مطالعه رشد و واکنش دفاعی ریشه گیاهان در خاکهای آلوده به نفت

خدیجه کیارستمی[۱،*]، فاطمه غفاری رهبر[۱] و روانبخش شیردم[۲]

[۱] **تهران، دانشگاه الزهرا، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی**

[۲] **کرج، دانشگاه تهران، دانشکده محیط زیست**

تاریخ دریافت: ۸۹/۳/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۲/۴

چکیده

کنش متقابل خاک و ریشه گیاهان فاکتور اساسی موفقیت گونه‌های گیاهی در تحمل و حذف آلودگی نفتی خاک است. ارتباط گیاهان و میکربهای خاک آلوده از طریق ترشحات ریشه منجر به اثرات ریزوسفری می‌شود. نتیجه اثرات متقابل ریزوسفری تجزیه ترکیبات نفتی خاک درمحیط ریشه است. هدف از تحقیق حاضر بررسی رشد، تغییرات و واکنش ریشه گیاهان در خاکهای آلوده به نفت بود. در این مطالعه تغییرات طول ریشه، مقدار پروتئین، میزان جمعیت میکربهای محیط ریشه و آسیب بافتهای ریشه در مطالعات آناتومیک این گیاهان در خاکهای آلوده ارزیابی شد. در کلیه آزمایشها تغییرات ریشه گیاهان در شرایط آلوده نسبت به تیمارهای غیرآلوده بررسی شد. در شرایط آلوده رشد ریشه ذرت و جودوسر کاهش معنی‌داری را نشان داد اما ریشه آفتابگردان افزایش رشد داشت. در ریشه همه گیاهان آلوده غلظت پروتئین بالاتر از گیاهان غیرآلوده بود. جمعیت میکربهای بی هوازی خاک آلوده در حضور سیستم ریشه‌ای آفتابگردان و ذرت افزایش یافت، درحالی‌که جمعیت میکربهای هوازی خاک آلوده در محیط ریشه جودوسر افزایش داشت. مطالعات آناتومیک مبین آسیب‌پذیری و از هم گسیختگی بافت پارانشیم ریشه ذرت در شرایط آلوده بود.

واژه‌های کلیدی: آلودگی نفتی خاک، طول ریشه، غلظت پروتئین، جمعیت میکربهای خاک، بافت ریشه

* نویسنده مسئول، تلفن: ۸۸۰۵۸۹۱۲، پست الکترونیکی: su-kiarostami@yahoo.com

مقدمه

ریشه گیاهان بدلیل ارتباط مستقیم با خاک بیشترین تأثیرپذیری را از محیط و محتوای خاک دارد. در صورت وجود هر نوع شرایط نامطلوب خاک اعم از شوری، خشکی، شرایط غرقابی و وجود آلاینده‌ها و سموم در خاک، ریشه در دسترس‌ترین اندام گیاه برای آسیب‌پذیری و واکنش در برابر این تنش‌هاست. در خاکهای آلوده پاسخ ریشه گیاهان در مقابله با سموم یا آلاینده‌ها شامل حذف، تجزیه و غیرفعال سازی آنهاست.

گیاهان آلاینده‌ها را از طریق ریشه خود جذب نموده و بعد طی فرایندهایی آن را ذخیره (Phytoextraction) یا تجزیه (Phytodegradation) می‌کنند (۲۸).

در خاکهای آلوده به مواد آلی شیمیایی گیاهان اثرات گیاه پالایی (Phytoremediation) خود را بر روی آلاینده‌ها، با تحریک میکروارگانیسم‌های ریزوسفر جهت تجزیه این سموم اعمال می‌کنند که به آن فرایند Rhizodegradation می‌گویند (گیاهان جمعیت میکربهای محیط ریشه را با ترشحات کربنی، آنزیمی، مواد مغذی، انرژی و گاهی اوقات اکسیژن تحریک و حمایت می‌کنند) (۵، ۸ و۲۶).

نوع ترشحات ریشه گیاهان می‌تواند بر نوع برهم‌کنش گیاهان و میکروارگانیسم‌های خاک تأثیر بگذارد. این برهم‌کنش‌ها با توجه به نوع ترشحات، می‌تواند اختصاصی یا غیر اختصاصی باشد (۲۳).

برهم‌کنش‌های اختصاصی زمانی روی می‌دهد که ترشحات ریشه گیاهان یک ترکیب شیمیایی خاص را در پاسخ به حضور نوعی آلاینده ترشح کنند (۲۷). در برهم‌کنش‌های غیر اختصاصی مواد شیمیایی مشابهی از ریشه گیاهان در پاسخ به انواع آلاینده‌ها ترشح می‌شوند.

آلاینده‌های نفتی نیز ازجمله ترکیباتی هستند که گیاهان آن را با کمک میکربها و یا پس از جذب بطور مستقیم تجزیه می‌کنند (۱۰و ۱۳). گیاهان بسیاری به‌عنوان گیاهان مقاوم به آلودگی نفتی توسط محققان مختلف شناسایی و معرفی شده‌اند (۱۲). از اولین علائم مسمومیت ناشی از هیدروکربنهای نفت خام بر روی گیاهان کاهش رشد است (۶ و ۲۱).

میزان تحمل به ترکیبات نفت خام در گیاهان مختلف متفاوت است. اگر سطح آلودگی نفتی خاک در حد تحمل گیاه باشد، گیاه می‌تواند بخوبی رشد کند، بدون اینکه علائم آسیب در آن نمایان گردد. در سال ۱۹۹۴، دیوید و همکاران با بررسی یونجه در خاکهای آلوده به تولوئن دریافتند که یونجه به مدت یکسال در خاکی با غلظت ppm ۵۰۰ تولوئن که از رطوبت اشباع باشد، فعالانه رشد می‌کند. زمانیکه سطع آلودگی خاک در حد بحرانی باشد، علائم آسیب در گیاهان نمایان می‌گردد. دانه‌رست‌های ذرت با افزایش غلظت نفت خام تا حد v/w ۱۰٪ در خاک، علائمی ازجمله زردی برگ، تشکیل نقاط بافت مردگی در برگها، کمبود آب و توقف رشد را نشان می‌دهند (۲۵). از اولین علائم آسیب ریشه گیاهان در غلظت‌های بحرانی هیدروکربنهای نفت خام کاهش بیوماس ریشه و تغییر ساختمان ریشه در برخی گونه‌هاست که در مطالعات بسیاری از محققان گزارش شده است (۱۷و۲۹). هیدروکربنها قادرند ریشه گیاهان را بپوشانند و مانع دسترسی ریشه به آب و مواد مغذی گردند (۱۵). این مسئله منجر به کاهش رشد و تولیدات ریشه می‌گردد و بر قابلیت ترشح ریشه نیز تأثیرگذار است.

آنچه مسلم است اینکه ریشه گیاهان بدلیل تماس مستقیم با ترکیبات نفتی در مقایسه با سایر اندامهای گیاه تأثیر بیشتری بر روی آلاینده و میکروارگانیسم‌های خاک دارد و از طرف دیگر خود نیز از نظر عملکرد، رشد و ساختار تغییرات بیشتری را متحمل می‌شود. میزان آسیب‌پذیری ریشه و نحوه عملکرد آن نه تنها تعیین کننده دوام و پایداری گیاه در شرایط آلوده است بلکه کارایی گیاه را در پروسه گیاه پالایی کاملا تحت تأثیر قرار می‌دهد.

در این مطالعه تغییرات و عملکرد ریشه برخی گیاهان در خاکهای آلوده به پساب‌های نفتی مورد بررسی قرار گرفت. از سه گیاه ذرت (*Zea mays*)، جودوسر (*Avena sativa*) و آفتابگردان (*Helianthus annus*) در این پژوهش استفاده شد. این گیاهان دارای پتانسیل قابل توجهی در تحمل محیط‌های آلوده به نفت می‌باشند و از آنها در بسیاری از مطالعات گیاه پالایی ترکیبات نفتی استفاده شده است (۶ و۲۰). لازم به ذکر است که جودوسر از گیاهان بومی اطراف پالایشگاه تهران است. در این مطالعه از خاکهای آلوده پوند ۴ پالایشگاه تهران استفاده شد که قدمت آلودگی نفتی آن بالغ بر ۵۰ سال بود. پس از انجام نمونه‌برداری و تعیین میزان کل ترکیبات نفتی خاک، بذر گیاهان در خاکهای آلوده و غیرآلوده، درون گلدان کشت شد. ۴ هفته پس از جوانه‌زنی، رشد ریشه و غلظت کل پروتئین‌های ریشه اندازه‌گیری شد. پس از ۸ هفته جمعیت میکربی محیط ریشه گیاهان و تغییرات آناتومیک بافتهای ریشه بررسی گردید.

مواد و روشها

نمونه‌برداری و آماده سازی خاک: در منطقه آلوده، آلودگی به شکل لکه‌هایی در سطح خاک نمایان بود و خاک از نظر آلودگی همگن نبود. نمونه‌برداری در دو محل و از دو عمق خاک آلوده صورت گرفت. در محل اول، نمونه‌برداری تا عمق ۵۰ سانتی‌متری از سطح خاک انجام شد. ترکیبات نفتی این خاک به رنگ قهوه‌ای تیره، چسبناک

و بشدت آبگریز بود و خواص ظاهری آن به ترکیبات نفتی سنگین یا سوختهای دیزلی نزدیک بود. در محل دوم، نمونه‌برداری در عمق ۵۰ تا ۱۰۰ سانتی‌متری سطح خاک انجام شد. ترکیبات نفتی خاک در این عمق شفاف و زرد رنگ، با ویسکوزیته اندک و خواص آبگریزی میانه‌ای بود. همچنین از یک ناحیه غیرآلوده این منطقه به‌عنوان خاک شاهد تا عمق ۵۰ سانتی‌متری از سطح خاک نمونه‌برداری شد. خاکهای آلوده پس از انتقال به آزمایشگاه در شرایط هوا خشک شدند و بعد با غربال‌های ۲ میلی‌متری الک شدند تا ذرات آلاینده بطور یکنواخت در بافت خاک پخش شود، سپس خاکهای آلوده محل اول و دوم به نسبت ۱ به ۱ با هم مخلوط شدند. این خاک جهت کشت و مطالعه گیاهان مورد استفاده قرار گرفت.

تعیین میزان ترکیبات نفتی خاک: ۵ گرم خاک پس از توزین به درون یک بالن ۱۰۰ میلی لیتری ریخته شد و ترکیبات نفتی موجود در آن با استفاده از گزیلن به مقدار ۵۰ mL در چند مرحله استخراج شدند. در هر بار گزیلن ۱۰mL به خاک اضافه شد و مخلوط حاصل با دور شدید شیکر شد. سپس محلولهای استخراجی به لوله‌های سانتریفوژ منتقل گردیدند. لوله‌ها بمدت ۱۵ دقیقه و با سرعت ۶۷g در دستگاه سانتریفوژ مدل Beckman سانتریفوژ شدند. جذب روشناور حاصل از سانتریفوژ ترکیبات نفتی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-visible مدل Philips در طول موج ۴۲۵ نانومتر بررسی شد. به‌منظور رسم منحنی استاندارد از غلظت‌های ۱ تا ۸ ppm نفت کرایزن استفاده شد (۱۸).

تهیه بذر و روش کشت: بذرهای رقم SC700 ذرت و همچنین رقم آذر گل آفتابگردان از مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شدند. بذر علف جودوسر از ذخایر موجود در آزمایشگاه گیاه‌شناسی دانشگاه الزهرا تهیه شد. ابتدا بذر گیاهان از نظر قوه نامیه بررسی شدند. سپس بذرها در گلدان و در دو نوع تیمار خاک آلوده و شاهد کشت شدند. آبیاری در حد ظرفیت زراعی انجام شد.

بررسی رشد و تغییرات ریشه: چهار هفته پس از جوانه‌زنی، جهت بررسی ریشه ابتدا گیاه (چهار نمونه از هر نوع گیاه) را با احتیاط از گلدان خارج کرده، بطوریکه ریشه گیاه آسیب نبیند و پاره نشود. سپس گیاه با آب شستشو داده شد تا کلیه ذرات خاک از ریشه شسته شود. ریشه گیاهان از نظر رشد طولی ارزیابی و محاسبه شدند.

سنجش پروتئین : با جدا کردن ریشه از گیاهان، نمونه‌های ریشه‌ای جهت استخراج پروتئین از ریشه بدست آمدند. نسبت بافر استخراج به نمونه ۱ به ۲ بود. به این منظور از بافر فسفات سدیم ۰/۲ مولار (pH=۷/۵) استفاده شد. استخراج پروتئین درهاون چینی و تمامی مراحل در سردخانه و در دمای ۰-۴ درجه سانتیگراد انجام شد. به این منظور پس از افزودن بافر استخراج، عمل سائیدن در هاون بمدت ۳۰ دقیقه ادامه یافت تا اینکه نمونه‌ها همگن شدند. سپس همگنای حاصل به لوله سانتریفوژ منتقل شد و با استفاده از دستگاه سانتریفوژ مدل Beckman (LE80K) در دمای ۴ درجه سانتیگراد با سرعت ۱۱۳۲۶g بمدت ۴۵ دقیقه سانتریفوژ شد. پس از پایان سانتریفوژ محلول روشناور از۶ لایه پارچه ململ عبور داده شد. سپس سنجش پروتئین به روش برادفورد (۱۹۷۶) انجام شد و به منظور تهیه محلول استاندارد از غلظت‌های مختلف سرم آلبومین گاوی استفاده شد. سری غلظت‌های محلول استاندارد ۴۰/۵،۵۰،۲،۰،۱۰،۱۵،۲۰،۲۵،۳۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر بدست آمدند. جذب هر نمونه پس از ۱۵ دقیقه بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتر UV-visible مدل Philips در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد.

تعیین جمعیت میکربهای خاک : هشت هفته پس از جوانه‌زنی جمعیت میکربهای محیط ریشه تعیین شد. تعدادی گلدان حاوی خاک آلوده و فاقد گیاه به‌عنوان شاهد در همان شرایط محیطی گلدانهای حاوی گیاه بمدت هشت

هفته آبیاری شدند تا جمعیت میکربهای خاک صرف‌نظر از اثرات تحریک کنندگی ریشه گیاهان تعیین گردد. به یک گرم خاک محیط ریشه هر تیمار، آب مقطر استریل به میزان ۹ mL اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه شیکر شد تا میکربهای چسبیده به ذرات خاک جدا شوند. از روشناور بالای رسوب، رقت‌های 10^{-1}، 10^{-2}، 10^{-3}، 10^{-4}، 10^{-5}، 10^{-6} و 10^{-7} در آب مقطر استریل تهیه گردید.

کشت میکربهای هوازی: یک میلی لیتر از سوسپانسیون میکربی رقیق نشده و از هر رقت ۱ میلی لیتر در پلیت‌های استریل ریخته شد و بعد ۱۵–۲۰ mL محیط کشت حاوی آگار با دمای ۴۵ –۵۰ درجه سانتی گراد به هر پلیت اضافه شد. پس از منعقد شدن آگار پلیت‌ها در حرارت ۲۵–۳۰ درجه سانتی گراد بمدت ۴۸–۷۲ ساعت انکوبه شدند.

کشت میکربهای بی هوازی: ۵ میلی لیتر محیط کشت حاوی آگار (nutrient agar) در پلیت استریل ۸ میلی لیتری ریخته شد، بعد از منعقد شدن آگار ۰/۵ mL از هر رقت در هر پلیت ریخته و پخش گردید. آنگاه ۱۰–۱۵ میلی لیتر آگار مغذی ۴۵ درجه سانتی‌گراد مجددا روی هر پلیت ریخته شد و پس از منعقد شدن آگار، پلیت‌ها در ظرف کشت بی هوازی و در دمای ۳۷ درجه بمدت ۲۴–۳۶ ساعت قرار داده شدند. برای تعیین جمعیت میکربهای خاک، پلیتی برای شمارش انتخاب شد که حاوی ۲۰–۱۰۰ کلنی بود. بعد از شمارش با در نظر گرفتن رقت هر پلیت، تعداد میکربها در یک میلی لیتر محلول خاک رقیق شده که معادل $(n)10^{x}$ است، بدست آمد که در آن n معادل تعداد کلنی و x معادل ضریب رقت است (۱۴).

مطالعات آناتومیک : به‌منظور مطالعات آناتومیک از گیاهان ۸ هفته‌ای استفاده شد. از ریشه گیاهان ۷ تا ۱۱ برش عرضی به ضخامت یک لایه سلول و به روش دستی تهیه شد. پس از قرار دادن و شستشوی نمونه‌ها به‌ترتیب در آب ژاول ۱٪ بمدت ۲۰ دقیقه و اسید استیک ۱٪ بمدت ۱ دقیقه نمونه‌ها رنگ‌آمیزی شدند. رنگ‌آمیزی بوسیله کارمن زاجی و سبزمتیل انجام شد. نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده با استفاده از میکروسکوپ نوری Olympus مدل BX51TF بررسی شدند.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: کلیه آزمایشات در چهار تکرار انجام شد. تجزیه آماری داده‌ها با روش تجزیه واریانس (ANOVA) بوسیله نرم‌افزار spss انجام شد. برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون Tukey استفاده شد.

نتایج

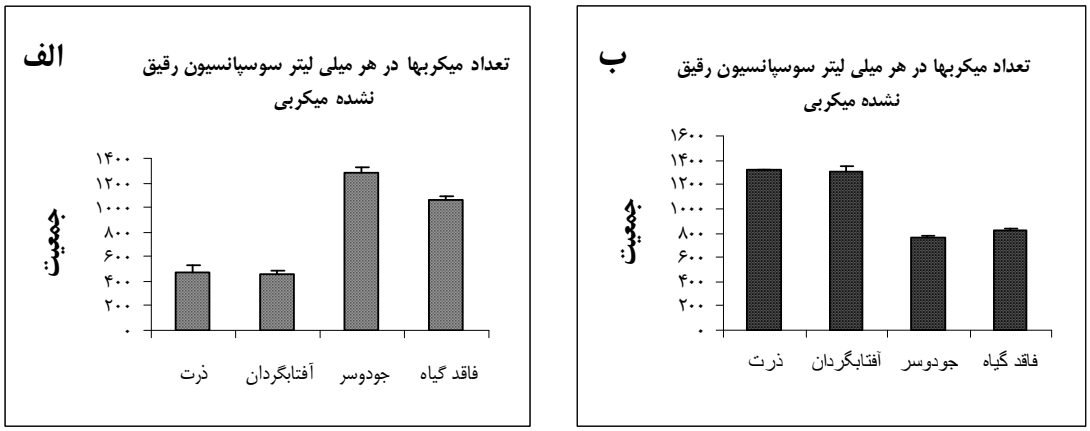
میانگین غلظت نفت در خاک مورد آزمایش حدود ۲۱۶۰۰mg/kg بدست آمد. مطالعه ریشه گیاهان بیانگر آسیب‌پذیری بیشتر ذرت در مواجه با آلاینده‌های نفت در مقایسه با گیاهان دیگر بود. هر چند هر سه گیاه واکنش دفاعی قابل توجهی در سطح ریشه و خاک نشان دادند.

جدول ۱– نتایج اندازه‌گیری طول ریشه و غلظت پروتئین در تیمارهای آلوده و شاهد (میانگین±انحراف معیار).

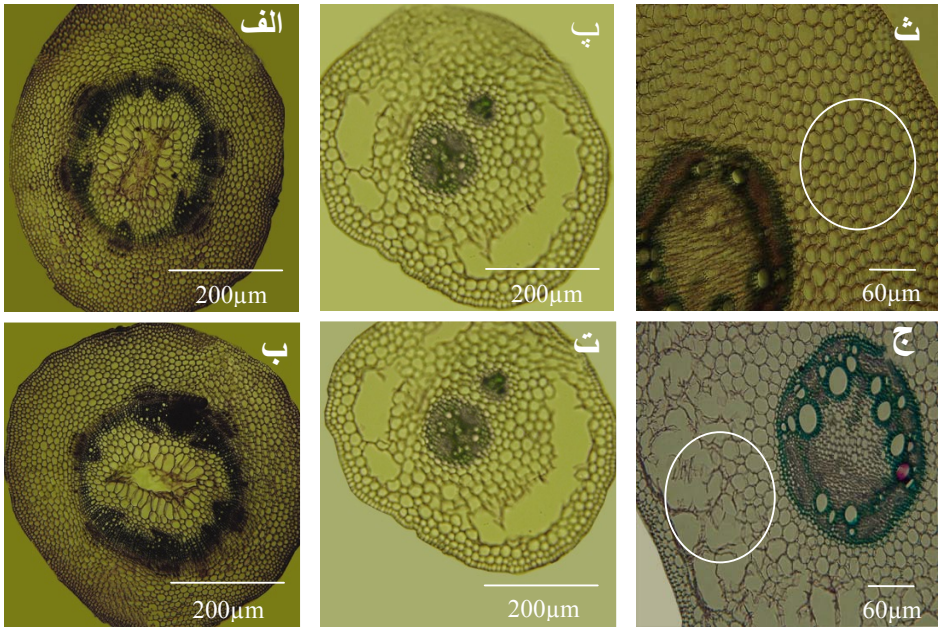
گیاهان	طول ریشه (cm)		غلظت پروتئین (mg/g)	
	آلوده	شاهد	آلوده	شاهد
ذرت	۲۴/۸±۵/۷[b]	۲۸/۴±۸/۳[a]	۰/۰۰۶۳ ±۰/۰۰۰۲[a]	۰/۰۰۲۶±۰/۰۰۰۲[b]
آفتابگردان	۱۳/۶±۸/۱[a]	۸/۴ ±۸/۹[b]	۰/۰۱۲ ±۰/۰۰۰۹[a]	۰/۰۰۶۱ ±۰/۰۰۰۳[b]
جودوسر	۳/۴±۵/۹[b]	۷/۳±۹/۳[a]	۰/۷۵ ± ۰/۰۱[a]	۰/۰۳۵ ±۰/۰۰۷[b]

تفاوت میانگین‌ها در سطح ($p<$ ۰/۰۵) معنی‌دار است.

بررسی رشد گیاهان در ذرت و جودوسر نمایانگر اثرات منفی هیدروکربنهای نفت خام بر رشد ریشه این گیاهان بود، درحالی‌که در آفتابگردان ریشه آلوده افزایش معنی‌داری در رشد داشت. اندازه‌گیری غلظت پروتئین ریشه گیاهان مبین افزایش قابل توجه غلظت پروتئین هر سه گیاه در خاک آلوده بود. هرچند این افزایش در ریشه جودوسر آلوده بسیار چشمگیر بود (جدول ۱).



شکل ۱ – مقایسه میانگین جمعیت میکربهای محیط ریشه گیاهان با تیمار شاهد (خاک آلوده فاقد گیاه) الف: میکربهای هوازی ب: میکربهای بی هوازی (تفاوت میانگین‌ها در سطح ($p< ۰/۰۵$) معنی‌دار است).



شکل ۲– مقایسه تغییرات بافتهای ریشه گیاهان در خاکهای آلوده و غیرآلوده یا شاهد در برش عرضی ریشه
الف: آفتابگردان غیرآلوده ب: آفتابگردان آلوده پ: جودوسر غیرآلوده ت: جودوسر آلوده ث: ذرت غیرآلوده
ج: ذرت آلوده

اثرات تحریک کننده ریشه کلیه گیاهان بر رشد و توسعه جمعیت میکربهای خاک جالب توجه بود. این در حالیست که ریشه برخی گیاهان مثل ذرت با وجود آسیب‌پذیری و پارگی بافت پارانشیم (نتایج آناتومیک) در تحریک میکروارگانیسم‌های خاک آلوده عملکرد مؤثری داشت. ذرت و آفتابگردان در تحریک میکربهای بی هوازی و جودوسر در تحریک میکربهای هوازی محیط ریشه مؤثر بودند، در مقابل جمعیت میکربهای هوازی ذرت و آفتابگردان و همچنین جمعیت میکربهای بی هوازی در جودوسر کاهش قابل توجهی در مقایسه با خاک شاهد داشت (شکل ۱). در مطالعات میکروسکوپی مقایسه بافتهای ریشه گیاهان آلوده و غیرآلوده تغییر ساختاری یا آسیب جدی را در ریشه آفتابگردان و جودوسر نشان نداد. در ذرت از هم گسیختگی بافت پارانشیم و آسیب‌دیدگی سلولها واضح بود و در بعضی قسمتها پارگی بافت عمیق‌تر بود (شکل ۲).

بحث

از اولین علائم مسمومیت گیاهان در خاکهای آلوده به نفت بازدارندگی رشد و بعد کاهش رشد است. خاصیت آبگریزی ترکیبات نفتی موجب تغییر رفتار خاک و ناهمگن شدن انتشار آب در خاک می‌گردد. این مسئله موجب کمبود آب در خاک و ایجاد شرایط خشکی در خاک می‌شود و قابلیت دسترسی گیاهان به آب و مواد مغذی کاهش می‌یابد (۲)، در نتیجه رشد و تولیدات گیاهی کاهش می‌یابد. کاهش رشد گیاهان به‌ویژه ریشه در مطالعات بسیاری از محققان گزارش شده است (۱۷و۲۹).

مطالعات بنگوش در سال ۲۰۰۳ نشان داد که وجود نفتهای سنگینی مثل آسفالتن در خاکهای آلوده به نفت موجب بوجود آمدن نوعی نیروی مکانیکی مقاوم در خاک می‌گردد که طویل شدن ریشه‌های گیاهان را کند می‌سازد. کاهش رشد طولی ریشه ذرت و جودوسر با توجه به ویژگیهایی که از خاکهای آلوده پالایشگاه ذکرشد، بعلت بالا بودن میزان نفتهای سنگین در این خاکها بود. اما ریشه آفتابگردان در شرایط آلوده افزایش رشد را نشان داد. در سال ۲۰۰۴ مطالعات مرک و همکاران بر روی گیاهان گرمسیری در خاکهای آلوده به نفت خام نشان داد که ریشه‌های *Calopogonium mucunoides* و *Centrosema brasilianum* در مقایسه با ساقه در خاکهای آلوده افزایش رشد دارند، به‌طوری‌که نسبت رشد ساقه به ریشه این گیاهان در شرایط آلوده کاهش می‌یابد. آنان دریافتند که این مسئله نوعی پاسخ دفاعی و یا استراتژی گیاه در مواجه با کمبود دسترسی به مواد مغذی در خاک آلوده است، زیرا افزایش رشد و بیوماس ریشه موجب افزایش جذب نیتروژن خاک می‌شود (۱۶). افزایش رشد ریشه آفتابگردان در خاک آلوده احتمالا نوعی مکانیسم دفاعی برای دسترسی بهتر به مواد مغذی خاک بود.

در سال ۱۹۹۵ اسنور و همکارانش دریافتند که آنزیم‌ها عامل اصلی تغییر آلاینده‌های مخلوط با خاک و رسوبات هستند. یافته‌های آنها نشان داد که آنزیم‌ها از طریق واکنشهای تجزیه‌ای قادرند آلاینده‌های آلی را تغییر داده و تجزیه کنند. آنان با بررسی ترشحات ریشه و جداسازی انواع آنزیم‌ها شامل دهالوژناز، نیتروردوکتاز، پراکسیداز، لاکاز و نیتریلاز را شناسایی کردند. افزایش غلظت پروتئین ریشه جودوسر در شرایط آلوده ممکن است یک افزایش مصنوعی و به علت تنش آب باشد یا بدلیل افزایش تولید یا انتقال آنزیم در ریشه به‌منظور افزودن بر فعالیت ترشحی باشد. ترشح آنزیم از ریشه نوعی واکنش دفاعی گیاه برای تجزیه هر چه سریعتر آلاینده‌های نفت خام و کاستن سطح غلظت مسموم کننده نفت در خاک است.

میکربهای تجزیه کننده آلاینده‌های آلی میکربهایی هستند که از آلاینده‌ها برای رشد و تکثیر خود استفاده می‌کنند (۷). آلاینده‌های آلی نه تنها منبع کربن، بلکه منبع تأمین‌کننده انرژی میکربها هستند. اساس متابولیسم میکربی آلاینده‌ها استفاده از تنفس هوازی یا تجزیه میکربی

آلاینده‌ها در حضور اکسیژن است (۷). بطور مثال در تجزیه هوازی پلی آروماتیک هیدروکربن‌ها (PAHs) باکتریها از آنزیم دی اکسیژناز استفاده می‌کنند. آنزیم با الحاق دو اتم اکسیژن به مولکول هیدروکربن آنرا به ترکیباتی با سمیت کمتر همانند اسید، الکل، دی‌اکسید کربن و آب تبدیل می‌کند (۱۱و۱۹).

در جودوسر اثرات تحریک کننده ریشه بر رشد و تکثیر میکربهای هوازی خاک آلوده مشهود بود. نتایج آناتومیک این پژوهش نمایانگر تشکیل بافت آئرانشیم در ریشه‌های جودوسر در هر دو تیمار آلوده و غیرآلوده بود. با توجه به نقشی که بافت آئرانشیم در انتقال اکسیژن به ریشه و تبادل گازی خاک دارد و همچنین افزایش چشمگیر غلظت پروتئین ریشه این گیاه که ممکن است به علت افزایش ترشحات آنزیمی ریشه در شرایط آلوده باشد، به نظر می‌رسد در محیط ریشه شرایط مناسبی برای رشد و تکثیر میکربهای هوازی تجزیه کننده نفت فراهم بود. رقابت میکربهای هوازی و بی هوازی در تجزیه هیدروکربنهای خاک برای کسب کربن و انرژی بیشتر جهت رشد و تکثیر خود، می‌تواند دلیل کاهش جمعیت میکربهای بی هوازی در محیط ریشه این گیاه باشد. راه‌های متابولیسمی دیگر در تجزیه میکربی آلاینده‌ها شامل تنفس غیر هوازی، تخمیر، واکنشهای دهالوژناسیون- احیا و استفاده همزمان از چند راه متابولیسمی مرتبط به هم است (۷). با توجه به اثرات تحریک کننده ریشه ذرت و آفتابگردان بر میکربهای بی‌هوازی خاکهای آلوده، ریشه این گیاهان در انتقال اکسیژن و ایجاد تبادل گازی در محیط ریشه نقش چندانی نداشت و یا بدلیل آسیب‌دیدگی ریشه در ذرت تنفس ریشه‌ای با مشکل مواجه بود. علاوه بر این احتمالا خواص آبگریزی و ویسکوزیته ترکیبات نفتی که موجب چسبندگی ذرات خاک و کاهش قابلیت زهکشی خاک می‌گردد، موجب گردید که شرایط برای رشد و تکثیر میکربهای هوازی مناسب نباشد. در چنین شرایطی میکربهای بی هوازی تحت تأثیر ریشه و ترشحات آن به رشد و تکثیر و احتمالا تجزیه نفت پرداختند و در نتیجه جمعیت میکربهای بی هوازی افزایش و در مقابل جمعیت میکربهای هوازی کاهش قابل ملاحظه‌ای را نشان داد.

بررسی بافتهای ریشه آفتابگردان و جودوسر و مقایسه آن در تیمارهای آلوده و غیر آلوده، تغییر و آسیب بارزی را در شرایط آلوده نشان نداد اما در ذرت اثرات سمی ترکیبات نفت کاملا مشهود بود. اثرات مخرب نفت بصورت از هم گسیختگی بافت پارانشیم مشاهده شد که در بعضی قسمتها پارگی بافت پارانشیم عمیق و مرگ سلولها محرز بود.

گیاهان از نظر قدرت تحمل و قابلیت دفاعی در برابر ترکیبات سمی متفاوت هستند. گیاهان در صورت مسمومیت و آسیب ریشه نیز قادر به واکنش دفاعی و تحریک میکروارگانیسم‌های خاک می‌باشند. ذرت با وجود از هم گسستگی بافت پارانشیم و آسیب سلولهای ریشه توانست به تحریک میکربهای بی هوازی خاک ادامه دهد. بنابراین بنظر می‌رسد تجزیه و کاستن غلظت یک آلاینده شیمیایی مثل نفت و رساندن غلظت آن به سطحی که برای گیاه قابل تحمل باشد، اولین هدف گیاهان است که حتی در صورت مسمومیت نیز به این مبارزه حیاتی ادامه می‌دهند تا بتوانند بقای خود را حفظ کنند.

مشاهدات ما نشان داد که جودوسر با وجود کاهش رشد ریشه، توانایی قابل توجهی در تحریک میکربهای هوازی خاک دارد. با توجه به اینکه تجزیه هوازی آلاینده‌ها اساس فرایند Rhizodegradation است، بنظر می‌رسد جودوسر پاک کننده مناسبی برای آلاینده‌های نفتی در لایه‌های سطحی خاک باشد.

نتایج این پژوهش نشان‌دهنده افزایش طول ریشه آفتابگردان در خاکهای آلوده بود. طبق نظر بنگوش در ۲۰۰۳ مبنی بر تأثیر نفتهای سنگین در تشکیل یک نیروی مکانیکی مقاوم در برابر رشد ریشه گیاهان، بنظر می‌رسد این نیرو در کاهش روند رشد ریشه گیاهانی مثل ذرت و جودوسر که ریشه‌های افشان و نازک دارند، مؤثر است و

گیاهی همانند آفتابگردان بدلیل داشتن ریشه راست قادر است بر این نیروی مکانیکی غلبه کرده و به‌منظور دسترسی هر چه سریعتر به مواد مغذی خاک بر رشد طولی خود بیفزاید. واکنش رشد ریشه گیاهان در خاکهای آلوده به نفت تا حدودی به شکل ریشه و نوع گیاه وابسته است. آفتابگردان توانایی خوبی در تحریک میکربهای بی هوازی دارد و با توجه به رشد ریشه‌های آن در عمق خاک می‌تواند برای حذف ترکیبات نفتی در لایه‌های زیرین خاک مناسب باشد.

آنچه مسلم است اینکه بررسی عملکرد و واکنش ریشه گیاهان در خاکهای آلوده راه مناسبی برای انتخاب مقاومترین گیاهان پاکساز است و اگر گیاه منتخب جزء گیاهان بومی منطقه آلوده باشد، بدلیل سازگاری اکولوژیکی با سایر گیاهان محیط آلوده کم هزینه‌ترین و تأثیرگذارترین گیاه در پایش خاک است.

منابع

1. Anderson, T.A., Guthrie, E.A. and Walton, B.T. 1993. Bioremediation in the rhizosphere. *Environmental Science and Technology*. 27(13): 2630-2636.
2. Bengough, A.G. 2003. Root growth and function in relation to soil structure, composition, and strength In: *Root Ecology* (Dekroon. H., Visser. E.J.W., Eds). Springer Heidelberg Chapter 6.
3. Bossert, L., Bartha, R. 1985. Plant growth on soils with a history of oily sludge disposal. *Soil and Science*. 140(1): 75-77.
4. Bradford, M. 1976. *Analitical Biochemistry*. Arapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities in utilizing the principle of protein –dye binding . 72:284-254.
5. Campbell, R., 1985. *Plant Microbiology*. Edward Arnold: Baltimore, MD, London.
6. Chaineau, C.H., Morel, J.L., Oudot, J. 1997. Phytotoxicity and plant uptake of fuel oil hydrocarbons. *Journal of Environmental Quality*. 26: 1478-1483.
7. Committee on In Situ Bioremediation, Water Science and Technology Board, Commission on Engineering and Technical Systems, and National Research Council. 1993. National Academy Press: Washington, D.C.
8. Cunningham, S.D. and Ow, D.W. 1996. Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiology*. 110(3): 715-719.
9. Davis, L.C., Muralidharan, N., Visser, V.P., Chaffin, C., Fateley, W.G., Erickson., L.E. and Hammaker, R.M. 1994. Chapter 10 Alfalfa plants and associates microorganisms promote biodegradation rather than volatilization of organic substances from ground water. *Bioremediation Through Rhizosphere Technology*. T.A. Anderson and J.R. Coats. American Chemical Society: Washington, D.C. ACS Symposium Series. 563: 112-122.
10. Edwards, N.T. 1988. *Asimilation and metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons by vegetation –an apporach of to this controversial issue and suggestions for future research*. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A Decade of Progress – 10th International Symposium, Columus, OH, Battelle Press.
11. Eweis, J.B., Ergas, S.J., Chang, D.P.Y. and Schroeder, E.D. 1998. Bioremediation Principles. McGraw-Hill, Inc.: Toronto.
12. Frick, C.M., Farell, R.E., Germida, J.J. 1999. Assessment of Phytoremediation as an In-situ technique for cleaning Oil-Contaminated Sites. Department of Soil Science University of Saskatchewan Saskatoon, SK. Petroleum Technology Alliance Canada (PTAC), Calgary AB, Canada. Report, Desember 1999.
13. Gunther, T., Dornberger, U., and Fritsche, W. 1996. Eeffects of ryegrass on biodegradation of hydrocarbons in soil. *Chemosphere*. 33(2): 203-215.
14. Gupta, P.K. 2006. *soils , plants , water and fertilizer analysis*. published by: updesh purhit for Agrobios. India, Jodhpur . 18: 367-368.
15. Kuhn, W., Gambino, R., Al-Awadhi, N., Balba, M.T. and Dragun, J. 1998. Growth of tomato plants in soil contaminated with Kuwait crude oil. *Journal of Soil Contamination*. 7: 801-806.
16. Marschner, H. 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press: London.

17. Merkl, N., Schultze-kraft, R., Infante, C. 2004. Phytoremediation in the tropics-the effect of crude oil on the growth of tropical plants. *Bioremediation Journal*. 8(3-4): 177-184.

18. Osuji, L.C., Egbuson, E.J.G., Ojinnaka, C.M. 2005. Chemical redamation of crude-oil-inundated soils from Niger Delta, Nigeria. *Chemistry and Biodiversity*. 21(1), 1-10.

19. Pothuluri, J.V. and Cerniglia, C.E. 1994. Chapter 5 Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biological Degradation and bioremediation of Toxic Chemicals*. G.R. Chaudry.Dioscorides Press. Portland, Oregon. 92-124.

20. Rentz, J.A., Alvarez, P.J.J., Schnoor, J.L. 2004. Repression of Pseudomonas putida phenanthrene degrading activity by plant root extracts and exudates. *Environmental Microbiology*. 6(6), 574-583.

21. Salanitro, J.P., Dorn, P.B., Huesemann, M,H., Moore, K.O., Rhodes, I.A., Jackson, L.M.R., Vipond, T.E., Western, M.M. and Winiewksi, H.L., 1997. Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment. *Environmental Science and Technology*. 31: 1769-1776.

22. Schnoor, J.L., Licht, L.A., McCutcheon, S.C., Wolfe, D.C., and Carreira, L.H. 1995. Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. *Environmental Science and Technology*. 29(7): 318-323.

23. Siciliano, S.D. and Germida, J.J. 1998. Mechanisms of phytoremediation: biochemical and ecological interactions between plants and bacteria. *Environmental Review*. 6: 65-79.

24. U.S. EPA, 1999. Phytoremediation Resource Giude. EPA 542-B-99-003. Office of Solid Waste and Eemergency Response, Washington, D.C.

25. Udo, E.J., and Fayemi, A.A.A. 1975. The effect of oil pollution of soil on germination, growth and nutrient uptake of corn. *Journal of Environmental Quality*. 4(4):537-540.

26. Vance, D.B. 1996. Phytoremediation: enhancing natural attunation processes. *National Environmental Journal*. 6(Jan/Feb): 30-31.

27. Walton, B.T., Hoylman, A.M., Peres, M.M., Anderson, T.A., Johnson, T.R., Guthrie, E.A., and Christman, R.F. 1994. Chapter 7- Rhizosphere microbial communities as a plant defense against toxic substances in soils. T.A. Anderson and J.R. Coats. *Bioremediation Through Rhizosphere Technology*. American Schemical Society: Washington, DC. 82-92.

28. Wenzel, W.W., Adriano, D.C., Salt. D., Smith, R., 1999. Phytoremediation: plant-microbe-based remediation system. In: Adriano, D.C., Bollag, J.-M., Frankenberger Jr., W.T., Sims, R.C. (Eds), Bioremediation of Contaminated Soils. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, 475-508 (Agronomy Monograph 37).

29. Xu, J.G., Johnson, R.L. 1995. Root growth , microbial activity and phosphatase activity in oil–contaminated, remediated and uncontaminated soils planted to barley and field pea. *Plant and Soil*. 173: 3-10.

Study of the function and alteration of plants root in the Oil-contaminated Soils

Kiarostami Kh.[1], Ghafari Rahbar F. and Shirdom R.[2]

1 Biology Dept., Faculty of Science, Alzahra University, Tehran, I.R. of Iran

2 Faculty of Environment, University of Tehran, Karaj, I.R. of Iran

Abstract

Interaction between soil and its effect on plant roots is the key factor in success of a plant species in tolerance and remediation of hydrocarbon pollutant. The root exudates are the link between plants and microbes that leads to the rhizosphere effects. The result of this interaction results is degradation of petroleum hydrocarbons. Aim of the current study was consideration of growth, changes and reaction of the plants root in the oil-contaminated soils. The effect of oil-contaminated soils on root length, protein concentration, rhizosphere microbial population and damaged of the root tissues in the anatomical studies on *Zea mays, Helianthus annus* and *Avena sativa* were investigated. As a result *Z.mays* and *A.sativa* roots length significantly decreased in contaminated condition while *H.annus* root length increased in contaminated soils. In all of the plants roots protein concentration was higher in compared with uncontaminated plants. The anaerobic microbial population in the contaminated soil increased in the presence of *H.annus* and *Z.mays* root system whereas *A.sativa* caused enhancement of the aerobic microbial population in rhizosphere. Anatomical studies were indicative vulnerability and rupture of the root parenchyma tissue in the contaminated *Z.mays*.

Keywords: Soil petroleum pollution, Length of root, Protein concentration, Soil microbial population, Root tissue