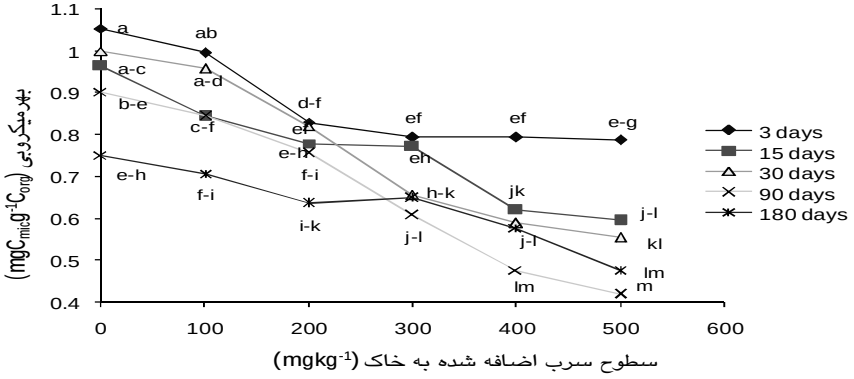
شکل 1- روند تغییرات کربن زیتوده در دوره‌های گوناگون انکوباسیون خاک با سطوح گوناگون سرب

پس از 90 روز، در غلظت $300\ mgPbkg^{-1}$ کربن زیتوده در برابر شاهد به‌گونه معنی‌داری کاهش یافت (37 درصد کاهش) و با افزایش سطوح آلودگی روند کاهشی بیشتر بود. در روز 90 در غلظت‌های 300، 400 و $500\ mgPbkg^{-1}$، اندازه کربن زیتوده در برابر روز سوم و 15 به‌گونه معنی‌داری کمتر بود که نشان‌دهنده پیامد زیانبار آلودگی سرب خاک بر توده میکروبی است. همچنین کاهش معنی‌داری در کربن میکروبی شاهد در برابر روز سوم دیده شد. پس از180 روز، کاهش اندازه کربن زیتوده در غلظت $200\ mgPbkg^{-1}$ دیده شد (19 درصد) و تا غلظت $400\ mgPbkg^{-1}$ تغییرات معنی‌دار نبود و در غلظت $500\ mgPbkg^{-1}$ دوباره کاهش یافت. پس از 180 روز تفاوت معنی‌داری در اندازه کربن میکروبی غلظت‌های 100، 200، 300 و $400\ mgPbkg^{-1}$ دیده نشد و اندازه کربن زیتوده این دوره در غلظت‌های بالاتر در برابر دیگر دوره‌ها، تفاوت کمتری با نمونه شاهد داشت که شاید وابسته به کاهش زیست‌فراهمی سرب و یا افزایش جمعیت ریزجانداران مقاوم در برابر آلودگی سرب باشد که با گذشت زمان، جمعیت میکروبی خاک به‌دلیل دریافت کردن ژن مقاومت یا سازگاری فیزیولوژیکی به سمیت سرب، افزایش می‌یابد.

اندازه کربن زیتوده در نمونه شاهد در روز 180 در برابر روزهای 3، 15 و 30 به‌گونه معنی‌داری کمتر بود که شاید وابسته به کاهش منابع کربن قابل بهره‌گیری ریزجانداران خاک بوده است. لیاو و همکاران (2005) در بررسی پیامد زیانبار کادمیوم بر زیتوده میکروبی خاک و فعالیت آنها، دیدند که در روزهای نخست، زیتوده میکروبی و فعالیت‌های متابولیکی آن کاهش یافته است ولی با گذشت زمان، تحمل به کادمیوم در جامعه میکروبی ایجاد می‌شود و اندکی از کاهش اولیه در درازمدت جبران می‌شود (کاندیلر و همکاران 2000). همچنین بررسی‌ها نشان می‌دهند که قرار دادن کوتاه‌مدت جمعیت میکروبی خاک در معرض فلزهای سنگین، باعث کاهش زیادی در فعالیت میکروبی خاک می‌شود (رونایی و کیلوگ 1996). در مکان‌هایی که سال‌ها به سطوح بالای فلزهای سنگین آلوده هستند، فعالیت میکروبی هنوز وجود دارد ولی این فعالیت در برابر مکان‌های غیرآلوده کمتراست (کاندیلر و همکاران 1996).

بهر میکروبی

نتایج محاسبه بهر میکروبی در شکل 2 آمده است.



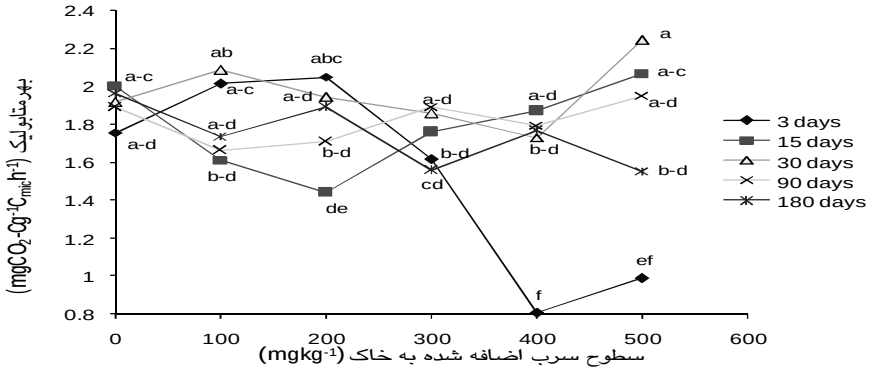
شکل 2- روند تغییرات بهر میکروبی دردوره‌های گوناگون انکوباسیون خاک با سطوح گوناگون سرب.

نسبت کربن زیتوده به کربن آلی خاک (بهر میکروبی) الگوی بسیار مشابهی با کربن زیتوده نشان داد. از آنجایی که نمونه‌های خاک بررسی شده کاملاً همسان بودند و اندازه کربن آلی کل خاک، در یک دوره

زمانی تقریباً در همه تیمارها یکسان بود، بنابراین کربن زیتوده تنها منبع تغییر بهر میکروبی بود و تغییرات بهر میکروبی کاملاً منطبق بر تغییرات کربن زیتوده بود.

بهر متابولیک

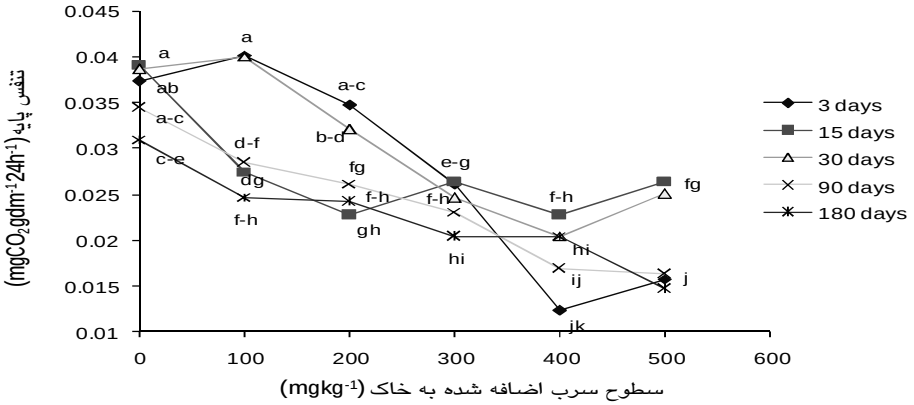
در روز سوم از آلودگی، کاهش معنی‌دار اندازه بهر متابولیک در برابر شاهد در غلظت $400\ mgPbkg^{-1}$ دیده شد (54 درصد کاهش). پس از 15 روز، بهر متابولیک در غلظت $200\ mgPbkg^{-1}$ کاهش معنی‌داری نشان داد (28 درصد کاهش). در دیگر غلظت‌های سرب، هر چند بهر متابولیک با افزایش غلظت در برابر غلظت $200\ mgPbkg^{-1}$ افزایش یافت ولی تفاوت معنی‌داری در اندازه بهر متابولیک در برابر شاهد دیده نشد. در دوره‌های 30، 90 و 180 روز از انکوباسیون، با افزایش غلظت سرب تفاوت معنی‌داری در اندازه بهر متابولیک دیده نشد. روی هم رفته تغییرات بهر متابولیک روند ویژه‌ای نشان نداد ولی در غلظت‌های بالای سرب در روز 15، 30 و 90 افزایش بهر متابولیک دیده شد (شکل 3).



شکل 3- روند تغییرات اندازه بهر متابولیک در دوره‌های گوناگون انکوباسیون خاک با سطوح گوناگون سرب

نفس پایه خاک

3 روز پس از آلودگی، در غلظت $100\ mgPbkg^{-1}$، افزایش تنفس پایه و سپس در غلظت $200\ mgPbkg^{-1}$ کاهش آن معنی‌دار نبود ولی در غلظت $300\ mgPbkg^{-1}$ در برابر شاهد به‌گونه معنی‌داری کاهش یافت (29 درصد) ودر غلظت‌های 400 و $500\ mgPbkg^{-1}$ به کمترین اندازه رسید (به‌ترتیب 67 و 57 درصد کاهش). نتایج اندازه‌گیری تنفس پایه در شکل 4 آمده است.

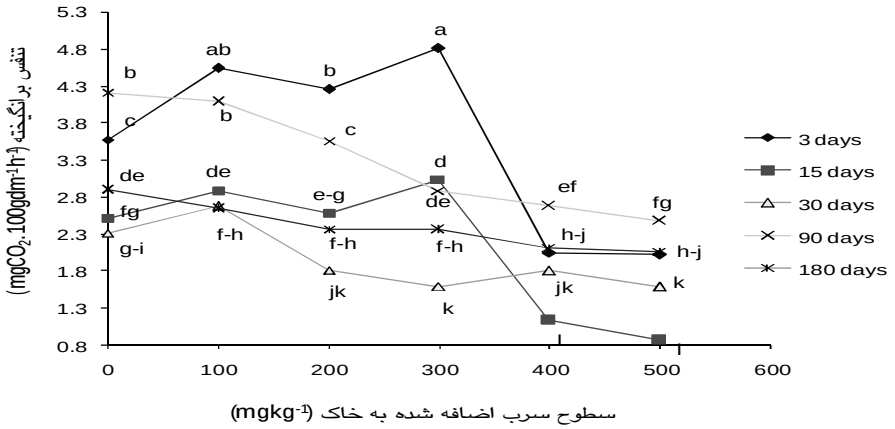


شکل 4- روند تغییرات تنفس پایه در دوره‌های گوناگون انکوباسیون خاک با سطوح گوناگون سرب.

پس از 15 روز و در غلظت $100\ mgPbkg^{-1}$، تنفس پایه کاهش معنی‌داری در برابر شاهد نشان داد (30 درصد کاهش) و تا غلظت $500\ mgPbkg^{-1}$ تغییر معنی‌داری نکرد. در غلظت‌های 400 و $500\ mgPbkg^{-1}$، تنفس پایه در برابر روز سوم افزایش معنی‌داری نشان داد که شاید وابسته به از بین رفتن گونه‌های میکروبی حساس و افزایش منابع کربن قابل بهره‌گیری در اثر رها شدن اندوخته یاخته‌ای آنها برای گونه‌های مقاوم باشد. 30 روز پس از آلودگی، کاهش تنفس میکروبی از غلظت $200\ mgPbkg^{-1}$ آغاز شد (17 درصد کاهش) و کاهش تا غلظت $500\ mgPbkg^{-1}$ بیشتر شد. همانند روز 15، در غلظت‌های 400 و $500\ mgPbkg^{-1}$، تنفس پایه بیشتر از روز سوم بود. 90 روز پس از انکوباسیون، تنفس پایه در غلظت $100\ mgPbkg^{-1}$، کاهش معنی‌داری در برابر شاهد نشان داد (18 درصد) و تا غلظت $300\ mgPbkg^{-1}$، تغییرات معنی‌داری دیده نشد و دوباره در غلظت 400 و $500\ mgPbkg^{-1}$ کاهش یافت. پس از 180 روز تنفس پایه با افزایش میزان آلودگی کاهش یافت ولی اندازه تنفس پایه در غلظت‌های 100، 200، 300 و $400\ mgPbkg^{-1}$ تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. همچنین در این دوره، در خاک شاهد تنفس پایه به‌گونه معنی‌داری پایین‌تر از روز سوم بود (17 درصد کمتر) که شاید به‌دلیل کاهش منابع کربن آلی در خاک بود. همچنین ممکن است ریزجانداران خاک به سطوح پایین سرب مقاوم شده باشند و یا زیست‌فراهمی سرب برای ریزجانداران کاهش یافته باشد، لذا تفاوت‌ها در این سطوح معنی‌دار نبود.

تنفس برانگیخته

نتایج اندازه‌گیری تنفس برانگیخته در شکل 5 نشان داده شده است.



شکل 5- روند تغییرات تنفس برانگیخته در دوره‌های انکوباسیون خاک با سطوح گوناگون سرب

پس از 3 روز، تا غلظت $mgPbkg^{-1}$ 300، تنفس برانگیخته به‌گونه معنی‌داری افزایش یافت (27 درصد افزایش) ولی در غلظت‌های 400 و $mgPbkg^{-1}$ 500 با شیب تندی کاهش یافت (به ترتیب 43 و 44 درصد کاهش در برابر شاهد). پس از 15 روز، در غلظت $mgPbkg^{-1}$ 100، افزایش معنی‌داری در تنفس برانگیخته دیده شد و تا $mgPbkg^{-1}$ 300 تفاوت، معنی‌دار نبود ولی در بالاتر از آن به شدت کاهش یافت (55 و 66 درصد کاهش به ترتیب در غلظت‌های 400 و $mgPbkg^{-1}$ 500). در این دوره، در کلیه سطوح آلودگی، اندازه تنفس برانگیخته کمتر از روز سوم بود. 30 روز پس از آلودگی، در غلظت $mgPbkg^{-1}$ 200، تنفس برانگیخته در برابر نمونه شاهد کاهش معنی‌داری یافت (22 درصد کاهش) و تا غلظت $mgPbkg^{-1}$ 500 تغییرات معنی‌داری دیده نشد. در این دوره، در کلیه سطوح آلودگی، اندازه تنفس برانگیخته کمتر از روز سوم بود که شاید به دلیل تأثیر بیشتر آلودگی و کاهش ریزجانداران نسبت به روز سوم باشد اما نسبت به روز 15 و در غلظت‌های 400 و $mgPbkg^{-1}$ 500 این اندازه بیشتر بود که شاید به دلیل سازگاری ریزجانداران به سرب نسبت به روز 15 باشد. افزایش تحمل در ریزجانداران پس از افزوده شدن سرب، در نتیجه توانایی رقابتی متفاوت ریزجانداران و مرگ گونه‌های حساس و سازگار شدن باکتری‌های زنده مانده است (دیاز راوینا و بات 1996).

پس از 90 روز، در غلظت $mgPbkg^{-1}$ 200، تنفس برانگیخته در برابر نمونه شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد (16 درصد کاهش) و با افزایش غلظت سرب تا غلظت $mgPbkg^{-1}$ 400 کاهش تنفس بیشتر شد. در این دوره در کلیه سطوح آلودگی، تنفس برانگیخته در برابر روز 30 افزایش یافت که شاید وابسته به افزایش ریزجانداران متحمل در برابر سمیت سرب بود. در روز 180 از آلودگی، در غلظت $mgPbkg^{-1}$ 100، تنفس برانگیخته کاهش معنی‌داری نشان داد (9 درصد کاهش) و با افزایش غلظت سرب، تفاوت معنی‌داری دیده نشد. در هیچ یک از دوره‌های انکوباسیون، تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های400 و $mgPbkg^{-1}$ 500 دیده نشد. افزایش تنفس در روزهای نخست می‌تواند به‌دلیل تحریک ریزجانداران بر اثر اعمال آلودگی باشد که این پاسخ در غلظت‌های پایین دیده می‌شود و در غلظت‌های بالای سرب شاید به‌دلیل از بین رفتن ریزجانداران یا کاهش فعالیت آنها، تنفس کاهش می‌یابد.

با افزایش زمان انکوباسیون، همبستگی منفی بین سطوح سرب و اکثر شناسه‌های اندازه‌گیری شده افزایش یافت به‌گونه‌ای که میانگین همبستگی بین سطوح سرب و اکثر شناسه‌های اندازه‌گیری شده در روز سوم از آلودگی

کمترین مقدار بود و با گذشت زمان، همبستگی منفی افزایش یافت (جدول 4).

جدول 4- ضرایب همبستگی (r) بین سطوح اولیه آلودگی سرب با تنفس میکروبی خاک، کربن زیتوده و شناسه‌های اکوفیزیولوژیک در پنج دوره انکوباسیون.

دوره انکوباسیون (day)	بهر متابولیک	بهر میکروبی	تنفس پایه	تنفس برانگیخته	کربن زیتوده
3	-0/80*	-0/89*	-0/91**	-0/63ns	-0/89*
15	0/32ns	-0/97**	-0/69ns	-0/75ns	-0/97**
30	0/15ns	-0/98**	-0/89*	-0/79*	-0/98**
90	0/42ns	-0/99**	-0/98**	-0/98**	-0/99**
180	-0/35ns	-0/95**	-0/97**	-0/85*	-0/96**

ns، ** و * به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال 1% و معنی‌دار در سطح احتمال 5%

در روزهای نخست پس از آلودگی خاک به سرب، برخی از شناسه‌ها مانند تنفس پایه و تنفس برانگیخته، در غلظت‌های پایین سرب اندکی افزایش یافتند ولی با افزایش میزان آلودگی این شناسه‌ها نیز کاهش یافتند. با گذشت زمان غلظت‌های پایین‌تر سرب هم باعث کاهش شناسه‌های میکروبی شدند. شاید افزایش فعالیت میکروبی در روزهای نخست آلودگی، به‌دلیل مرگ گونه‌های میکروبی حساس و رها شدن منابع کربن آلی یاخته‌های آنها برای ریزجانداران پایدارتر خاک است. همچنین میکروب‌ها در هنگام روبرو شدن با تنش‌های وارد شده به خاک مانند آلاینده‌های فلزی، فعالیت زیستی خود را به‌گونه چشم‌گیری افزایش می‌دهند و انرژی بیشتری برای روبرو شدن با آلاینده و زنده‌مانی در این زیستگاه دشوار بکار می‌برند که با افزایش تنفس هویدا می‌شود ولی این افزایش با ادامه حضور آلاینده‌ها و افزایش غلظت آنها، نمی‌تواند ادامه پیدا کند و گونه‌های حساس می‌میرند (دیاز-راوینا و بات 1996). بنابراین، در غلظت‌های بالاتر، کاهش تنفس و فعالیت میکروبی دیده می‌شود. در پایان دوره انکوباسیون، بیشتر شناسه‌ها اندکی افزایش یافتند که شاید به‌دلیل متحمل شدن ریزجانداران خاک به سمیت سرب و یا کاهش زیست‌فراهمی سرب برای ریزجانداران بود. در این پژوهش بهر متابولیک روند ویژه‌ای را در برابر آلودگی سرب نشان نداد در حالی که پیش‌بینی شده بود که با افزایش میزان آلودگی سرب، بهر متابولیک افزایش یابد. شناسه‌های دیگر مانند تنفس پایه و برانگیخته، بهر میکروبی و کربن زیتوده به‌گونه معنی‌داری همبستگی منفی با سطوح آلودگی سرب نشان دادند. خاک‌های آلوده شده با سرب، به‌گونه معنی‌داری بهر متابولیک بالاتری دارند و از این رو نیاز به انرژی بیشتر برای نگهداری ریزجانداران خاک است (بروکس 1995). در این پژوهش در بیشتر زمان‌ها تغییرات بهر متابولیک از دیدگاه آماری غیر معنی‌دار بود.

تحت شرایط طبیعی خاک، نسبت کربن میکروبی به کربن آلی کل خاک، در حدود 1 تا 4% برآورد شده است. این نسبت معمولاً در همه خاک‌های بدون‌کشت دیده می‌شود ولی در خاک‌های آلوده‌شده بدون‌کشت که $900\ mgPbkg^{-1}$ دریافت کرده بودند این نسبت به کمتر از 1% کاهش یافت (لیاو و همکاران 2007). اندازه کم این نسبت در خاک در غلظت‌های بالای سرب می‌تواند وابسته به کاهش بازده بهره‌گیری از بستره توسط ریزجانداران باشد چون ریزجانداران خاک انرژی بیشتری را برای زنده‌مانی خود در خاک مصرف می‌کنند که پیشتر این انرژی برای ساخت پیکره آنها

بکار می‌رفت. بنابراین با کاهش کربن زیتوده، این نسبت هم کاهش می‌یابد (اسپارلینگ 1992). بروکس (1995) و مک‌گرات و همکاران (2001) گزارش کردند که آلودگی خاک با فلزهای سنگین، باعث کاهش نسبت کربن میکروبی به کربن آلی کل خاک می‌شود آنان این نسبت را به‌عنوان یک کمیت سودمند برای نشان دادن آلودگی خاک با فلزهای سنگین گزارش کردند. با گذشت زمان، شماری از شناسه‌های اندازه‌گیری شده در 180 روز پس از آلودگی تا حدودی بازیابی می‌شوند ولی در غلظت‌های بالای سرب ($500\ mgPbkg^{-1}$ و 400) پیامد فلزهای سنگین ماندگارتر خواهد بود. در واقع در غلظت‌های بالای سرب، ممکن است تغییرات شدید ژنتیکی و فیزیولوژیک در جامعه میکروبی خاک دیده شود (علی‌اصغرزاد و همکاران 2011) به‌گونه‌ای که گونه‌های حساس که ممکن است گونه‌های مفید خاک هم باشند، از میان رفته و گونه‌های متحمل در برابر فلز سنگین ایجاد شود و در نتیجه باعث کاهش تنوع عملکردی و تنوع گونه‌ای شود (آلماس و همکاران 2004). در این حالت ممکن است جامعه تغییر یافته میکروبی نتواند همه وظایف عملکردی مربوط به کل ریزجانداران خاک را انجام بدهد (گیلر و همکاران 1999) و در نتیجه باعث ایجاد اختلال در چرخه عناصر غذایی شوند و بنابراین انباشتگی ترکیب‌های آلی در خاک و کاهش اندوخته کربنی فراهم خاک رخ خواهد داد، در نتیجه بسیاری از ریزجانداران هتروتروفیک خاک با مشکل کمبود مواد غذایی روبرو شده و با کاهش فراوانی این باکتری‌ها، تجزیه مواد سمی در خاک کاهش می‌یابد و بدین ترتیب کیفیت اکوسیستم خاک کاهش خواهد یافت (لوک و جانسن 2005).

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش شناسه‌های میکروبی اندازه‌گیری شده، به گونه معنی‌داری همبستگی منفی با سطوح آلودگی سرب نشان دادند به‌گونه‌ای که در غلظت‌های بالای 100 تا $300\ mgPbkg^{-1}$ کاهش معنی‌داری داشتند. در واقع می‌توان این غلظت را به عنوان غلظت بحرانی برای خاک بررسی شده دانست. در غلظت‌های بالاتر از آن، کاهش معنی‌داری بویژه 90 روز پس از آلودگی، در شناسه‌های بررسی شده دیده شد. این یافته‌ها نشان می‌دهند که اگر غلظت سرب در خاک بررسی شده، به بالاتر از این دامنه برسد و سرب به مدت طولانی در خاک حضور داشته باشد، ممکن است صدمات جبران‌ناپذیری به اکوسیستم زنده خاک وارد شود بنابراین در افزودن موادی مانند کمپوست زباله شهری که دارای فلزهای سنگینی مانند سرب هستند باید توجه نمود که غلظت سرب در خاک از حد بحرانی آن بالاتر نرود. با توجه به نتایج، شناسه‌های اندازه‌گیری شده به‌جز بهر متابولیک می‌توانند به‌عنوان شناسه‌های حساس میکروبی، برای بررسی پیامد زیانبار سرب بر کیفیت خاک بررسی شده معرفی شوند.

منابع مورد استفاده

بهره‌مند م، افیونی م، حاج‌عباسی م و رضایی‌نژاد ی، 1381. اثر لجن فاضلاب بر برخی ویژگی‌های فیزیکی خاک. علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، شماره 4، صفحه‌های 1تا 8.

گله دار م، 1387. جذب زیستی عناصر سنگین (کادمیوم، نیکل و کبالت) به‌وسیله مخمر تثبیت شده *Saccaromyces cerevisia* در ستون فشرده. پایان‌نامه کارشناسی ارشد محیط زیست، دانشکده علوم دریایی و محیط زیست، دانشگاه تربیت مدرس.

Aliasgharzad N, Molaei A and Oustan S, 2011. Pollution induced community tolerance (PICT) of microorganisms in soil incubated with different levels of lead. WASET 60: 1469-1473.

Almas AR, Bakken LR and Mulder J, 2004. Changes in tolerance of soil microbial communities in Zn and Cd contaminated soils. Soil Biol Biochem 36: 805-813.

Anderson TH and Domsch KH, 1990. Application of ecophysiological quotients (qCO^2 and qD) on microbial biomass from soils of different cropping histories. Soil Biol Biochem 22: 251–255.

Anonymus, 1982. Soil Survey Laboratory Methods and Procedures for Collecting Soil Sample. USDA-SCS. Soil Survey. Invest.

Ansari M, and Malik A, 2007. Biosorption of nickel and cadmium by metal resistant bacterial isolates from agricultural soil irrigated with industrial wastewater. Bioresource Technol 98: 3149-3153.

Bââth E, Arnebrandt K and Nordgren A, 1991. Microbial biomass and ATP in smelter-polluted forest humus. Bull. Environ. Contam Toxicol 47: 278–282.

Babich H and Stotzky G, 1985. Heavy metal toxicity to microbe-mediated ecologic processes. A review and potential application to environmental policies. Environ Res 36: 591–594.

Brookes PC, 1995. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals[J]. Biol Fertil Soils 19: 269–279.

Brookes PC, Heijnen CE, McGrath SP and Vance ED, 1986. Soil microbial biomass estimates in soils contaminated with metals. Soil Biol Biochem 18: 383–388

Chander K and Brookes PC, 1991. Effects of Heavy-Metals from Past Applications of Sewage-Sludge on Microbial Biomass and Organic-Matter Accumulation in a Sandy Loam and Silty Loam Uk Soil. Soil Biol Biochem 23: 927-32.

Diaz-Ravina M and Bååth E. 1996. Development of metal tolerance in soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels. Appl Environ Microbiol 62: 2970-2977.

Diaz-Ravina M, Calvo de Anta R and Bååth E, 2007. Tolerance (PICT) of the bacterial communities to copper in Vineyards soils from Spain. J Environ Qual 36: 1760-1764.

Filip Z, 2002. International approach to assessing soil quality by ecologically-related biological parameters[J]. Agr Ecol Environ 88: 169–174.

Frostegard A and Bååth E, 1996. The use of phospholipids fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. Biol Fertil Soils 22: 59-65.

Gee GW and Bauder JW, 1986. Physical and Mineralogical Methods. Pp: 383-409. In: Clute A (ed). Methods of Soil Analysis, part 1. ASA and SSSA, Medison Wisconsin.

Giller KE, Witter EE and McGrath SP, 1999. Assessing risks heavy metal toxicity in agricultural soils. Human. Ecol Risk Assessment 5: 683-689.

Isermeyer H, 1952. Eine einfache methode zur bestimmang der bodenatmung und der carbonate im Boden. Z P Flanzenernaehr Bodenkd 56: 26-38.

Jaggi W, 1976.Die bestimmung der CO_2-bildung asl MaB der bodenbiologischen aktivität. Schw Landw Forsch 15:371-380.

Kandeler E, Kampichler C and Horak O, 1996. Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities. Biol Fertil Soils 23: 299–306.

Kandeler E, Tscherko D, Bruce KD, Stemmer M, Hobbs PJ, Bardgett RD and Amelung W, 2000. Structure and function of the soil microbial communities in microhabitats of a heavy metal polluted soil. Biol Fertil Soil 32: 390-400

Kelly JJ, Häggblom L and Tate III RL, 1999. Changes in soil microbial communities over time resulting from one time application of zinc: a laboratory microcosm study. Soil Biol Biochem 31: 1455-1465.

Liao M, Yun-kuo L, Xiao-min Z and Chang-yong H, 2005. Toxicity of cadmium to soil microbial biomass and its activity: Effect of incubation time on Cd ecological dose in paddy soil. J. Zhejiang University Sci 5: 324-330.

Liao M, Chen C-L, Zeng L-S and C-Y, 2007. Influence of lead acetate on soil microbial biomass and community structure in two different soils with the growth of Chinese cabbage (Brassica

chinensis). Chemosphere 66: 1197–1205.

Loeppert RH, and Suarez GL, 1996. Chemical Methods. Pp: 437-474. In: Sparks DL (ed.) Methods of Soil Analysis, Part 3. SSSA, Medison Wisconsin.

Lock K and Janssen CR, 2005. Influence of soil zinc concentrations on zinc sensitivity and functional diversity of microbial communities. Inviron Pollut 136: 275-281.

Martens R, 1991. Methoden zur quantitative Bestimmung und Charakterisierungder mikrobiellen biomasse in Böden. Eigenverlag des institutes für Bodenbiologie der FAL Braunschweig.

McGrath SP, Zhao FJ and Lombi E, 2001. Plant and rhizosphere processes involved in phytoremediation of metalcontaminated soils. Plant Soil 232: 207–214.

Nelson DW and Sommers LE, 1982. Total carbon, organic carbon, and organic matter. Pp. 539–579. In: Page AL, Miller RH and Keeney DR (eds). Methods of Soil Analysis, part 2. ASA and SSSA, Medison, Wisconsin.

Olsen SR and Sommers LE, 1982. Phosphorus. Pp. 403–430. In Page AL, Miller RH and Keeney DR (eds). Methods of Soil Analysis, part 2. ASA and SSSA, Medison, Wisconsin.

Ronae TM and Kellogg ST, 1996. Characterization of bacterial communities in heavy metal contaminated soils. Can J Microbiol 42: 593-603.

Sparling GP, 1992. Ratio of microbial biomass carbon as a sensitive indicator of changes in soil organic matter. Australia J Soil Res 30: 195-207.

Sparling GP and West AW, 1988. A direct extraction method to estimate soil microbial carbon: Calibration in situ using microbial respiration and ^{14}C labeled sells. Soil Biol Biochem 20: 337-343.

Wang Y, Shi J, Lin Q,Chen X and Chen Y, 2007. Heavy metal availability and impact on soil microorganisms along a Cu/Zn contamination gradient. J Environ Sci 19: 848-853.

Wardle DA and Ghani A, 1995. A critique of the microbial metabolic quotient (qCO2) as bioindicator of disturbance and ecosystems development. Soil Biol Biochem 27: 1601-1610.