نشریه دانش آب و خاک / جلد ۲۷ شماره ۴ صفحه‌های ۱۳ تا ۲۵ / سال ۱۳۹۶

تاثیر کروم (VI) و ورمی‌کمپوست بر برخی از شاخص‌های میکروبی و اکوفیزیولوژیک خاک

الهام عزیزی [۱]، آتنا میربلوک [۲*]

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۳/۳۱ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۱/۱۹

۱-دانشیار گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور

۲- دانشجوی دکتری شیمی و حاصلخیزی خاک دانشگاه ارومیه و مدرس مدعو دانشگاه پیام نور

مسئول مکاتبات، پست الکترونیک: atena.mirbolook@yahoo.com

چکیده

در این مطالعه اثر فلز سنگین کروم بر برخی شاخص‌های میکروبی و اکوفیزیولوژیکی خاک در حضور ورمی کمپوست و در قالب طرح کاملا تصادفی بررسی شد. این آزمایش در پنج سطح کروم (۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم کروم بر کیلوگرم خاک از نمک دی کرومات پتاسیم) و در هفت دوره انکوباسیون (۵، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۰۰، ۱۱۰، ۱۲۰ روز) در سه تکرار اجرا گردید و به‌منظور کاهش اثرات مخرب آلاینده در خاک، در روز ۹۰ ام به همه تیمارها ورمی کمپوست اضافه شد. در انتهای هر دوره فعالیت آنزیم دهیدروژناز، تنفس پایه و کربن بیومس میکروبی به عنوان شاخص‌های میکروبی و همچنین نسبت میکروبی و متابولیک به عنوان شاخص های اکوفیزیولوژیک اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان دادند که با افزایش غلظت کروم در خاک شاخص‌های میکروبی خاک تا روز نود کاهش یافتند. آنزیم دهیدروژناز در غلظت ۱۰۰ میلی گرم کروم در خاک، ۱۰۰ درصد کاهش را پس از نود روز انکوباسیون نشان داد و پس از آن افزایش یافت و در غلظت‌های کمتر از ۱۰۰ میلی گرم کروم کاربرد ورمی‌کمپوست تاثیر سوء آلاینده را جبران نمود. سهم متابولیک در غلظت $mg\ Cr\ kg^{-}$ ۳۰۰ بعد از افزودن ماده آلی از ۵/۴۳ در روز ۹۰ ام به ۰/۱۶۴ در روز ۱۰۰ ام رسید و همین کاهش با روند شدیدتر در تیمار $mg\ Cr\ kg^{-}$ ۴۰۰ نیز اتفاق افتاد. . نسبت میکروبی با افزایش ماده آلی در خاک، در تیمار شاهد ۵۶ درصد و در بالاترین غلظت کروم در خاک، ۴۴ درصد افزایش را نشان داد. بر اساس یافته‌های این پژوهش در غلظت‌های بیش از ۱۰۰ میلی گرم کروم در خاک پیامدهای منفی فلز بر شاخص‌های میکروبی خاک نمایان شد و کاربرد ورمی کمپوست در بهبود این شاخص‌ها در حضور آلاینده موثر بود.

واژه‌های کلیدی: سهم متابولیک و نسبت میکروبی، کربن بیومس میکروبی، زمان، فعالیت آنزیم دهیدروژناز

The Effect of Cr(VI) and Vermicompost on Some of Microbial and Ecophysiological Indices of Soil

E. Azizi, [1] A. Mirbolook [2*]

Received: Monday, June 20, 2016 Accepted: 08 April 2017
1-Assoc. Prof. of Agronomy department Payame Noor University Iran
2-Ph.D. Student of soil Chemistry, Urmia University and Lecturer in Payame Noor University Iran
*Corresponding Author Email: atena.mirbolook@yahoo.com

Abstract

In this study the effect of heavy metal of chromium on microbial and eco physiological indices of soil in presence of vermicompost was evaluated using a complete randomized design. This experiment was carried out in five levels of chromium (0, 100, 200, 300 and 400 mg Cr kg^{-1} soil from potassium dichromate) and seven incubation periods (5, 30,60,90,100,110 and 120 days) in three replicates and for decreasing the adverse effects of pollutant in soil, in the 90th day, vermicompost was added to all of the treatments. At the end of each period, dehydrogenase enzyme activity, basal respiration and microbial biomass carbon as microbial indices and also metabolic and microbial quotient as eco physiological indices were measured. The results showed that with increasing chromium concentration in soil, the microbial indices were decreased up to the 90th day. Dehydrogenase enzyme activity decreased by 100 percent in concentrations of 100 mg Cr kg^{-} and then it was increased, therefore application of the vermicompost compensated the adverse effects of the pollutant. Metabolic quotient in concentration of 300 mg kg- Cr the 90th day reached to 5.43 and then decreased to 0.164 in the 100th day. This decrease happened in concentration of 400 mg kg- Cr, severely. By adding organic matter, the microbial quotient increased 56 and 44 percent in control and in the highest concentration of the chromium respectively. Based on result of this research, in concentrations higher than 100 mg Cr kg^{-} in soil negative effects of the metal on microbial indices was revealed and usage of vermicompost in improvement of this indices in presence of chromium was efficient.

Keywords: Dehydrogenase enzyme activity, Microbial and metabolic quotient, Microbial biomass carbon, time

مقدمه

کروم دهمین عنصر فراوان در پوسته زمین و در محیط زیست است که به فرم‌های سه و شش ظرفیتی مشاهده می‌شود. کروم شش ظرفیتی برای گیاهان و حیوانات سمی است و خاصیت سرطان‌زایی شدیدی دارد (بانرجی و همکاران ۲۰۰۴) که از طریق صنایع گوناگونی چون چرم‌سازی، تولید استیل، حفاظت چوب، سوخت زغال سنگ و روغن‌ها به طور وسیعی وارد محیط زیست و خاک می‌شود. کروم تجمع یافته در خاک در طول زمان می‌تواند تاثیرات سمی و مخربی روی اکوسیستم خاک و مخصوصا جامعه میکروبی و در نهایت سلامت خاک بگذارد (ویتی ۲۰۰۶). تاثیرات منفی جبران ناپذیری که فلزات سنگین بر جامعه میکروبی و به‌دنبال آن سلامت خاک می‌گذارند توسط شاخص‌های بیولوژیکی، مانند فعالیت‌های آنزیمی، تنفس، بیومس میکروبی کربن و

شاخص‌های اکوفیزیولوژیکی[1] مانند نسبت میکروبی[2] و سهم متابولیک[3] قابل ارزیابی است، چراکه این شاخص‌ها حساسیت بالایی برای تعیین اثر متغیرهای محیطی بر خاک دارند. امروزه از این شاخص‌های بیولوژیکی برای بررسی اثر تنش های وارد شده بر جامعه میکروبی خاک و تغییرات ایجاد شده در کیفیت و سلامت خاک استفاده می‌شود (کیلهام ۱۹۹۶).

فعالیت های آنزیمی خاک یک نقش حیاتی را در چرخه عناصر غذایی بازی می‌کنند و برای معدنی شدن و تبدیل مواد آلی خاک و عناصر غذایی در اکوسیستم خاک مهم هستند (دیک وطباطبائی ۱۹۹۳) فعالیت‌های آنزیمی در خاک به تغییر و تبدیل های طبیعی و ساخته دست بشر حساس هستند و می‌توانند نمادی از تغییرات کیفی خاک‌ها به دلیل استرس‌های محیطی یا عملیات‌های مدیریتی باشند. یکی از شاخص‌های عمومی که برای ارزیابی فعالیت میکروبی در خاک استفاده می‌شود، فعالیت آنزیم دهیدروژناز می‌باشد که ایده اصلی استفاده از فعالیت این آنزیم در تعیین شاخص‌های میکروبی و حاصلخیزی خاک‌ها اولین بار توسط واکسمن مطرح شد (واکسمن ۱۹۹۲).

تنفس خاک، که به آن تنفس پایه نیز گفته می‌شود، ناشی از تجزیه مواد آلی خاک بوده که متشکل از تعداد بیشماری از فعالیت‌های انفرادی است. CO_2 ناشی از تنفس خاک که آخرین مرحله معدنی شدن کربن در خاک است، می‌تواند شاخص بسیار مناسبی از جمعیت میکروارگانیسم‌های خاک باشد (کیلهام ۱۹۹۴).

زیتوده میکروبی خاک جزء زنده ماده آلی خاک و دربرگیرنده باکتری‌ها، اکتینومایست‌ها، قارچ‌ها، پروتوزوآ، جلبک‌ها و میکروفون می‌باشد و در نهایت حدود ۲ درصد از کل کربن آلی خاک و ۵ درصد از نیتروژن آلی را شامل می‌شود (هو و کائو ۲۰۰۷). معمولاً کربن بیومس میکروبی را به عنوان برآوردی از فعالیت و حیات توده میکروبی خاک محسوب می‌کنند (پیج و همکاران ۱۹۸۲) زیرا از طرفی هم شاخصی از تغییر و تبدیل ماده آلی خاک است و هم منبع و مخزن عناصری مانند کربن، نیتروژن، فسفر و گوگرد می‌باشد.

به منظور بررسی تکمیلی شاخص های بیولوژیکی خاک، افزون بر تعیین کمی زیتوده میکروبی کربن، بررسی چگونگی حالت فیزیولوژیک جمعیت میکروبی نیز اهمیت زیادی دارد. حالت فیزیولوژیک ریزجانداران خاک بستگی به وضعیت تغذیه‌ای، نوع خاک، آب و هوا و پیامد آلاینده‌ها در خاک دارد. سهم متابولیک و نسبت میکروبی از گروه شناسه های اکو فیزیولوژیک هستند که برای بررسی وضعیت ریزجانداران خاک ارزیابی می‌شوند.

سهم متابولیک معیار غیرمستقیمی از کارایی انرژی میکروبی است که به صورت CO_2 حاصل از تنفس میکروبی در واحد وزن زیست توده میکروبی خاک تعریف می‌شود. تغییرات سهم متابولیک به تغییرات ساختاری جمعیت یا به تغییر بستره و پیشماده‌ای که یک جمعیت غیرقابل تغییر استفاده می‌کند و یا به هر دوی آنها بستگی دارد. گزارش‌های انجام شده روی پاسخ بهرمتابولیک به آلودگی فلزهای سنگین در منابع مختلف متفاوت است. برخی از پژوهشگران افزایش سهم متابولیک (بروکس و همکاران ۱۹۸۶) و برخی دیگر کاهش سهم متابولیک را با افزایش آلودگی گزارش کردند (بس و همکاران ۱۹۹۱). این شاخص میکروبی در خاک‌های آلوده شده با فلزهای سنگین بیشتر از خاک‌های غیرآلوده گزارش شده است (چندر و بروکس ۱۹۹۱). هر چه سهم متابولیک کمتر باشد، چرخه های میکروبی کارآمدتر هستند. تنش‌هایی مانند حضور فلزات سنگین سبب افزایش سهم متابولیک خاک می‌شوند (واردل و گندر ۱۹۹۵).

نسبت میکروبی یا نسبت کربن میکروبی به کربن آلی خاک، نیز برای بررسی کیفیت خاک به کار می‌رود. این نسبت رابطه کربن میکروبی و کربن آلی را نشان می‌دهد و به کمک آن می‌توان دینامیک کربن در خاک را بررسی کرد. با این که کربن زیست توده ارتباط نزدیکی

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

با مقدار ماده آلی دارد، ولی زیست توده از طرفی تحت تأثیر زیست فراهمی بستره تجزیه پذیر و از طرف دیگر تحت تأثیر محیط شیمیایی و ساختار فیزیکی قرار می‌گیرد و عواملی مانند آنتی بیوتیک‌ها بر روی آن تأثیر بسیار منفی دارند.

استفاده از منابع گیاهی و حیوانی قابل تجدید از مواردی است که نقش مهمی در باروری و حفظ فعالیت‌های بیولوژیکی خاک دارد. کاربرد نهاده‌های آلی میتواند علاوه بر بهبود ساختار فیزیکی خاک، با افزایش سطح ماده آلی خاک به بهبود شرایط بیولوژیک خاک نیز منجر گردد (محمدی و همکاران ۲۰۱۲). تجادا و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که استفاده از کودهای آلی باعث افزایش جامعهٔ میکروبی خاک و افزایش فعالیت آنزیم‌های اوره آز، بتا گلوکوزیداز، فسفاتاز و دهیدروژناز می‌گردد. ورمی کمپوست از جمله کودهای آلی است که با بکارگیری کرمهای خاکی که معروف‌ترین آنها ایسنیا فتیدا [۴]است، تهیه می‌شود. در این پژوهش تاثیر فلز سنگین کروم بر شاخص‌های بیولوژیکی خاک مورد ارزیابی قرار گرفت و اثر ورمی‌کمپوست در احیای خاک و کاهش اثرات مخرب ناشی از آلودگی کروم بررسی شد.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی خاک

این آزمایش در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه فردوسی مشهد در قالب طرح کاملا تصادفی و به صورت فاکتوریل در سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل پنج سطح کروم با غلظت‌های صفر، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم کروم در کیلوگرم خاک و هفت زمان نمونه برداری شامل زمان‌های ۵، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۰۰، ۱۱۰، ۱۲۰ روز از شروع آزمایش بودند. ابتدا یک نمونه از خاک برداشته شد و پس از هوا خشک کردن و گذراندن از الک دو میلی‌متری، برای تعیین برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی به آزمایشگاه منتقل شد. ویژگی‌های اصلی خاک مورد آزمایش در جدول ۱ آورده شده است. به منظور آلوده کردن خاک با فلز سنگین کروم از نمک دی کرومات پتاسیم استفاده شد که به به گلدان‌های حاوی ۲ کیلوگرم خاک در سه تکرار اضافه شدند و برای ایجاد غلظت‌های برابر پتاسیم در خاک، کلرید پتاسیم در غلظت‌های معکوس به گلدان‌ها افزوده شد. سپس گلدان‌ها به مدت ۱۲۰ روز در رطوبت ۷۰ درصد ظرفیت مزرعه و در دمای ۲۳ درجه سیلسیوس انکوباسیون گردیدند که حفظ رطوبت از طریق وزن کردن روزانه گلدانها و اضافه نمودن آب لازم برای دستیابی به ظرفیت رطوبتی مورد نظر انجام شد. در روز ۹۰ ام از شروع آزمایش به همه گلدانها میزان ۵۰۰ گرم ورمی کمپوست اضافه شد و به خوبی با خاک مخلوط گردید. در زمان‌های ۵، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۰۰، ۱۱۰، ۱۲۰ روز از شروع انکوباسیون که معادل با تاریخ‌های ۱۵ مرداد، ۱۰ شهریور، ۱۰ مهر، ۱۰ آبان، ۲۰ آبان، ۳۰ آبان و ۱۰ آذر بود در نمونه های تیمار شده با کروم شاخص‌های میکروبی اندازه‌گیری شدند.

اندازه‌گیری شاخص‌های میکروبی

برای تعیین فعالیت آنزیم دهیدروژناز از ۵،۳،۲- تری فنیل تترا زولیوم کلراید (TTC) ۳ ٪ استفاده شد. سه گرم از هر نمونه وزن شد و روی آن یک میلی لیتر TTC ریخته شد و نمونه ها به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی قرار داده شدند. طی این زمان TCC به ۵،۳،۲- تری فنیل فورمازان (TPF) تبدیل می شود. در انتها میزان TPF بعد از عصاره‌گیری با متانول و عبور از کاغذ صافی واتمن شماره ۵، با دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل WPA-S2000 در طول موج ۴۸۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (کازیدا و همکاران ۱۹۶۴).

برای تعیین تنفس میکروبی با بهره‌گیری از روش ایزرمایر (۱۹۵۲)، نمونه خاک مرطوب گلدان‌ها به درون ظروف شیشه‌ای مخصوص در چهار تکرار ریخته شد و در کنار محلول هیدروکسید سدیم ۰/۱ مولار به مدت ۵ روز در دمای ۲۵ درجه سیلسیوس انکوباسیون گردید.

[4] Eisenia fetida

جدول۱- ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد آزمایش.

بافت خاک Soil texture	میزان عناصر غذایی Nutrient level (ppm)			هدایت الکتریکی	اسیدیته
	پتاسیم قابل دسترس Available K	فسفر قابل دسترس Available P	نیتروژن کل Total N	EC (dS m^{-1})	pH
Silty-loam	۱۱۸	۷/۱	۲۹۸	۱/۱۴	۷/۷۵

پس از پایان انکوباسیون، بالون‌های دارای سود با HCl ۰/۱ مولار تیتر شدند و مقدار تنفس بر پایه mg CO_2/g soil.day برآورد شد (ایزرمایر ۱۹۵۲). برای تعیین کربن زیتوده میکروبی با کمک روش تدخین- استخراج، خاک مرطوب به مدت ۲۴ ساعت با کلروفرم تدخین شد. سپس خاک تدخین شده با عصاره‌گیر سولفات پتاسیم نیم مولار به مدت ۳۰ دقیقه شیک شده و عمل عصاره گیری صورت گرفت. همین کار برای خاک تدخین نشده نیز انجام شد و در نهایت کربن آلی عصاره‌ها به روش والکی و بلک (۱۹۳۴) اندازه‌گیری شد. در انتها کربن زیتوده میکروبی از تفاوت کربن آلی استخراج شده از نمونه های تدخین شده و تدخین نشده بر پایه $mgC_{min}100g^{-}$ d برآورد شد (اسپارلینگ و وست ۱۹۸۸). سهم متابولیک از تقسیم کربن اندازه‌گیری شده در تنفس پایه بر کربن بیومس میکروبی خاک بدست می‌آید که بر حسب $mgCO_2$-Cg^{-} $C_{mic}H^{-}$ می‌باشد. نسبت میکروبی از بخش کردن کربن میکروبی بر کربن آلی خاک بر حسب mgC_{mic} gC_{org}^{-} به دست آمد (مارتنز ۱۹۹۱). نتایج با استفاده از نرم‌افزارهای MINITAB و MSTATC در سطح معنی‌داری ۵ درصد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و نمودارها با استفاده از نرم افزار EXCEL رسم گردید.

نتایج و بحث

بر اساس نتایج تجزیه واریانس در همه شاخص-های میکروبی بررسی شده، اثرهای اصلی و متقابل کروم و زمان انکوباسیون در سطح ۱ درصد معنی‌دار بودند. نتایج تجزیه واریانس در جدول ۲ آمده است.

جدول۲- تجزیه واریانس پیامد سطوح آلودگی و دوره‌های انکوباسیون بر فعالیت آنزیم دهیدروژناز، تنفس میکروبی، زیتوده میکروبی، سهم متابولیک و نسبت میکروبی.

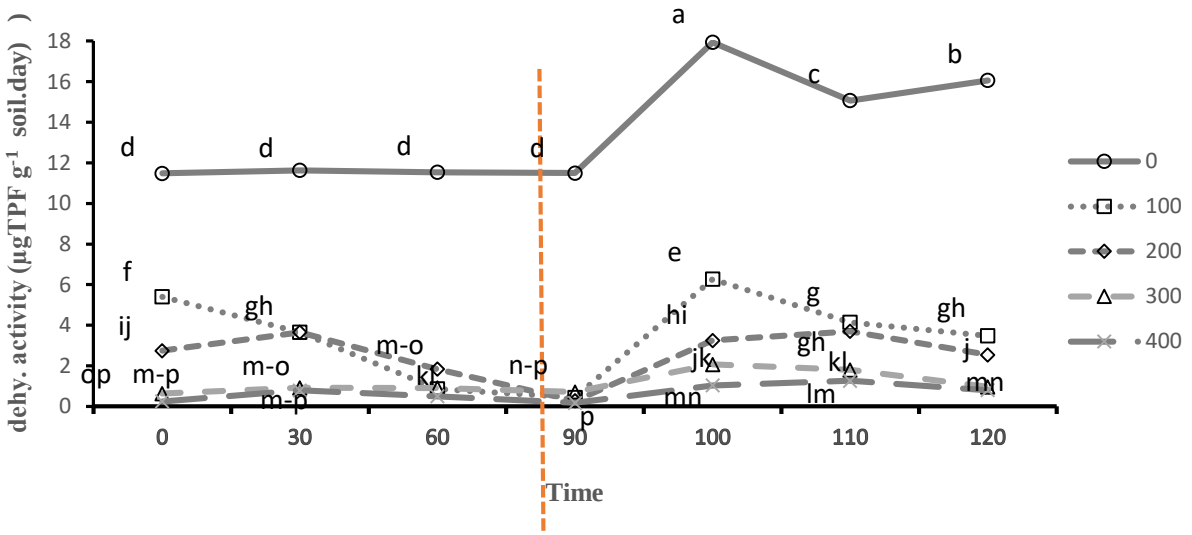
منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		فعالیت آنزیم دهیدروژناز	تنفس میکروبی	زیتوده میکروبی	سهم متابولیک	نسبت میکروبی
کروم	۳	۵۹۴/۴۸۲**	۴۵/۴۵۶**	۱۶/۴۹۲**	۳۴/۲۹۲**	۲۲/۶۲۰**
زمان	۶	۲۱/۳۷۴**	۲۱/۳۷۴**	۲/۷۶۰**	۹/۶۸۸**	۳/۷۷۶**
کروم* زمان	۲۴	۵/۱۰۳**	۱/۲۱۵**	۰/۱۵۷**	۴/۹۲۵**	۰/۲۱۵**
خطا	۷۰	۰/۱۷۷	۰/۱۴۸	۰/۰۱۵	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵
ضریب تغییرات (٪)		۹/۸۰۰	۱۱/۲۴۰	۱۲/۳۲۰	۷/۰۱۰	۵/۹۷۰

فعالیت آنزیم دهیدروژناز

بررسی تغییرات فعالیت آنزیم دهیدروژناز در معرض سطوح مختلف کروم در طی زمان در شکل ۱ نشان داده شده است. با توجه به شکل مشاهده می‌شود که میزان فعالیت آنزیم دهیدروژناز به طور معنی‌داری در شاهد نسبت به خاک‌هایی که در معرض آلودگی با فلز سنگین کروم بوده‌اند، بیشتر بود. با افزایش غلظت کروم در خاک، فعالیت آنزیم دهیدروژناز کاهش یافت و

بیشترین کاهش در تیمار ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم کروم مشاهده شد. در غلظت‌های مختلف کروم، بعد از گذشت ۹۰ روز از انکوباسیون خاک، کاهش در فعالیت آنزیم دهیدروژناز مشهود بود، به‌طوری‌که تیمار mg Cr Kg⁻ ۱۰۰ و mg Cr Kg⁻ ۴۰۰ به ترتیب بیش از ۱۰۰ درصد و ۷۰ درصد کاهش را نسبت به شروع آزمایش نشان دادند. فعالیت‌های آنزیمی با حساسیت بالایی وضعیت بیولوژیکی خاکها را منعکس می‌کنند (سیسا و همکاران ۱۹۹۳). چندین دلیل برای اهمیت آنزیم ها به عنوان شاخص های کیفیت خاک وجود دارد: اول اینکه آنها به طور محکمی با ویژگی های مهم خاک مثل مواد آلی، ویژگی‌های فیزیکی، فعالیت های میکروبی یا زیست توده خاک در ارتباط هستند، دوم اینکه آنها زودتر از دیگر ویژگی‌های خاک تغییر می کنند و دلیل سوم این است که نسبت به دیگر پارامترهای مهم در کیفیت خاک، تعیین آنها ساده‌تر می‌باشد. نتایج این پژوهش ممانعت معنی دار از فعالیت آنزیمی را در سطوح بالای آلودگی با فلز سنگین کروم در خاک نشان داد. این نشان می‌دهد که فلزات سنگین می‌توانند از طریق کمپلکس شدن با آنزیم ها یا مسدود کردن گروه های عامل آنزیمی یا واکنش دوباره با کمپلکس آنزیم-سوبسترا مانع از فعالیت های آنزیمی شوند (اسپیر و همکاران ۱۹۹۵).

مواد آلی با تاثیر روی فعالیت های میکروبی خاک می‌توانند فعالیت‌های آنزیمی را افزایش دهند. نه فقط مقدار مواد آلی در خاک مهم است بلکه کیفیت ماده آلی نیز به منظور فراهمی رشد میکروبی و تولیدات آنزیمی مهم می باشد (فونتین و همکاران ۲۰۰۳).



شکل۱ - روند تغییرات فعالیت آنزیم دهیدروژناز در سطوح مختلف کروم در طی ۱۲۰ روز دوره انکوباسیون (خط چین عمودی: زمان اضافه کردن ورمی کمپوست به خاک می‌باشد).

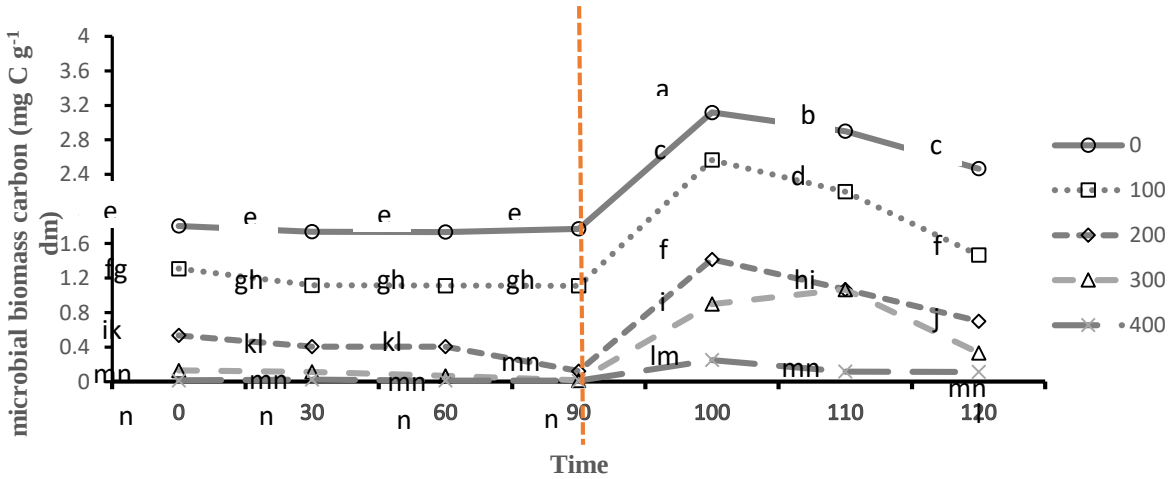
بعد از افزایش ورمی‌کمپوست به خاک (۱۰ آبان)، ابتدا افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم دهیدروژناز در همه تیمارها مشاهده شد به‌طوری‌که در تیمار mg Cr Kg⁻ ۱۰۰ از۰/۴۴ به ۶/۲۶ و در mg Cr Kg⁻ ۴۰۰ از ۰/۱۷ به ۱/۰۳ میکرو گرم فورمازان بر گرم خاک افزایش یافت. دلیل این امر افزایش فعالیت میکروارگانیسم‌ها در حضور مواد آلی در خاک می‌باشد، در واقع سطح بالای ماده آلی سوبسترای کافی برای بیومس میکروبی را فراهم می‌کند و در نتیجه فعالیت‌های آنزیمی افزایش خواهند داشت (یوان و یو ۲۰۱۲). زانگ و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که فعالیت آنزیم دهیدروژناز و میزان مواد آلی خاک دارای همبستگی مثبت هستند. سالازار و همکاران (۲۰۱۱) فرض کردند که فعالیت آنزیم دهیدروژناز در اکوسیستم‌های مختلف در چرخه کربن درگیر است و فعالیت این آنزیم به میزان زیادی با تجزیه ماده آلی تغییر خواهد کرد. مقادیر بالای ماده آلی منجر به فعالیت بیشتر

میکروارگانیسم‌های خاک شده و شدت تجزیه افزایش خواهد یافت که این امر منجر به تنفس بیشتر خاک و رهایی دی اکسید کربن از ریزوسفر می‌شود (زانگ و همکاران ۲۰۱۰).

پس از گذشت ۲۰ تا ۳۰ روز از افزودن ورمی کمپوست به خاک، مواد آلی تحت فعالیت‌های میکروبی تجزیه شده و در ادامه، کاهش در فعالیت آنزیم دهیدروژناز رخ داد. روند کاهش در حضور غلظت‌های مختلف کروم در خاک متفاوت بود. به‌طوری‌که در غلظت $mg\ Cr\ Kg^{-}$ ۴۰۰ پس از ۳۰ روز، فعالیت آنزیم دهیدروژناز دوباره ۶۸/۳۷ درصد کاهش یافت ولی در پایان دوره انکوباسیون نسبت به شروع آزمایش (۱۵ مرداد) ۳/۲۳ برابر بیشتر شد، این افزایش، نشان‌دهنده حضور تاثیر گذار ماده آلی برای مقابله با آلاینده می‌باشد. افزایش ۷۱/۶۰ درصدی فعالیت آنزیم دهیدروژناز از زمان افزایش ورمی کمپوست تا پایان دوره آزمایش در نمونه شاهد و افزایش بیش از ۱۰۰ درصدی آن در غلظت $mg\ Cr\ Kg^{-}$ ۱۰۰بدین معنی است که در غلظت‌های پایین‌تر از $mg\ Cr\ Kg^{-}$ ۱۰۰ کاربرد ورمی کمپوست به عنوان اصلاح کننده خاک می‌تواند تاثیر مخرب آلاینده را در از بین بردن میکروارگانیسم‌های خاک تا حدودی جبران کند. ولی در غلظت‌های بالاتر از $mg\ Cr\ Kg^{-}$ ۱۰۰ به دلیل سمیت بالای کروم، افزایش ماده آلی تغییر مثبت معنی‌داری را منجر نشد. استپنیوسکا و ولینسکا (۲۰۰۵) نیز گزارش کردند که کاربرد کروم یک تاثیر منفی در فعالیت آنزیم دهیدروژناز دارد و در نمونه‌های خاکی که با غلظت‌های ۰ تا ۲۰۰ میلی‌گرم کروم در کیلوگرم خاک تیمار شده بودند میزان ۱۴ تا ۲۵ درصد کاهش در میزان فعالیت آنزیم دهیدروژناز مشاهده شد.

کربن زیتوده میکروبی

روند تغییرات کربن زیتوده میکروبی در سطوح مختلف کروم در طی زمان در شکل ۲ نشان داده شده است. از شروع آزمایش تا روز ۹۰ ام در میزان بیومس میکروبی کربن در شاهد و تیمار $mg\ Cr\ kg^{-}$ ۱۰۰ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. ولی در غلظت‌های ۲۰۰، ۳۰۰ و $mg\ Cr\ kg^{-}$ ۴۰۰ میزان کربن بیومس میکروبی کاهش یافت. این امر نشان می‌دهد که در غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کروم، میکروارگانیسم‌ها قادر به تحمل حضور آلاینده و تاثیر مخرب آن نیستند و از بین خواهند رفت. البته با توجه به حد آستانه پایین کروم در تاثیرات سمی آن روی موجودات زنده، ممکن است که در غلظت‌های کمتر از ۱۰۰ میلی گرم کروم میکروارگانیسم‌ها کشته شده باشند ولی اندوخته کربن آلی سلولی آنها هنوز رها نشده باشد.

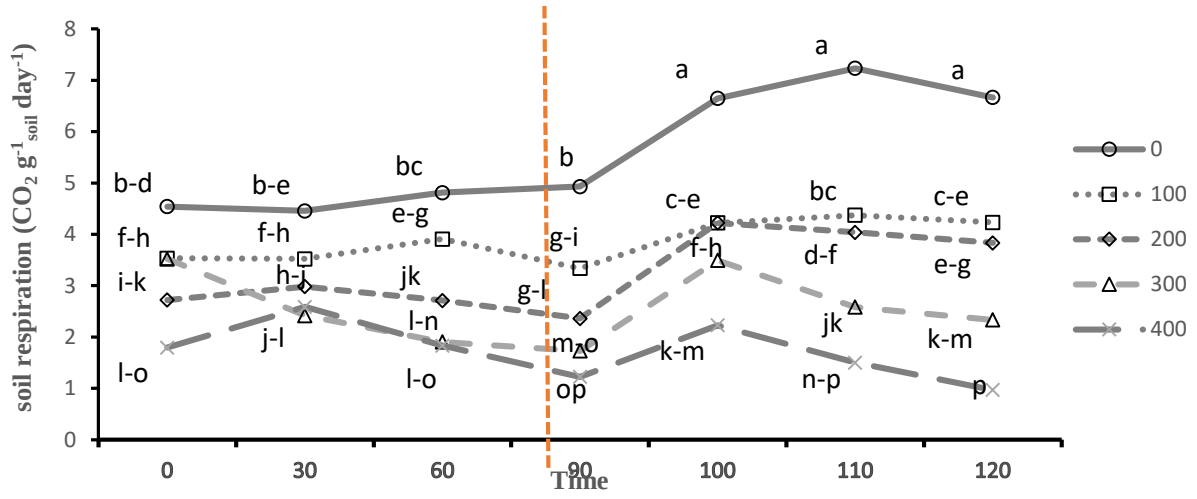


شکل۲- روند تغییرات کربن بیومس میکروبی در سطوح مختلف کروم در طی ۱۲۰ روز انکوباسیون خاک (خط چین عمودی: زمان اضافه کردن ورمی کمپوست به خاک می‌باشد).

شیرزاد و همکاران (۱۳۹۳) ۳۶ درصد کاهش در میزان کربن زیست توده را بعد از ۱۵ روز انکوباسیون خاک‌ها با سرب گزارش کردند. اضافه کردن ورمی‌کمپوست به نمونه‌های خاک منجر به افزایش زیتوده میکروبی خاک شد. این افزایش ۱۰ روز بعد از اضافه کردن ورمی‌کمپوست به خاک در تیمار شاهد ۵۷ درصد و با افزایش غلظت کروم در خاک بین ۴۲ تا ۹/۷ درصد در سایر تیمارها متغیر بود. با گذشت زمان و در انتهای دوره انکوباسیون زیتوده میکروبی شروع به کاهش کرد و فقط در تیمار شاهد نسبت به ابتدای آزمایش، افزایش معنی‌داری را نشان داد. ولی نسبت به زمان اولیه افزایش ورمی‌کمپوست در سایر تیمارها نیز تفاوت معنی‌داری در این پارامتر بیولوژیکی مشاهده شد. این بدان معنی است که ورمی‌کمپوست با ایجاد تغییرات مثبت در توده خاک همچون افزایش جمعیت میکروبی، بهبود کارایی چرخه عناصر غذایی و ایجاد کمپلکس‌های نامحلول با آلاینده ها در خاک منجر به کاهش اثرات مخرب آلاینده بر شاخص‌های میکروبی خاک شده است. لوپس و همکاران (۲۰۰۱) نیز حضور مواد آلی را به دلیل افزایش جمعیت میکروبی و در نتیجه تولید ترکیبات و متابولیت های خاص و در نتیجه بهبود حاصلخیزی خاک، عاملی مثبت در بهبود بیومس میکروبی خاک بیان نمودند. همچنین آلماس و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کردند که در غلظت‌های بالای فلزات سنگین، گونه‌های حساس میکروبی از بین رفته و گونه‌های تحمل پذیر باقی می‌مانند که این امر منجر به کاهش تنوع گونه‌ای و به دنبال آن اختلال در چرخه عناصر غذایی می‌گردد.

تنفس پایه خاک

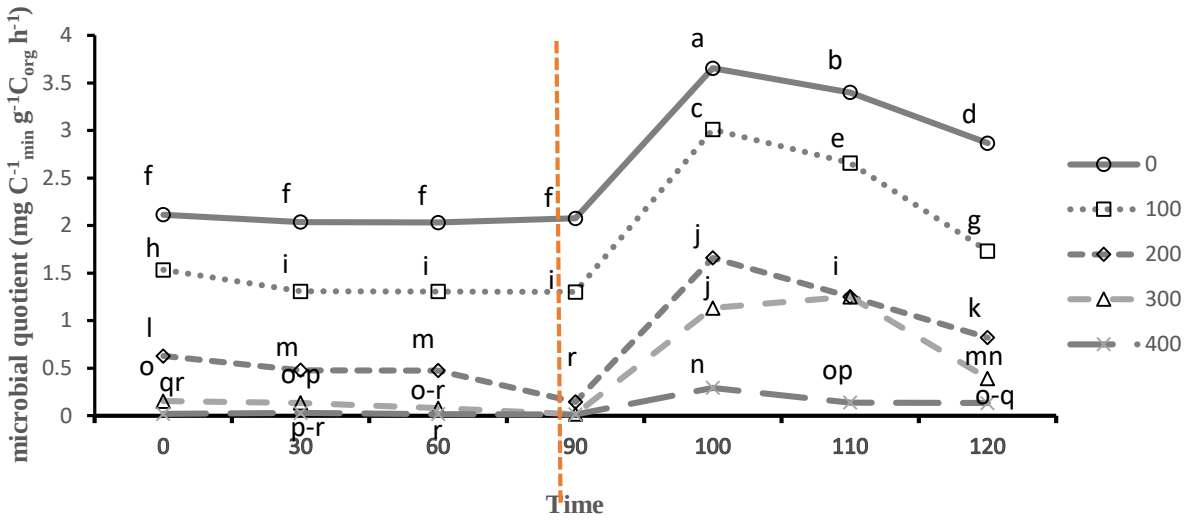
تغییرات تنفس خاک در تیمار شاهد تا روز ۹۰ ام از شروع آزمایش تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ولی ۱۰ روز پس از افزایش ورمی‌کمپوست ۷۳ درصد افزایش به دلیل تحریک و افزایش فعالیت میکروارگانیسم‌ها در خاک مشاهده شد. در سطوح غلظتی کروم، تا قبل از افزایش ورمی‌کمپوست، تنفس میکروبی خاک کاهش یافت که بیشترین میزان کاهش در تیمار K^{-} ۴۰۰ mg Cr مشاهده شد. در روزهای نخست آلودگی به دلیل مرگ گونه‌های میکروبی حساس و افزایش زیتوده آنها به خاک، گونه‌های پایدارتر بقاء بهتری می یابند و همچنین گونه‌های میکروبی برای مقابله با آلودگی انرژی بیشتری مصرف می کنند که این امر با افزایش تنفس در آنها همراه خواهد بود. ولی با گذشت زمان و افزایش شدت آلودگی میکروب‌ها قادر به مقاومت نبوده و فعالیت های بیولوژیکی آنها کم می شود (دیاز و همکاران ۲۰۰۷). با کاربرد ورمی‌کمپوست، در پایین‌ترین سطح کروم ۷۸ درصد و در بالاترین آن ۵۴ درصد افزایش معنی‌دار در تنفس خاک رخ داد. در انتهای دوره انکوباسیون خاک (۱۰ آذر) در همه تیمارها نسبت به ابتدای آلودگی با فلز سنگین کروم، افزایش معنی‌داری در تنفس خاک مشاهده می‌شود که نشان از تاثیر مثبت استفاده از ماده آلی در تضعیف تاثیر آلاینده بر جامعه میکروبی خاک دارد. قربانی و همکاران (۲۰۰۲) نیز نتایج مشابهی را در مورد تاثیر فلزات سنگین بر روی تنفس میکروبی خاک گزارش کردند.



شکل۳- روند تغییرات تنفس پایه خاک در سطوح مختلف کروم در طی ۱۲۰ روز انکوباسیون خاک (خط چین عمودی: زمان اضافه کردن ورمی کمپوست به خاک می‌باشد).

نسبت میکروبی

نسبت کربن بیومس میکروبی به کربن آلی خاک (نسبت میکروبی) الگوی مشابهی را با کربن بیومس میکروبی نشان داد. چون نمونه‌های خاک از نظر میزان کربن آلی یکسان بودند پس تنها عامل تغییر در نسبت میکروبی خاک، میزان کربن بیومس میکروبی خواهد بود که تغییرات این دو پارمتر مشابه شدند. در روز ۱۰۰ ام از شروع آزمایش، یعنی ۱۰ روز بعد از افزودن ورمی‌کمپوست به عنوان ماده اصلاحی در خاک نسبت میکروبی مانند کربن بیومس میکروبی افزایش معنی داری را در تمام تیمارها نشان داد و از ۵۶/۸۴ درصد در تیمار شاهد تا ۴۴/۸۲ درصد در تیمار ۴۰۰ mg Cr Kg^{-} متغیر بود. لیا و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که نسبت میکروبی در شرایط طبیعی خاک در حدود ۱ تا ۴ درصد می‌باشد ولی در خاکهایی که در معرض آلاینده‌ها هستند این نسبت معمولا کم شده و به کمتر از ۱ درصد خواهد رسید. با مشاهده نمودار شکل ۴ درمی‌یابیم که در غلظت‌های ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ mg Cr Kg^{-} نسبت میکروبی به زیر ۱ درصد در خاک رسیده‌است و حتی در غلظت ۱۰۰ میلی گرم کروم نیز میزان نسبت میکروبی بین ۱/۵ تا ۲ درصد می باشد. از طرفی در زمان اضافه کردن ماده آلی (روز ۹۰ ام) نسبت میکروبی در غلظت mg Cr Kg^{-} ۱۰۰ به حدود ۳ رسید ولی در غلظت های بالاتر کروم افزایش قابل توجهی در میزان نسبت میکروبی مشاهده نشد. این نتایج نشان می‌دهد که ورمی کمپوست در غلظت‌های پایین کروم، اثر تخریبی آلاینده را کم کرد ولی در غلظت های بالاتر از mg Cr Kg^{-} ۱۰۰ تاثیر آلاینده جبران ناپذیر است. در انتهای دوره انکوباسیون (۱۰ آذر) پس از تجزیه ماده آلی در خاک دوباره کاهش در نسبت میکروبی قابل توجه است که در غلظت mg Cr Kg^{-} ۱۰۰ کروم این میزان به بالای ۱درصد در خاک رسید.

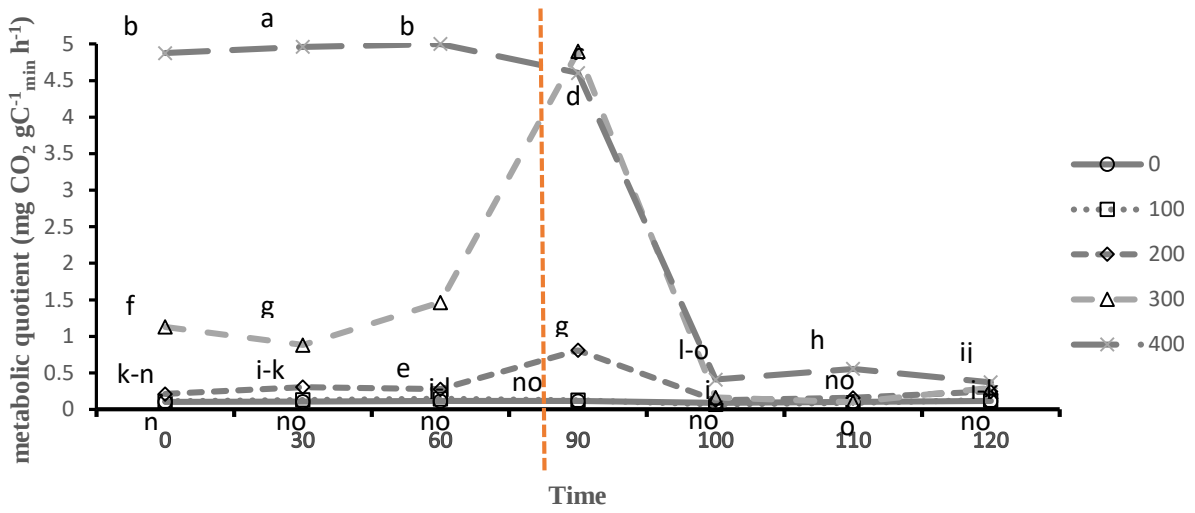


شکل۴- روند تغییرات نسبت میکروبی خاک در سطوح مختلف کروم در طی ۱۲۰ روز انکوباسیون خاک (خط چین عمودی:زمان اضافه کردن ورمی کمپوست به خاک می‌باشد).

شیرزاد و همکاران (۱۳۹۳) در بررسی آلودگی سرب روی تغییرات نسبت میکروبی خاک بیان کردند که اندازه کم نسبت میکروبی در خاک در غلظت‌های بالای سرب می‌تواند وابسته به کاهش بازده بهره گیری از بستره توسط ریز جانداران باشد چون ریز جانداران خاک انرژی بیشتری را برای زنده ماندن خود در خاک مصرف می‌کنند که بیشتر این انرژی برای ساخت پیکره آنها بکار می‌رفت. بروکس (۱۹۹۵) گزارش کرد آلودگی خاک با فلزهای سنگین منجر به کاهش نسبت میکروبی خاک می‌شود و این نسبت می تواند به عنوان یک کمیت سودمند برای نشان دادن آلودگی خاک با فلزهای سنگین گزارش شود.

سهم متابولیک

سهم متابولیک که عبارت است از CO_2 حاصل از تنفس پایه در واحد وزن بیومس میکروبی کربن در خاک، درواقع به طور غیر مستقیم کارایی انرژی میکروبی را در خاک بیان می‌کند. با افزایش غلظت کروم در خاک و همچنین گذشت زمان، افزایش در سهم متابولیک در همه تیمارها بجز تیمار شاهد، مشاهده شد و مخصوصا در بالاترین غلظت کروم (۴۰۰ mg Cr kg^{-}) تغییرات سهم متابولیک نسبت به همه تیمارها مشهودتر بود. با گذشت ۱۰ روز از افزودن ماده آلی به خاک، به دلیل افزایش بیومس میکروبی کربن در خاک، سهم متابولیک دوباره افزایش یافت. در غلظت ۳۰۰ mg Cr kg^{-} بعد از افزودن ماده آلی سهم متابولیک از۵/۴۳ در روز ۹۰ ام به ۰/۱۶۴در روز ۱۰۰ ام رسید و همین کاهش با روند شدید تر در تیمار ۴۰۰ mg Cr kg^{-} نیز اتفاق افتاد. افزایش سهم متابولیک در حضور آلاینده نشان دهنده مرگ و میر بالای میکروارگانیسم ها و در نتیجه کاهش کربن زیتوده میکروبی در خاک می‌باشد، در واقع می توان گفت که هرچه سهم متابولیک کمتر باشد چرخه های میکروبی کارآمدتر هستند. محققان درباره افزایش مقدار سهم متابولیک در اثر استفاده از لجن فاضلابی که آلوده به فلزات سنگین است، نتایج مشابهی را گزارش کرده‌اند (فورتز ۲۰۰۰). شاندر و بروکس (۱۹۹۱) بیان کردند که این شاخص میکروبی در خاک‌های آلوده با فلزات سنگین بیشتر از خاک‌های غیر آلوده است. باتوجه به نمودار شکل۵ مشاهده می شود که ورمی‌کمپوست به طور معنی داری سهم متابولیک را در خاک‌های آلوده به کروم کاهش داد. در این پژوهش، سهم متابولیک در پایان آزمایش (۱۰ آذر) در غلظت ۳۰۰ mg Cr kg^{-} حدود ۲۶ درصد و در غلظت ۴۰۰mg Cr kg^{-} به بیش از ۱۰۰ درصد کاهش یافت.



شکل۵- روند تغییرات سهم متابولیک در سطوح مختلف کروم در طی ۱۲۰ روز انکوباسیون خاک (خط چین عمودی: زمان اضافه کردن ورمی کمپوست به خاک می‌باشد).

نتیجه گیری کلی

در این پژوهش کلیه شناسه های میکروبی اندازه گیری شده در خاک کاهش معنی‌داری را با افزایش غلظت کروم در خاک نشان دادند. در غلظت های بالاتر از ۱ mg Cr kg^{-} ۲۰۰ تاثیر میزان آلودگی بر کلیه شاخص‌های زیستی مشهودتر بود، پس می توان از این دامنه غلظتی به عنوان غلظت بحرانی آلودگی برای کروم در این خاک مورد بررسی نام برد. همچنین از نتایج این پژوهش چنین برمی‌آید که افزودن مواد آلی در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین، نظیر ورمی‌کمپوست، می‌تواند تا حدودی از اثر مخرب تنش‌های ایجاد شده توسط آلاینده بر جامعه میکروبی خاک بکاهد. ورمی‌کمپوست با بهبود کیفیت خاک می‌تواند در افزایش کارایی چرخه‌های طبیعی میکروبی در خاک موثر باشد. بنابراین پیشنهاد می‌شود که در خاک‌های آلوده به غلظت‌های بحرانی کروم، با استفاده از ورمی‌کمپوست، امکان کاهش تاثیرات نامطلوب کروم بر فعالیت‌های میکروبی خاک وجود دارد.

منابع مورد استفاده

Almas A, 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.

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

Banerjee M, Mishra S, Chatterjee J, 2004. Scavenging of nickel and chromium toxicity in *Aulosirafertilissima* by immobilization: Effect on nitrogen assimilating enzymes. Electronic J of Biotech 7: 302−309.

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

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

Cassida LE, Klein JD and Santoro D, 1964. Soil dehydrogenase activity. Soil Science 98: 371-374.

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 silt loam uk Soil. Soil Biol Biochem 23: 927-32.

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

Dick WA and Tabatabai MA, 1993. Significance and potential uses of soil enzymes, Pp. 95-127, In B. Metting (ed.), Soil Microbial Ecology, Marcel Dekker, New York.

Fontaine S, Marotti A and Abbadie L, 2003. The Priming Effect of Organic Matter: A Question of Microbial Competition. Soil Biology Biochem 35: 837-843.

Fortes Neto P, 2000. Degradation and bioaccumulation of soil index biological. Ph.D. Thesis, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, Brasil, 113.

Ghorbani NR, Salehrastin N and Moeini A, 2002. Heavy metals affect the microbial populations and their activities, 17th WCSS. Thailand, Symposium no. 54: 1-11.

Hu C and Cao Z, 2007. Size and activity of the soil microbial biomass and soil enzyme activity in long-term field experiments. W.J. of Agri. Sci. 3: 63-70.

Isermeyer H, 1952. Einee in fachemethode zurbestimmang der bodenatmung und der carbonate imBoden. Z P FlanzenernaehrBodenkd 56: 26-38.

Killham K, 1994. Soil Ecology, Cambridge University Press, UK.

Liao M, Chen CL, Zeng LS, and CY, 2007. Influence of lead acetate on soil microbial biomass and community structure in two different soils with the growth of Chinese cabbage (*Brassicachinensis*). Chemosphere 66: 1197–1205.

Lopes EB, 2001. Diversidademetabólicaem solo tratado com biossólidos, M.Sc. Dissertation, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, Brasil, 65.

Martens R, 1991. Methodenzur quantitative Bestimmung und Charakterisierung dermikrobiellen biomasse in Boden. Eigenverlag des institutes fürBodenbiologie der FAL Braunschweig.

Mohammadi, K, Heidari MT, KarimiNezhad S, Ghamari. Y, 2012. Contrasting soil microbial responses to fertilization and tillage systems in canola rhizosphere. Saudi J. Biol. Sci. 19(3): 377-383.

Page AL, Miller RH and Keeney DR, 1982. Methods of Soil Analysis. 2nd ed. A.A.C., Inc., Soil S.S.S.A., Inc., Madison Publisher, Wisconsin, USA.

Salazar S, Sanchez L, Alvarez J, Valverde A, Galindo P, Igual J, Peix A, 2011. Correlation among soil enzyme activities under different forest system management practices. Ecological Engineering 37: 1123-1131.

Shirzade N, Aliasgharzad N, and Najafi N, 2012. Changes in Microbial Biomass Carbon, Ecophysiological indices, Basal Respiration and Substrate-Induced Respiration of Soil after Incubation with Different Lead Levels. Water and Soil Science- University of Tabriz. 23: 111-124.

Šíša R, 1993. Enzym ová aktivit apůdyja koukazate ljejíbiologi ckéaktivity. Rostl. Výr.,39: 817–825

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

Speir TV, Kettles HA, Parshotam A, Searle P.L, Vlaar LNC, 1995. A simple kinetic approach to derive the ecological dose value ED 50, for the assessment of Cr (VI) toxicity to soil biological properties. Soil Biol Biochem 27: 801–811.

Stępniewska Z and Wolińska A, 2004. Enzyme Activity In The Soil Contaminated by Chromium (III, VI) Forms. Modern physical & physicochemical methods & their applications in agro ecological research. Institute of Agro physics PAS, Lublin, 201-207.

Tejada M, Gonzalez AM, Garcıa-Martınez and Parrado J, 2008. Application of a green manure and green manure composted with *beet vinasseon* soil restoration: Effects on soil properties. Biores Technol 9: 4949-4957.

Viti C, 2006. Response of microbial communities to different doses of chromate in soil microcosms. Applied Soil Ecology 34: 125−139.

Waksman SA, 1992. Microbiological analysis of soil as an index of soil fertility. III. Influence of fertilization upon numbers of microorganisms in soil. Soil Sci 14: 321-346.

Walkley A, and Black A, 1934. An examination of Degtjareff method for determining soil organic matter, and proposed modification of the chromic acid tritation method. Soil Science 37:29-38.

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

Wright AL, Hons FM and Matocha JE, 2005. Tillage impacts on microbial biomass and soil carbon and nitrogen dynamics of corn and cotton rotations. Applied Soil Ecology 29: 85–92.

Yuan B, and Yue D, 2012. Soil microbial and enzymatic activities across a chronosequenceof chinese pine plantation development on the loess plateau of china. Pedosphere 22: 1-12.

Zhang N, He X, Gao Y, Li Y, Wang H, Ma D, Zhang R, and Yang S, 2010. Pedogenic carbonate and soil dehydrogenase activity in response to soil organic matter in *artemisia ordosica* community. Pedosphere, 20: 229-235.