Đánh giá ảnh hưởng vi sinh vật hệ rễ lên khả năng hấp thu đồng (Cu) trong đất của cây cỏ đậu (*Arachis pintoi* Krapov & Gregory)

- **Đặng Diệp Yến Nga**
- **Phạm Thị Kim Trong**

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 27 tháng 02 năm 2015, nhận đăng ngày 12 tháng 01 năm 2016)

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá tiềm năng hấp thu đồng (Cu) trong đất của cây cỏ đậu (Arachis pintoi) kết hợp với chủng vi sinh vật được phân lập từ nốt sần của rễ nhằm tìm ra một phương pháp mới để nâng cao hiệu quả xử lý/ cải tạo đất ô nhiễm kim loại nặng. Việc bổ sung $CuSO_4.5H_2O$ vào đất để tạo các mức ô nhiễm khác nhau 200, 400 và 600 mg/kg. Riêng ở nồng độ 400 mg/kg được thực hiện khảo sát thêm trường hợp đất không khử trùng và đất khử trùng có bổ sung vi khuẩn phân lập từ nốt sần ở rễ của cây Arachis pintoi. Các nồng độ còn lại, chỉ thực hiện trên đất không khử trùng và không bổ sung vi khuẩn phân lập từ nốt sần của rễ cây. Kết quả của thí nghiệm đã cho thấy cây có khả năng sinh trưởng bình thường trên đất có nồng độ Cu 200 mg/kg. Cây tích lũy hiệu quả đến 668,2 mgCu/kg ở đất có nồng độ 200 mg/kg, trong đó hàm lượng Cu trong rễ là 107 mg/kg và thân lá là 561,2 mg/kg. Ở hai nồng độ 400 mg/kg và 600 mg/kg, cây tích lũy Cu cao hơn nhưng cây bắt đầu bị ngộ độc và sinh khối thu được khá thấp nên nhìn chung hiệu quả xử lý về lâu dài không cao. Tiềm năng xử lý Cu trong đất còn được thể hiển qua hệ số tích lũy sinh học BCF (Bioconcentration Factor) và hệ số vận chuyển TF (Translocation Factor). Khi đất có nồng độ Cu 200 mg/kg thì các hệ số này khá cao, lần lượt là 3,34 và 5,24. Các hệ số này đều lớn hơn 1 cho thấy Arachis pintoi thích hợp xử lý đất có nồng độ từ 200-400 mg/kg. Bên cạnh đó, vi khuẩn phân lập từ rễ cây cỏ đậu được bổ sung trong thí nghiệm sau khi định danh là Burkholderia kururiensis. Mặc dù vi khuẩn Burkholderia kururiensis là vi khuẩn cố định đạm và kích thích cây sinh trưởng nhưng thí nghiệm cho thấy vi khuẩn Burkholderia kururiensis có khả năng chống chịu kém với Cu (25 mg/L). Vì vậy, để nâng cao hiệu quả xử lý Cu của thực vật kết hợp với vi sinh vật (VSV), thì cần nghiên cứu thêm một số chủng vi khuẩn khác trong hệ rễ thực vật. Kết quả bài nghiên cứu đã khẳng định tiềm năng chiết rút kim loại nặng (KLN) bằng thực vật (phytoextraction) của Arachis pintoi rất cao và dễ dàng áp dụng vào thực tế trong tương lai.

Từ khóa: *Arachis pintoi, Burkholderia kururiensis, hấp thu kim loại đồng (Cu), cải tạo đất ô nhiễm, vi khuẩn cộng sinh nốt sần, cây cỏ đậu.*

MỞ ĐẦU

Kim loại đồng (Cu) có vai trò quan trọng trong các phản ứng chuyển hóa sinh hóa trong cơ thể sống. Tuy nhiên, Cu vừa là nguyên tố vi lượng, vừa là chất độc hại đối với con người, cây trồng và động vật. Hàm lượng cho phép của Cu trong rau xanh là 30 mg/kg theo "Ngưỡng giới hạn kim loại nặng" của bộ Y Tế (1995). Trong trường hợp đồng tích lũy trong gan quá cao sẽ dẫn đến bệnh Wilson's, khi bắt đầu nhiễm sâu vào cơ thể sẽ gây các dấu hiệu bất lợi cho mô hạch, tổn thương gan, thận [1, 2].

Trong môi trường đất, hàm lượng Cu trong tự nhiên xấp xỉ 24–70 mg/kg, phụ thuộc vào thành phần khoáng vật và quá trình hình thành đất. Tuy nhiên, do các hoạt động của con người đã làm hàm lượng Cu trong đất vượt tiêu chuẩn cho phép. Nguồn gây ô nhiễm Cu chủ yếu là hoạt động khai thác khoáng sản, các lò đúc kim loại, bùn cống rãnh, sự lắng đọng do mưa của các chất thải khô, bụi, chất thải công nghiệp và các loại thuốc diệt nấm, chất diệt tảo, đặc biệt là hỗn hợp Bordeaux. Tại Úc, 30000 ha đất trồng táo và lê bị ô nhiễm, phải cải tạo để sử dụng cho mục đích khác do nồng độ Cu trong đất sau nhiều lần phun thuốc đã lên tới 110–1500 mg/kg [2]. Ở Việt Nam, theo kết quả đo đạc với 4 vùng khai thác mỏ đặc trưng (mỏ than Núi Hồng, mỏ sắt Trại Cau, mỏ chì - kẽm làng Hích, xã Tân Long và mỏ thiếc núi Pháo, Hà Thượng) có hàm lượng Cu trung bình là 1260 mg/kg,… cao gấp nhiều lần tiêu chuẩn cho phép đối với đất nông nghiệp là 50 mgCu/kg. Đất trồng ở khu vực mỏ thiếc Sơn Dương, Tuyên Quang cũng có hàm lượng Cu khá cao lần lượt là 235 mg/kg và As là 642 mg/kg [3].

Hiện nay, phương pháp xử lý ô nhiễm kim loại nặng (KLN) trong đất được chú ý nhất là phương pháp xử lý bằng thực vật (phytoremediation), cơ chế xử lý được áp dụng phổ biến là chiết xuất chất ô nhiễm bằng thực vật (phytoextraction). Phytoextraction là phương pháp xử lý chất ô nhiễm bằng rễ thực vật và vận chuyển chất ô nhiễm trong các bộ phận của cây. Chất ô nhiễm thường sẽ được loại bỏ sau khi thu hoạch thực vật. Công nghệ này thường được áp dụng để chiết rút và loại bỏ chất ô nhiễm trong đất, bùn cặn, trầm tích. Những chất ô nhiễm có thể loại bỏ bao gồm một số kim loại như Ag, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Zn; á kim như As, Se và một số chất phóng xạ như ^{90}Sr, ^{137}Cs, ^{239}Pu, ^{238,234}U. Một số loài thực vật điển hình là cây mù tạc Ấn Độ, cây *pennycress*, hướng dương, cây dương,... [15]. Ngoài khả năng xử lý của hệ rễ thực vật thì vi sinh vật (VSV) trong đất và VSV cộng sinh vùng rễ còn đóng góp một vai trò không nhỏ. Các loài vi khuẩn kết hợp thực vật (Plant-associated microbes) thúc đẩy quá trình phytoremediation trong đất nhiễm KLN bằng cách tác động đến tính linh động/cố định của kim loại, khả năng oxi hóa - khử, tính tan, khả năng tạo các phức kim loại,… nhờ vào các hoạt chất như siderophores, chelator, acid hữu cơ (LMWOAs), biosurfactants, polymer, glycoprotein và biosortion. Nhờ đó, vi khuẩn hỗ trợ cây chống lại điều kiện môi trường bất lợi. Theo nghiên cứu của Arwidsson và cộng sự (2010), *Aspergillus niger* tạo oxalic acid, *penicillium bilaiae* tạo citric acid làm hòa tan Ni, Cu, Zn, Pb trong đất ô nhiễm hay nghiên cứu của Venkatesh và Vedaraman, 2012 cũng cho thấy *Pseudomonas aeruginosa* tạo rhamnolipids (một biosurfactants) đã làm tăng tính linh động của Cu [13].

Bên cạnh đó, ngoài những ứng dụng truyền thống trong cải tạo, tăng hàm lượng nitrogen cho đất thì cây họ Đậu gần đây còn nhận được nhiều sự quan tâm từ các nhà khoa học vì khả năng xử lý đất ô nhiễm kim loại (phytostabilization) và khả năng chống chịu cao với As, Cd, Cr của các vi khuẩn cộng sinh như *Rhizobium leguminosarum, Bradyrhizobium, Mesorhizobium*. Thực tế nghiên cứu tại mỏ khai thác pyrit Aznalco´llar, Nam Tây Ban Nha của Jose´

Antonio Carrasco và cộng sự đã chứng minh được mối quan hệ trên. Trong 99 loài hiện diện, có tới 15 loài thuộc họ Đậu và sau khi phân lập 100 chủng *Rhizobium* cho thấy 41 chủng có khả năng chống chịu cao với hàm lượng As (300 mg/L), Cu (100 mg/L), Pb (500 mg/L) [8]. Vì vậy, xu hướng xử lý ô nhiễm đất bằng cách kết hợp thực vật - VSV hệ rễ đang mở ra hướng nghiên cứu mới và tiềm năng lớn trong công nghệ xử lý ô nhiễm đất.

Cây cỏ đậu có tên khoa học là *Arachis pintoi* Krap & Greg, thuộc họ Đậu, còn có tên là hoàng lạc, cỏ đậu phộng, cây lạc dại, ... Theo Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp các tỉnh miền núi phía Bắc (NOMAFSI), cỏ đậu có xuất xứ từ Nam Mỹ, du nhập vào Việt Nam qua một số dự án, hệ thống canh tác. Cỏ đậu còn có khả năng cộng sinh với vi khuẩn cố định đạm tạo các nốt sần trên rễ. Loài cỏ đậu thích hợp với những khu vực khí hậu nhiệt đới ẩm, có thể sinh trưởng trên đất nghèo dinh dưỡng, hạn hán, chống chịu tốt với hàm lượng Mn, Al cao. Ở miền Nam, cỏ đậu được trồng để phủ đất đã được thử nghiệm tại vườn hồ tiêu, xoài, điều (Bình Phước, Kon Tum, Đăk Lăk), thanh long,…giúp chống xói mòn, tăng độ ẩm và hệ VSV cố định đạm. Ngoài ra, hiện nay, cây cỏ đậu còn được dùng tạo cảnh quan cho đường giao thông.

Vì vậy, nghiên cứu này tiến hành nhằm đánh giá sự thích nghi và khả năng chống chịu của loài cỏ đậu trong xử lý đất ô nhiễm Cu, xác định ảnh hưởng và vai trò của chủng vi khuẩn cộng sinh vùng rễ tới hiệu quả xử lý KLN và sự sinh trưởng của cây cỏ đậu. Từ đó đưa ra các giải pháp nâng cao hiệu quả xử lý KLN và ứng dụng thực vật vào thực tế.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chuẩn bị đất trồng

Đất trồng không khử trùng: là đất sạch được phơi khô, đập nhỏ và loại bỏ một số tạp chất để đồng nhất về kích thước hạt, tính chất hóa lí và sinh học. Đất sạch là đất được phân tích các thông số chất lượng (pH, độ chua, chất hữu cơ, nitrogen, P_2O_5, vi sinh vật, hàm lượng kim loại nặng theo Tiêu Chuẩn Việt Nam (TCVN) [5, 6, 7, 8, 9, 10, 11].

Đất khử trùng: được sấy trong tủ sấy ở 100 ^{0}C và kiểm tra lại hàm lượng vi sinh vật trên môi trường thạch [4]. Sau khi sấy, đất được để nguội và bảo quản trong túi nilon kín.

Đất được làm bẩn với dung dịch $CuSO_4.5H_2O$ (hóa chất từ Guangdong Guanghua Chemical Factory Co., Ltd.) theo các nồng độ khác nhau phụ thuộc vào yêu cầu thí nghiệm.

Chuẩn bị cây *Arachis pintoi* và phương pháp phân tích, đánh giá

Mỗi chậu có đường kính 15 cm, chiều cao 12 cm và chứa 1 kg đất/chậu (Hình 1). Cây cỏ đậu được chọn từ hom giống ươm trồng sẵn. Mỗi chậu trồng 2 hom giống có kích thước thân dài khoảng 20 cm, chiều dài rễ 5 cm, mỗi nghiệm thức được trồng 2 chậu và toàn bộ thí nghiệm được lặp 2 lần.

Hình 1. Cây *Arachis pintoi* trong túi ươm cây giống ban đầu và trong chậu trồng

Khi thu mẫu, cây được nhổ cẩn thận để tránh đứt rễ, rửa sạch cây nhiều lần bằng nước máy và nước cất, cân khối lượng thân, lá và rễ. Sau đó, mẫu đem cắt nhỏ và sấy khô ở nhiệt độ 105 ^{0}C, nghiền nhỏ để phá mẫu thực vật bằng nitric acid và sulfuric acid [17]. Hàm lượng Cu trong thực vật và quá trình thí nghiệm được phân tích bằng máy ICP- MS của Hãng Agilent Technologies.

Xác định hệ số TF và BCF

Hệ số TF và BCF được dùng để đánh giá tiềm năng tích lũy và xử lý KLN bằng thực vật xác định như sau:

Hệ số vận chuyển: $TF = \frac{[Cu]_{shoot}}{[Cu]_{root}}$

Hệ số tích lũy sinh học: $BCF = \frac{[Cu]_{shoot\ and\ root}}{[Cu]_{soil}}$ của một kim loại là hệ số giữa tổng lượng kim loại có trong cây với lượng kim loại có trong môi trường. Hệ số càng cao thì hiệu quả xử lý kim loại càng lớn.

Mối tương quan giữa khả năng hấp thu kim loại của cây và sự giảm hàm lượng của kim loại đó trong môi trường được thể hiện qua hệ số tích lũy sinh học.

Phân lập và định danh vi sinh vật

Môi trường nuôi cấy chủng vi khuẩn phân lập từ nốt sần của rễ cây cỏ đậu là môi trường YEM được chuẩn bị với các thành phần cho 1 L dung dịch nuôi cấy như sau: manit/ mannitol/ glucose (10 g), K_2HPO_4 (0,5 g), $MgSO_4.7H_2O$ (0,2 g), NaCl (0,2 g), $CaCO_3$ (0,3 g), Dịch chiết nấm men 10 % (100 mL), agar (20 g), côngô đỏ 1 % (10 mL), nước cất (1000 mL), pH 6,8 ± 0,2 [16].

Vi khuẩn được phân lập từ các nốt sần ở rễ cây và nuôi, ủ trên các đĩa thạch ở nhiệt độ 25-28 ^{0}C trong 5–7 ngày (Hình 2). Vi sinh vật sau khi phân lập mẫu được đem định danh tại công ty Nam Khoa, sử dụng công cụ Blast Search trên NCBI, kết quả cho thấy vùng trình tự khuếch đại tương đồng 100 % với chủng mẫu. Sau khi phân lập được chủng vi khuẩn thuần khiết, tiến hành nhân sinh khối vi sinh vật trong môi trường dịch thể. Sau khoảng 5–6 ngày, sinh khối vi khuẩn thu được sẽ được dùng tưới vào cây trồng với thể tích trung bình 50 mL/chậu/lần.

Hình 2. Các nốt sần trên rễ cây cỏ đậu (được đánh dấu trong vòng tròn đỏ) (hình trái) và vi sinh vật phân lập được từ nốt sần (hình phải)

Cách bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm xác định khả năng chống chịu với kim loại đồng của cây cỏ đậu trên đất có hàm lượng Cu tăng dần từ 0–1600 mgCu/kg với các nghiệm thức đối chứng (ĐC), Cu $_{200}$, Cu $_{400}$, Cu $_{600}$, Cu $_{800}$, Cu $_{1000}$, Cu $_{1200}$, Cu $_{1400}$, Cu $_{1600}$, ứng với hàm lượng Cu trong đất (mg/kg) lần lượt là 0, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600 (các mẫu được lặp 2 lần).

Thí nghiệm đánh giá khả năng tích lũy KLN của cây *Arachis pintoi* trên đất không khử trùng với các nghiệm thức đối chứng (ĐC), Cu $_{200}$, Cu $_{400}$, Cu $_{600}$ ứng với hàm lượng Cu trong đất (mg/kg) lần lượt là 0, 200, 400, 600 (các mẫu được lặp 2 lần).

Thí nghiệm đánh giá khả năng tích lũy KLN của *Arachis pintoi* trên đất khử trùng với các nghiệm thức đối chứng ($ĐC_{KT}$), Cu_{KT-400} ứng với hàm lượng Cu trong đất (mg/kg) là 0 và 400. Đồng thời, thí nghiệm cũng tiến hành với các nghiệm thức $Cu_{KT-400-vsv}$ có hàm lượng Cu trong đất (mg/kg) là 400 và được bổ sung VSV (các mẫu được lặp 2 lần).

Thí nghiệm xác định khả năng chống chịu của vi sinh vật được phân lập từ nốt sần rễ cây cỏ đậu trong môi trường thạch chứa kim loại Cu trên đĩa petri.

Cây được ghi nhận các biểu hiện sinh trưởng và tiến hành thu hoạch để phân tích KLN vào ngày thứ 30, 45, 60.

KẾT QUẢ

Đất trồng được phân tích các thông số chất lượng và thu được kết quả như sau: pH-H_2O (4,23), độ chua trao đổi (0,95 mg dlH^+/100 g đất), độ chua thủy phân (13,5 mg dlH^+/100 g đất), hàm lượng chất hữu cơ (3,3 %), hàm lượng Cu trong đất đối chứng ($Cu_{Đ-ĐC}$) (25 mg/kg) và hàm lượng Cu trong thực vật đối chứng ($Cu_{TV-ĐC}$) (15 mg/kg).

Kết quả khảo sát khả năng chống chịu của *Arachis pintoi* theo nồng độ Cu

Khả năng chống chịu của thực vật là một bước quan trọng để xác định ngưỡng giới hạn KLN mà cây có thể sống sót và hấp thu KLN được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2. Khả năng chống chịu Cu của *Arachis pintoi* trên đất không khử trùng

Stt	Công thức	Sinh khối khô (g)	Hàm lượng Cu tích lũy theo sinh khối (mg)	Lượng Cu tích lũy (mg/kg)	Thời gian sống (ngày)
1	Đối chứng (ĐC) Cu = 0 mg/kg	1,178	0,022	18.6	Sinh trưởng bình thường
2	Cu_{200}	1,544	0,062	40	Sinh trưởng bình thường
3	Cu_{400}	1,342	0,195	145	Dấu hiệu bị ngộ độc nhẹ
4	Cu_{600}	1,283	0,199	155	Dấu hiệu bị ngộ độc trung bình
5	Cu_{800}	0,902	1,101	1220	Dấu hiệu bị ngộ độc nặng
6	Cu_{1000}	0,707	0,993	1404	23
7	Cu_{1200}	0,684	0,909	1328	15
8	Cu_{1400}	0,634	0,789	1244	11
9	Cu_{1600}	0,794	1,062	1337	5

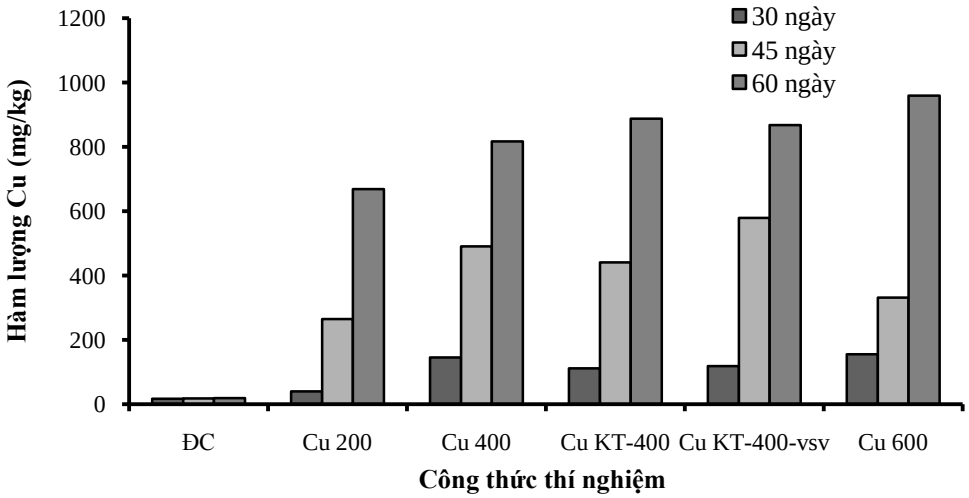
Kết quả ở Bảng 2 cho thấy *Arachis pintoi* có thể sinh trưởng trên đất có hàm lượng Cu trong khoảng 0- 600 mg/kg. Ở các nồng độ 1000, 1200, 1400, 1600 mg/kg thì cây chỉ sống được 23, 15, 11 và 5 ngày tương ứng, riêng đất có nồng độ 800 mg/kg thì cây bị ngộ độc Cu nặng, dù có thể sống đến ngày thứ 30 nhưng cây hoàn toàn không có khả năng sinh trưởng tiếp, hệ rễ không phát triển. Ở nồng độ 200 mg/kg, cây vẫn phát triển bình thường, lượng sinh khối khô thu được cao nhất, đối với nồng độ Cu_{400} và Cu_{600} thì cây bắt đầu có dấu hiệu ngộ độc tương ứng từ ngày 60 và ngày 45, sinh khối bắt đầu giảm so với cây đối chứng và Cu_{200} (Hình 3). Vậy *Arachis pintoi* thích hợp ứng dụng xử lý Cu trong đất có nồng độ dưới 600 mg/kg.

Hình 3. Các chậu cây cỏ đậu sau 30 ngày theo thứ tự hàm lượng Cu tăng dần từ trái sang phải: cây đối chứng, cây có nồng độ Cu 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400 và 1600 mg/kg

Xác định hàm lượng Cu tích lũy trong thực vật theo thời gian

Hàm lượng Cu tích lũy trong khoảng thời gian 30, 45, 60 ngày được thể hiện trong Hình 4. Trong 30 ngày, *Arachis pintoi* hấp thụ Cu khá thấp, khoảng từ 40 – 155 mg/kg. Trong 45 ngày, khả năng tích lũy Cu trong cây của lô thí nghiệm Cu_{200} tăng lên cao nhất, tiếp theo là $Cu_{KT-400-vsv}$, Cu_{KT-400}, Cu_{400} và Cu_{600}. Xu hướng tích lũy Cu trong thân không có sự thay đổi lớn so với hàm lượng tích lũy Cu ở thời điểm 30 ngày. Tuy nhiên, $Cu_{KT-400-vsv}$ đã tích lũy hàm lượng Cu cao hơn do sinh khối của cây đã tăng nhiều hơn. Nguyên nhân dẫn đến sự chênh lệch này là do quá trình bổ sung VSV đã cung cấp cho đất một lượng chất hữu cơ và độ ẩm, làm kích thích sinh trưởng.

Trong 60 ngày, hàm lượng Cu tích lũy trong cây đã tăng đáng kể. Trong đó, lô thí nghiệm Cu_{200} tích lũy Cu tăng cao nhất, từ 265 mg/kg đến 668,2 mg/kg, tiếp theo là lô thí nghiệm Cu_{600}, Cu_{KT-400}, Cu_{400} và $Cu_{KT-400-vsv}$. Từ đây, kết quả đã chứng minh lô thí nghiệm Cu_{400}, Cu_{600} đã bị ngộ độc nên sinh khối và khả năng tích lũy Cu tăng chậm, hiệu quả xử lý bắt đầu giảm. Trong khi đó, Cu_{KT-400} và $Cu_{KT-400-vsv}$ lại có nồng độ Cu tích lũy trong cây cao hơn lô thí nghiệm Cu_{400}. Nguyên nhân là do ở giai đoạn này, đất đã khôi phục lại một phần tính chất ban đầu và hệ VSV đất đang được hình thành trở lại với các loại nấm, vi khuẩn, xạ khuẩn trong đất.



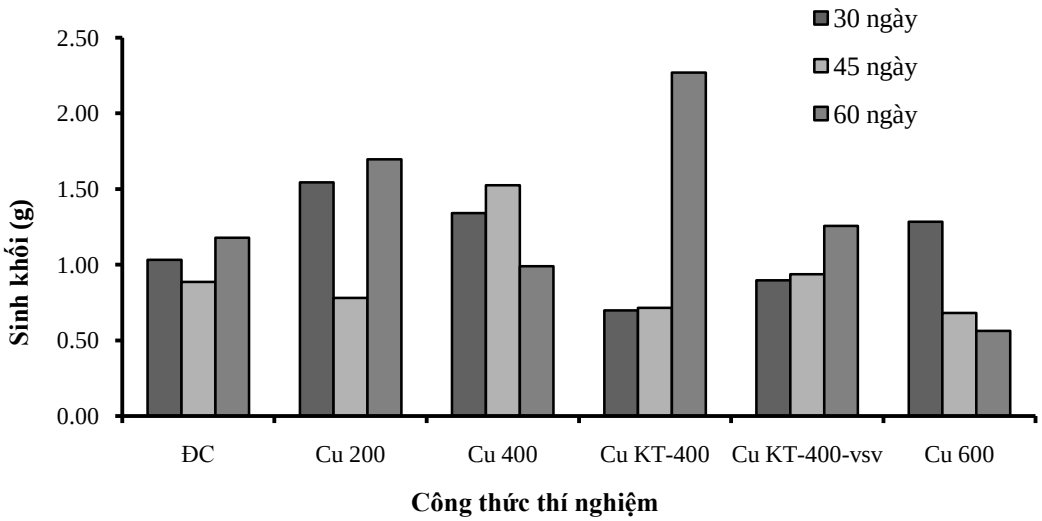
Hình 4. Hàm lượng Cu tích lũy trong *Arachis pintoi* theo các nồng độ Cu khác nhau (mg/kg) sau 30, 45 và 60 ngày

Trong khoảng thời gian 2 tháng, hàm lượng cao nhất mà cây hấp thụ là 638,7 mg/kg và khoảng tích lũy từ 462–638,7 mg/kg. Xét theo Baker và Brooks (1989), với nồng độ Cu tích lũy trong thân lá thực vật nhỏ hơn 1000 mg/kg đối với Cu thì cây *Arachis pintoi* được xếp vào loài thực vật tích lũy kim loại Cu (accumulators). Mặt khác, phần trăm hàm lượng Cu tích lũy trong sinh khối khô của cây đều nhỏ hơn 0,1 %. Vì vậy, *Arachis pintoi* được xếp là loài thực vật tích lũy Cu.

Đánh giá sinh khối thực vật thu được theo thời gian trên đất có nồng độ Cu khác nhau

Dựa trên Hình 5 cho thấy lô thí nghiệm Cu_{200}, cây sinh trưởng rất tốt, thậm chí còn phát triển hơn cả cây đối chứng, còn ở các lô thí nghiệm Cu_{400} và Cu_{600} có sinh khối cây thu được thấp hơn và giảm theo chiều tăng nồng độ Cu trong đất. Điều này hoàn toàn phù hợp với thí nghiệm xác định tính chống chịu do cây đã bắt đầu bị ngộ độc Cu, đặc biệt là ở lô thí nghiệm Cu_{600}, cây giảm sinh khối rất mạnh. Sau 60 ngày, sinh khối cây thu được khoảng 0,562–2,270 g.

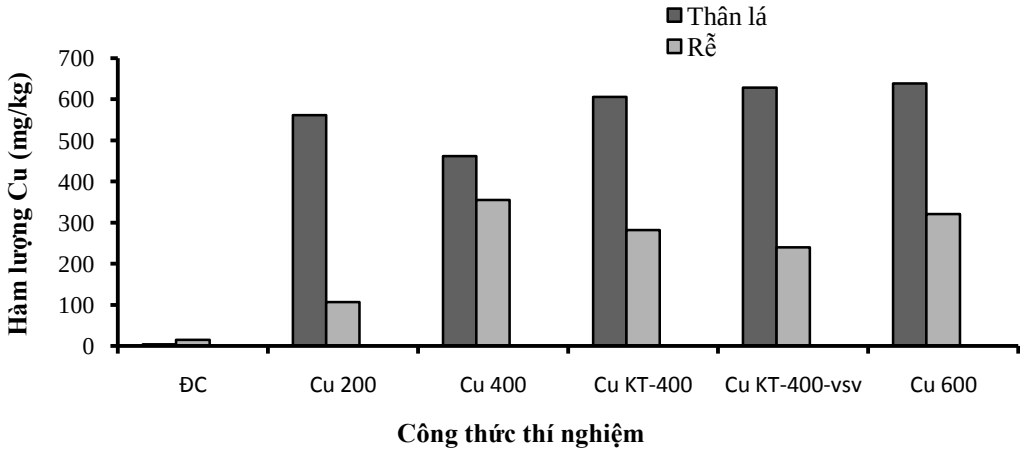
Đối với Cu_{KT-400}và $Cu_{KT-400-vsv}$, sinh khối cây thu được thấp hơn vào 30 ngày và 45 ngày so với lô thí nghiệm Cu_{400}. Sau đó, sinh khối liên tục tăng theo thời gian, vào ngày thứ 60 thu được 2,270 g và 1,257 g ứng với Cu_{KT-400} và $Cu_{KT-400-vsv}$. Nguyên nhân là do trong khoảng thời gian từ lúc trồng đến 30 ngày, cây được trồng trên đất khử trùng, đất đã bị thay đổi một số tính chất như giảm khả năng giữ nước, giảm độ ẩm đất, hệ vi sinh vật đất bị tiêu diệt, đất bị mất một số hợp chất hữu cơ dễ bay hơi,… nên cây không thể có điều kiện tốt để sinh trưởng so với đất không khử trùng. Điều này dẫn đến sinh khối cây giảm, sau một khoảng thời gian sinh trưởng, cây bắt đầu thích nghi và đất dần dần khôi phục được tính chất ban đầu nên sinh khối cây tăng dần lên. Trong lô thí nghiệm $Cu_{KT-400-vsv}$ thì hàm lượng Cu tích lũy vẫn thấp hơn so với lô thí nghiệm Cu_{400} ở thời gian 30 và 45 ngày, đất khử trùng và $Cu_{KT-400-vsv}$ lại tích lũy Cu cao hơn ở thời gian 60 ngày cho thấy VSV bổ sung chưa có tác dụng thúc đẩy sinh trưởng và tích lũy Cu ở thực vật.



Hình 5. Sinh khối thực vật thu được theo thời gian trên đất có nồng độ Cu khác nhau

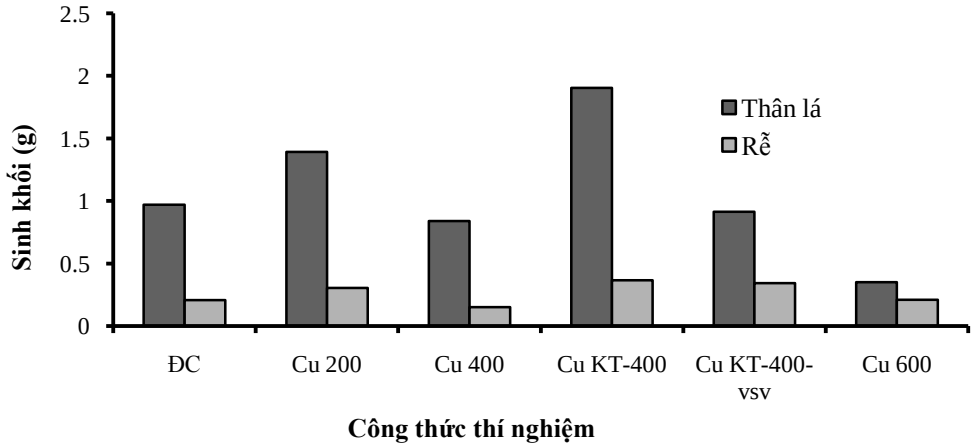
Xác định hàm lượng Cu tích lũy trong thân lá và rễ của *Arachis pintoi*

Sau thời gian 60 ngày, các mẫu cây được thu hoạch và phân tích hàm lượng Cu tích lũy trong thân lá và rễ. Trong đó, phần lớn Cu được cây hấp thụ và tích lũy trong thân lá, một phần nhỏ tích lũy trong rễ cây. Ở đất có nồng độ Cu 200 mg/kg có khả năng tích lũy trong thân lá cao nhất khoảng 561,2 mg/kg, trong rễ chỉ chứa 107 mg Cu/kg; lô thí nghiệm Cu_{400}, Cu_{600}, Cu_{KT-400} và $Cu_{KT-400-vsv}$ tích lũy Cu trong rễ và thân lá khá cao. Điển hình lô thí nghiệm Cu_{400}, Cu trong thân lá là 462 mg/kg, trong rễ là 355,2 mg/kg; lô thí nghiệm Cu_{600} có lượng Cu trong rễ và thân lá tương ứng là 321 mg/kg và 638,7 mg/kg (Hình 6).



Hình 6. Đánh giá khả năng tích lũy Cu trong thân lá và rễ cây *Arachis pintoi*

Sinh khối thực vật thu được cũng hoàn toàn phù hợp với kết quả thu được trong thí nghiệm tính chống chịu của *Arachis pintoi*. Ở nồng độ càng cao, cây bị ngộ độc càng rõ, ảnh hưởng nghiêm trọng đến sinh khối các bộ phận thu được của cây. Sau 2 tháng, sinh khối của Cu_{KT-400}, lô thí nghiệm Cu_{200} đạt khá cao. Sinh khối của lô thí nghiệm Cu_{400} thấp hơn $Cu_{KT-400-vsv}$. Riêng lô thí nghiệm Cu_{600}, cây đã bị ngộ độc khá rõ khi sinh khối thu được rất thấp (Hình 7).

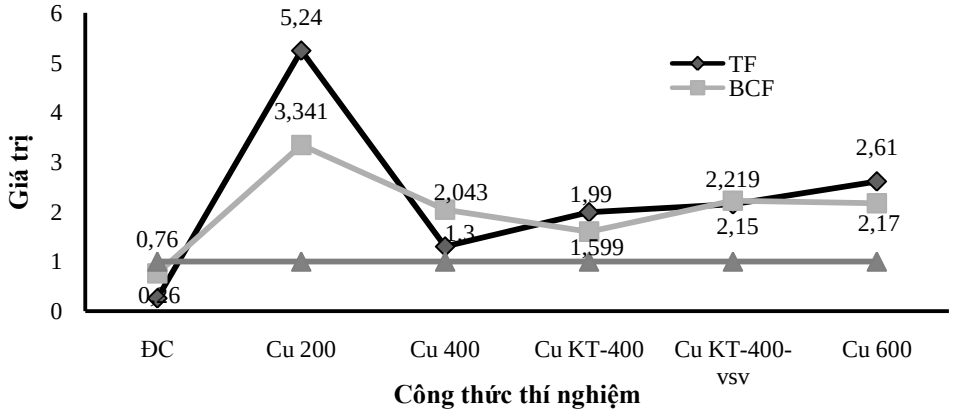


Hình 7. Sinh khối thực vật theo thân lá và rễ *Arachis pintoi* trên đất có nồng độ Cu khác nhau

Dựa vào nồng độ Cu tích lũy cao trong thân lá và rễ của cây *Arachis pintoi*, giúp xác định được cơ chế xử lý sinh khối chứa Cu này. Xét theo Méndez và Maier (2008), nồng độ kim loại lớn nhất trong thức ăn của động vật ăn cỏ đối với Cu là 40 mg/kg. Vì vậy, sinh khối thân lá của cây *Arachis pintoi* thu được không thể làm nguồn thức ăn tươi cho các loài động vật. Sinh khối chứa Cu sẽ được kết hợp với các nguồn dinh dưỡng khác hay các loại phân bón khác với nồng độ Cu phù hợp để làm phân bón vi lượng bổ sung cho các vùng đất canh tác bị thiếu đồng.

Đánh giá khả năng hấp thụ (BCF) và khả năng vận chuyển Cu (TF) trong cây *Arachis pintoi*

Sau thời gian trồng và phân tích hàm lượng Cu trong thân lá và rễ của cây *Arachis pintoi*, hệ số TF và BCF được biểu thị trong Hình 8.



Hình 8. Biểu đồ giá trị TF và BCF trong quá trình tích lũy Cu theo thời gian

Hệ số TF cao nhất là 5,24, ứng với cây trồng trên đất có nồng độ 200 mg/kg, thấp nhất là 1,30 đối với nồng độ 400 mg/kg, các lô thí nghiệm Cu_{600}, Cu_{KT-400}và $Cu_{KT-400-vsv}$ có hệ số TF tương ứng là 1,99; 2,15; 2,61. Từ hệ số TF cho thấy khả năng vận chuyển Cu từ rễ lên thân lá nhỏ nhất đối với lô thí nghiệm Cu_{400} và lớn nhất với công thức Cu_{200}. Vì vậy, nếu áp dụng cây *Arachis pintoi* để xử lý ô nhiễm Cu trong khoảng nồng độ từ 200-400 mg/kg là thích hợp, có thể dễ dàng thu sinh khối chứa Cu của cây. Hệ số tích lũy sinh học BCF có giá trị cao nhất trên đất có nồng độ 200 mg/kg chứng tỏ *Arachis pintoi* có tiềm năng lớn trong xử lý ô nhiễm Cu trong đất. Tương tự, hệ số BCF cũng khá cao ở lô thí nghiệm Cu_{400}, Cu_{KT-400}, $Cu_{KT-400-vsv}$. Dựa trên hệ số BCF cao cho thấy *Arachis pintoi* có tiềm năng phytoextraction lớn.

Với hệ số TF khá cao cho thấy khả năng vận chuyển Cu lên thân, lá rất lớn so với giá trị TF = 0,04 ÷ 0,41 trong thí nghiệm của Robson Andreazza và cộng sự (2011). Giá trị TF của cây *Arachis pintoi* trong thí nghiệm trên đất trồng nho và đất vùng mỏ tại Brazil của Robson Andreazza lại cho thấy Cu tích lũy phần lớn trong rễ và vận chuyển lên thân lá thực vật rất thấp. Trong đó, thực vật trên mẫu đất Inceptisol (207 mgCu/kg), Mollisol (142 mgCu/kg) đều cho hệ số BCF cao hơn nghiên cứu này với giá trị lần lượt là 3,83 và 3,24, riêng đất vùng mỏ (576 mgCu/kg) có gía trị BCF thấp hơn là 0,74 [14]. Tuy nhiên cả hai thí nghiệm đều cho thấy, trên đất có hàm lượng kim loại nặng càng cao thì hệ số BCF càng giảm. Điều này có thể được lý giải do hàm lượng kim loại nặng càng cao, gây ngộ độc cho thực vật ở các mức độ khác nhau, làm giảm khả năng sinh trưởng, sức chống chịu, từ đó

hiệu quả hấp thu Cu giảm xuống. Do vậy, cây *Arachis pintoi* sẽ cho hiệu quả chiết rút kim loại cao nhất trong khoảng hàm lượng Cu từ 200 mg/kg – 400 mg/kg. Ngoài ra, nguồn giống thực vật, môi trường sinh trưởng cũng ảnh hưởng rất lớn đến khả năng chống chịu ô nhiễm của thực vật. Giống cây sử dụng trong thí nghiệm của Robson Andreazza là loài cây bản địa, có thời gian dài thích nghi trên đất có hàm lượng Cu cao, cây đã thích nghi hoàn toàn với điều kiện sống bất lợi và hình thành cơ chế để tồn tại được trên đất ô nhiễm Cu. Trong khi đó, cây *Arachis pintoi* sử dụng trong thí nghiệm là loài cây được du nhập từ Nam Mỹ vào Việt Nam. Chính điều này đã ảnh hưởng đến khả năng xử lý cũng như cơ chế vận chuyển kim loại Cu trong thực vật. Tuy nhiên, hệ số BCF đạt giá trị cao nhất 3,341 đã khẳng định một lần nữa khả năng chiết rút kim loại khỏi môi trường của cây *Arachis pintoi*. Điều này có ý nghĩa rất lớn trong việc áp dụng thực vật để xử lý ô nhiễm.

Khi thực hiện so sánh với một số loài thực vật xử lý Cu khác do nhóm nghiên cứu của Joonki Yoon (2006) thực hiện tại khu vực mỏ của Florida cũng cho thấy *Arachis pintoi* có những ưu thế nổi trội.

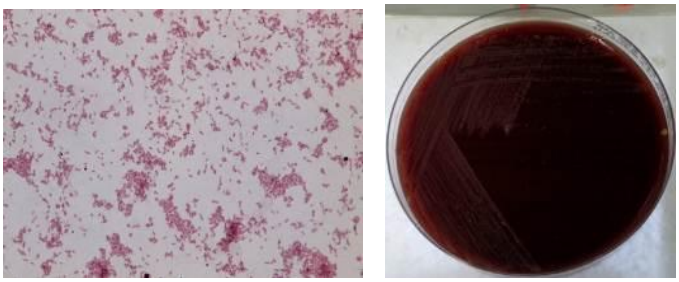
Bảng 3. Một số loài thực vật xử lý ô nhiễm Cu tại một khu mỏ của Florida [7]

Tên thực vật	Hàm lượng Cu tích lũy (mg/kg)	Hàm lượng Cu trong đất (mg/kg)
Paspalum notatum	602	980
Cynodon dactylon	362	860
Cyperus esculentus	170	300
Cynodon dactylon	57	314
Solidago altissima	518	314
Sonchus asper	80	746
Equisetum arvense	133	990

Arachis pintoi có khả năng chống chịu Cu trong khoảng từ 200 – 600 mgCu/kg, thấp hơn so với nghiên cứu của Joonki Yoon và cộng sự trên cây *Paspalum notatum, Equisetum arvense, Cynodon dactylon* nhưng khả năng hấp thu Cu lại khá lớn, từ 668,2 mg/kg ÷ 959,7 mg/kg sinh khối, cao hơn hẳn khả năng hấp thu Cu của các loài cây khác (Bảng 3). Điều này cho thấy *Arachis pintoi* thích hợp ứng dụng để loại bỏ kim loại nặng ra khỏi đất ở khoảng nồng độ ô nhiễm Cu trung bình.

Đánh giá khả năng chống chịu của vi sinh vật với Cu trong môi trường thạch đĩa

VSV được phân lập từ các nốt sần của rễ cây *Arachis pintoi* được định danh bằng phương pháp giải trình tự gen 16S, kết quả cho thấy chủng VSV ở nốt sần trên rễ cây *Arachis pintoi* là *Burkholderia kururiensis* (Hình 9).

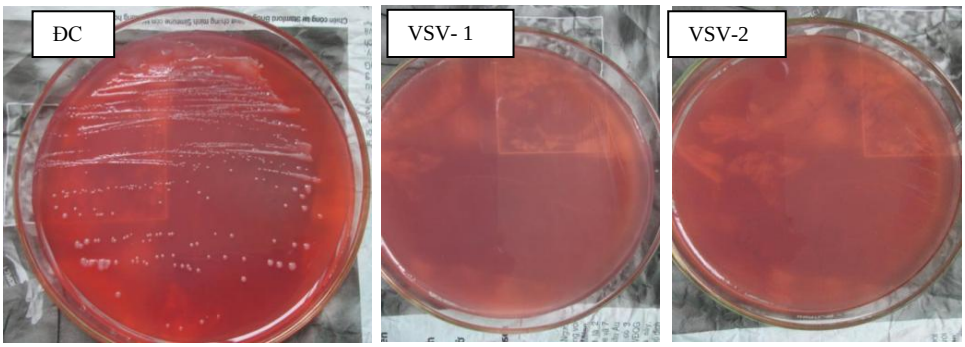


Hình 9. Hình ảnh nhuộm Gram vi khuẩn (bên trái) và các khuẩn lạc mọc trên môi trường thạch đĩa (bên phải).

Các chủng *Burkholderia* phân bố rất rộng rãi trong tự nhiên, đặc biệt là trong thực vật. *Burkholderia* trên rễ cây cao gấp từ 100–1000 lần so với môi trường đất. Các chủng *Burkholderia* sống trong vùng rễ phổ biến nhất là *B. ambifaria, B. caribensis, B. graminis, B. vietnamiensis, B. tropica,…* Các chủng *Burkholderia* phát triển rất phong phú trong vùng rễ, chúng cấu thành nên một bộ phận chính trong tổng số các loài vi sinh vật của thực vật: 88 % trong ngô, 40 % trong lúa, 60 % trong cây đậu, 25 % trong cây mía. Một vài chủng còn có mối quan hệ gần gũi với cây chủ, chúng cư trú ở các mô bên trong cây chủ, tạo nên mối quan hệ cộng sinh. Ngoài ra, *Burkholderia* còn sản sinh ra các hợp chất chelating sắt khối lượng phân tử thấp, thí dụ như siderphores, cepaciacheline, cepabactine, ornibactine,… trong môi trường có hàm lượng sắt cao. Bên cạnh đó, các loài *Burkholderia* còn có thể chống chịu với nhiều chất kháng sinh và có khả năng tự sản xuất ra kháng sinh cho chính chúng, mang lại cho chúng một ưu thế lớn khi sống cạnh tranh trong vùng rễ. Trường hợp *Burkholderia* cư trú trên nốt sần rễ cây họ Đậu cũng đã được ghi nhận cho thấy khả năng cộng sinh cùng có lợi với thực vật của *Burkholderia*. Một số loài tiêu biểu được phát hiện ở nốt rễ thực vật có khả năng cố định nitrogen trong không khí là *B. vietnamiensis* (Tran van et al., 1996), *B. kururiensis* , *B. tropica* (Estrada De los Santos et al., 2001) và *B. unamae* (Caballero Mellado et al., 2004) [12].

Kết quả phân tích vi khuẩn trong nghiên cứu này hoàn toàn phù hợp với các kết quả nghiên cứu về chủng *Burkholderia*. Trên thế giới có rất ít nghiên cứu ghi nhận về vi khuẩn *Burkholderia kururiensis* cộng sinh trong nốt sần rễ cây *Arachis pintoi* nên đây cũng là một kết quả khả quan cho thấy vai trò quan trọng của vi khuẩn cộng sinh tới sự sinh trưởng và sức chống chịu của loài cây này trong môi trường sống bất lợi.

Để đánh giá khả năng chống chịu của vi khuẩn trong môi trường đất, thí nghiệm cũng đã tiến hành kiểm tra sức chống chịu *B. kururiensis* trên môi trường thạch có hàm lượng Cu tăng dần (Hình 10).



Hình 10. Kiểm tra vi khuẩn *Burkholderia kururiensis* trong môi trường thạch có Cu (đĩa ĐC: đĩa đối chứng không chứa Cu, đĩa VSV-1: có nồng độ Cu là 25 ppm, đĩa VSV-2: nồng độ Cu: 50 ppm)

Mặc dù vi khuẩn *Burkholderia kururiensis* có nhiều ưu điểm hỗ trợ cây sinh trưởng trong môi trường bất lợi nhưng *Burkholderia kururiensis* lại có khả năng chống chịu kém trong môi trường chứa Cu. Điều này có thể được lý giải một phần do *B. kururiensis* không có hệ gen chống chịu KLN hoặc cơ chế phản ứng với Cu, nên sự xuất hiện của Cu đã gây cản trở cho các quá trình vận chuyển cũng như chuyển hóa các chất khác tới tế bào, từ đó gây độc cho vi khuẩn *B. kururiensis*. Mặt khác, chủng *B. kururiensis* được sinh trưởng trong môi trường có hàm lượng Cu thấp một thời gian dài nên *B.kururiensis* không hình thành cơ chế thích nghi với môi trường có nồng độ Cu cao.

Điều này phù hợp với hầu hết các nghiên cứu khoa học đã được công bố, trong đó phần lớn các chủng VSV cộng sinh với cây họ Đậu có khả năng chống chịu cao với nồng độ Cu đều có thời gian cộng sinh lâu dài với cây chủ trên đất ô nhiễm KLN [15]. Trong nghiên cứu các dòng vi khuẩn cộng sinh cây họ Đậu phân lập từ mỏ pyrit Aznalco´llar, Jose´ Antonio Carrasco và cộng sự cũng đã cho thấy cùng vi khuẩn *Sinorhizobium meliloti* nuôi cấy trong môi trường chứa Cu (125 mg/L) nhưng dòng vi khuẩn có gen chống chịu Cu (*Med4D)* lại tích lũy và hấp phụ sinh học Cu tới 912 mgCu so với dòng vi khuẩn không có tính chống chịu *(Ism6)* chỉ tích lũy 304,3 mgCu trên bề mặt tế bào vi khuẩn [8].

Tuy vậy, việc phân tích được vi khuẩn *Burkholderia kururiensis* cộng sinh trong nốt sần rễ cây *Arachis pintoi* và các nghiên cứu trên thế giới cho thấy vai trò quan trọng của vi khuẩn *Burkholderia kururiensis* trong quá trình sinh trưởng của cây *Arachis pintoi*. Nhờ vào khả năng cố định nitrogen khí quyển và các hoạt chất mà *Burkholderia kururiensis* sản sinh đã giải thích cho tính chống chịu cao của cây *Arachis pintoi* trong điều kiện môi trường nghèo dinh dưỡng, độ ẩm thấp, thúc đẩy cây sinh trưởng, tăng hàm lượng nitrogen trong đất.

Trong khi còn ít nghiên cứu chuyên sâu về mối quan hệ giữa vi sinh vật cộng sinh và thực vật trong xử lý ô nhiễm kim loại nặng tại Việt Nam thì đề tài nghiên cứu đã mang lại một hướng nghiên cứu mới. Trong đó, cây *Arachis pintoi* không chỉ được ứng dụng cải tạo đất, tạo lớp phủ thực vật mà còn áp dụng xử lý ô nhiễm đất nói riêng và các cây họ Đậu nói chung tại các vùng khai thác mỏ, khu vực đất hoàn thổ nghèo dinh dưỡng và hàm lượng kim loại cao.

KẾT LUẬN

Sau khoảng thời gian 6 tháng thực hiện trên mô hình thực nghiệm đã cho thấy tiềm năng chiết rút Cu khá cao ở cây *Arachis pintoi*. Cây tích lũy hiệu quả 668,2 mgCu/kg trên đất có nồng độ 200 mgCu/kg, trong đó hàm lượng Cu trong rễ là 107 mg/kg và thân lá là 561,2 mg/kg. Đối với vi khuẩn *Burkholderia kururiensis* phân lập từ nốt sần rễ cây chưa phát huy một cách rõ rệt khả năng hỗ trợ cây và cố định KLN. Tuy nhiên, chủng vi khuẩn cộng sinh vùng rễ đang mở ra tiềm năng rất lớn để nâng cao hiệu quả xử lý KLN bằng thực vật. Vì vậy, cần nghiên cứu về *Arachis pintoi* sâu hơn để đánh giá toàn diện khả năng xử lý của *Arachis pintoi* và tạo điều kiện tối ưu cho cây cũng như vi sinh vật xử lý KLN hiệu quả nhất.

Lời cảm ơn: *Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn đến các cán bộ giảng viên thuộc Khoa Môi trường, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM đã hỗ trợ cơ sở vật chất, kỹ thuật chuyên môn và tạo điều kiện tốt nhất cho chúng tôi hoàn thành đề tài nghiên cứu này.*

Evaluation of the effect of microorganisms in *Arachis pintoi* roots on the potential of copper absorption in land

- **Dang Diep Yen Nga**
- **Pham Thi Kim Trong**

University of Science, VNU-HCM

ABTRACT

The research was carried out to evaluate the potential phytoextraction and phytostability of perennial peanut (Arachis pintoi) and to determine the influence of the isolated microorganisms from the root nodules of Arachis pintoi on copper-contaminated soil to improve the ability of treatment metal in soil pollution. Perennial peanuts were planted in the experimental pots which had unsterilized and sterilized soil. Different quanlities of $CuSO_4.5H_2O$ were directly homogenized into sieved soil to formulate mixtures containing Cu in concentrations (mg/kg) of 200, 400 and 600. In addition, sterilized soil was contaminated by adding Cu with 400 mg/kg. The other pots had copper- contaminated sterilized soil and was added the isolated microorganisms from the root nodules of Arachis pintoi. Our results showed that the perennial peanut had high phytomass production and grew normally in the soil with 200 mg/kg of Cu. The copper accumulation was determined of 668.2, 107 and 561.2 mg/kg in the whole plant, roots and shoots, respectively in plants which were cultivated in the soil with 200 mg/kg of Cu. In the soil with 400 mg/kg and 600 mg/kg of Cu, the plants showed low biomass production and the plants had been poisonous. Both bioconcentration factors (BCF) and translocation factors (TF) were used to estimate a plant's potential for the purpose of phytoremediation. The highest BCF and TF for Cu concentrations were 3.341 and 5.24 with 200 mg/kg of Cu, respectively. Both factors were higher than 1 therefore Archis pintoi is a potential plant for copper phytoextraction in copper contaminated sites at the concentration of 200-400 mg/kg. The isolated microrganism from the root nodules of Arachis pintoi on copper- contaminated soil was Burkholderia kururiensi PR1, which was a species of proteobacteria and stimulated plant growth. However, the result showed that Burkholderia kururiensi is unable to resistant to concentration of copper (25 mg/L). More research on the other isolated microorganisms of the root system to enhance the Cu accumulation in plants should be carried. Finally, these results showed the potential of the heavy metal phytoextraction of the perennial peanut in contaminated soil. It is easy to apply because of the low cost.

Key words: *Arachis pintoi, Burkholderia kururiensi, copper uptake, remediation of contaminated soil, root nodule symbiosis, perennial peanut.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. L.H. Bá, Độc học môi trường, NXB Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh (2008).

[2]. L.H. Bá, Độc học môi trường cơ bản, NXB Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh (2008).

[3]. Đ.Đ. Kim, Nghiên cứu sử dụng thực vật để cải tạo đất bị ô nhiễm kim loại nặng tại các vùng khai thác khoáng sản, Đề tài nghiên cứu cấp Nhà nước KC08.04/06-10, Viện Công nghệ môi trường (2010).

[4]. L.T. Trinh, Bước đầu nghiên cứu chủng vi sinh vật trong đất cát pha nhiều mùn có khả năng tham gia quá trình phân hủy thuốc trừ sâu cơ phốt pho chứa hoạt chất diazinon, *Tạp chí Khoa học Công nghệ Việt Nam*, 15, 47–50 (2013).

[5]. Bộ Khoa học và Công nghệ, TCVN 5979: 2007 - Chất lượng đất - Xác định pH (2007).

[6]. Ủy ban Khoa học và Kỹ thuật Nhà nước, TCVN 4401: 1987 - Phương pháp xác định pH_{KCL} (1987).

[7]. Ủy ban Khoa học và Kỹ thuật Nhà nước, TCVN 4403: 1987 - Đất trồng trọt–Phương pháp xác định độ chua trao đổi (1987).

[8]. Ủy ban Khoa học và Kỹ thuật Nhà nước, TCVN 4404: 1987 - Đất trồng trọt–Phương pháp xác định độ chua thuỷ phân (1987).

[9]. Ủy ban Khoa học và Kỹ thuật Nhà nước, TCVN 4050:1985 - Đất trồng trọt - Phương pháp xác định tổng số chất hữu cơ (1985).

[10]. Bộ Khoa học và Công nghệ, TCVN 5255: 2009 - Chất lượng đất - Phương pháp xác định hàm lượng nitơ dễ tiêu (2009).

[11]. Bộ Khoa học và Công nghệ, TCVN 8661: 2011 - Chất lượng đất - Xác định phospho dễ tiêu - phương pháp olsen (2011)

[12]. A. Ahmad, R. Ghufran, Z. Wahid, Cd, As, Cu, and Zn transfer through dry to rehydrated biomass of *Spirulina platensis* from wastewater, *Polish J. of Environ. Stud.*, 19, 887–893 (2010).

[13]. E. Pajuelo, I.D. Rodríguez-Llorente, A. Lafuente, M.A. Caviedes, Legume–rhizobium symbioses as a tool for bioremediation of heavy metal polluted soils, *Springer Science and Business Media*, 95–123 (2011).

[14]. J. Yoon, X. Cao, Q. Zhou, L.Q. Ma, Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site, *Science of the Total Environment*, 368, 456–464 (2006).

[15]. J.A. Carrascoa, P. Armarioc, E. Pajueloa,c, A. Burgosa, M. Caviedesc, R. Lo´pezb, M.A. Chambera, A.J. Palomaresc, Isolation and characterisation of symbiotically effective Rhizobium resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Aznalco´llar pyrite mine, *Soil Biology & Biochemistry*, 37, 1131–1140 (2005).

[16]. I. Kuiper, E.L. Lagendijk, G.V. Bloemberg, B.J.J. Lugtenberg, Rhizoremediation: A beneficial plant-microbe interaction, *Molecular Plant- Microbe Interactions*, 17, 6–15 (2003).

[17]. H. Mokhtar, N. Morad, F.F.A. Fizri, Hyperaccumulation of copper by two species of aquatic plants, *International Conference on Environment Science and Engineering*, 8, 115–118 (2011).

[18]. J.P. Hernandez, Y. Bashan, The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation – A comprehensive evaluation, *Applied Soil Ecology*, 61, 171–189 (2012).

[19]. T. Coenye, P. Vandamme, Burkholderia: Molecular microbiology and genomics, *Horizon Bioscience*, 131–145 (2006).

[20]. M. Rajkumar, S. Sandhya, M.N.V. Prasad, H. Freitas, Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation,

Biotechnology Advances, 30, 1562–1574 (2012).

[21]. R. Andreazza, L. Bortolon, S. Pieniz, M. Giacometti, D.D. Roehrs, M.R. Lambais, F.A.O. Camargo, Potential phytoextraction and phytostabilization of perennial peanut on copper-contaminated vineyard soils and copper mining waste, *Biol Trace Elem Res*, 143, 1729–1739 (2011).

[22]. United States Environmental Protection Agency, Introduction to Phytoremediation, (2000).

[23]. J.M.Vincent, A Manual for the practical study of root-nodule bacteria, *Blackwell Scientific* (1970).

[24]. John R. De1an, Methods for environmental trace analysis, *Journal of Chromatography A*, 754, 431–442 (1996).