

## همزیستی افاقیا- ریزوبیوم جهت گیاه‌پالایی خاک‌های آلوده به نفت خام

مه‌ری عسکری Ph.D.<sup>۱\*</sup>، فاطمه بیگی M.Sc.<sup>۲</sup>، فریبا امینی Ph.D.<sup>۱</sup>، مرتضی زاهدی M.Sc.<sup>۲</sup>

۱- دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، کد پستی: ۳۸۱۵۶-۸-۸۳۴۹

۲- کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

۳- کارشناسی ارشد مهندسی صنایع، دانشکده فنی حرفه‌ای امیرکبیر اراک

\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: m-askary@araku.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۹/۲۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۵/۱۰

## چکیده:

**هدف:** اندرکنش میکروب- گیاه به‌عنوان یک جریان مهم کارآمد گیاه‌پالایی آلودگی نفتی مورد توجه است. استفاده از لگوم-ریزوبیوم روش مناسبی برای پالایش اراضی آلوده به نفت خام می‌باشد. هدف از این مطالعه ارزیابی توانایی گیاه‌پالایی همزیستی افاقیا- ریزوبیوم در خاک‌های آلوده به نفت خام می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** گیاهچه‌های سه روزه افاقیا به محیط هیدروپونیک منتقل و با ریزوبیوم تلقیح شدند. سپس، گیاهچه‌های ۱۳ روزه به خاک‌های آلوده به نفت خام در غلظت‌های ۰ (شاهد)، ۱ تا ۵ درصد (حجمی/وزنی) منتقل و در ابتدا و انتهای یک دوره ۹۰ روزه، میزان حذف هیدروکربن‌ها (هیدروکربن‌های کل، n- تری‌دکان، n-تترادکان و n-پنتادکان) خاک با GC اندازه‌گیری شد. مقادیر سرب، روی و کادمیم در خاک و ریشه گیاه توسط دستگاه جذب اتمی اندازه‌گیری شد. داده‌ها با کمک SPSS11 و تست دانکن آنالیز آماری شدند.

**نتایج:** نتایج تجمع فلزات سنگین را در ریشه گیاهان و کاهش آن‌ها را در خاک نشان دادند. کاهش مقدار هیدروکربن‌ها در تمامی تیمارها در طی آزمایش مشاهده گردید. ماکزیمم برداشت در گیاهان تلقیح شده ریزوبیومی در تیمار ۴ درصد نفت خام بدست آمد که در آن جا افاقیای تلقیح‌شده ۹۷ تا ۱۰۰ درصد هیدروکربن‌ها را از خاک حذف نمود. بنابراین تلقیح افاقیا با ریزوبیوم در حذف هیدروکربن‌ها و فلزات سنگین خاک‌های آلوده به نفت خام موثر است.

**نتیجه‌گیری:** براساس این نتایج، افاقیای تلقیح‌شده با ریزوبیوم می‌تواند به عنوان یک انباشتگر سرب و کادمیم در خاک آلوده به نفت استفاده گردد و به منظور گیاه‌پالایی خاک‌های آلوده به نفت خام انتخاب شود.

**واژگان کلیدی:** افاقیا، ریزوبیوم، فلزات سنگین، گیاه پالایی هیدروکربن‌ها، نفت خام

## مقدمه

خاک از منابع تجدیدنشدنی و ضروری است. آلودگی نفتی خاک در طی قرن گذشته بسیار مورد توجه بوده است (۱). آلودگی خاک به نفت به دلایل مختلف استخراج، تصادفات، حمل و نقل، نشت، قطع و شکستگی خطوط لوله نفت، پالایش و مصرف رخ می‌دهد (۲). از جمله آلاینده‌های نفتی می‌توان به هیدروکربن‌های نفت‌خام (TPHs) Total petroleum hydrocarbons، هیدروکربن‌های پلی‌سیکلیک آروماتیک Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)، هیدروکربن‌های هالوژنه، آفت‌کش‌ها، حلال‌ها و فلزات سنگین آن مثل سرب، کادمیوم، روی، وانادیم، آهن، نیکل، اورانیم و مس اشاره کرد (۳ و ۴).

نفت‌خام در خاک شرایط نامناسبی را برای رشد و نمو گیاه فراهم می‌کند؛ این شرایط وابسته به عدم تهویه، خشکی و سمیت ناشی از حضور هیدروکربن‌ها، کاهش مقدار عناصر ضروری در دسترس برای گیاه و یا افزایش مقدار سمی برخی عناصر معین مثل سرب، کادمیوم، آهن و روی است (۵). بنابراین معمولاً آلاینده‌های نفتی کارایی و رشد و نمو گیاهان را به خصوص در مراحل اولیه رشد کاهش می‌دهند (۳ و ۶)، به طوری که کاهش ۶۶ و ۸۶ درصدی جوانه‌زنی و طول ریشه‌چه اقلیایا به ترتیب در غلظت ۱۰ درصد نفت‌خام توسط محققین گزارش شده است (۷). اثرات شیمیایی نفت ناشی از عمل‌کرد ترکیبات آن مثل فلزات سنگین و هیدروکربن‌های نفت می‌باشد. همه فلزات سنگین در غلظت‌های بالا اثرات بسیار سمی دارند و به عنوان آلاینده محیطی محسوب می‌شود (۸). هیدروکربن‌های نفت نیز یکی از عمومی‌ترین ترکیبات آلی مقاوم محیطی هستند که برای بسیاری از موجودات زنده سمی هستند (۹ و ۱۰). چهار گروه عمده ترکیبات هیدروکربنی نفت‌خام شامل پارافین (مثل  $C_{15}H_{32}$ )، نفتن‌ها، آروماتیک‌ها، رزین-آسفالتین‌ها می‌باشد (۱۱).

پالایش آلودگی‌های محیطی بر پایه و اساس گیاه - میکروب یک تکنولوژی نسبتاً جدید، کارآمد و دوست‌دار محیط زیست است که می‌تواند جهت خروج بسیاری از آلاینده‌ها مثل آلودگی هیدروکربن‌ها و فلزات سنگین نویدبخش باشد (۶ و ۱۲). ریزوباکترهای محرک رشد گیاه plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) باکتری‌هایی هستند که با ریشه گیاهان همراه شده و ایمنی و بازدهی گیاهان را افزایش می‌دهند

(۱۳). باکتری‌های فوق همچنین در پالایش و تصفیه آلودگی‌های ریزوسفر نقش دارند (۱۴). ریزوبیوم مشهورترین ریزوباکتر تثبیت‌کننده نیتروژن ملکولی از خانواده ریزوبیاسه است. باکتری فوق، آندوفیت طبیعی لگوم‌ها بوده و با آن‌ها روابط همزیستی برقرار می‌کند (۱۵). ریزوبیوم علاوه بر تثبیت  $N_2$ ، ملکول‌هایی مثل اکسین، سیتوکینین، اسیدآبسیزیک، لومیکروم، ریبوفلاون، لیپو-کیتوالیگوساکارید و ویتامین‌ها را تولید می‌کند بنابراین، احتمالاً علاوه بر نقش متابولیت‌های میکروبی در افزایش دسترس بودن مواد معدنی در محیط گیاه، ریزوبیوم قادر به تحریک رشد گیاه، استقرار در ریشه و در نتیجه افزایش نمو گیاه می‌باشد. لومیکروم علاوه بر تحریک رشد گیاهان، سبب افزایش تحمل خشکی گیاهان از طریق کنترل گشودگی روزنه‌ها می‌شوند (۱۶). تلقیح ریزوبیومی لگوم‌ها، اثر بازدارندگی تنش‌ها را کاهش داده و باعث بقای بهتر گیاه در محیط نامناسب می‌شوند (۱۷).

گیاهان متنوعی به دلیل توان‌مندی بالا در تسهیل گیاه‌پالایی مناطق آلوده مورد توجه قرار گرفته‌اند. بقولات و میکروارگانیزم‌های همزیست آن‌ها به دلیل کارایی زیاد در حذف آلودگی‌ها گزینه‌های خوبی برای گیاه‌پالایی و اصلاح زیستی اراضی آلوده به فلزات سنگین و همچنین دیگر آلاینده‌های آلی می‌باشند (۱۸ و ۱۹). آلودگی‌های آلی سهم مهم و بزرگی از آلاینده‌های خاک را تشکیل می‌دهند (۶). خروج و حذف فلزات سنگین و هیدروکربن‌های نفت در خاک، اغلب به میکروارگانیزم‌های زنده ریزوسفر که تحت تاثیر ترشحات ریشه گیاهان قرار دارند نسبت داده می‌شود (۱۰). پژوهش‌های مختلف نشان داده که جمعیت میکروبی خاک‌های کشت شده بیشتر و فعال‌تر از خاک‌های کشت نشده است (۲۰). بیوماس بیشتر ریشه همراه با رشد جمعیت میکروبی و افزایش فعالیت میکروب‌های ریزوسفر سبب کارایی بیشتر گیاه‌پالایی می‌شود (۶). گیاهان با تجمع و انباشت فلزات سنگین (۲۱) و با تغییر دادن شرایط فیزیکی و شیمیایی خاک و افزایش تهویه و فراهم کردن اکسیژن جهت تجزیه ترکیبات نفتی در کاهش آلودگی‌های زیست محیطی مؤثر می‌باشند (۲۲). میکروارگانیزم‌ها نیز می‌توانند بر حلالیت و زیست‌فراهمی فلزات و حرکت آن‌ها در خاک بسیار تاثیرگذار باشند. بنابراین بقولات به راحتی در اراضی غیر حاصل‌خیز مستقر می‌شوند و همزیستی امکان رشد گیاهان را بدون عرضه کودهای نیتروژن فراهم می‌کند (۱۹). در بررسی

گرفته و چندین بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند (۲۶). سپس گرهک‌ها در چند قطره آب استریل بوسیله انبرک له شده و یک لوپ استریل از گرهک له شده فوق به محیط اختصاصی (YMA) Yeast-manitol-mineral salts agar انتقال یافت (۲۷). پتری‌دیش‌های حاوی باکتری به انکوباتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند. ریزوبیوم پس از ۴ الی ۵ روز کلنی‌های حلقوی، به قطر ۲ تا ۴ میلی‌متر، محدب و برجسته نیمه‌شفاف، مات، لزج و موسیلاژی تولید می‌کند. سپس با لوپ استریل مقدار کمی از کلنی‌های حاصله به محیط کشت جدید YMA انتقال یافتند. ۳ الی ۴ روز پس از انکوباسیون در ۲۵ درجه سانتی‌گراد، از کلنی‌های منفرد، کدر و موسیلاژی تشکیل شده تعدادی لام آماده و رنگ‌آمیزی گرم انجام گردید. نوع واکنش گرم و مورفولوژی باکتری در زیر میکروسکوپ بررسی شد. تشکیل کلنی‌های محدب و برجسته، نیمه شفاف و لزج و موسیلاژی و واکنش گرم منفی نشانه موفقیت‌آمیز بودن جداسازی ریزوبیوم در نظر گرفته شد. جهت اطمینان، تشکیل گرهک در ریشه افاقیا توسط ریزوبیوم استخراجی در شرایط استریل بررسی گردید (۲۸).

یک لوپ استریل از کلنی‌های ریزوبیوم در محیط کشت جامد YMA، به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع YMA منتقل شده و به مدت ۲۴ ساعت (فاز لگاریتمی رشد) در روتاری شیکر با دور ۲۰۰ rpm در شرایط تاریکی کشت و غلظت  $10^5$  cfu/ml ریزوبیوم تهیه شد. جهت تهیه غلظت فوق از جذب نوری استفاده گردید. اگر جذب نوری محلول YMA مایع در طول موج ۶۲۰ نانومتر معادل ۰/۱ باشد غلظت ریزوبیوم  $10^8$  Cells ml<sup>-1</sup> در نظر گرفته شد. سپس غلظت  $10^5$  cfu ml<sup>-1</sup> باکتری با رقیق نمودن محلول مادر فوق توسط بافر فسفات تهیه شد (۲۹).

**تهیه و آماده‌سازی بذر افاقیا و نفت:** بذرهای سالم، دارای مغز و بدون آفت افاقیا از پارک کلاله شهر سنجان جمع‌آوری و نفت خام از پالایشگاه سازند تهیه گردید. بذرهای توسط اتانول ۷۰ درصد به مدت ۲ دقیقه و سپس هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی سطحی و سپس ۵ بار با آب مقطر شستشو داده شدند (۳۰). دانه‌های ضدعفونی‌شده بر روی کاغذ صافی مرطوب با محلول هوگلند (۳۱) غنی شده با نیترات پتاسیم  $0.2 \text{ g L}^{-1}$  درون پتری‌دیش به مدت ۳ روز در تاریکی و حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد جهت جوانه‌زنی قرار گرفتند. سپس گیاهچه‌های سه روزه به محیط هیدروپونیک حاوی محلول

نقش باکتری *Rhizobium leguminosarum* و گیاهان لگوم در پالایش خاک آلوده به نفت، دو گیاه لگومی *Vicia faba* و *Lupinus albus* و یک گیاه غیرلگومی *Solanum melongena* در خاک بیابان‌های آلوده به نفت در کویت کشت شدند. نتایج نشان داد که دو گیاه لگومی *V. faba* و *L. albus* کارایی بیشتری در حذف آلودگی نفتی نسبت به گیاه غیرلگوم داشتند. در خاک‌های کشت شده با *V. faba*، *L. albus* و *S. melongena* به ترتیب ۸۵، ۷۷ و ۵۵ درصد از آلودگی نفتی کاسته شد. همچنین حذف و برداشت نفت در آب اطراف ریشه‌های گرهک‌دار نسبت به ریشه‌های بدون گرهک بیشتر است. به علاوه باکتری‌های ریزوبیوم که باکتری همزیست با لگوم‌ها می‌باشد دوز وسیعی از هیدروکربن‌های آروماتیک و آلیفاتیک نفت خام را به عنوان منبع کربن و انرژی مصرف می‌کند (۲۳).

ایران یکی از کشورهای نفت‌خیز جهان می‌باشد که همواره در معرض این نوع آلاینده محیطی قرار دارد. شناسایی گیاهان و میکروارگانیسم‌هایی که در پالایش آلودگی‌های نفتی نقش دارند و مطالعه شرایطی که در بهینه عمل کردن این مجموعه موثر هستند، می‌تواند راهکارهایی جهت حذف آلودگی‌ها از خاک این مناطق باشد. درخت زینتی افاقیا به طور گسترده در نواحی شهری و روستایی رشد می‌کند، دارای محدوده جغرافیایی وسیع و توزیع اکولوژیک در کل جهان بوده، کاشت و نگهداری آن آسان و کم‌هزینه است (۲۴)، افاقیا متعلق به خانواده فاباسه از خانواده‌های گیاهی مقاوم به آلاینده‌های نفتی می‌باشد (۲۵)، این تحقیق به منظور بررسی نقش احتمالی افاقیا به صورت منفرد و در تلقیح با ریزوبیوم در کاهش و حذف برخی فلزات سنگین و هیدروکربن‌های نفتی موجود در خاک انجام شد.

## مواد و روش‌ها

**جداسازی، شناسایی و تهیه مایه تلقیح ریزوبیوم:** ریزوبیوم یک باکتری گرم منفی از گروه  $\alpha$ -پروتوباکتورها (باکتری‌های ارغوانی) می‌باشد. جهت جداسازی و شناسایی باکتری ریزوبیوم از آزمایشات مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی توضیح داده شده در کتاب برگه استفاده شد (۲۶). ریشه‌های تازه افاقیا دارای گرهک پس از انتقال به آزمایشگاه به منظور خروج ذرات خاک اطراف گرهک‌ها، ۲۰ دقیقه درون آب قرار گرفته و شسته شدند. جهت استریل سطحی، ۱۰ دقیقه در اتانول ۷۵ درصد قرار

استاندارد براساس جذب رسم و فرمول خطی محلول‌ها به دست آمد. بیشترین جذب نیترات‌سرب، نیترات‌روی و نیترات‌کادمیم به ترتیب در ۲۸۳/۳، ۲۱۳/۹ و ۲۲۸/۸ نانومتر مشاهده شد (۲۴).

**اندازه‌گیری عناصر سنگین (روی، سرب، کادمیم) خاک در ابتدا و انتهای دوره ۹۰ روزه کشت:** ۲ گرم خاک آلوده به نفت خام را پس از خشک و الک کردن (۲ میلی‌متر) با ۲/۵ میلی‌لیتر اسیدنیتریک غلیظ و ۷/۵ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک غلیظ به مدت یک شب به حال خود گذاشته و پس از آن به دمای ۷۰ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد منتقل نموده و در نهایت پس از ته‌نشینی رسوبات با اسیدنیتریک ۱ درصد به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. محلول‌های استاندارد نیترات‌روی، نیترات‌کادمیم و نیترات‌سرب مانند مرحله قبل تهیه شدند و جذب آن‌ها به همراه نمونه‌ها توسط دستگاه جذب اتمی مدل Shimadzu AA680 خوانده شد. نمودار استاندارد براساس جذب رسم و فرمول خطی محلول‌ها به دست آمد (۲۴).

**اندازه‌گیری هیدروکربن‌های کل خاک در ابتدا و انتهای دوره ۹۰ روزه کشت:** پس از آلوده نمودن خاک استریل با غلظت‌های مختلف نفت خام میزان هیدروکربن‌های کل، n-تری‌دکان، n-تترادکان و n-پنتادکان در خاک به روش گاز کروماتوگرافی GC اندازه‌گیری شد. ۱۵ گرم خاک خشک (۳۲) هر تیمار را با ۲۵ میلی‌لیتر استن به مدت ۲۴ ساعت به شیکر با دور ۲۵۰ rpm منتقل کرده، سپس نمونه‌ها با کاغذ صافی فیلتر شده و به دستگاه GC (Agilen 6890N) با ستون VF-1ms با برنامه دمایی ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، ۱۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه و ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد تزریق شد. این عملیات پس از گذشت سه ماه و برداشت گیاهان مجدداً بر روی خاک هر گلدان صورت گرفت (۱۸).

### نتایج

به منظور بررسی حضور باکتری ریزوبیوم در ریشه گیاه و اثبات تلقیح باکتریایی، تشکیل گرهک در پایان دوره رشد گیاهان افاقیای تلقیح‌یافته بررسی گردید (شکل ۱). گیاهان تحت تیمار ۳، ۴ و ۵ درصد نفت خام که باکتری دریافت نکرده‌اند هیچ رشدی نداشتند. ولی گیاهان تلقیح‌شده با ریزوبیوم تا غلظت ۴ درصد نفت خام رشد نمودند و در غلظت ۵ درصد نفت خام، هیچ گیاهی، چه تلقیح نشده و چه تلقیح‌شده با ریزوبیوم، رشد نکرد. بنابراین، غلظت ۳ و ۵ درصد نفت خام خاک به ترتیب برای

نیمه‌هوگلند و سوسپانسیون ریزوبیومی  $10^5 \text{ cfu mL}^{-1}$  منتقل شدند. بذره‌های شاهد در محلول نیمه‌هوگلند در شرایط مشابه قرار گرفتند. بعد از ۱۰ روز به گلدان‌های حاوی غلظت‌های متفاوت نفت خام انتقال یافتند.

**کشت گلدانی افاقیا:** گیاهچه‌های ۱۳ روزه به گلدان‌های (طول ۲۰ سانتی‌متر و قطر ۱۸ سانتی‌متر) شاهد و گلدان‌های محتوی خاک آلوده به نفت خام در غلظت ۰، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ درصد (حجمی/وزنی) انتقال یافتند. بدین منظور خاک مورد استفاده در ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت در دو روز متوالی در اتوکلاو استریل شده و به نسبت ۱:۱ (v/v) با پرلیت مخلوط گردید. سپس در بیرون گلدان با توجه به تیمار نفتی، مقداری نفت اضافه و کاملاً مخلوط و یکنواخت شدند. به ازای هر ۲۰۰۰ گرم خاک، به ترتیب برای تیمارهای ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ درصد به ترتیب ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میلی‌متر مکعب نفت خام (حجمی/وزنی) به خاک اضافه و خوب مخلوط گردید. گلدان‌ها با خاک آلوده فوق (با توجه به تیمار نفتی) پر شدند و گیاهچه‌های تلقیح شده ۱۳ روزه به خاک‌های آلوده منتقل و روی گیاهچه‌ها با همان خاک آلوده پوشانده شدند. گلدان‌های شاهد از همان خاک بدون افزودن نفت خام پر شدند. پس از پوشاندن روی دانه‌رست‌ها توسط خاک همان گلدان، آبیاری با ۲۵۰ میلی‌لیتر محلول نیمه‌هوگلند صورت گرفت و گلدان‌ها در شرایط محیط در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد در شب و ۲۸ درجه سانتی‌گراد در روز و فتوپریود ۱۲L/۱۲D قرار گرفتند. آبیاری هر هفته با توجه به نیاز گیاه، به میزان ۲۵۰ میلی‌لیتر محلول نیمه‌هوگلند صورت گرفت. آزمایش در طرح کاملاً تصادفی در قالب آزمایشات فاکتوریل در سه تکرار انجام شد. در پایان ۳ ماه، برداشت نهایی انجام شد.

**اندازه‌گیری عناصر سنگین در ریشه افاقیای ۹۰ روزه:** به ۱/۲ گرم ریشه گیاهان ۴ میلی‌لیتر اسیدنیتریک ۶۵ درصد اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار داده شدند، سپس ۵ تا ۶ ساعت در آون ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته تا  $\text{NO}_2$  تبخیر شود. بعد از خشک شدن، نمونه‌ها صاف و با آب مقطر به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شدند. محلول‌های استاندارد نیترات‌روی  $(\text{N}_2\text{O}_6\text{Zn} \cdot 4\text{H}_2\text{O})$ ،  $261/44 \text{ gr/mol}$ ، نیترات‌کادمیم  $(\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O})$ ،  $308/47 \text{ gr/mol}$  و نیترات‌سرب  $(\text{N}_2\text{O}_6\text{Pb})$ ،  $331/21 \text{ gr/mol}$  تهیه شدند و جذب آن‌ها و نمونه‌ها در دستگاه جذب اتمی Shimadzu AA680 خوانده شد. نمودار

افاقیای تلقیح‌نشده و افاقیای تلقیح ریزوبیومی شده غلظت کشنده در نظر گرفته شد.



شکل ۱: تشکیل گرهک در گیاهان افاقیای تلقیح‌یافته با ریزوبیوم. فلش‌ها گرهک را نشان می‌دهند.

ولی اختلاف معنی‌داری در تجمع عنصر روی در ریشه گیاهان مورد بررسی دیده نشد (جدول ۱). براساس جدول مقایسه میانگین‌ها (جدول ۲) بیشترین میزان کادمیوم در گیاه ۲ درصد تلقیحی مشاهده می‌شود. میزان تجمع سرب و کادمیوم در ریشه گیاهان شاهد که تیمار نفتی نداشته‌اند با توجه به عدم حضور نفت در خاک مربوطه صفر بود. میزان تجمع سرب در ریشه گیاه ۲ و ۴ درصد تلقیح شده به ۴۰ ppm می‌رسد که بیشترین میزان تجمع را نشان داد. با افزایش غلظت نفت‌خام، مقدار سرب در ریشه گیاهان تحت تیمار نفتی، تلقیحی و غیرتلقیحی، افزایش را نشان داد. در تمامی حالات مقدار تجمع سرب در یک تیمار نفتی، در گیاه تلقیح‌شده نسبت به گیاه تلقیح‌نشده در همان تیمار نفتی، افزایش معنی‌داری را نشان داد. مقدار عنصر روی در گیاهان مختلف اختلاف معنی‌داری را نشان نداد، اگرچه مقدار عنصر روی در تمامی تیمارها نسبت به عنصر کادمیوم بیشتر بود.

غلظت‌های مختلف نفت، تلقیح ریزوبیومی و برهم‌کنش نفت و باکتری بر تجمع عناصر کادمیوم و سرب در ریشه افاقیا، اختلاف معنی‌داری ( $p \leq 0.01$ ) بین گیاهان تیمار و شاهد ایجاد کرده‌اند

جدول ۱: جدول آنالیز واریانس اثر غلظت‌های مختلف نفت خام (۰، ۱، ۲، ۳، ۴ درصد حجمی/وزنی) و تلقیح باکتری ریزوبیوم و برهم‌کنش نفت‌خام و باکتری بر میزان تجمع عناصر کادمیوم (ppb) cd، سرب (ppm) pb و روی (ppm) zn در ریشه گیاه افاقیای ۹۰ روزه. مقایسه برای هر ستون جداگانه انجام شده است.

منابع تغییر	Cd	Pb	Zn
اثر نفت خام	۶۸۵**	۲۵۴۸**	۱ <sup>ns</sup>
اثر تلقیح باکتری	۸۰۴**	۱۳۱۵**	۱ <sup>ns</sup>
برهم‌کنش نفت خام و باکتری	۱۴۲۴**	۳۷۴**	۲ <sup>ns</sup>

\*<sup>ns</sup> معنی‌دار نیست      \*\* معنی‌دار در سطح ۱ درصد

جدول ۲: میانگین غلظت عناصر کادمیوم (ppb) cd، روی (ppm) zn و سرب (ppm) pb در ریشه افاقیای تلقیح‌شده +R و بدون تلقیح -R با باکتری ریزوبیوم در غلظت‌های مختلف نفت خام (۰، ۱، ۲، ۳، ۴ درصد حجمی/وزنی). حروف یکسان عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌های مندرج را مطابق آزمون دانکن و برای هر ستون نشان می‌دهد. هر رقم میانگین ۳ تکرار ( $\pm SE$ ) می‌باشد.

تیمار نفت	ریزوبیوم	کادمیوم ppb	سرب ppm	غلظت عناصر روی ppm
شاهد	-R	. <sup>d</sup>	. <sup>f</sup>	۲/۰۵ <sup>a</sup> ±۱/۹
	+R	. <sup>d</sup>	. <sup>f</sup>	۱/۳ <sup>a</sup> ±۰/۴
۱ درصد	-R	. <sup>d</sup>	۱ <sup>d</sup> ±۰/۱	۰/۶ <sup>a</sup> ±۳/۶
	+R	۰/۳ <sup>c</sup> ±۰/۱	۲ <sup>e</sup> ±۰	۲ <sup>a</sup> ±۰/۱۳
۲ درصد	-R	۱/۵ <sup>b</sup> ±۰/۰۴	۳۵ <sup>b</sup> ±۰/۴	۱ <sup>a</sup> ±۰/۰۱
	+R	۱/۵ <sup>a</sup> ±۰/۰۴	۴۰ <sup>a</sup> ±۰/۳	۲ <sup>a</sup> ±۰/۰۸
۳ درصد	+R	۰/۵ <sup>b</sup> ±۰/۰۴	۳۰ <sup>c</sup> ±۰/۴	۱ <sup>a</sup> ±۰
	+R	۰/۵ <sup>b</sup> ±۰/۰۱	۴۰ <sup>a</sup> ±۰/۳	۱ <sup>a</sup> ±۰/۰۲

جدول ۳: جدول آنالیز واریانس اثر غلظت‌های مختلف نفت خام (۰، ۱، ۲، ۳، ۴ درصد حجمی/وزنی) و تلقیح باکتری ریزوبیوم و برهم‌کنش نفت خام و باکتری بر میزان برداشت عناصر کادمیم (ppm) cd، سرب (ppm) pb و روی (ppm) zn موجود در خاک بعد از دوره کشت سه ماهه. مقایسه برای هر ستون جداگانه انجام شده است.

منابع تغییر	Cd	Pb	Zn
اثر نفت خام	۳۰۰/۳۸**	۳۹۹/۳۸**	۶۰/۳**
اثر تلقیح باکتری	۰/۰۰۱ <sup>ns</sup>	۰/۰۲ <sup>ns</sup>	۰/۰۵۴ <sup>ns</sup>
برهم‌کنش نفت خام و باکتری	۰/۰۰۸ <sup>ns</sup>	۰/۰۶ <sup>ns</sup>	۰/۰۴۸ <sup>ns</sup>

<sup>ns</sup> معنی‌دار نیست      \*\* معنی‌دار در سطح ۱ درصد

جدول ۴: میانگین کاهش غلظت عناصر کادمیوم (ppb) Cd، روی (ppm) zn و سرب (ppm) pb در خاک آلوده به غلظت‌های مختلف نفت خام (۰، ۱، ۲، ۳، ۴ درصد حجمی/وزنی) و تحت کشت گیاهان افاقیای تلقیح شده +R و بدون تلقیح -R با باکتری ریزوبیوم. حروف یکسان عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌های مندرج را مطابق آزمون دانکن و برای هر ستون نشان می‌دهد. هر رقم میانگین ۳ تکرار (±SE) می‌باشد.

تیمار نفت	ریزوبیوم	کادمیم (ppb)	سرب (ppm)	روی (ppm)
شاهد	-R	<sup>d</sup>	<sup>e</sup>	۱۱/۶۲ <sup>d</sup> ±۰/۱۲
	+R	<sup>d</sup>	<sup>e</sup>	۱۱/۵۵ <sup>d</sup> ±۰/۰۵
۱ درصد	-R	۰/۲۹۲ <sup>c</sup> ±۰/۰۵۸	۰/۴۴۲ <sup>d</sup> ±۰/۰۰۲	۱۲/۳۵ <sup>c</sup> ±۰/۱۳
	+R	۰/۲۹۳ <sup>c</sup> ±۰/۰۰۷	۰/۴۴۵ <sup>d</sup> ±۰/۰۵۵	۱۲/۳۸ <sup>c</sup> ±۰/۶۲
۲ درصد	-R	۰/۳۴۲ <sup>b</sup> ±۰/۰۰۸	۰/۵۲۲ <sup>c</sup> ±۰/۰۰۸	۱۳/۰۷ <sup>b</sup> ±۰/۰۳
	+R	۰/۳۴ <sup>b</sup> ±۰/۰۰۵	۰/۵۲ <sup>c</sup> ±۰/۰۰۹	۱۳/۰۵ <sup>b</sup> ±۰/۰۵
۳ درصد	+R	۰/۳۹۶ <sup>a</sup> ±۰/۰۰۴	۰/۶۳۳ <sup>b</sup> ±۰/۰۰۶	۱۳/۴۶ <sup>b</sup> ±۰/۰۴
	+R	۰/۳۹۲ <sup>a</sup> ±۰/۰۰۲	۰/۹۲۳ <sup>a</sup> ±۰/۰۷۷	۱۳/۸۷ <sup>a</sup> ±۰/۱۳

مربوط به شاهد است. با افزایش مقدار نفت خام (هم در گیاهان تلقیح ریزوبیومی و هم گیاهان غیرتلقیحی)، میزان حذف و برداشت کادمیوم، سرب و روی توسط گیاهان افزایش معنی‌داری داشته است. بین گیاهان تلقیح با ریزوبیوم و گیاهان تلقیح نشده در خصوص حذف سرب، کادمیوم و روی خاک اختلاف معنی‌داری مشاهده نمی‌شود (جدول ۴).

نفت، تلقیح باکتری ریزوبیوم و برهم‌کنش نفت و باکتری اختلاف معنی‌داری (p≤۰/۰۱) را بین خاک‌های آلوده به نفت و تحت کشت گیاهان تلقیح شده و بدون تلقیح در خصوص کاهش مقدار هیدروکربن‌های کل، n-تری‌دکان، n-تترادکان و n-پنتادکان خاک ایجاد کرده‌اند (جدول ۵). میزان هیدروکربن‌های کل به طور قابل ملاحظه‌ای در همه تیمارها در طی ۹۰ روز کاهش معنی‌داری یافته است. بیشترین و کمترین برداشت هیدروکربن‌های کل به ترتیب در گیاه ۴ درصد تلقیح شده و ۱ درصد بدون تلقیح می‌باشد. افاقیا به تنهایی (بدون باکتری)، به ترتیب مقدار ۹۹۲ppm (۹۵ درصد) و ۱۷۶۵/۶ppm (۹۴ درصد)

مطابق جدول آنالیز واریانس (جدول ۳) غلظت‌های مختلف نفت خام بر میزان برداشت و حذف عناصر کادمیوم، سرب و روی بین خاک‌های آلوده به نفت خام که تحت کشت گیاهان تلقیح و بدون تلقیح با باکتری ریزوبیوم هستند اختلاف معنی‌داری (p≤۰/۰۱) ایجاد نموده است. بیشترین حذف عنصر کادمیوم مربوط به گیاهان تلقیح یافته در خاک ۳ و ۴ درصد نفت است که به ترتیب ۹۹ و ۹۸ درصد کادمیوم را از محیط برداشت نموده‌اند. بیشترین برداشت و حذف سرب توسط گیاهان تیمار ۴ درصد تلقیحی با ریزوبیوم رخ داده است که تقریباً بیشتر عنصر سرب موجود در خاک (۹۹/۲ درصد) را برداشت نموده‌اند. در گیاهان شاهد تلقیح شده و بدون تلقیح، که غلظت نفت خام صفر است، مشابه ابتدای آزمایش، هیچ کادمیوم و سربی مشاهده نشد. بیشترین برداشت و حذف عنصر روی Zn از خاک نیز در گیاهان تلقیح شده با ریزوبیوم در خاک آلوده به نفت ۴ درصد مشاهده می‌شود که تقریباً تمام عنصر Zn موجود در محیط (۹۹/۸ درصد) را برداشت نموده‌اند. کمترین میزان حذف عنصر روی

معدنی‌داری افزایش داده است، بطوری‌که گیاه ۲، ۳ و ۴ درصد تلقیح‌شده به ترتیب ۱/۸۱، ۲/۲ و ۳/۶ برابر گیاه ۱ درصد بدون تلقیح هیدروکربن‌های کل را از خاک آلوده به نفت حذف نموده‌اند (جدول ۶).

جدول ۵: جدول آنالیز واریانس اثر غلظت‌های مختلف نفت‌خام (۰، ۱، ۲، ۳ و ۴ درصد حجمی/وزنی) و تلقیح باکتری ریزوبیوم و برهم‌کنش نفت‌خام و باکتری بر میزان کاهش هیدروکربن‌های کل، n-تری‌دکان، n-تترادکان و n-پنتادکان (ppm) در خاک بعد از یک دوره کشت ۹۰ روزه افاقیای. مقایسه برای هر ستون جداگانه انجام شده است.

منابع تغییر	هیدروکربن کل	n-تری‌دکان	n-تترادکان
اثر نفت‌خام	۱/۲E۲۹**	۱/۶E۷**	۷۷۲۹۰۲**
اثر تلقیح باکتری	۱/۶E۳۳**	۵۸۴۲۱/۲۶**	۸۷/۶۶**
برهم‌کنش نفت‌خام و باکتری	۸/۲E۲۸**	۱۵۱۳۱/۳۵**	۴۷۹/۸۱**

ns معنی‌دار نیست \*\*معنی‌دار در سطح ۱٪

جدول ۶: میانگین میزان حذف هیدروکربن‌های کل، n-تری‌دکان، n-تترادکان و n-پنتادکان (ppm) در خاک آلوده به غلظت‌های مختلف نفت‌خام (۰، ۱، ۲، ۳ و ۴ درصد حجمی/وزنی) و تحت کشت گیاهان تلقیح‌شده +R و بدون تلقیح -R با باکتری ریزوبیوم. حروف یکسان عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌های مندرج را مطابق آزمون دانکن و برای هر ردیف نشان می‌دهد. هر رقم میانگین ۳ تکرار (±SE) می‌باشد.

تیمار نفت	ریزوبیوم	هیدروکربن کل	n-تری‌دکان	n-تترادکان	n-پنتادکان
شاهد	-R	.g	.g	.g	.e
۱ درصد	+R	۹۹۲ <sup>f</sup> ±۰	۷۶ <sup>f</sup> ±۰/۲	۱۱۵ <sup>e</sup> ±۰/۲۸	۱۰۶ <sup>d</sup> ±۰
۲ درصد	-R	۱۷۶۵/۶ <sup>d</sup> ±۱/۷	۱۴۸/۴ <sup>d</sup> ±۰/۰۲	۲۰۳/۳ <sup>d</sup> ±۰/۰۲	۲۰۹ <sup>c</sup> ±۰/۳
۳ درصد	+R	۱۷۹۲/۵ <sup>c</sup> ±۰/۲۳	۱۵۸ <sup>c</sup> ±۰/۰۳	۲۱۱/۶ <sup>c</sup> ±۰/۰۵	۲۰۹ <sup>c</sup> ±۰/۳
۴ درصد	+R	۳۵۷۳ <sup>a</sup> ±۷/۲	۳۴۱/۸۵ <sup>a</sup> ±۰/۷۳	۴۱۷/۳۵ <sup>a</sup> ±۰/۲	۲۸۱ <sup>b</sup> ±۰/۴۵

به‌تنهایی در خاک آلوده به نفت ۲ درصد، ۱/۹۵ برابر بیشتر n-تری‌دکان را نسبت به خاک ۱ درصد حذف نموده است و همچنین افاقیای تلقیح‌شده در خاک آلوده به نفت ۲ درصد، ۱/۸ برابر بیشتر n-تری‌دکان را نسبت به افاقیای تلقیح‌شده در خاک ۱ درصد حذف نموده است. به دنبال تلقیح ریزوبیومی، میزان حذف n-تری‌دکان افزایش معنی‌داری داشته است (جدول ۷).

n-تترادکان در گیاهان تلقیح‌نشده در تیمار ۱ درصد نفت و گیاهان تلقیح‌شده در تیمار ۴ درصد نفت به طور کامل از خاک حذف شده است. بیشترین برداشت n-تترادکان، در تیمار ۴ درصد نفت توسط افاقیای تلقیح‌شده با ریزوبیوم رخ داده است و کمترین در تیمار ۲ و ۱ درصد توسط افاقیای غیرتلقیحی صورت

از دیگر هیدروکربن‌های مورد بررسی n-تری‌دکان می‌باشد که در گیاه ۱ درصد تلقیح‌شده کاملاً حذف شده است. در حالی که در گیاه ۱ درصد بدون تلقیح حدود ۱۲ppm از این هیدروکربن در خاک باقی مانده است و تنها ۸۶ درصد حذف شده است. بیشترین و کمترین برداشت n-تری‌دکان از خاک آلوده به نفت به ترتیب در گیاه افاقیای تلقیحی تیمار نفتی ۴ درصد و غیرتلقیحی با ۱ درصد نفت صورت گرفته است. افاقیای به‌تنهایی در خاک آلوده به نفت ۱ و ۲ درصد به ترتیب ۸۶ و ۹۲ درصد از هیدروکربن n-تری‌دکان را حذف نموده است. با افزایش غلظت نفت (چه گیاهان تلقیح‌یافته و چه غیرتلقیحی)، میزان برداشت n-تری‌دکان افزایش معنی‌داری نموده است. بطور مثال افاقیای

روی Zn و حضور آن در محیط هوگلدن، این کاملاً طبیعی است (۲۴). بیشترین میزان روی در ریشه گیاه شاهد غیرتلقیحی مشاهده شد. مشابه عدم انباشت فلزات سنگین کادمیوم، مس، سرب، نیکل و روی در بخش هوایی و ریشه گیاه *Phaseolus vulgaris* L. در خاک آلوده به نفت، که به همین علت گیاه فوق به عنوان گیاه انباشتگر و تجمع‌کننده فلزات فوق در نظر گرفته نشد (۳).

گیاهان مورد بررسی از لحاظ تجمع عناصر سرب و کادمیوم در ریشه تفاوت معنی‌داری نشان می‌دهند. با افزایش غلظت نفت خام مقدار سرب در ریشه گیاهان تحت تیمار نفتی، چه تلقیح‌شده و چه تلقیح‌نشده، افزایش را نشان می‌دهد. گیاهان غیرتلقیحی در تیمار ۲ درصد نفت، ۳۵ برابر بیش از تیمار ۱ درصد، سرب را در خود انباشت کرده‌اند. این نتایج با مطالعه فلزات سنگین در اقاویا که در ترکیه انجام شده است مطابقت دارد (۲۴). هم‌چنین انباشت ۲۰/۸ برابری سرب در برگ‌های اقاویا در خاک آلوده به ۱ درصد نفت خام توسط محققین گزارش شده است. انباشت مقادیر بالای فلزاتی مثل سرب توسط اقاویا به‌تنهایی (بدون تلقیح باکتریایی) در محیط‌های آلوده، ضمن حفظ بقا و رشد معمولی خود و بدون داشتن علائم مرئی مشخص مثل کلروز و نکروز برگی صورت گرفته است (۳۵). هم‌چنین تجمع فلزات سنگین در بخش هوایی گیاه لوبیا رشد یافته در خاک آلوده به نفت خام گزارش شده است (۳). یکی از تغییرات شیمیایی گیاهان در حضور نفت خام ذخیره و تجمع فلزات سنگین می‌باشد (۲۱). در تمامی تیمارهای نفتی مقدار تجمع سرب، در اقاویای تلقیح‌شده نسبت به گیاه تلقیح‌نشده در همان تیمار نفتی، افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد. بیشترین تجمع سرب در گیاهان با تیمار ۲ درصد تلقیح‌شده است که نسبت به ۲ درصد بدون تلقیح ۱۴ درصد تجمع بیشتر سرب را نشان می‌دهد. این امر نشان دهنده نقش مفید و موثر باکتری ریزوبیوم در میزان انباشت عنصر سرب می‌باشد. در مطالعه‌ای تاثیر غلظت‌های مختلف سرب (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ ppm) بر گیاه *Pisum sativum* در تیمارهای حاوی ریزوبیوم و بدون ریزوبیوم بررسی شد. جذب سرب از خاک توسط گیاه تلقیح‌شده با ریزوبیوم، نسبت به گیاه بدون تلقیح افزایش داشت (۳۶). گیاه لوبیا عناصر سرب، روی و کادمیوم را در ریشه انباشته می‌سازد ولی در گیاه تلقیح‌شده این انباشتگی بیشتر می‌باشد. توانایی انباشته‌سازی این عناصر در غلظت‌های بالاتر مشهودتر است (۳۷). غلظت نرمال سرب در گیاهان کمتر از ۱۰ ppm است (۳۸). غلظت کمتر از ۳ ppm

گرفته است. حذف n-تترادکان نیز مانند هیدروکربن‌های قبلی، با افزایش غلظت نفت، چه در گیاهان تلقیحی و چه گیاهان تلقیح‌نیافته، افزایش معنی‌داری داشته است. تلقیح ریزوبیومی میزان حذف n-تترادکان را بطور معنی‌داری افزایش داده است. بطور مثال گیاهان تلقیح‌یافته در خاک به نفت ۱، ۲، ۳ و ۴ درصد به ترتیب ۰/۹۷، ۱/۸۴، ۲/۶ و ۳/۶۳ برابر بیش از اقاویای تنها در خاک آلوده به ۱ درصد نفت، n-تترادکان را حذف نموده‌اند (جدول ۶).

n-پنتادکان، در انتهای دوره در هیچ یک از تیمارها حضور نداشت، یعنی ۱۰۰ درصد n-پنتادکان در تمامی تیمارهای نفتی (چه تلقیح‌شده و چه غیرتلقیحی) از خاک حذف شده است، بنابراین بین تیمارها اختلافی موجود نبود که آنالیز واریانس انجام شود ولی مسلم است که کل هیدروکربن n-پنتادکان موجود در خاک کشت شده با اقاویا حذف شده است (جدول ۶). با توجه به اینکه تنها ۰/۰۲ درصد از هیدروکربن‌های کل نفت خام در خاک آلوده در طی آبیاری آبشویی می‌شود، خروج هیدروکربن‌های نفت در طی آزمایش به دنبال آبیاری نادیده گرفته شده است، ضمن اینکه این پدیده برای کل تیمارها رخ داده است (۳۳). از آنجا که کل خاک‌های مورد بررسی استریل و فاقد هر گونه باکتری بودند، پس امکان تجزیه و حذف هیدروکربن‌ها توسط باکتری‌های طبیعی موجود در خاک صفر می‌باشد. بنابراین حذف تمامی هیدروکربن‌ها توسط گیاهان اقاویا، بدون ریزوبیوم و یا همراه ریزوبیوم، انجام شده است.

## بحث

در این پژوهش، تلقیح با باکتری ریزوبیوم، غلظت‌کشنده نفت خام خاک را از ۳ درصد به ۵ درصد برای اقاویا ارتقا داد. یعنی تلقیح ریزوبیومی توانایی بقا اقاویا را در خاک‌های آلوده به نفت خام افزایش داده است. تلقیح باکتریایی دارای اثرات مثبت بر رشد گیاهان حتی در خاک‌های آلوده از طریق تاثیر بر شرایط تغذیه گیاه دارد (۶). ریزوباکترهای محرک رشد گیاهان PGPR جذب یون‌های معدنی را از طریق تحریک پمپ پروتون ATPase باعث می‌شود، بدین ترتیب سبب رشد و بقا بیشتر گیاهان در محیط‌های آلوده مثل نفت می‌شوند (۳۴).

تجمع عنصر روی در ریشه گیاهان تحت بررسی اختلاف معنی‌داری نشان نمی‌دهد، اگرچه مقدار آن در تمامی تیمارها نسبت به کادمیوم بیشتر است که با توجه به ضروری بودن عنصر



آنزیم‌ها مختل می‌شود (۴۴). در جذب کادمیوم، عواملی مانند pH، مقدار هوموس خاک، میزان کادمیوم محلول خاک و قابل دسترس برای گیاه، تعیین‌کننده هستند (۴۶). از طرفی توانایی ریزوبیوم در تولید سیدروفور، آنزیم ACC-دآمیناز و هورمون ایندول‌استیک‌اسید منجر به افزایش قابلیت دسترسی عناصر از جمله سرب و کادمیوم، برای گیاه شده و به این ترتیب جذب و تجمع کادمیوم توسط ریشه گیاه افزایش می‌یابد (۴۷). حضور باکتری‌های محرک رشد در ریزوسفر گیاهان در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین سبب افزایش غلظت برخی از این فلزات همچون روی، مس، سرب و کروم در اندام‌های گیاهی می‌شود (۴۸). در اغلب گونه‌های گیاهی تجمع فلزات در قسمت‌های زیرزمینی گیاه یعنی ریشه بیشتر از قسمت‌های بالای سطح زمین می‌باشد (۳ و ۴۱). یک گیاه انباشت‌گر می‌تواند بیشتر از ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم جیوه Hg، ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کادمیوم Cd، ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب Pb، مس Cu، کروم Cr و کبالت Co، ۱۰۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روی Zn و نیکل Ni را در خود انباشته سازد (۴۹). میکروب‌ها از طریق آزاد کردن عوامل کلات‌کننده (مثل سیدروفور)، اسیدی کردن محیط، انحلال‌پذیر شدن فسفات و تغییرات اکسیداسیون و احیا، بر میزان در دسترس بودن فلز سنگین برای گیاه تاثیر می‌گذارند و بنابراین توان افزایش فرآیندهای گیاه‌پالایی را دارند (۴۷).

بیشترین برداشت و حذف عناصر سرب، روی و کادمیوم از خاک، توسط افاقایای تلقیح‌شده با ریزوبیوم در غلظت ۴ درصد نفت انجام شده است که تقریباً ۹۹ درصد عناصر فوق از خاک آلوده به نفت برداشت شده‌اند. با افزایش مقدار نفت خاک، چه در گیاهان تلقیح‌شده و چه گیاهان غیرتلقیحی، مقدار برداشت سه عنصر سرب، کادمیوم و روی توسط گیاه افزایش معنی‌داری داشته است. نتایج شناسایی گیاهان انباشت‌گر فلزات سنگین از جمله *Noea mucronata*, *Gundelia tournefortii*, *Polygonum aviculare*, *Amaranthus retroflexus* و *N. murcronata* نشان داد که گیاه *Scariola orientalis* بهترین انباشت‌گر کادمیوم، مس، روی و سرب می‌باشد. همه عناصر از جمله سرب، کادمیوم، نیکل، مس و روی در خاک کشت شده توسط این گیاه کاهش یافتند. کاهش سرب (۹۸ درصد) بیش از سایر عناصر خاک بود. کاهش کادمیوم، نیکل، مس و روی نیز به ترتیب ۷۲/۰۴، ۳۳/۶۱، ۷۳/۳۸ و ۷۹/۰۳ درصد بود (۸).

سرب، غلظت طبیعی برای گیاهان گزارش شده است. غلظت مرگ‌آور سرب در درختان به سطح ۴۳ppm می‌رسد (۲۴). در بیشتر تیمارهای نفتی مورد بررسی غلظت سرب در ریشه نزدیک به غلظت مرگ‌آور (۳۵-۴۰ ppm) است، یعنی افاقیا چه تلقیح‌یافته با ریزوبیوم و چه تلقیح‌نشده یک انباشت‌گر سرب محسوب می‌شود. احتمال دارد یکی از دلایل عدم بقا افاقایای تلقیح‌نشده در غلظت ۳ و ۴ درصد، غلظت بالای سرب موجود در نفت و تجمع بیش از حد آن در ریشه گیاه باشد. فلزات سنگین با اختلال در فتوسنتز، تنفس، کاهش کلروفیل و کاروتنوئیدها و متابولیسم نیتروژن در گیاهان منجر به کاهش رشد می‌شوند (۳۹).

اختلاف معنی‌داری در تجمع کادمیوم در ریشه گیاهان تلقیح‌یافته و بدون تلقیح براساس غلظت‌های نفت‌خام دیده می‌شود. بیشترین میزان کادمیوم در ریشه گیاه ۲ درصد تلقیحی مشاهده می‌شود که ۳ برابر مقدار کادمیم ریشه افاقایای غیرتلقیحی در تیمار ۲ درصد نفت و ۵ برابر مقدار کادمیوم ریشه افاقایای تلقیح‌شده در تیمار ۱ درصد نفت است. یعنی افزایش غلظت نفت و تلقیح ریزوبیومی با تجمع و انباشت بیشتر کادمیم همراه شده است. کادمیوم اگرچه برای رشد گیاه ضروری نیست اما این فلز به راحتی از طریق پوست ریشه جذب می‌شود و سپس از راه سیمپلاستی یا آپوپلاستی وارد بافت چوب می‌شود (۴۰). کادمیوم اغلب در واکنش سلول‌های گیاهان عالی تجمع می‌یابد، تجمع کادمیوم در دیواره سلول و تیغه میانی بین آندودرم و دایره محیطیه نیز گزارش شده است (۴۱). تاخیر در رشد گیاهان در خاک‌های آلوده به نفت و فلزات سنگین از نشانه‌های سمیت با کادمیوم است (۱۸). کادمیوم بر تقسیم و رشد سلول‌ها، رشد کلی گیاه، تقسیم سلولی منطقه مریستمی و رشد و نمو گیاهان اثر می‌گذارد (۹)، سبب کاهش مقدار کلروفیل *a* و *b* و کاروتنوئیدها (۴۰)، کلروز و نکروز برگ (۴۲)، اختلال در متابولیسم کربوهیدرات‌ها (۳۹)، افزایش مقدار قندهای احیا و کاهش قندهای غیراحیا (۴۳)، تشکیل مالون‌دی‌آلدئید (شاخص افزایش پراکسیداسیون لیپید) (۴۴)، کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت (۴۵) می‌شود. پاسخ‌های گوناگون به کادمیوم احتمالاً به سطح کادمیوم ذخیره شده و به غلظت گروه‌های تیولی موجود در گیاه بستگی دارد. تیول‌ها با خصوصیات آنتی‌اکسیدانتی قوی که دارند می‌توانند تنش اکسیداتیو را بی‌اثر کنند (۴۶). کادمیوم به گروه تیول (-SH) آنزیم‌ها و پروتئین‌ها میل شدید دارد، بنابراین در صورت وجود کادمیوم فعالیت

و شیمیایی خاک و افزایش تهویه و فراهم کردن اکسیژن جهت تجزیه ترکیبات نفتی موثر باشند (۲۲).

### نتیجه گیری

اندرکنش میکروب-گیاه به عنوان یک جریان مهم و کارآمد در گیاه پالایی آلاینده‌های نفتی مطرح است. گیاه افاقیا به تنهایی یا همراه با ریزوبیوم، انباشتگر سرب و کادمیوم می‌باشد. برداشت و حذف ۹۷ تا ۹۹ درصدی عناصر سرب، روی، کادمیوم، هیدروکربن‌های کل، n-تری‌دکان، n-تترادکان و n-پنتادکان از خاک‌های آلوده به نفت خام، توسط افاقیا تنها و افاقیا-ریزوبیوم، نشان‌دهنده نقش افاقیا و باکتری ریزوبیوم در پالایش، تصفیه و کاهش فلزات سنگین و هیدروکربن‌های نفت است. کشت افاقیا در مناطق آلوده به غلظت‌های پایین نفت خام و فضاهای سبز ایران به عنوان یک گونه درختی، زینتی، غیرخوراکی، انباشتگر سرب و کادمیوم، گیاه پالا و موثر در کاهش هیدروکربن‌های نفتی پیشنهاد داده می‌شود.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله لازم می‌دانند از حوزه معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه اراک که حمایت مالی و اجرایی این طرح پژوهشی را به عهده داشتند صمیمانه تشکر و قدردانی بنمایند. همچنین از مسئولین محترم پتروشیمی شازند به خصوص همکاران آزمایشگاه پتروشیمی که در اندازه‌گیری‌های با گاز-کروماتوگراف و جذب اتمی همکاری نمودند تشکر می‌شود.

### منابع

- Peng S, Zhou Q, Cai Z, Zhang Z. Phytoremediation of Petroleum Contaminated Soils by *Mirabilis Jalapa* L. in Greenhouse Plot Experiment. *Journal of Hazardous Materials*. 2009.
- Scott SL. Biodegradation and Toxicity of Total Petroleum Hydrocarbon Leachate from Land treatment Units. Department of Engineering. California Polytechnic State University. 2003; p52.
- Al-Yemeni M, Siddiqui M, Wijaya L. Effect of petroleum polluted soil on the performance of *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of Agric and Environ science*. 2010; 7(4): 427-432.
- Bona C, Rezende IM, Santos GDO, Souza LA. Effect of Soil Contaminated by Diesel Oil on the Germination of Seeds and the Growth of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) Seedlings.

میزان تمامی هیدروکربن‌های مورد سنجش (هیدروکربن‌های کل، n-تری‌دکان، n-تترادکان، n-پنتادکان) به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای (اکثر بالای ۹۰ درصد) در همه تیمارها در خاک آلوده به نفت، کاهش معنی‌داری یافته است. n-پنتادکان در همه تیمارها کاملاً حذف شده است. بیشترین برداشت و حذف تمام هیدروکربن‌های فوق توسط افاقیا تلقیح‌شده با ریزوبیوم در تیمار نفتی ۴ درصد اتفاق افتاده است. افاقیا بدون باکتری، حدود ۹۴ درصد هیدروکربن‌های کل خاک آلوده به نفت را برداشت نموده است ولی تلقیح باکتریایی میزان حذف هیدروکربن‌ها را بطور معنی‌داری (۱/۲ تا ۴/۵ برابر) افزایش داده است. مشابه نتایج بررسی تاثیر آلودگی نفتی بر گیاهان فستوکا و ذرت که نشان‌دهنده کاهش میزان هیدروکربن کل در همه تیمارها بود. بیشترین برداشت هیدروکربن در گیاه فستوکا به میزان ۹۶/۳ درصد بود (۶). غلظت هیدروکربن‌های آروماتیک در خاک کشت شده با گیاهان مختلف، به خصوص خانواده گندمیان، نسبت به خاک کشت نشده کاهش قابل‌ملاحظه‌ای دارد. در بین گندمیان، آندروپوگون و چمن خیلی موثرتر از بقیه محرک مصرف هیدروکربن‌های آروماتیک هستند (۵۰). در یک آزمایش گلخانه‌ای کشت چاودار، سورگوم، ذرت، یونجه، برنج در خاک آلوده به نفت، سبب کاهش معنی‌دار غلظت هیدروکربن‌های کل نفت در خاک کشت‌شده نسبت به کنترل که گیاهی در آن وجود نداشت شدند (۳۲). ریزوبیوم قادر به مصرف ترکیبات هیدروکربنی و هیدروکربن‌های هتروسیکلیک آروماتیک است (۵۱). در تلقیح یونجه با ریزوبیوم ملیوتی، به میزان قابل‌توجهی تجزیه هیدروکربن‌های آروماتیک، فعالیت میکروبی خاک و توانایی مصرف کربن در خاک آلوده به میکروب افزایش یافت. یونجه، مقادیری از هیدروکربن‌های آروماتیک PAHs را در بخش هوایی و ریشه خود انباشت کرد. درصد برداشت این ترکیبات توسط یونجه تلقیح‌شده با ریزوبیوم بیش از یونجه بدون تلقیح بود (۲۹). کاهش غلظت هیدروکربن‌ها در خاک می‌تواند به دلیل میکروارگانسیم‌های ریزوسفر یا در اثر تغییر ترشحات ریشه طی فرایند گیاه‌پالایی یا تجزیه زیستی باشد. انجام فعالیت‌های متابولیکی گیاه تلقیح‌شده با باکتری ممکن است منجر به تحریک رشد باکتری تجزیه‌کننده هیدروکربن‌ها شود (۵ و ۲۹). بعلاوه باکتری‌های ریزوبیوم مقدار زیادی از هیدروکربن‌های آروماتیک و آلیفاتیک نفت‌خام را به عنوان منبع کربن و انرژی مصرف می‌کند (۲۳). گیاهان و ریشه‌های آن‌ها می‌توانند به طور غیرمستقیم از طریق تغییر دادن شرایط فیزیکی

- Brazilian archives of biology and technology. 2011; 54(6): 1379-1387.
5. Omosun G, Markson AA, Mbanasor O. Growth and Anatomy of *Amaranthus Hybridus* as Affected by Different Crude Oil Concentrations. American-Eurasian Journal of Scientific Research. 2008; 3 (1): 70-74.
6. Daryabeigi Zand A, Nabi Bidhendi Gh, Mehrdadi N. Phytoremediation of total petroleum hydrocarbons (TPHs) using plant species in Iran. Turk J Agric For. 2010; 34: 429-438.
7. Askary M, Noori M, Amini F, Beigi F. [Evaluation of germination, growth and chlorophyll content of *Rubinia pseudoacacia* L. as affected by petroleum pollution]. Journal of Plant Biology, 2011;7:41-54. Persian.
8. Chehregani, A, Noori M, Lari Yazdi H. Phytoremediation of heavy-meta-polluted soils: screening for new accumulator plants in Angouran mine (Iran) and evaluation of removal ability , Journal of Ecotoxicology and Environmental Safety. 2009; 72(5): 1349-1353.
9. Das K, Mukherjee AK. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India, Journal of Bioresource Technology. 2007; 98: 1339-1345.
10. Joner JE, Hirmann D, Szolar HJ, Todorovic OD, et al. Priming effects on PAH degradation and ecotoxicity during a phytoremediation experiment. Environ Pollut. 2004; 128:429-435.
11. Us EPA (united states environmental protection agency). Crude oil category. The american petroleum institute, petroleum HPV (high production volume) testing group. 2011; 108pp.
12. Qixing Z, Zhang C, Zhineng Z, Weitao L. Ecological Remediation of Hydrocarbon Contaminated Soils with Weed Plant. Journal of Resources and Ecology. 2011; 2(2):97-105.
13. Kloepper JW, Ryu CM, Zhang SA. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by Bacillus species. Journal of Phytopathology. 2004; 94: 1259-1266.
14. Lugtenberg B, Kamilova F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. Annual Review Microbiology. 2009; 63:541-56.
15. Gentili F, Jumpponen A. Potential and possible uses of bacterial and fungal biofertilizers. In Handbook of microbial biofertilizers. (eds). by M. K. Rai. p. 543. The Haworth press, New York. 2006.
16. Matiru V, Dakora F. Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. African J. Biotechnol. 2004; 3(1):1-7.
17. Gaballah MS, Gomaa AM. Interactive effect of *Rhizobium* inoculation, sodium benzoate and salinity on performance and oxidative stress in two fababean varieties, International Journal of Agriculture and Biology. 2005; 7(3): 495-498.
18. Lee SH, Lee WS, Lee CH, Kim JG. Degradation of phenanthrene and pyrene in rhizosphere of grasses and legumes, Journal of Hazardous Materials. 2008; 153: 892-898.
19. Pajuelo E, Rodríguez-Llorente ID, Dary M, Palomares AJ. Toxic effects of arsenic on *Sinorhizobium Medicago sativa* symbiotic interaction, Environmental Pollution. 2008; 154: 203-211.
20. Mueller KE, Shann JR. PAH dissipation in spiked soil: Impacts of bioavailability, microbial activity, and trees. Chemosphere. 2006; 64:1006-1014.
21. Peretiemo-Clarke BO, Achuba FI. Phytochemical Effect of Petroleum on Peanut (*Arachis hypogea*) Seedlings, Journal of Plant Pathology. 2007; 6 (2): 179-182.
22. Shirdam R, Daryabeigi Zand A, Nabi Bidhendi G. Phytoremediation of hydrocarbon-contaminated soils with emphasis on the effect of petroleum hydrocarbons on the growth of plant species, Journal of Phytoprotection. 2008; 89: 21-29.
23. Dashti N, Khanafer M, El-Nemr I, Sorkhoh N, et al. The potential of oil-utilizing bacterial consortia associated with legume root nodules for cleaning oily soils, Journal of Chemosphere. 2009; 74: 1354-1359.
24. Celik A, Kartal AA, Akdogan A, Kaska Y. Determining the heavy metal pollution in Denizli (Turkey) by using *Robinio pseudo-acacia* L., Journal of Environment International. 2005; 31:105-112.
25. Anoliefo GO, Isikhuemhen OS, Ohimain EI. Sensitivity studies of the common bean (*Vigna unguiculata*) and maize (*Zea mays*) to different soil types from the crude oil drilling sites at Kutchalli, Nigeria, Journal of Soils Sediments. 2006; 6 (1): 30-36.
26. Holt JG, Kreig NR, Sneath PHA, Staley JT, et al. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th edn, Williams and Wilkins, Baltimore, USA. 1994. 787pp.
27. Molla AH, Shamsuddin ZH, Halimi MS, Morziah M, et al. Potential for enhancement of root growth and nodulation of soybean co-inoculated

- with *Azospirillum* and *Bradyrhizobium* in laboratory systems. *Soil Biol. Biochem.* 2001; 33: 457-463.
28. Swift M, Bignell D. Standard methods for assessment of soil biodiversity and land use practice. International centre for research in Agroforestry(ICRAF) Southeast Asia. 40pp.
29. Teng Y, Shen Y, Luo Y, Sun X, et al. Influence of *Rhizobium meliloti* on phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by alfalfa in an aged contaminated soil, *Journal of Hazardous Materials.* 2010; 10: 1-29
30. Wang Y, Oyaizu H. Evaluation of the phytoremediation potential of four plant species for dibenzofuran-contaminated soil, *Journal of Hazardous Materials.* 2009; 168: 760-764.
31. Hoagland DR, Arnon DI. The water-culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station Circular, 1950; 347: 1-32.
32. Kaimi E, Mukaidani T, Tamaki M. Screening of twelve plant species for phytoremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil. *Plant production science.* 2007; 10(2): 211-218.
33. Hutchinson SL, Banks MK, Schwab AP. Phytoremediation of aged petroleum sludge: effect of inorganic fertilizer. *J Environ Qual.* 2001; 30(2): 395-403.
34. Mantelin S, Touraine B. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability impacts on root development and nitrate uptake, *Journal of Exp. Bot.* 2004; 55(394): 27-34.
35. Askary M, Noori M, Beigi F, Amini F. [Evaluation of the phytoremediation of *Robinia pseudoacacia* L. in petroleum-contaminated soils with emphasis on the some heavy metals]. 2012; 2(4): 435-442. Persian.
36. Abas SM, Kamel EA. *Rhizobium* as a biological agent for preventing heavy metal stress, *Asian Journal of Plant Sciences.* 2004; 3(4): 416- 424.
37. Saleh M. Saleh Al- Garni. Increased heavy metal tolerance of cowpea plants by dual inoculation of an arbuscular mycorrhizal fungi and nitrogen-fixer *Rhizobium* bacterium, *African Journal of Biotechnology.* 2006; 2(2): 133-142.
38. Kabata-Pendias A, Pendias H. Trace elements in soils and plants. Chemical rubber company (CRC) press.1984; 315pp.
39. Gouia H, Ghorbal MH, Meyer C. Effect of cadmium on activity of nitrate reductase and on other enzymes of the nitrate assimilation pathway in bean, *Plant Physiology.* 2001; 38: 629-638.
40. Sanita di, Toppi L, Gabbriellini R. Response to cadmium in higher plants- review. *Environmental and Experimental Botany.* 1999; 41:105-130.
41. Ramos I, Esteban E, Lucena JJ, Garate A. Cadmium uptake and subcellular distribution in plants of *Lactuca sp.* Cd-Mn interaction. *Plant Science.* 2002; 162:761-767.
42. Zhang G, Fukami M, Sekimoto H. Influence of cadmium on mineral concentration and yield components in wheat genotypes differing in Cd tolerance at seedling stage. *Field Crops Research.* 2002; 77(2): 93-98.
43. Hegedus A, Erdi S, Horvath G. Comparative studies of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxifying enzymes in green and greening barley seedling under cadmium stress. *Plant Science.* 2001; 160:1085- 1093.
44. Vassilev A, Vangronsveld J, Yordanov I. Cadmium phytoextraction; present state, biological backgrounds and research needs – review. *Plant Physiology.* 2002; 28:68-95.
45. Schutzenhubel A, Polle A. Plant responses to abiotic stress: heavy metal – induced oxidative stress and protection by mycorrhization, *Experimental Botany.* 2002; 53:1351- 1365.
46. Mejare M, Bulow L. Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals – review. *Trends, in Biotechnology.* 2001; 19:67-72.
47. Khan MS, Zaidi A, Wani PA, Oves M. Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils, *Environ Chem Lett.* 2008; 7: 1-19.
48. Abou-Shanab RAI, Angle JS, Van Berkum P. Chromate tolerant bacteria for enhanced metal uptake by *Eichhornia crassipes* (Mart). *Int Journal of Phytoremediation.* 2007; 9: 91-105.
49. Baker A.J.M, Mc Grath S.P, Reeves R.D, Smith J.A.C. Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. In: Terry, N., Banuelos, G. (eds.), *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water.* Lewis Publishers, Boca Raton, FL; 2000; pp. 85-107.
50. Olson PE, Castro A, Joern M, Duteau N, et al. comparison of Plant families in a greenhouse phytoremediation study on an aged polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil, *Journal of Environ.Qual.* 2007; 36: 1461-1469.
51. Keum YS, Seo JS, Hu YT, Li QX. Degradation pathways of phenanthrene by *SinoRhizobium sp.* C4. *appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006; 71: 935- 941.

## ***Rubinia pseudoacacia* – *Rhizobium* Symbiosis for Phytoremediation of Petroleum Polluted Soil**

Askary M. Ph.D.<sup>1\*</sup>, Biegi F. M.Sc.<sup>2</sup>, Amini F. Ph.D.<sup>1</sup>, Zahedi M. M.Sc.<sup>3</sup>

1. Biology Department, Faculty of Sciences, Arak University, Arak 38156-8-8349, Iran

2. M.Sc. in Plant Physiology, Biology Department, Faculty of Sciences, Arak University

3. M.Sc. in Industrial Engineering, Amirkabir Technical and Vocational College, Arak.

\* Email corresponding author: m-askary@araku.ac.ir

Received: 31 Jul. 2012

Accepted: 11 Dec. 2012

### **Abstract**

**Aim:** Plant-microbe interactions are considered to be important processes determining the efficiency of phytoremediation of petroleum pollution. The use of legume-Rhizobium is a suitable method for modification of petroleum-contaminated soil. The aim of this study was to evaluate the phytoremediation potential of *Acacia*-Rhizobium symbiosis in petroleum-polluted soil.

**Material and methods:** The three-day acacia-seedlings were transferred to hydroponic medium and inoculated with rhizobium. Then, the 13-days seedlings transferred to polluted soil with different concentration of crude oil, that is; 0% as control and 1-5% (vol. /Wight), at the start and end of the 90-days period. Soil samples were analyzed for hydrocarbon removal (total hydrocarbon, n-tridecan, n-tetradecan and n-pantadecan) by GC-FID. Contents of Pb, Zn and Cd were measured with atomic absorption from soil and plant roots. The data were statistically analyzed with the help of SPSS11 and Duncan 'test.

**Results:** The results showed accumulation of heavy metal in plant roots and it's reducing in soil. Hydrocarbon reduction was found over the course of the experiment in all treatments. The maximum removal was obtained in plants inoculated with rhizobium at 4% treatment, in which inoculated-acacia removed 97-100% of the hydrocarbons from soil. There fore inoculation *Rubinia pseudoacacia* with Rhizobia are effective in removing TPHs and heavy metals from petroleum polluted soil.

**Conclusion:** Based upon these results, *Rubinia pseudoacacia* L. inoculated with rhizobium can be used as lead and cadmium bioaccumulator in petroleum pollution and was selected for the phytoremediation of petroleum-contaminated soil.

**Key words:** Acacia, Petroleum, Heavy metals, Hydrocarbons Phytoremedaion, Rhizobium