زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال ششم، شماره بیست و یکم، پاییز ۱۳۹۳، صفحه ۷۱-۸۴
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۰۸/۱۲
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۲/۱۱/۰۵
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۲/۱۲/۱۳
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۳/۰۲/۲۸

بررسی اثر آلودگی نفتی و باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت‌خام بر برخی شاخص‌های بیوشیمیایی و رشد گیاه ذرت

مهرداد کاووسی بافتی، زهرا اسرار، مهدی حسن‌شاهیان * و بتول کرامت
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

چکیده

استفاده از سیستم گیاه و باکتری برای احیای زیستی خاک های آلوده به نفت یکی از دستاوردهای بیوتکنولوژی در دهه اخیر بوده و مشخص شده است که آلودگی نفتی باعث ایجاد تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌شود. در پژوهش حاضر، به منظور بررسی اثر آلودگی نفتی بر روی گیاه ذرت (*Zea mays*) و احیای زیستی با همکاری باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت و گیاه، چهار تیمار آزمایشگاهی تحت شرایط گوناگون طراحی شد. عوامل متعدد فیزیولوژیکی و میکروبی جهت مشخص شدن این آثار سنجش شد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که با حضور یک درصد نفت‌خام سبک در خاک گلدان‌های گیاه ذرت، میزان وزن خشک اندام هوایی کاهش و ترکیبات فنلی افزایش یافت. در حضور یک درصد نفت‌خام و باکتری *Pseudomonas aeruginosa* وزن خشک اندام هوایی، کلروفیل a و کلروفیل کل کاهش یافت و آنتوسیانین، ترکیبات فنلی، مالون‌دی‌آلدهید و فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش یافت. یک درصد نفت‌خام به همراه باکتری *Acinetobacter calcoaceticus* تغییر معنی‌داری در شاخص‌های رشد و میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی نداشت و باعث افزایش آنتوسیانین، ترکیبات فنلی، مالون‌دی‌آلدهید و فعالیت آنزیم کاتالاز گردید. در حضور هر دو باکتری و نفت‌خام میزان وزن خشک اندام هوایی و کلروفیل a کاهش و میزان آنتوسیانین و مالون‌دی‌آلدهید افزایش یافت. در شاخص‌های میکروبی افزودن نفت‌خام به خاک حاوی باکتری‌های تجزیه‌کننده باعث افزایش تعداد باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت و باکتری‌های هتروتروف خاک و حذف نفت گردید. با به کارگیری سیستم‌های گیاه و باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت در مقیاس میدانی می‌توان پساب صنعتی بسیاری از پالایشگاه‌های نفت و کارخانجات شیمیایی به طرز صحیحی پاکسازی نمود.

واژه‌های کلیدی: آسینتوباکتر، آلودگی نفتی، تنش اکسیداتیو، سودوموناس، زیست پالایی، ذرت

مقدمه

مصرف گسترده مشتقات نفتی باعث گسترش آلودگی به همه بخش‌های زیست محیطی گردیده است. این آلودگی‌ها اختلالات وسیعی در ساختارهای زیستی و

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: mshahi@uk.ac.ir، شماره تماس: ۰۳۴۳۳۲۲۲۰۶۷

غیر زیستی به وجود آورده است (Chaillana *et al*., 2004). نفت‌خامی که از میدان‌های نفتی مختلف استخراج می‌گردد، دارای ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی متفاوتی است. هیدروکربن‌ها جزء اصلی ترکیبات نفت خام را تشکیل می‌دهند و مولکول‌های آنها فقط شامل کربن و هیدروژن است. ریشه گیاه طیف گسترده‌ای از مولکول‌های آلی هیدروفیل و لیپوفیل (ترکیبات آلیفاتیک،آروماتیک، الکل‌ها، فنول‌ها و آمین‌ها) را جذب می‌کند. همچنین، توانایی جذب ترکیباتی با حلالیت بسیار پایین مانند هیدروکربن ها حلقوی را دارد (Kvesitadze *et al*., 2006). البته میزان آب گریز بودن ترکیبات در مراحل جذب توسط ریشه یک عامل مؤثر در جذب آنها است. گونه‌های مختلفی از گیاهان از توانایی تجمع و تحمل ترکیبات آروماتیک حلقوی (PAHs, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) برخوردار هستند. گزارش شده است که گیاهانی مانند تاج خروس، چاودار، گندم، جوی دو سر، ذرت، آفتابگردان، لوبیای سویا، نخود و هویج آلاینده‌های نفتی و PAHs را از محیط خودجذب می‌نمایند (Wang *et al*., 1998؛ Pradhan *et al*., 2003). از میان ترکیبات مختلف موجود در نفت‌خام، هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (PAHs) توسط آژانس حفاظت محیط زیست ایالات متحده آمریکا (EPA, U.S. Environmental Protection Agency) به عنوان سمّی‌ترین ترکیبات شناخته شده‌اند؛ به هر صورت این ترکیبات برای جانوران سرطان‌زا یا جهش‌زا هستند و برای گیاهان نیز سمّی هستند (Hodgeson, 1990). ترکیبات PAHs از عوامل تنش غیرزیستی در گیاه شناخته شده‌اند.از سوی دیگر، افزایش تولید H_2O_2 در هنگامی که گیاه در معرض این نوع آلاینده قرار می‌گیرد مشاهده گردیده است، اما به درستی مشخص نیست که منشأ پراکسید هیدروژن حاصل از NADPH اکسیداز است یا طی اکسیداسیون PAHs تولید می‌گردد (Alkio *et al*., 2005). در گیاه *Cyperus rotundus* گزارش شده است که فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) تحت تأثیر آلودگی نفتی افزایش یافته است، علت این افزایش در فعالیت این آنزیم نقش آن در حذف گونه‌های فعال اکسیژن بیان شده است. این پاسخ به ترکیبات سمّی آلی جذب شده توسط گیاه تولید گردیده است. همچنین، در یونجه نیز آلودگی نفت خام به عنوان عاملی تنش‌زا باعث بروز مکانیسم‌های ضد تنش در گیاه شده است (Wang *et al*., 2010). در گیاهانی که تحت تأثیر هیدروکربن‌های آروماتیک قرار گرفته‌اند، یافته‌ها از این فرضیه حمایت می‌کنند که گیاهانِ تحت تأثیر تنش دچار پراکسیداسیون لیپیدها هستند (Liu *et al*., 2009). اندازه‌گیری محصولات نهایی پراکسیداسیون لیپیدها یکی از راه‌های تشخیص تنش اکسیداتیو است. در نتیجه پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع، مالون‌دی‌آلدهید (MDA) و سایر آلدهیدهای غیر اشباع تولید می شود که این ترکیبات ثانویه آلدهیدی حاصل از پراکسیداسیون لیپیدها به طور معمول به عنوان شاخص تنش اکسیداتیو محسوب می‌شوند. افزایش MDA که محصول پراکسیداسیون لیپیدها است بیانگر این مطلب است که از صدمات ROS به طور کامل جلوگیری نگردیده است (Liu *et al*., 2009). در کلروپلاست‌ها، کارتنوئیدها به عنوان رنگیزه کمکی عمل می‌کنند اما نقش مهم‌تر آنها نقش آنتی‌اکسیدانی آنها است (Egert and Tevini, 2002).

ترکیبات فنلی در شرایط طبیعی در سلول سنتز می‌گردند اما تنش‌های محیطی یا زنده مقدار آنها را در سلول تغییر می‌دهد (Wen *et al*., 2008). گیاهان دارای سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی هستند که قادر به سمّ‌زدایی و جاروب کردن گونه‌های فعال اکسیژن است و با کمک این سیستم‌های آنتی‌اکسیدان قادر به کاهش آثار تنش اکسیداتیو هستند (Jithesh *et al*., 2006).

امروزه استفاده از سیستم‌های احیای زیستی گیاه و باکتری جهت پاکسازی خاک های آلوده به نفت بسیار مورد توجه است. زیرا ترکیب این دو روش موجب حذف سریع‌تر خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌ها می‌شود. برای نمونه، Chaudhry و همکاران (۲۰۰۵) از تعامل بین باکتری‌های ریزوسفر و گیاه جهت افزایش شکست آلاینده‌های آلی در خاک استفاده کردند. آنها به این نتیجه رسیدند که تیمار همزمان خاک با تعامل گیاه و باکتری به افزایش تجزیه زیستی آلاینده ها در خاک آلوده منجر می‌شود (Chaudhry *et al*., 2005).

هدف از پژوهش حاضر، بررسی آثار نفت‌خام بر شاخص‌های بیوشیمیایی و رشد گیاهان و همچنین درک اثر متقابل نفت‌خام و باکتری تجزیه‌کننده بر شاخص‌های بیوشیمیایی گیاهان و در نهایت، تعیین اثر همکاری بین گیاه و باکتری در حذف نفت و شناخت بهتر سازوکار احیای زیستی با عملکرد همزمان گیاه و باکتری است. در واقع، پرسش اساسی تحقیق حاضر این است که آیا می‌توان از سیستم گیاه و باکتری برای احیای زیستی خاک‌های آلوده به آلاینده‌های نفتی استفاده کرد؟

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در گروه زیست‌شناسی دانشگاه شهید باهنر کرمان انجام شده است. ابتدا بذرهای گیاه ذرت رقم سینگل کراس ۷۰۴ از مرکز تحقیقات کشاورزی کرمان تهیه شد و به مدت ۱۵ دقیقه با محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد ضدعفونی شد و پس از چند بار شستشو با آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت در آب مقطر خیسانده شد. برای جوانه‌زنی این بذرها به پتری‌دیش‌های حاوی کاغذ صافی مرطوب انتقال یافت. گلدان های حاوی خاک به پنج گروه تقسیم گردید: در گروه اول خاک بدون آلودگی نفتی و بدون افزودن باکتری در سه تکرار آماده گردید، که در هر گلدان چهار دانه‌رُست ذرت ۵ روزه کشت گردید؛ در گروه دوم به میزان ۱ درصد وزنی نفت خام سبک (تهیه شده از پالایشگاه نفت بندرعباس) به یک کیلوگرم خاک اضافه گردید و دانه‌رُست‌ها در آنها کشت گردید؛ در گروه سوم علاوه بر افزودن ۱ درصد نفت خام سبک به خاک بافر حاوی باکتری کشت داده شده *Pseudomonas aeruginosa* AS به خاک افزوده شد؛ در گروه چهارم ۱ درصد نفت‌خام سبک و باکتری *Acinetobacter calcoaceticus* BS به خاک اضافه شد و در گروه پنجم علاوه بر ۱ درصد نفت‌خام هر دو باکتری AS و BS به خاک اضافه گردید. برای هر تیمار سه گلدان به عنوان سه تکرار در نظر گرفته شد. در هر گلدان ۴ گیاه به عنوان ۴ نمونه قرار گرفت. همه تیمارها در شرایط فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شده، به مدت ۲۸ روز در این شرایط رشد کردند. پس از گذشت دوره زمانی ۲۸ روزه شاخص‌های رشد، بیوشیمیایی، آنزیمی و میکروبی جهت بررسی اثر هر یک از تیمارها روی گیاه ذرت سنجش شدند.

باکتری‌های استفاده شده: در پژوهش حاضر، دو باکتری استاندارد با نام‌های *Pseudomonas aeruginosa* AS و *Acinetobacter calcoaceticus* BS استفاده شد. این باکتری‌ها در پژوهش‌های پیشین جداسازی و شناسایی شده بودند و همچنین در بانک ژنی NCBI با شماره دستیابی FM881902 و FM957532 به ثبت رسیده‌اند. نام‌های AS و BS را محقق برای این باکتری‌ها انتخاب کرده است (Hassanshahian *et al*., 2012). این باکتری‌ها قبل از افزودن به خاک در محیط نوترینت براث کشت داده شدند تا کدورت نوری آنها در ۶۰۰ نانومتر به ۰/۵ برسد که این کدورت نوری معادل 10^8 باکتری در هر گرم خاک است. سپس، باکتری های رشد یافته با سانتریفیوژ در دور g ۵۰۰۰ به مدت ده دقیقه رسوب داده شدند و در بافر فسفات حل گردیدند، سپس به خاک گلدان‌ها در آزمایش های مختلف اضافه شدند. با توجه به این که هدف از تحقیق حاضر استفاده عملی از باکتری‌های نام‌برده است، شرح ویژگی‌های کامل این باکتری‌ها به تحقیق Hassanshahian و همکاران (۲۰۱۲) ارجاع داده می‌شود.

اندازه‌گیری شاخص‌های رشد: برای اندازه‌گیری وزن خشک اندام‌های هوایی و ریشه، نمونه‌ها در فویل آلومینیومی پیچیده و به مدت ۷۲ ساعت درآون در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد خشک شد. سپس، وزن خشک نمونه‌ها با ترازوی Sartorius (BPSIID) با دقت ۰/۰۰۱ گرم اندازه‌گیری و بر حسب میلی‌گرم گزارش شد.

رنگیزه‌های فتوسنتزی: اندازه‌گیری مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی شامل کلروفیل‌های a و b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها با روش Lichtenthaler (۱۹۸۷) انجام شد. ۰/۲ گرم از برگ های فریز شده انتهای گیاه با ۱۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد ساییده شد و پس از صاف کردن جذب نور آنها با اسپکتروفتومتردر طول موج‌های ۶۴۶/۸، ۶۶۳/۲۰ و ۴۷۰ نانومتر خوانده شد و غلظت رنگیزه‌ها بر حسب میکروگرم بر گرم وزن‌تر محاسبه گردید.

کلروفیل a: $chla = 12.25\ A_{663.2} - 2.79\ A_{646.8}$

کلروفیل b: $chlb = 21.21\ A_{646.8} - 5.1\ A_{663.2}$

کلروفیل کل: $chlT = chla + chlb$

کاروتنوئید: $car = (1000A_{470} - 1.8\ chla - 85.02\ chlb)/198$

سنجش مقدار آنتوسیانین، ترکیبات فنلی کل و مالون‌دی‌آلدهید: از روش Wagner (۱۹۷۹) برای اندازه‌گیری مقدار آنتوسیانین‌های اندام هوایی استفاده شد. محتوای ترکیبات فنلی کل با روش Soland و Laima (۱۹۹۹) انجام گرفت. اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدهید با روش Heath و Packer (۱۹۶۹) انجام شد.

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) (EC 1.11.1.6): سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از محاسبه کاهش جذب H_2O_2 (کاهش مقدار H_2O_2) در طول موج ۲۴۰ نانومتر و با روش Dhindsa و Motowe (۱۹۸۱) انجام شد. برای استخراج عصاره آنزیمی یک گرم بافت تر در یک هاون چینی حاوی سه میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۷/۲ که شامل اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) ۱ میلی‌مولار، فنیل متان سولفونیل فلوراید (PMSF) ۱ میلی‌مولار و پلی وینیل پیرولیدون

(PVP) ۱ درصد بود، ساییده شد. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال دار در ۱۴۰۰۰g و دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار گرفت. از محلول رویی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم استفاده گردید (این محلول در اپندورف و در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید). مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۷ و پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی مولار بود. با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به مخلوط ذکر شده، واکنش شروع می شود. شاهد برای صفر کردن دستگاه اسپکتروفتومتر شامل مخلوط واکنش اما فاقد عصاره آنزیمی بود. تغییرات جذب (یعنی تفاضل جذب در زمان شروع واکنش از جذب در زمان یک دقیقه)، پس از شروع واکنش محاسبه گردید. مقدار H_2O_2 موجود در مخلوط واکنش پس از یک دقیقه با استفاده از ضریب خاموشی (ε=۰/۲۸ $mM^{-1}cm^{-1}$) و رابطه ۱ محاسبه شد که نشان دهنده میزان فعالیت آنزیم کاتالاز است.

رابطه ۱ $A=\varepsilon bc$

A: جذب خوانده شده، ε: ضریب خاموشی، c: غلظت H_2O_2 و b: طول کوت (۱ سانتی‌متر) است.

فعالیت آنزیم به صورت واحد آنزیمی بر حسب مقدار پروتئین کل (میلی‌گرم) موجود در ۱۰۰ میکرولیتر عصاره (به دست آمده از روش Bradford (۱۹۷۶)) در یک دقیقه محاسبه گردید. یک واحد آنزیمی کاتالاز مقدار آنزیمی است که ۱ میلی مول H_2O_2 را در یک دقیقه تجزیه می‌کند.

شمارش تعداد باکتری‌های تجزیه‌کننده و هتروتروف: تعداد باکتری‌های هتروتروف در خاک با روش رقت‌سازی و کشت در محیط نوترینت آگار تعیین گردید. تعداد کل باکتری‌های تجزیه‌کننده نیز با روش رقت‌سازی و کشت در محیط Bushnell Hass Mineral Salt حاوی یک درصد نفت‌خام به عنوان منبع کربن تعیین گردید (Rahman *et al*., 2004).

سنجش حذف نفت‌خام توسط باکتری‌های جدا شده با روش اسپکتروفتومتری: میزان حذف نفت خام با حل کردن مقدار نفت باقیمانده محیط در خاک توسط دی کلرومتان و سپس خواندن کدورت نفت استخراج شده در مقابل شاهد در طول موج ۴۲۰ نانومتر تعیین گردید و از رابطه ۲ برای محاسبه درصد حذف نفت‌خام استفاده شد (Rahman *et al*., 2004).

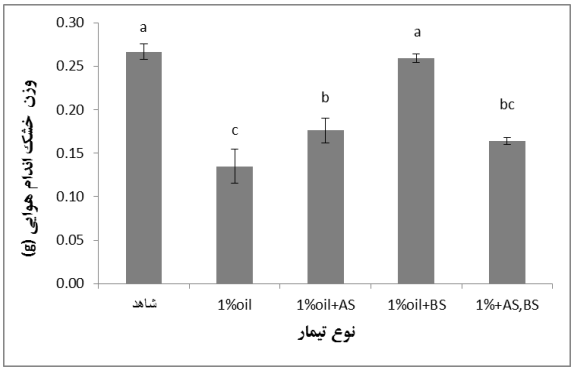
رابطه ۲ درصد حذف نفت‌خام= (میزان جذب نمونه- میزان جذب شاهد)/ میزان جذب شاهد

تحلیل آماری: تحلیل‌های آماری در این مطالعه با آزمایش فاکتوریل و با سه تکرار صورت گرفت و داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۵ تحت آنالیز واریانس دو طرفه قرار گرفت و اختلاف میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد مقایسه شدند.

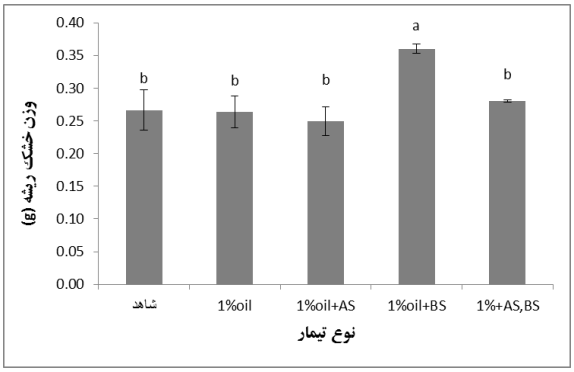
نتایج

وزن خشک اندام هوایی گیاه در تیمار نفت خام و بدون حضور باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت کاهش یافت و در تیمار نفت همراه باکتری AS و در تیمار نفت همراه با دو باکتری کاهش وزن معنی‌داری مشاهده گردید (شکل ۱). وزن خشک ریشه گیاه در تیمار نفت و باکتری BS افزایش داشت (شکل ۲).

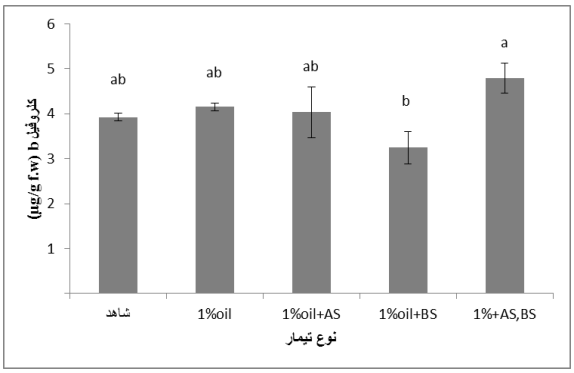
میزان کلروفیل a در تیمار نفت و باکتری AS و تیمار نفت و باکتری‌های AS و BS به طور معنی‌داری کاهش نشان داد و در تیمارهای دیگر کاهش معنی‌داری مشاهده نگردید (شکل ۳). مقدار کلروفیل b نسبت به شاهد در تیمار نفت و باکتری BS به طور معنی‌داری کاهش نشان داد. در سایر تیمارها کاهش معنی‌داری مشاهده نگردید (شکل ۴). میزان کل کلروفیل نسبت به شاهد در تیمار نفت و باکتری BS و در تیمار نفت و باکتری AS کاهش معنی‌داری مشاهده گردید (شکل ۵). در میزان کاروتنوئیدها تغییر معنی‌داری مشاهده نگردید (شکل ۶). میزان ترکیبات فنلی نسبت به تیمار شاهد در تیمار نفت و بدون حضور باکتری‌های تجزیه کننده نفت افزایشی به میزان ۲۳ درصد مشاهده گردید. تیمار نفت و باکتری AS به میزان ۴۴ درصد افزایش نشان داد. همچنین، در تیمار نفت و باکتری BS افزایش معنی‌دار بود (شکل ۷). مقدار آنتوسیانین نسبت به تیمار شاهد در تیمار نفت و بدون حضور باکتری‌های تجزیه کننده نفت ۶ درصد افزایش داشت که کاهش معنی داری نبود. در تیمار نفت و باکتری AS با ۱۲۳ درصد همراه بود، همچنین مقدار آنتوسیانین در تیمار نفت خام و باکتری BS در حدود ۱۱۶ درصد افزایش داشت. از سوی دیگر، در تیمار نفت و باکتری‌های AS و BS افزایش ۱۰۶ درصدی مشاهده گردید (شکل ۸). میزان مالون‌دی‌آلدهید نسبت به شاهد در تیمار نفت و بدون باکتری ۲۵۸ درصد افزایش داشت و در تیمار نفت و باکتری AS همچنین در تیمار نفت و باکتری BS ۴۷۲ درصد افزایش و در تیمار نفت و هر دو باکتری ۲۷۹ درصد افزایش دیده شد (شکل ۹). میزان فعالیت کاتالاز در تیمارشاهد بسیار ناچیز بود و در سایر تیمارها که باکتری‌های تجزیه‌کننده فعالیت داشتند نسبت به تیمار نفت و بدون حضور باکتری‌های افزایش مشاهده گردید. در تیمار نفت و باکتری AS به میزان ۲۳۴ درصد مشاهده شد. همچنین، در تیمار نفت و باکتری BS در حدود ۱۹۲ درصد افزایش داشت. از سوی دیگر، در تیمار نفت و هر دو باکتری AS و BSافزایش ۱۵ درصدی مشاهده گردید (شکل ۱۰). از آغاز تلقیح نفت (زمان صفر) تا روز هفتم کاهش محسوسی در تعداد کل هتروتروف ها مشاهده شد، به طوری که در تیمار باکتری AS تعداد از 1.35E+5 به 1.00E+5 کاهش یافت و پس از روز هفتم در تمامی تیمارها تعداد کل هتروتروف ها افزایش یافت (شکل ۱۱). تعداد باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت در تیمارهای دارای باکتری‌های AS و BS افزایش داشته است. اما در تیمار شاهد که تنها حاوی خاک آلوده به نفت بوده است افزایش قابل توجهی مشاهده نشد. تعداد باکتری‌ها در تیمار باکتری BS بیش از سایر گلدان‌ها بود به طوری که در انتهای زمان آزمایش (روز ۲۸ام) به 9.10E+5 رسید (شکل ۱۲). در تیمار بدون باکتری‌های تجزیه‌کننده پس از ۲۸ روز باعث تجزیه ۲۵ درصدی نفت‌خام در خاک گردید و تیمار دارای باکتری AS اثر قابل توجهی بر تجزیه نفت خام داشت که به میزان ۸۷ درصد بود. همچنین تیمار دارای باکتری BS باعث تجزیه ۸۵ درصدی نفت‌خام گردید از سوی دیگر همکاری این دو باکتری در تیمار حاوی باکتری های AS و BS نفت را به میزان ۴۱ درصد تجزیه نمود (شکل ۱۳).



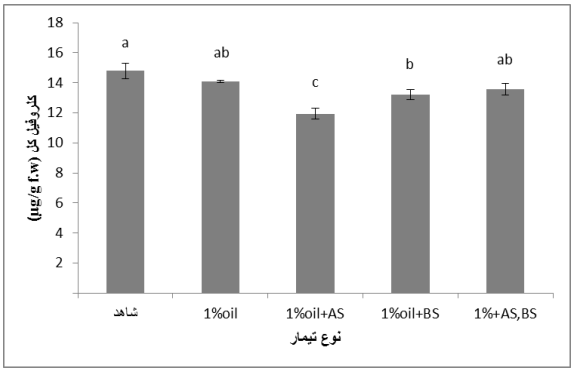
شکل ۱- تأثیر آلودگی نفت‌خام سبک با غلظت ۱ درصد و باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت‌خام شامل باکتری‌های AS و BS به مدت ۲۸ روز بر وزن خشک اندام‌های هوایی *Zea mays* رقم ۷۰۴. مقادیر میانگین سه تکرار ± SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن (P≤۰/۰۵) است.



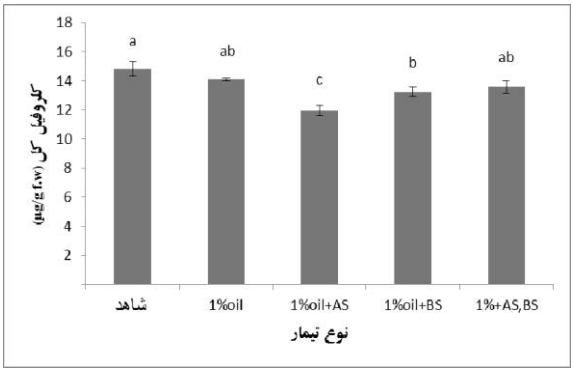
شکل ۲- تأثیر آلودگی نفت‌خام سبک با غلظت ۱ درصد و باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت‌خام شامل باکتری‌های AS و BS به مدت ۲۸ روز بر وزن خشک ریشه *Zea mays* رقم ۷۰۴. مقادیر میانگین سه تکرار ± SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن (P≤۰/۰۵) است.



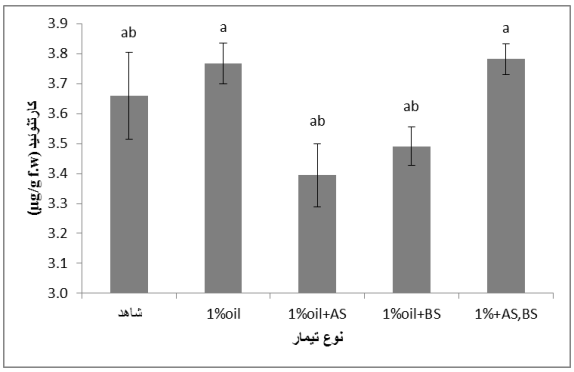
شکل ۳- تأثیر آلودگی نفت‌خام سبک با غلظت ۱ درصد و باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت‌خام شامل باکتری‌های AS و BS به مدت ۲۸ روز بر میزان کلروفیل a *Zea mays* رقم ۷۰۴. مقادیر میانگین سه تکرار ± SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن (P≤۰/۰۵) است.



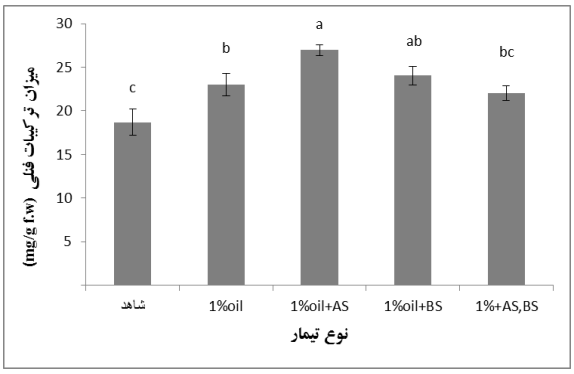
شکل ۴ - تأثیر آلودگی نفت‌خام سبک با غلظت ۱ درصد و باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت‌خام شامل باکتری‌های AS و BS به مدت ۲۸ روز بر میزان کلروفیل b *Zea mays* رقم ۷۰۴. مقادیر میانگین سه تکرار ± SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن (P≤۰/۰۵) است.



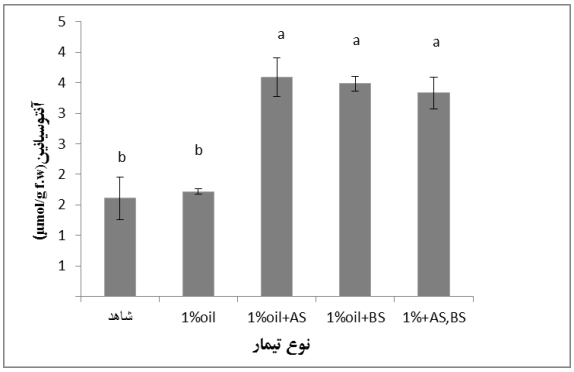
شکل ۵- تأثیر آلودگی نفت‌خام سبک با غلظت ۱ درصد و باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت‌خام شامل باکتری‌های AS و BS به مدت ۲۸ روز بر میزان کلروفیل کل *Zea mays* رقم ۷۰۴. مقادیر میانگین سه تکرار ± SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن (P≤۰/۰۵) است.



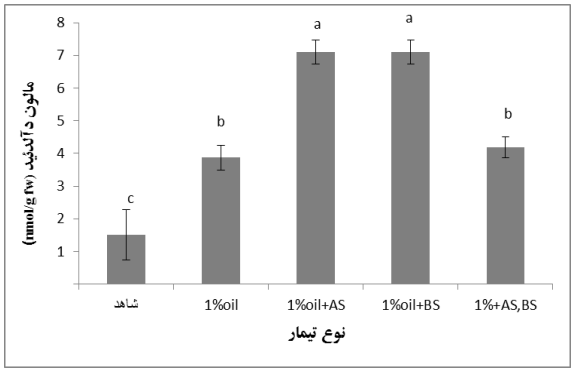
شکل ۶- تأثیر آلودگی نفت‌خام سبک با غلظت ۱ درصد و باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت‌خام شامل باکتری‌های AS و BS به مدت ۲۸ روز بر میزان کاروتنوئید *Zea mays* رقم ۷۰۴. مقادیر میانگین سه تکرار ± SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن (P≤۰/۰۵) است.



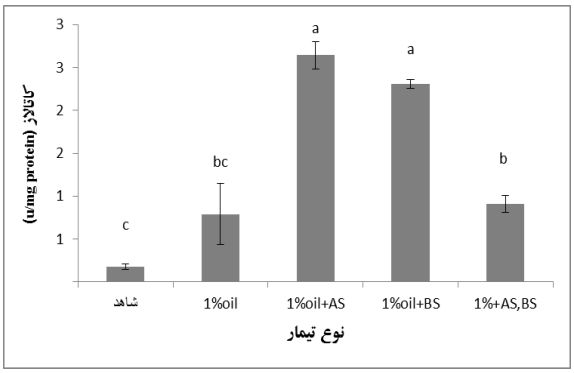
شکل ۷- تأثیر آلودگی نفت‌خام سبک با غلظت ۱ درصد و باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت‌خام شامل باکتری‌های AS و BS به مدت ۲۸ روز بر میزان ترکیبات فنلی *Zea mays* رقم ۷۰۴. مقادیر میانگین سه تکرار ± SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن (P≤۰/۰۵) است.



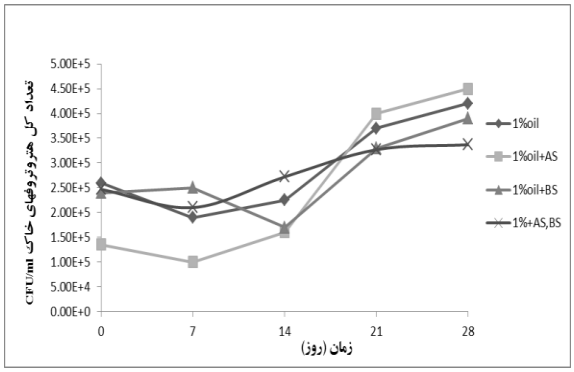
شکل ۸- تأثیر آلودگی نفت‌خام سبک با غلظت ۱ درصد و باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت‌خام شامل باکتری‌های AS و BS به مدت ۲۸ روز بر میزان آنتوسیانین *Zea mays* رقم ۷۰۴. مقادیر میانگین سه تکرار ± SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن (P≤۰/۰۵) است.



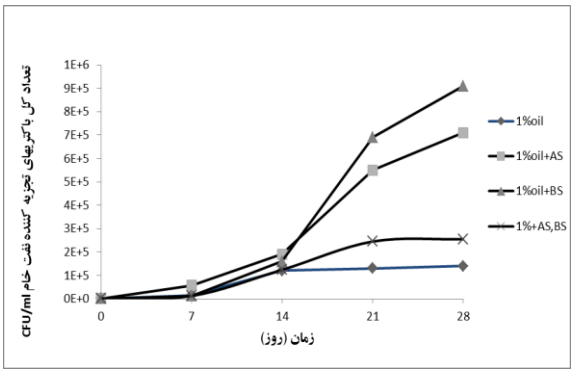
شکل ۹- تأثیر آلودگی نفت‌خام سبک با غلظت ۱ درصد و باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت‌خام شامل باکتری‌های AS و BS به مدت ۲۸ روز بر میزان مالون‌دی‌آلدهید *Zea mays* رقم ۷۰۴. مقادیر میانگین سه تکرار ± SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن (P≤۰/۰۵) است.



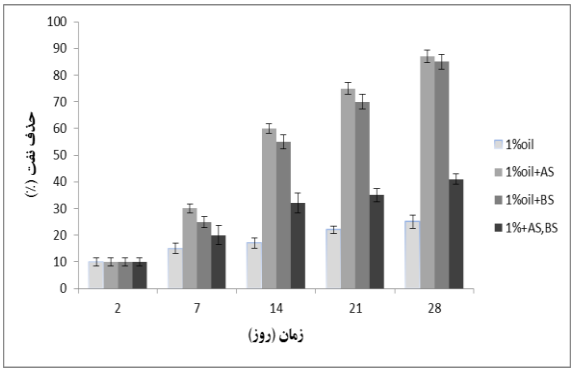
شکل ۱۰- تأثیر آلودگی نفت‌خام سبک با غلظت ۱ درصد و باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت‌خام شامل باکتری‌های AS و BS به مدت ۲۸ روز بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز *Zea mays* رقم ۷۰۴. مقادیر میانگین سه تکرار ± SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن (P≤۰/۰۵) است.



شکل ۱۱- تغییرات در شمارش تعداد کل هتروتروف‌های خاک (CFU) در ریزوسفر گیاه *Zea mays* رقم ۷۰۴ در تیمار شاهد در حضور ۱ درصد نفت‌خام و بدون تلقیح باکتری و در تیمارهای تلقیح شده با باکتری‌های AS و BS به همراه ۱ درصد نفت‌خام



شکل ۱۲- تغییرات در شمارش تعداد باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت‌خام (CFU) در ریزوسفر گیاه *Zea mays* رقم ۷۰۴ در تیمار شاهد در حضور ۱ درصد نفت‌خام و بدون تلقیح باکتری و در تیمارهای تلقیح شده با باکتری‌های AS و BS به همراه ۱ درصد نفت‌خام



شکل ۱۳- تغییرات در میزان درصد نفت حذف شده در ریزوسفر گیاه *Zea mays* رقم ۷۰۴ در تیمار شاهد در حضور ۱ درصد نفت‌خام و بدون تلقیح باکتری و در تیمارهای تلقیح شده با باکتری‌های AS و BS به همراه ۱ درصد نفت‌خام

بحث

اثر نفت‌خام با غلظت ۱ درصد بر گیاه ذرت باعث تغییراتی در شاخص‌های رشد و بیوشیمیایی گیاه گردید، شاید این تغییرات بیانگر تنش اکسیداتیو در گیاه باشد. به نظر می‌رسد این تغییرات حاصل فعالیت گیاه در جذب گروهی از هیدروکربن‌های نفت‌خام (هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای) و سمّ‌زدایی و تجزیه این ترکیبات است (Moller *et al.*, 2007). در تیمارهای که نفت‌خام بدون باکتری‌های AS و BS در گلدان‌ها بود، کاهش در وزن خشک اندام هوایی مشاهده گردید. همچنین در شاخص‌هایی نظیر: ترکیبات فنلی، میزان مالون‌دی‌آلدهید و فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش مشاهده گردید که نشان دهنده بروز تنش در گیاه است. در تیمارهایی که باکتری AS به همراه نفت‌خام وجود دارد، در وزن خشک اندام هوایی، میزان کلروفیل a و کلروفیل کل کاهش مشاهده گردید و میزان آنتوسیانین همراه با افزایش بود. در شاخص‌های ترکیبات فنلی، مالون‌دی‌آلدهید و فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش مشاهده گردید که میزان افزایش در این تیمار نسبت به سایر تیمارها بیشتر بود که نشان‌دهنده افزایش میزان تنش است. در تیمار نفت خام و باکتری BS میزان وزن خشک اندام هوایی، کلروفیل b و کلروفیل کل کاهش مشاهده گردید و در میزان آنتوسیانین، ترکیبات فنلی، مالون‌دی‌آلدهید و فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش مشاهده شد که میزان این افزایش نسبت به تیمار نفت‌خام و باکتری AS کمتر بود و بیانگر تنش کمتر نسبت به این تیمار است. در تیمار حاوی هر دو باکتری و نفت‌خام وزن خشک اندام هوایی و میزان کلروفیل a کاهش یافت و میزان آنتوسیانین، ترکیبات فنلی، مالون‌دی‌آلدهید و فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش یافت؛ مقدار این افزایش نسبت به تیمار دارای باکتری AS و تیمار دارای باکتری BS کمتر بود. در هیچ یک از تیمارها میزان کاروتنوئید تغییر معنی‌داری نداشت.

سایر پژوهشگران نیز در تحقیقات خود روی گیاهان دیگر به نتایج مشابه با نتایج تحقیق حاضر بر روی گیاه ذرت رسیده‌اند. برای مثال، Gao و همکاران (۲۰۰۶) با بررسی میان کنش بین گیاه برنج و باکتری‌های تجزیه‌کننده PAHs در خاک های آلوده به فنانترن و پیرن مشاهده نمودند که وزن خشک ریشه و ساقه هنگامی که گیاه برنج به صورت منفرد کشت داده می‌شود در مقایسه با حالتی که در ترکیب با باکتری‌های تجزیه‌کننده در خاک الوده کشت داده می‌شود کاهش قابل ملاحظه‌ای دارد. آنها علت این کاهش در وزن خشک ریشه و ساقه

را آثار فوق سمّی ترکیبات آروماتیک چند حلقه‌ای بر ریشه و ساقه گیاه عنوان کردند.

Mohsenzadeh و همکاران (۲۰۱۰) خاک را به طور مصنوعی به نفت‌خام آلوده کردند و گیاه خار شتر (*Alhaji cameleron*) را در آن کشت دادند و قارچ *Altenaria* sp. را در برخی از خاک‌ها اضافه نمودند. نتایج حاصل از تحقیق آنها نشان داد که در حالتی که گیاه خارشتر همراه با قارچ در خاک آلوده به نفت کشت داده می‌شود میزان ترکیبات فنلی، مالون‌دی‌آلدهید و فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش می‌یابد. آنها علت این افزایش را زیاد شدن تنش اکسیداتیو در گیاه و تلاش و همکاری گیاه و قارچ برای حذف نفت‌خام از خاک عنوان کردند.

در شاخص‌های میکروبی در تیمار فاقد باکتری‌های AS و BS تغییری در تعداد باکتری‌های تجزیه‌کننده مشاهده نگردید، اما در میزان کل هتروتروف‌های خاک مشاهده گردید. در تیمارهای حاوی نفت و باکتری‌های AS و تیمار نفت و باکتری BS در میزان کل هتروتروف‌های خاک و تعداد باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت، افزایش بیشتری نسبت به سایر تیمارها مشاهده گردید این موارد بیانگر تجزیه بیشتر نفت خام در این تیمارها است. در تیماری که هر دو باکتری حضور دارند میزان کل هتروتروف‌های خاک و تعداد باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت، افزایش کمتر نسبت به تیمارهای دارای یک باکتری مشاهده گردید. از این رو، توانایی گیاه در تغییر بر ترکیبات موجود در نفت خام می‌تواند به افزایش تحرک آنها در ریشه و کاهش سمّیت این ترکیبات منجر گردد (Meudec *et al.*, 2006). این تأثیر حاصل توانایی‌های باکتری‌های AS و BS در تجزیه هیدروکربن‌های آلیفاتیک و از سوی دیگر توانایی محدود این باکتری‌ها در تجزیه PAHs است، در نتیجه این تغییرات هیدروکربن های موجود در نفت‌خام که خاصیت آب‌گریزی بیشتری دارند و مانع جذب سایر هیدروکربن ها با آب گریزی کمتر (آروماتیک‌های حلقوی) می‌شوند، توسط باکتری‌های AS و BS تجزیه می‌شوند و در نتیجه این تغییر در ترکیب نفت‌خام، جذب PAHs افزایش یافته است (Mitaishvili *et al.*, 2005).

افزایش تعداد باکتری‌های هتروتروف و تجزیه‌کننده نفت‌خام پس از آلودگی خاک با آلاینده‌ها به ویژه نفت توسط محققان دیگر نیز گزارش گردیده است. برای نمونه، Phillips و همکاران (۲۰۰۸) در خاک آلوده به گازوئیل که گیاه یونجه را کشت داده بودند افزایش معنی‌دار باکتری‌های تجزیه‌کننده را در مقایسه با خاک غیر آلوده مشاهده نمودند. آنها علت افزایش تعداد باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت در خاک آلوده نسبت به خاک غیر آلوده را فشار انتخابی نفت وارد شده به خاک و در نتیجه گزینش باکتری‌های مصرف‌کننده نفت و تطابق آنها با آلودگی نسبت به سایر باکتری‌های خاک عنوان کردند.

بنابراین به نظر می‌رسد در تیمارهایی که نفت‌خام در محیطی عاری از باکتری‌های AS و BS قرار داشت حضور هیدروکربن‌های آلیفاتیک آب‌گریز با کاهش جذب هیدروکربن‌ها آروماتیک همراه بود، شاخص‌ها بیانگر میزان تنش کمتری نسبت به سایر تیمارها بود و تیمارهایی با باکتری‌های AS یا BS در آنها حضور داشتند، کاهش هیدروکربن های آب گریز آلیفاتیک توسط باکتری‌ها باعث جذب بیشتر ترکیبات آروماتیک

گردید که در نتیجه آن افزایش تنش در گیاه را به دنبال داشت. نتایج پژوهش حاضر در مجموع نشان داد که استفاده از یک باکتری منفرد در سیستم حذف آلاینده‌های نفتی با همکاری گیاه و باکتری کارآیی بالاتری نسبت به استفاده از مخلوط باکتری‌ها دارد. به نظر می‌رسد که فعالیت باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت شرایط مساعدی را در جذب این آلاینده توسط گیاه فراهم می‌آورند.

سپاسگزاری

نگارندگان از دانشگاه شهید باهنر کرمان به خاطر حمایت مالی قدردانی می‌نمایند.

منابع

Alkio, M., Tabuchi, X. and Wang, A. (2005) Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in *Arabidopsis* include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms. Journal of Experimental Botany 56(421): 2983-2994.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Annual Biochemistry 72: 248-254.

Chaillana, F., Flècheb, A., Burya, E., Phantavonga, Y., Saliot, A. and Oudot, J. (2004) Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. Research Microbiology 155(7): 587-595.

Chaudhry, Q., Blom-Zandstra, M., Gupta, S. and Joner, E. J. (2005) Utilizing the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of organic pollutants in the environment. Environment Science Pollution Research 12: 34-48.

Kvesitadze, G., Khatisashvili, G., Sadunishvili, T. and Ramsden, J. (2006) Biochemical mechanisms of detoxification in higher plants basis of phytoremediation. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Dhindsa, R. S. and Motowe, W. (1981) Drought tolerance in two mosses: correlation with enzymatic defense against lipid peroxidation. Journal of Experimental Botany 32: 79-91.

Egert, M. and Tevini, M. (2002) Influence of drought on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress in leaves of chives (*Allium schoenoprasum*). Environment and Experimental Botany 48: 43-49.

Gao, X. Z., Yu, S. C., Wu, K. C., Cheung, N. F. Y., Tam, P. Y. and Qian, M. H. (2006) Interactions of rice (*Oryza sativa* L.) and PAH-degrading bacteria (*Acinetobacter* sp.) on enhanced dissipation of spiked phenanthrene and pyrene in waterlogged soil. Science of the Total Environment 372: 1-11.

Hassanshahian, M., Emtiazi, G., Cappello, S. (2012) Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. Marine Pollution Bulletin 64: 7-12.

Heath, R. L. and Packer, L. (1969) Photoperoxidation in isolated chloroplast kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archive of Biochemistry Biophysics 125: 189-198.

Hodgeson, J. W. (1990) Polynuclear aromatic hydrocarbons. Ecotoxicology and Environmental Safety 20: 234-240.

Jithesh, S. R., Prashanth, K. R., Sivaprakash, S. and Ajayk, P. (2006) Antioxidative response mechanisms in halophytes: their role in stress defence Taramani. Journal of Genetics 85: 87-97.

Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology 148: 350-382.

Liu, H., Weisman, D., Yua.n-bei, Y., Bo Cui, Y., Huang, A., Carmona C. and Zong-hua, W. (2009) An oxidative stress response to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure is rapid and complex in *Arabidopsis thaliana*. Plant Science 176: 375-382.

Meudec, A., Dussauze, E., Deslandes, N. and Poupart, P. (2006) Evidence for bioaccumulation of PAHs within internal shoot tissues by a halophytic plant artificially exposed to petroleum-polluted sediments. Journal of Experimental Botany 65: 474-481.

Mitaishvili, T., Scalla, R., Ugrekhelidze, D., Tsereteli, B., Sadunishvili, T. and Kvesitadze, G. (2005) Transformation of aromatic compounds in plants grown under aseptic conditions. Zeitsschrift fur Naturforschung 60: 97-102.

Mohsenzadeh, F., Nasseri, S., Mesdaghinia, A., Nabizadeh, R., Zafari, D., Khodakaramian, G. and Chehregan, A. (2010) Phytoremediation of petroleum-polluted soils: application of Polygonum aviculare and its root-associated (penetrated) fungal strains for bioremediation of petroleum-polluted soils. Ecotoxicology and Environmental Safety 73: 613-619.

Moller, M., Poul, E., Jensen, B. and Andreas, H. (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. Annual Review Plant Biology 58: 459-81.

Phillips, L., James, J. Germida, F. and Charles, W. (2008) Hydrocarbon degradation potential and activity of endophytic bacteria associated with prairie plants. Soil Biology and Biochemistry 40: 3054-3064.

Pradhan, J. R., Conrad, J. R. and Paterek, S. (2003) Potential of phytoremediation for treatment of PAHs in soil at MGP sites. Soil and Sediment Contamination 7(4): 467-480.

Rahman, K. S. M., Thahira-Rahman, J., Lakshmanaperumalsamy, P. and Banat, I. M. (2004) Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. Bioresource Technology 85: 257-261.

Soland, S. F. and Laima, S. K. (1999) Phenolics and cold tolerance of *Brassica napus*. Plant Agriculture 5: 1-5.

Wagner, G. J. (1979) Content and vacuole/ extra vacuole distribution of neutral sugars, free amino acids and anthocyanins in protoplast. Plant Physiology 64: 88-93.

Wang, J., Liu, X., Zhang, X., Wang, Z., Zheng-nan, Z., Cheng-lin, S. and Peng, R. (2010) Phytoremediation potential of *Cyperus rotundus* for dieselcontaminated wetland. Journal of Shanghai University (English Edition) 14(5): 326-331.

Wang, L., Ke, W. Q. and Wong, T. W. Y (1998) Removal of pyrene from contaminated sediments by mangrove microcosms. Chemosphere 51 (1): 25-34.

Wen, P. F, Chen, J. Y., Wan, S. B., Kong, W. F., Zhang, P., Wang, W., Zhan, J., Pan, Q. H. and Hung, W. D. (2008) Salicylic acid activates phenylalanine ammonia-lyase in grape berry in response to high temperature stress. Plant Growth Regulation 55(1): 1-10.

A study of the effects of crude oil pollution and oil-degrading bacteria on some biochemical and growth factors of *Zea mays*

Mehrdad Kavousi Bafti, Zahra Asrar, Mehdi Hassanshahian * and Batoul Keramat

Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

Abstract

Bacteria-Plant systems for bioremediation of oil polluted sites are one of the most effective approaches of biotechnology in the recent years. It is well known that oil pollution induces oxidative stress in plants. In this research, the effects of crude oil pollution on *Zea mays* and bioremediation by synergism between plant and crude oil degrading bacteria, four different treatments were designed. Some physiological and microbial factors were assayed for determining the effects of oil pollution. The results showed that 1% crude oil in soil shoot, dry weight was reduced and the amount of phenolic compounds increased. With crude oil and *Pseudomonas aeruginosa* bacterium, shoot dry weight, chlorophyll (a), total chlorophyll and anthocyanins decreased wherase phenolic compounds, malodialdehyde and catalase enzyme activity increased. With 1% crude oil and *Acinetobacter calcoaceticus* bacterium, significant changes were seen in the parameters of growth. Photosynthetic pigment did not increase whereas anthocyanin, phenolic compounds, malodialdehyde and catalase activity increased. White Crude oil and the presence of both bacteria shoot dry weight and chlorophyll levels decreased and increased levels of anthocyanin and malon-dialdehyde were observed. Addition of oil to the soil, increased the numbers of crude oil degrading bacteria and heterotrophic bacteria but crude oil were removed from soil by biodegradation. By application of bacterial-plant systems in the field, industrial wastes from refinery and biochemical factories could be removed oppropriately.

Key words: *Acinetobacter*, Oil pollution, Oxidative stress, *Pseudomonas*, Bioremediation, *Zea mays*

* Corresponding Author: mshahi@uk.ac.ir