نشریه زیست‌شناسی خاک / جلد 7 / شماره 1 / 1398
Archive of SID

10.22092/sbj.2018.121657.133

اثر برخی ریز جانداران در کاهش آلودگی یک خاک آهکی آلوده به نفت خام

سمیرا کشاورز، رضا قاسمی فسائی[1]، عبدالمجید رونقی و مهدی زارعی

دانشجوی دکتری بخش علوم خاک دانشگاه شیراز؛ **samirakeshavarz71@yahoo.com**

دانشیار بخش علوم خاک دانشگاه شیراز؛ **ghasemif@gmail.com**

استاد بخش علوم خاک دانشگاه شیراز؛ **amronaghi@yahoo.com**

دانشیار بخش علوم خاک دانشگاه شیراز؛ **mehdizarei20@yahoo.ca**

دریافت: **97/3/1** و پذیرش: **97/7/18**

چکیده

آزمایشی گلخانه‌ای به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی به منظور بررسی اثر تیمارهای زیستی (باکتری *سودوموناس فلورسنس*، باکتری *میکروکوکوس یوننانسیس*، قارچ *کلارودیوگلوموس اتونیکاتوم* و قارچ *فونلیفورمیس موسه*) بر پاسخ‌های گیاه وتیور در آلودگی نفت خام (0، 2 و 4 درصد وزنی) انجام شد. نتایج نشان داد افزایش سطح آلودگی نفتی وزن خشک اندام هوایی و ریشه و همچنین درصد کلنیزاسیون ریشه را کاهش داد اما تنفس میکروبی و غلظت کل هیدروکربن‌ها در خاک پس از برداشت را افزایش داد. تلقیح باکتری *میکروکوکوس یوننانسیس* و قارچ *فونلیفورمیس موسه* وزن خشک اندام هوایی را افزایش داد، همه تیمارهای بیولوژیکی بجز باکتری *سودوموناس فلورسنس* افزایش وزن خشک ریشه را موجب گردیدند. مایه زنی قارچ *کلارودیوگلوموس اتونیکاتوم* باعث افزایش معنی‌دار غلظت و جذب آهن، و قارچ *فونلیفورمیس موسه* باعث افزایش معنی‌دار میانگین غلظت روی و جذب روی و آهن شد. همچنین مایه زنی قارچ باعث افزایش درصد کلنیزاسیون ریشه شدند. از بین ریزجانداران مطالعه شده باکتری *میکروکوکوس یوننانسیس* و قارچ *فونلیفورمیس موسه* تنفس میکروبی را افزایش دادند که به نوبه خود مقدارکل هیدروکربن‌های باقی مانده در خاک پس از برداشت را کاهش داد. نتایج ما نشان داد که از بین ریزجانداران باکتری *میکروکوکوس یوننانسیس* و قارچ *فونلیفورمیس موسه* اثرات مطلوب‌تری در زیست پالایی و مقاومت گیاه به آلودگی نفتی دارند.

واژه‌های کلیدی: آلودگی نفتی، باکتری‌های محرک رشد، قارچ ریشه، وتیور

[1]. نویسنده مسئول، آدرس: شیراز، دانشگاه شیراز- دانشکده کشاورزی، گروه علوم خاک

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

آلودگی نفتی یکی از شایع‌ترین نوع آلودگی‌ها، در زیست بوم خشکی و آبی مناطق نفت خیز است. مطالعات زیادی برای کاهش آلودگی نفتی گزارش شده است. که از بین آنها کاهش زیستی آلودگی‌های نفتی یک روش سازگار با محیط زیست است. گیاه پالایی به همراه کاهش زیستی یک همکاری بین گیاه و ریزجانداران موجود در ریزوسفر است که موجب کاهش آلاینده‌های آلی می‌شود (یاتیم و همکاران، 2013). از اثرات آلودگی نفتی برای گیاهان می‌توان به زرد شدن گیاه، کاهش و ایجاد مزاحمت برای رشد اشاره کرد که به دلیل تغییر ساختار غشا پلاسمایی گیاهان با جذب ملکول‌های سمی نفت و در نتیجه اختلال در مکانیسم گیاه است (پناکاسترو و همکاران، 2006).

مایه‌زنی قارچ ریشه آربسکولار به گیاهان باعث تحمل بالای گیاهان در برابر تنش‌های محیطی مثل شوری، خشکی، فلزات سنگین و ... می‌شود و بدین صورت باعث برانگیختن رشد گیاه و کمک به رشد گیاه در شرایط تنش می‌شود (تورنا و همکاران، 2005). حضور قارچ ریشه باعث تخریب شدید آلاینده‌های آلی شده است که نشان دهنده این است که مایه زنی قارچ ریشه یک روش امیدوار کننده برای آلودگی‌های آلی از جمله آلودگی نفتی است، برای مثال مایه زنی قارچ ریشه *گلوموس* به همراه گیاه چچم باعث کاهش آلودگی هیدروکربن‌های نفتی به ویژه پیرین می‌شود (یو و همکاران، 2011) و تلقیح قارچ ریشه *گلوموس موسه* و *گلوموس اتونیکاتیوم* با گیاه یونجه باعث حذف بیش از 98 درصد و 88 درصد فنانترن و پیرین شد (گاعو و همکاران، 2011).

باکتری‌های محرک رشد، باکتری‌های سودمندی در سطح ریشه و در ارتباط با ریشه‌ها هستند که در ریزوسفر ریشه یافت می‌شوند (احمد و همکاران،2008). و از طریق افزایش مصرف عناصر غذایی و سرکوب بیماری‌ها با تولید آنتی بیوتیک‌ها و سیدروفورها یا مواد ضد باکتریایی و قارچی، رشد گیاهان را بهبود می‌بخشند (آلمغربی و همکاران، 2013). همچنین باکتری‌های محرک رشد باعث کاهش معنی‌دار آلاینده‌های آلی می‌شوند و از این طریق رشد گیاهان را افزایش می‌دهد (هو و همکاران، 2015). در گیاه جو تلقیح باکتری *سودوموناس* علاوه بر اثر مثبت روی رشد گیاه، کاهنده نفت نیز است و باعث آزاد کردن سیدروفور و اثر مثبت روی عناصر غذایی می‌شود (لیو و همکاران، 2015). آنوخونیا و همکاران (2004) نیز گزارش کردند باکتری *سودوموناس فلورسنس* خاصیت کاهندگی نفت دارد و از این طریق رشد گیاه جو (*Hordeum sativum L*) را افزایش داده است. نتایج یک تحقیق در آب‌های آلوده به نفت سواحل کویت نشان داد باکتری‌های نظیر *سودوموناس* و *میکروکوکوس* می‌توانند باعث رقیق کردن نفت خام در نمونه‌های آب آلوده به نفت جمع آوری شده شوند در این مورد مطالعه شده اثر باکتری *میکروکوکوس یونانسیس* بهتر از *سودوموناس مندوسینا* بوده است و با توجه به حذف 11 تا 33 درصدی نفت خام توسط این دو باکتری، این باکتری‌ها می‌توانند برای زیست پالایی استفاده شوند (الآوادحی و همکاران، 2012).

گیاه وتیور (*Vetiver zizanoides*) از خانواده گندمیان بوده و فاقد ریزوم می‌باشد. بیشتر مناطق آلوده به نفت در ایران در جنوب کشور در منطقه خوزستان است، از آنجا که وتیور بومی این منطقه است می‌تواند انتخاب مناسبی برای کاشت باشد. پتانسیل بالای گیاه وتیور برای گیاه پالایی یک انتخاب موفق برای محیط آبی و خاکی است و از آن می‌توان در تالاب‌های آلوده به نفت خام برای کاهش آلودگی نفتی استفاده کرد (افندی و همکاران، 2017).

طبق فرضیات این تحقیق، ریزجانداران مورد استفاده از ترکیبات نفتی به عنوان منبع کربن استفاده می‌کنند و به دنبال آن باعث کاهش آلودگی نفتی خاک می‌شوند (لابود و همکاران، 2007). همچنین این ریزجانداران نقش‌های مؤثری در مقاوم سازی گیاه در مقابه با تنش ایفا می‌کنند (تورنا و همکاران، 2005). از جمله این اثرات می‌توان به ترشح برخی مواد محرک رشد (هوو و همکاران، 2015)، افزایش کلنیزاسیون ریشه و به دنبال آن جذب بهتر عناصر غذایی، افزایش تنفس خاک و کاهش آلودگی نفتی (یو و همکاران، 2011) اشاره کرد. با توجه به نقش ریزجانداران مفید در کاهش آلودگی و بهبود رشد گیاهان در شرایط آلودگی نفتی، این پژوهش با اهداف بررسی اثر ریزجانداران محرک رشد بر 1) تنفس خاک و مقدار کل هیدروکربن‌های باقی مانده در خاک پس از برداشت 2) بهبود وضعیت رشد و برخی عناصر غذایی در اندام هوایی گیاه انجام شد.

مواد و روش‌ها

جهت انجام این پژوهش از لایه 0 تا 30 سانتی متری خاک سری دانشکده که در طبقه‌بندی خاک در سیستم آمریکایی به صورت Fine, mixed, (calcareous), mesic, Typic Calcixerept نامگذاری شده، تهیه شد و برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک از جمله بافت به روش هیدرومتر (بایوکس، 1962)، پ‌هاش در خمیر اشباع به وسیله پ‌هاش متر، قابلیت هدایت

www.SID.ir

Archive of SID

الکتریکی در عصاره اشباع به وسیله هدایت سنج الکتریکی (رودز، 1996)، ماده آلی به روش اکسایش با بی کرومات پتاسیم و تیتر کردن با فروسولفات آمونیوم (نلسون و سامرز، 1982)، فسفر قابل استفاده به وسیله بیکربنات سدیم (اولسن و سامرز، 1982)، غلظت آهن و روی به روش عصاره‌گیری با دی‌تی‌پی‌ا (لیندسی و نورول، 1978) و اندازه‌گیری با دستگاه جذب اتمی مدل (Shimadzu AA-670) تعیین شد که در جدول 1 آمده است.

جدول 1- برخی ویژگی‌های خاک مورد استفاده در آزمایش

ویژگی	مقدار/تعریف
کلاس بافت	لوم رسی شنی
پ هاش خمیراشباع	7/6
قابلیت هدایت الکتریکی عصاره اشباع (دسی زیمنس برمتر)	2/15
ماده آلی(درصد)	1/3
فسفرقابل استخراج با بی کربنات سدیم (میلی‌گرم درکیلوگرم)	15
آهن قابل عصاره گیری بادی تی پی ا (میلی‌گرم درکیلوگرم)	5/1
روی قابل عصاره گیری بادی تی پی ا (میلی‌گرم درکیلوگرم)	1/3

تهیه زاد مایه باکتری

باکتری‌های محرک رشد گیاه میکروکوکوس *یوننانسیس*[1] و *سودوموناس فلورسنس*[2] که دارای توانایی حل کنندگی فسفات و تولید سیدروفور بودند (خسروی و همکاران، 2018)، از آزمایشگاه میکروبیولوژی بخش علوم خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز تهیه شد. و به منظور کشت و تهیه سوسپانسیون باکتری مقدار مشخصی از محیط کشت نوترینت براث در ارلن یک لیتری حاوی 500 میلی‌لیتر ریخته و درون اتوکلاو به مدت 15-20 دقیقه در دمای 121 درجه سانتی‌گراد و فشار 1/2 اتمسفر استریل گردید و پس از خنک کردن محیط کشت نوترینت براث مایه زنی شد در دمای 28 درجه سلسیوس بر روی شیکر انکوباتوردار در 120 دور در دقیقه به مدت 24 ساعت نگهداری شد. پس از رشد کامل باکتری‌ها به روش مک فارلند با لام نئوبار شمارش و جمعیت در 1×10^7CFU/ml تنظیم گردید و زادمایه باکتری مورد استفاده قرار گرفت.

آماده سازی و تکثیر قارچ ریشه آربسکولار

مایه تلقیح قارچ‌ها که از مناطق غیر آلوده به فلزات سنگین در منطقه انگوران زنجان شناسایی و جداسازی شده‌اند (زارعی، 1387) به روش تله‌ای تکثیر گردید (بهرامی نیا و همکاران، 2016). از ماسه بادی به عنوان بستر کشت و از ذرت علوفه‌ای به عنوان گیاه تله‌ای استفاده شد. ابتدا ماسه بادی چندین بار با آب معمولی شست و شو و بعد از خشک شدن در آون با مقداری خاک فقیر از نظر عناصر غذایی با نسبت وزنی 1:4 مخلوط و در اتوکلاو با دمای 121 درجه سلسیوس و فشار 1/2 اتمسفر به مدت نیم ساعت و در دو نوبت به فاصله 24 ساعت استریل گردید. گلدان‌های پلاستیکی در محلول وایتکس 10 درصد ضدعفونی و با آب شست و شو داده شدند. روز قبل از کاشت، مقدار کافی بذر ذرت به مدت 15 دقیقه در محلول وایتکس پنج درصد ضدعفونی و چندین بار با آب مقطر شست و شو گردید. در عمق 10 سانتی‌متری از سطح بستر، مقدار 150 گرم از هر کدام از زاد مایه‌های قارچ *کلاردیو گلوموس اتونیکاتوم*[3] و *فونلیفورمیس موسه*[4] پخش گردید و با لایه‌ای از خاک بستر پوشانده شد. پس از پایان 4/5 هفته، گیاهان برداشت شده و محتویات داخل گلدان‌ها درون کیسه‌های پلاستیکی خالی و در یخچال نگهداری شد. پتانسیل زاد مایه شامل 80 تا 85 درصد کلنیزاسیون ریشه و 8-10 عدد اسپور در هر گرم بستر بود که به روش زارعی و همکاران (2008) تعیین گردید.

اعمال تیمارهای آزمایشی و کاشت گیاه

آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی و به صورت فاکتوریل 3×5 شامل سه سطح نفت خام (0، 2 و 4 درصد وزنی) که با نسبت 1:1 با استون مخلوط شد و به سطح خاک اسپری شد (آلمنصوری و همکاران، 2015) و پنج سطح ریزجانداران (شاهد، مایه زنی با قارچ‌های *کلاردیو گلوموس اتونیکاتوم* و *فونلیفورمیس موسه* و باکتری‌های محرک رشد *سودوموناس فلورسنس* و *میکروکوکوس یوننانسیس*) انجام شد. پنج کیلوگرم خاک عبور یافته از الک دو میلی‌متر در هر کدام از گلدان‌ها

[1] *Micrococcus yunnanensis*
[2] *Pseudomonas fluorescens*
[3] *Claroideoglomus etunicatum*
[4] *Funneliformis mosseae*

www.SID.ir

Archive of SID

ریخته شد و به منظور جلوگیری از کمبود احتمالی برخی عناصر غذایی بر اساس نتایج آزمون خاک اضافه شدند. متناسب با هر سطح، نفت خام به خاک هر کدام از گلدان-ها اضافه شد. پس از آن که رطوبت خاک به حد مطلوب رسید، خاک به خوبی مخلوط شد. گیاه وتیور از شهرستان رامهرمز اهواز تهیه گردید. در هر گلدان یک نهال وتیور (با اندازه یکسان 25 سانتی‌متر اندام هوایی و پنج سانتی-متر ریشه) کشت شد. در تیمارهای دارای باکتری بر روی ریشه گیاه مقدار چهار میلی‌لیتر از زادمایه باکتری (1×10^7CFU/ml) مایه زنی شد (خسروی و همکاران، 2017؛ شهسوار و همکاران، 2016)، و در تیمارهای قارچی مقدار 50 گرم از زادمایه قارچ‌هادر کنار ریشه نهال‌ها اضافه شد (شهسوار و همکاران، 2016) (بهرامی‌نیا و همکاران، 2016). در تیمارهای بدون قارچ نیز به منظور یکسان سازی شرایط برای تمامی گلدان‌ها، به میزان 50 گرم از بستر گلدان‌های بدون قارچ مرحله تکثیر شده نیز اضافه گردید. در طول دوره رشد گیاهان در گلخانه در دمای 15-28 درجه سلسیوس، شدت روشنایی 10000 لوکس و 10-11 ساعت دوره روشنایی نگهداری شدند و روزانه با آب مقطر در حدود ظرفیت مزرعه با وزن کردن هر گلدان و افزودن آب مقطر آبیاری شدند. 100 روز پس از کاشت گیاهان از محل طوقه برداشت شدند و ریشه و اندام هوایی با آب مقطر شسته شدند و در آون با دمای 65 درجه سلسیوس تا رسیدن به وزن ثابت خشک شدند.

و به منظور بررسی میزان کلنیزاسیون ریشه نمونه‌هایی از ریشه تازه تهیه شد. و درصد کلنیزاسیون ریشه با روش تقاطع خطوط شبکه‌ای تعیین گردید (کورمانیک و مک‌گرو، 1982). غلظت آهن و روی در اندام هوایی به روش خاکستر خشک با اسید کلریدریک دو نرمال و با دستگاه جذب اتمی مدل (Shimadzu AA-670) اندازه‌گیری شد. مقداری از خاک مرطوب اطراف ریشه جداسازی شد و تنفس میکروبی[1] با استفاده از سیستم بسته[2] و تیتراسیون اندازه‌گیری شد (آیزرمایر، 1952). پس از هوا خشک شدن خاک گلدان‌ها و عبور از الک دو میلی‌متر عبور داده شد و هیدروکربن‌های کل باقی مانده در خاک با استفاده از حلال دی کلرو متان عصاره-گیری شد (هوتیچسون و همکاران، 2001) و پس از تبخیر حلال، کل هیدروکربن‌ها با روش توزین اندازه‌گیری شد.

داده‌ها با نرم افزای آماری SAS تجزیه و تحلیل و مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام گرفت.

نتایج و بحث

وزن خشک اندام‌های هوایی و ریشه

از نظر آماری نفت خام، ریزجانداران و اثر متقابل نفت خام/ ریزجانداران در سطح یک درصد بر وزن خشک گیاه تأثیر معنی‌دار دارند (جدول 2). آلودگی نفتی در سطح دو و چهار درصد وزنی باعث کاهش معنی‌دار میانگین وزن خشک اندام هوایی نسبت به میانگین شاهد شد (جدول 3). آلودگی 7/5 درصد نفت خام با گیاه چمن برمودا نیز باعث کاهش معنی‌دار 31 تا 33 درصدی زیست توده در سطوح مختلف تیمارهای عناصر غذایی شد (باسوماتاری و بردولوی، 2016). این کاهش عملکرد ممکن است بخاطر سمیت مواد نفتی باشد (چیما و همکاران، 2010). از بین ریزجانداران مایه زنی قارچ *فونلیفورمیس موسه* و باکتری *میکروکوکوس یوننانسیس* اثر معنی‌داری بر میانگین وزن خشک اندام هوایی دارد. در گیاه ذرت و کلزا نیز باکتری *میکروکوکوس یوننانسیس* به دلیل ترشح سیدروفورها باعث افزایش وزن خشک شد (قوامی و همکاران، 2017). در سطح چهار درصد وزنی نفت خام بیشترین میانگین وزن خشک اندام هوایی مربوط به گیاهان مایه زنی شده با قارچ *فونلیفورمیس موسه* است. در این سطح بجز قارچ *کلارودیوگلوموس اتونیکاتوم*، بقیه ریزجانداران باعث افزایش معنی دار وزن خشک اندام هوایی شدند که به دنبال آن ممکن است گیاه پالایی نیز افزایش یابد.

اثر نفت خام و ریزجانداران در سطح یک درصد بر وزن خشک ریشه معنی‌دار هستند (جدول 2). با افزایش سطح نفت خام، میانگین وزن خشک ریشه به طور معنی‌داری کاهش پیدا می‌کند (جدول 3). ریشه گیاهان به دلیل ارتباط مستقیم با خاک آلوده بیشترین تأثیر پذیری را دارند و به دنبال آلودگی نفتی برخی ترکیبات آن غشا را حل می‌کنند و در نتیجه عملکرد ریشه گیاه مختل می‌شود (پناکاسترو و همکاران، 2006). ریزجانداران باعث افزایش وزن خشک ریشه گیاه شده‌اند. مایه زنی قارچ *فونلیفورمیس موسه* در بین ریزجانداران سبب بیشترین عملکرد ریشه شده است. قارچ ریشه از طریق جذب عناصر غذایی از خاک و افزایش سطح جذب عناصر غذایی باعث رشد گیاهان می‌شود (فاینلی و همکاران، 2004) و به دنبال آن ممکن است گیاه پالایی را افزایش دهد.

1. Microbial respiration
2. Closed system

www.SID.ir

Archive of SID

جدول 2- نتایج تجزیه واریانس اثر نفت خام، ریزجانداران و اثر متقابل آنها بر وزن خشک اندام هوایی و ریشه، غلظت و جذب آهن و روی، درصد کلنیزاسیون ریشه و تنفس و کل هیدروکربن‌ها در خاک پس از برداشت

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات								
		وزن خشک اندام هوایی	وزن خشک ریشه	غلظت آهن اندام هوایی	جذب کل آهن اندام هوایی	غلظت روی اندام هوایی	جذب کل روی اندام هوایی	درصد کلنیزاسیون ریشه	تنفس میکروبی در خاک پس از برداشت	کل هیدروکربن‌ها در خاک پس از برداشت
نفت خام	2	45/3**	50/5**	8406**	47833**	124**	3851	1403**	46/9**	63/6**
ریزجانداران	4	7/52**	10/8**	543*	68891**	123**	17119**	2086**	11/4**	3/22**
نفت خام* ریزجانداران	8	4/76**	3/38	618**	81000**	13/8	2840	199**	6/41*	1/30*
خطا	30	1/36	2/05	167	12786	20/0	1712	27/0	2/65	0/527

** و * به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال 1 و 5 درصد

جدول 3- مقایسه میانگین اثر اصلی و اثر متقابل سطوح نفت خام و ریزجانداران بر وزن خشک اندام هوایی و ریشه گیاه وتیور

	تیمار نفتی (%)	شاهد	M	P	C	F	میانگین
وزن خشک اندام هوایی (گرم در گلدان)	0	7/19cd*	10/08ab	7/88b-d	10/80a	9/00a-c	8/99A
	2	7/49cd	8/42b-d	6/62d	6/43d	8/48b-d	7/49B
	4	3/76e	6/30d	6/37d	3/92e	7/27cd	5/52C
	میانگین	6/15B	8/27A	6/96B	7/05B	8/25A	
وزن خشک ریشه (گرم در گلدان)	0	7/51b-d*	11/11a	7/59b-d	10/72a	9/01ab	9/19A
	2	5/39de	7/27b-d	6/62b-e	6/43b-e	8/64a-c	6/87B
	4	3/83e	5/97c-e	6/03c-e	4/87de	7/11b-d	5/56C
	میانگین	5/58C	8/12AB	6/75BC	7/34AB	8/25A	

برای هر یک از پاسخ‌ها، اعدادی که دارای یک حرف مشترک کوچک (در ردیف یا ستون) یا حرف بزرگ (در ردیف یا ستون) هستند از لحاظ آماری با آزمون دانکن در سطح احتمال 5 درصد تفاوت معنی‌داری ندارند. O: نفت خام، M: باکتری میکروکوکوس یوننانسیس، P: باکتری سودوموناس فلورسنس، C: قارچ کلارودیوگلوموس اتونیکاتوم، F: قارچ فونلیفورمیس موسه.

www.SID.ir

Archive of SID

غلظت و جذب کل آهن و روی اندام هوایی

سطوح نفت خام و اثر متقابل نفت خام و ریزجانداران در سطح یک درصد و ریزجانداران در سطح پنج درصد بر غلظت آهن معنی‌دار هستند (جدول 2). با کاربرد دو و چهار درصد وزنی نفت خام به ترتیب 15 و 90 درصد میانگین کلی غلظت آهن اندام هوایی افزایش یافت (جدول 4). تمامی ریزجانداران باعث افزایش جذب کل آهن شدند و از این بین مایه زنی قارچ *کلارودیوگلوموس اتونیکاتوم* و *فونلیفورمیس موسه* افزایش معنی‌داری نسبت به میانگین کل شاهد دارند. بطور کلی قارچ ریشه از عناصر غذایی ریزوسفر خاک بهره برداری می‌کند و باعث افزایش آن در گیاه می‌شود (جونر و همکاران، 2006). در آلودگی چهار درصد وزنی نفت خام گیاه مایه زنی شده با باکتری سودوموناس فلورسنس بیشترین غلظت و جذب آهن را داشت. این باکتری بیوسورفکتانت‌های Cyclic Lipopeptide را ترشح می‌کند (دی‌سوزا و همکاران، 2003) که باعث افزایش دسترسی فلزات و در نتیجه افزایش جذب آن در گیاه می‌شود. همچنین تولید سیدروفور توسط باکتری‌های محرک رشد در ریزوسفر می‌تواند در افزایش غلظت و جذب آهن در گیاه مفید باشد (قوامی و همکاران، 2017).

طبق مشاهدات با افزایش آلودگی غلظت روی اندام هوایی نیز افزایش یافت. اثر اصلی ریزجانداران نشان می‌دهد اضافه کردن باکتری *سودوموناس فلورسنس* و قارچ *فونلیفورمیس موسه* باعث افزایش معنی دار میانگین غلظت روی اندام هوایی شده است (جدول 4). و در تیمار بدون نفت خام هم مایه زنی باکتری *سودوموناس فلورسنس* باعث افزایش 68 درصدی غلظت روی اندام هوایی شده است. نتایج نشان می‌دهد جذب روی در تمامی تیمارها بجز قارچ *کلارودیوگلوموس اتونیکاتوم* نسبت به میانگین شاهد افزایش معنی‌داری دارد. جذب فلزات در اندام هوایی و ریشه گیاهان وابسته به ریزجانداران ریزوسفری است که فعالیت‌هایشان باعث تغییر ویژگی‌های ریزوسفر و در نتیجه افزایش زیست فراهمی فلزات می‌شوند (لیوال و جونر، 2001). در شرایط آلودگی روی در گیاه ذرت نیز مایه زنی با گونه‌های قارچی در مقایسه با گیاهان مایه زنی نشده نقش مؤثرتری در افزایش مقدار روی اندام هوایی و ریشه داشت (زارعی و همکاران، 2011).

جدول 4- مقایسه میانگین اثر اصلی و اثر متقابل سطوح نفت خام و ریزجانداران بر غلظت و جذب کل آهن و روی در اندام هوایی گیاه وتیور

	تیمار نفتی (%)	شاهد	M	P	C	F	میانگین
	0	45/8d*	44/0d	41/8d	61/0cd	51/3d	48/8B
غلظت آهن اندام هوایی	2	54/1d	40/1d	39/8d	79/9bc	65/6cd	55/9B
(میکروگرم در گرم)	4	80/7bc	84/3bc	117/7a	83/6bc	98/2ab	92/9A
	میانگین	60/2BC	56/1C	66/4A-C	74/8A	71/7AB	
	0	326c-e	440b-e	319de	647ab	469b-e	440AB
جذب کل آهن اندام هوایی	2	406c-e	337c-e	266e	523a-d	558a-c	418B
(میکروگرم در گلدان)	4	304de	524a-d	749a	328c-e	720a	525A
	میانگین	345C	434BC	445BC	499AB	582A	
	0	14/2e	18/8c-e	18/7c-e	16/7de	23/9a-d	18/5B
غلظت روی اندام هوایی	2	17/5c-e	23/0a-d	23/8a-d	19/7c-e	25/9a-c	22/0A
(میلی‌گرم در کیلوگرم)	4	20/1c-e	20/4c-e	30/6a	20/8b-e	28/9ab	24/2A
	میانگین	17/3C	20/7BC	24/4AB	19/1C	26/2A	
	0	101cd*	190ab	148a-d	180a-c	217a	167A
جذب کل روی اندام هوایی	2	131b-d	192ab	155a-d	126b-d	219a	165A
(میکروگرم در گرم)	4	73d	129b-d	191ab	82d	216a	138A
	میانگین	102C	170B	165B	130BC	217A	

*برای هر یک از پاسخ‌ها اعدادی که دارای یک حرف مشترک کوچک (در ردیف یا ستون) یا حرف بزرگ (در ردیف یا ستون) هستند از لحاظ آماری با آزمون دانکن در سطح احتمال 5 درصد تفاوت معنی داری ندارند. O: نفت خام، M: باکتری میکروکوکوس یوننانسیس، P: باکتری سودوموناس فلورسنس، C: قارچ کلارودیوگلوموس اتونیکاتوم، F: قارچ فونلیفورمیس موسه.

www.SID.ir

Archive of SID

درصد کلنیزاسیون ریشه

اثراصلی نفت خام و ریزجانداران و اثر متقابل نفت خام و ریزجانداران در سطح یک درصد بر درصد کلنیزاسیون ریشه معنی‌دار بوده است (جدول 2). طبق نتایج مقایسه میانگین (جدول 5) با افزایش آلودگی میانگین کل درصد کلنیزاسیون ریشه به طور معنی‌داری کاهش یافت. برخی محققان کاهش کلنیزاسیون ریشه را راهکاری برای محدود کردن جذب اضافی آلودگی از طریق ریشه‌های قارچی گزارش کردند (هوسپیان و گریپسون، 2004). نتایج نشان می‌دهد مایه زنی باکتری‌ها اثر معنی‌داری روی درصد کلنیزاسیون ریشه نداشتند اما مایه زنی قارچ‌ها درصد کلنیزاسیون را به طور معنی‌داری افزایش داد. که با نتایج لو و لو (2015) برای گیاه علفی چمانو اش بلند مطابقت داشت. با افزایش کلنیزاسیون ریشه، سطح تماس آلودگی با ریشه زیاد می‌شود و احتمالاً موجب افزایش گیاه پالایی می‌شود. احتمالا باکتری‌های استفاده شده به تنهایی بر روی قارچ‌های بومی تأثیر معنی-داری نداشتند.

تنفس میکروبی در خاک پس از برداشت

طبق نتایج با افزایش سطوح نفت میانگین تنفس میکروبی افزایش یافته و میانگین آن در تیمار چهار درصد وزنی نفت خام افزایش معنی‌داری نسبت به میانگین تنفس میکروبی شاهد دارد. لابود و همکاران (2007) نیز گزارش کردند بر خلاف اینکه تصور می‌شود سمیت ترکیبات نفتی باعث کاهش فعالیت ریزجانداران می‌شود اما مشاهدات نشان داد با افزایش ترکیبات نفتی در خاک، تنفس میکروبی نیز زیاد می‌شود (جدول 5)، و از این ترکیبات نفتی به عنوان منبع کربن استفاده می‌کنند و باعث زیست پالایی ترکیبات نفتی می‌شوند.

جدول 5- مقایسه میانگین اثر اصلی و اثر متقابل سطوح نفت خام و ریزجانداران بر درصد کلنیزاسیون ریشه گیاه وتیور و تنفس میکروبی در خاک پس از برداشت

	تیمار نفتی (%)	شاهد	M	P	C	F	میانگین
کلنیزاسیون ریشه (درصد)	0	15/0d	15/3d	17/3d	66/3a	60/3a	34/9A
	2	14/3d	14/7d	14/3d	32/3c	47/3b	24/6B
	4	10/3d	13/7d	14/0d	28/0c	31/7c	19/3C
	میانگین	13/2B	14/6B	14/9B	42/2A	46/4A	
تنفس خاک پس از برداشت (میلی‌گرم دی اکسید کربن در50گرم خاک در 1 ساعت)	0	7/50f*	12/65a-c	10/80b-e	8/80d-f	8/52ef	9/65B
	2	9/04d-f	9/70c-f	9/96c-f	10/21c-f	12/47a-c	10/27B
	4	11/87a-d	14/91a	11/43b-e	12/63a-c	14/06ab	12/98A
	میانگین	9/47C	12/42A	10/73BC	10/55BC	11/68AB	

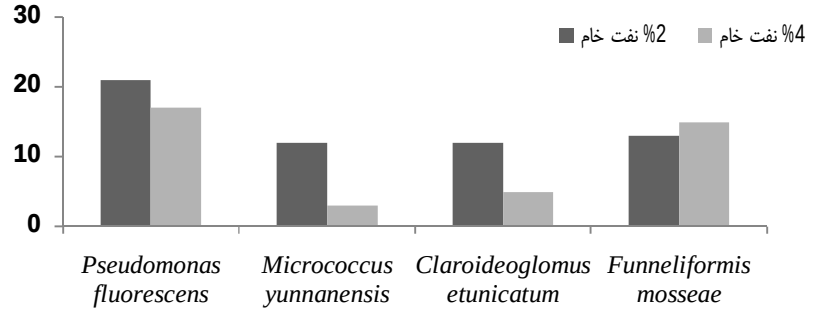
* برای هر یک از پاسخ‌ها اعدادی که دارای یک حرف مشترک کوچک (در ردیف یا ستون) یا حرف بزرگ (در ردیف یا ستون) هستند از لحاظ آماری با آزمون دانکن در سطح احتمال 5 درصد تفاوت معنی‌داری ندارند. O: نفت خام، M: باکتری میکروکوکوس یوننانسیس، P: باکتری سودوموناس فلورسنس، C: قارچ کلارودیوگلوموس اتونیکاتوم، F: قارچ فونلیفورمیس موسه.

میانگین تنفس میکروبی نشان می‌دهد با مایه زنی باکتری میکروکوکوس یوننانسیس و قارچ فونلیفورمیس موسه تنفس میکروبی افزایش می‌یابد. بیشترین میزان تنفس میکروبی مربوط به تیمار چهار درصد نفت خام با باکتری میکروکوکوس یوننانسیس است. تیمارهای قارچ ریشه و باکتری‌های محرک رشد باعث افزایش تنفس میکروبی در خاک شدند (رسولی صدقیانی و همکاران، 1390).

کل هیدروکربن‌های باقی مانده در خاک پس از برداشت از بین ریزجانداران مایه زنی شده باکتری *میکروکوکوس یوننانسیس* و قارچ *فونلیفورمیس موسه* باعث کاهش معنی‌دار میانگین آلودگی نفتی شد. در آلودگی چهار درصد وزنی نفت خام مایه زنی باکتری *میکروکوکوس یوننانسیس* و قارچ فونلیفورمیس موسه به ترتیب باعث کاهش معنی‌دار 15 و 17 درصدی مقدار کل هیدروکربن‌ها نسبت به شاهد شدند (نمودار1). اخیراً از قارچ ریشه برای گیاه پالایی آلودگی‌های آلی استفاده می‌شود (یو و همکاران، 2011)، زیرا ریزجانداران با تولید بیوسورفکتانت‌ها حلالیت آلاینده‌های آلی را افزایش می‌دهند (ویلومسن و آروین، 1999)، مایه زنی باکتری-های محرک رشد در گیاه علفی چمانواش بلند باعث افزایش زیست توده و حذف آلاینده‌های نفتی در تمامی تیمارها شدند (هو و همکاران، 2015).

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار 1- درصد حذف نفت خام نسبت به شاهد با کاربرد تیمارهای مختلف در دو سطح دارای تیمار نفتی

با توجه به جدول مقایسه میانگین، تنفس میکروبی در تیمارهای باکتری *میکروکوکوس یوننانسیس* و قارچ *فونلیفورمیس موسه* از میانگین تنفس میکروبی بقیه تیمارها بیشتر بود و مقدار کل هیدروکربن‌های این تیمارها از همه کمتر بود که نشان دهنده این است که احتمالاً این ریزجانداران از نفت به عنوان منبع کربن استفاده می‌کنند و اثر مثبتی بر زیست پالایی ترکیبات نفتی دارند.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که باکتری *میکروکوکوس یوننانسیس* و قارچ *فونلیفورمیس موسه* نسبت به بقیه تیمارها اثر بهتری بر افزایش وزن خشک اندام هوایی و ریشه داشته‌اند. استفاده از این دو ریزجاندار باعث تجزیه آلاینده‌های آلی و کاهش آلودگی نفتی در خاک‌ها و افزایش تنفس میکروبی شده است که احتمالاً به دلیل استفاده این ریزجانداران از ترکیبات نفتی به عنوان منبع کربن بوده است. همچنین اثر مثبت قارچ *فونلیفورمیس موسه* بر کاهش آلودگی نفتی را می‌توان به افزایش کلنیزاسیون ریشه و امکان تماس بیشتر از ریشه با خاک و آلاینده نسبت داد. بنابراین لازم است استفاده از چنین ریزجاندارانی در اصلاح و زیست پالایی خاک‌های آلوده به نفت مورد توجه واقع شود.

فهرست منابع:

1. رسولی صدقیانی، م. خداوردیلو، ح. برین، م. و کاظم علیلو، س. 1395. تأثیر باکتری‌های PGPR و قارچ‌های میکوریزا-آربسکولار بر رشد و برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک خارزن بابا در خاک آلوده به کادمیوم. مجله دانش آب و خاک. جلد 30، 542-554.
2. زارعی، 1387. بررسی تنوع قارچ‌های میکوریزی آربسکولار در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین و کارایی آن‌ها در گیاه پالایی. رساله دکتری خاکشناسی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران.
3. شهسوار، ع. طارق، م. زارعی، م. و اصل مشتاقی، ا. 1396. برهمکنش قارچ‌های میکورز آربسکولار و منابع آهن بر ویژگی-های رشد و جذب عناصر غذایی پایه مکزیکن لایم. نشریه دانش آب و خاک. جلد 27، 173-184.
4. Ahmad, F., Ahmad, I. and Khan, M. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiological Research 163: 173-181.
5. Al-Awadhi, H., Dashti, N., Kansour, M., Sorkhoh, N. and Radwan, S. 2012. Hydrocarbon-utilizing bacteria associated with biofouling materials from offshore waters of the Arabian Gulf. International Biodeterioration and Biodegradation 69: 10-16.

www.SID.ir

Archive of SID

6. Almansoory, A.F., Hasan, H.A., Idris, M., Abdullah, S.R.S. and Anuar, N. 2015. Potential application of a biosurfactant in phytoremediation technology for treatment of gasoline-contaminated soil. Ecological Engineering 84: 113-120.
7. Almaghrabi, O.A ,.Massoud, S.I. and Abdelmoneim, T.S. 2013. Influence of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on tomato plant growth and nematode reproduction under greenhouse conditions. Saudi Journal of Biological Sciences 20: 57-61.
8. Anokhina, T.O., Kochetkov, V.V., Zelenkova, N.F., Balakshina, V.V. and Boronin, A.M. 2004. Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* bacteria bearing rhizospheric plasmids in model plant–microbial associations. Applied Biochemistry and Microbiology 40: 568-572.
9. Bahraminia, M., Zarei, M., Ronaghi, A. and Ghasemi-Fasaei, R. 2016. Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of lead-contaminated soil by vetiver grass. International Journal of Phytoremediation 18: 730-737.
10. Basumatary, B. and Bordoloi, S. 2016. Phytoremediation of Crude Oil-Contaminated Soil Using *Cynodon dactylon (L.) Pers*. In Phytoremediation 4: 41-51.
11. Bouyoucos, G.J. 1962. Hydrometer method improved for making particle size analyses of soils. Agronomy Journal 54: 464-465.
12. Cheema, S.A., Khan ,M.I., Shen, C., Tang, X., Farooq, M., Chen, L., Zhang, C. and Chen, Y. 2010. Degradation of phenanthrene and pyrene in spiked soils by single and combined plants cultivation. Journal of Hazardous Materials 177: 384-389.
13. de Souza, J.T., de Boer, M., de Waard, P., van Beek, T.A. and Raaijmakers, J.M. 2003. Biochemical, genetic, and zoosporicidal properties of cyclic lipopeptide surfactants produced byPseudomonas fluorescens. Applied and Environmental Microbiology 69: 87161-7172.
14. Effendi, H., Munawaroh, A. and Ayu, I.P. 2017. Crude oil spilled water treatment with *Vetiveria zizanioides* in floating wetland. The Egyptian Journal of Aquatic Research 43: 185-193.
15. Finlay, R.D. 2004. Mycorrhizal fungi and the irmultifunctional roles. Mycologist 18: 91-96.
16. Gao, Y., Li, Q., Ling, W. and Zhu, X. 2011. Arbuscular mycorrhizal phytoremediation of soils contaminated with phenanthrene and pyrene. Journal of Hazardous Materials 185: 703-709.
17. Ghavami, N., Alikhani, H.A., Pourbabaei, A.A. and Besharati, H. 2017. Effects of two new siderophore-producing rhizobacteria on growth and iron content of maize and canola plants. Journal of Plant Nutrition 40: 736-746.
18. Hou, J., Liu, W., Wang, B., Wang, Q., Luo, Y. and Franks, A.E. 2015. PGPR enhanced phytoremediation of petroleum contaminated soil and rhizosphere microbial community response. Chemosphere 138: 592-598.
19. Hovsepyan, A. and Greipsson, S. 2004. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on phytoextraction by corn (*Zea mays*) of lead-contaminated soil. International Journal of Phytoremediation 6: 305-321.
20. Hutchinson, S.L., Schwab, A. and Banks, M. 2001. Phytoremediation of aged petroleum sludge: effect of irrigation techniques and scheduling. Journal of Environmental Quality 30: 1516.
21. Isermeyer, H. 1952. Eine einfache methode zur bestimmung der bodenatmung und der karbonate im boden. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 56: 26-38.
22. Joner, E.J., Leyval, C. and Colpaert, J.V. 2006. Ectomycorrhizas impede phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) both within and beyond the rhizosphere. Environmental Pollution 142: 34-38.

www.SID.ir

Archive of SID

23. Kormanik, P.P. and McGraw, A.A. 1982. Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizae in plant roots, In: Schenck NC. Methods and Principles of Mycorrhizal Research. American Phytopathological Society, St. Paul 37-45.
24. Khosravi, A., Zarei, M. and Ronaghi, A. 2018. Effect of PGPR, phosphate sources and vermicompost on growth and nutrients uptake by lettuce in a calcareous soil. Journal of Plant Nutrition 41: 80-89.
25. Khosravi, A., Zarei, M. and Ronaghi, A. 2017. Influence of biofertilizers and phosphate sources on the phosphorus uptake of lettuce and chemical forms of phosphorus in soil. Communications in Soil Science and Plant Analysis 48: 2701-2714.
26. Labud, V., Garcia, C. and Hernandez, T. 2007. Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. Chemosphere 66: 1863-1871.
27. Leyval, C. and Joner, E.J. 2001. Bioavailability of heavy metals in the mycorrhizosphere. Trace Elements in The Rhizosphere 165-185.
28. Lindsay, W.L. and Norvell, W.A. 1978. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese, and copper. Soil Science Society of America Journal 42: 421-428.
29. Liu, J.L., Xie, B.M., Shi, X.H., Ma, J.M. and Guo, C.H. 2015. Effects of two plant growth-promoting rhizobacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase on oat growth in petroleum-contaminated soil. International Journal of Environmental Science and Technology 12: 3887-3894.
30. Lu, Y.F. and Lu, M. 2015. Remediation of PAH-contaminated soil by thecombination of tall fescue, arbuscular mycorrhizal fungus and epigeic earthworms. Journal of Hazardous Materials 285: 535-541.
31. Nelson, R. E. and Sommers, L. E. 1982. Total carbon, Organic carbon and organic matter. In A. L. Page et al. (ed) Methods of Soil Analysis. Part2. 2nd. Agron. Monogr. 9. ASA and SSSA, Madison, WI. 539-579.
32. Olsen, S.R. and Sommers, L.E. 1982. Phosphorus. p. 403–427. In: Page, A.L. (ed.) Methods of soil analysis. Part 2. 2nd ed. Agron. Monogr. No. 9. ASA and SSSA, Madison, WI.
33. Peña-Castro, J.M., Barrera-Figueroa, B.E., Fernández-Linares, L., Ruiz-Medrano, R. and Xoconostle-Cázares, B. 2006. Isolation and identification of up-regulated genes in bermudagrass roots (*Cynodon dactylon L.*) grown under petroleum hydrocarbon stress. Plant Science 170: 724-731.
34. Rhoades, J. 1996. Salinity: Electrical conductivity and total dissolved solids. Methods of Soil Analysis Part 3—Chemical Methods 417-435.
35. Shahsavar, A.R., Refahi, A., Zarei, M. and Aslmoshtaghi, E. 2016. Analysis of the effects of *Glomus etunicatum* fungi and *Pseudomonas fluorescence* bacteria symbiosis on some morphological and physiological characteristics of Mexican lime (Citrus aurantifolia L.) under drought stress conditions. Advances in Horticultural Science 30: 39-45.
36. Turnau, K., Jurkiewicz, A., Lingua, G., Barea, J. and Gianinazzi-Pearson, V. 2005. Role of arbuscular mycorrhiza and associated microorganisms in phytoremediation of heavy metal-polluted sites. Trace elements in the environment. Biogeochemistry, biotechnology, and bioremediation. CRC Taylor & Francis, Boca Raton, London, New York 235-252.
37. Willumsen, P.A. and Arvin, E. 1999. Kinetics of degradation of surfactant-solubilized fluoranthene by a *Sphingomonas paucimobilis*. Environmental Science and Technology 33: 2571-2578.
38. Yateem, A. 2013. Rhizoremediation of oil-contaminated sites: a perspective on the Gulf War environmental catastrophe on the State of Kuwait. Environmental Science and Pollution Research 20: 100-107.

www.SID.ir

Archive of SID

39. Yu, X., Wu, S., Wu, F. and Wong, M. 2011. Enhanced dissipation of PAHs from soil using mycorrhizal ryegrass and PAH-degrading bacteria. Journal of Hazardous Materials 186: 1206-1217.
40. Zarei, M., Saleh-Rastin, N., Salehi-Jozani, G.,Savaghebi, G. and Francois, B. 2008. Arbuscular mycorrhizal abundance in contaminated soils around a zinc and lead deposit. Europen Journal of Soil Biology 4: 381-391.
41. Zarei, M., Saleh-Rastin, N. and Savaghebi, G. 2011. Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of zinc polluted soils using maize (*zea mays l.*). JWSS-Isfahan University of Technology 15: 151-168.

www.SID.ir

Archive of SID

Applications of Microorganisms in Bioremediation of a Crude Oil Contaminated Calcareous Soil

S. Keshavarz, R. Ghasemi-Fasaei[1], A. M. Ronaghi, and M. Zarei
PhD Student, Department of Soil Science, College of Agriculture, Shiraz University, Iran;
E-mail: samirakeshavarz71@yahoo.com
Associate Professor, Department of Soil Science, College of Agriculture, Shiraz University, Iran;
E-mail: ghasemif@gmail.com
Professor, Department of Soil Science, College of Agriculture, Shiraz University, Iran;
E-mail: amronaghi@yahoo.com
Associate Professor, Department of Soil Science, College of Agriculture, Shiraz University, Iran;
E-mail: mehdizarei20@yahoo.ca
Received: May, 2018 & Accepted: October, 2018

Abstract

A greenhouse experiment was conducted in a completely randomized design with factorial arrangement to investigate the influence of biological treatments (*Pseudomonas fluorescens, Micrococcus yunnanensis, Claroideoglomus etunicatum* and *Funneliformis mosseae*) on Vetiver grass grown on a crude oil contaminated calcareous soil (0, 2 and 4% crude oil). Results showed that the shoot and root dry weight and root colonization decreased in crude oil treatments. While the microbial respiration and total hydrocarbon concentration in post-harvest soil increased significantly. Soil inoculation with *Micrococcus yunnanensis* and *Funneliformis mosseae* had a positive effect on shoot dry weight but not for *Pseudomonas fluorescens* treatment. Iron concentration and iron and zinc concentrations enhanced significantly in *Claroideoglomus etunicatum* and *Funneliformis mosseae* treatments respectively. Root colonization also increased when mycorrhiza inoculation applied to soil samples. *Micrococcus yunnanensis* and *Funneliformis mosseae* increased microbial soil respiration and total hydrocarbon content reduced in post-harvest soil. Our result showed that among tested microorganisms, *Micrococcus yunnanensis* and *Funneliformis mosseae* had more positive effects on bioremediation and plant growth in crude oil contaminated calcareous soil.

Keywords: Arbuscular mycorrhiza, Plant growth promoting rhizobacteria, Oil pollution, Vetiver

[1] Corresponding author: Soil Science Department, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz.

www.SID.ir