# تاثیر قارچ اندوفیت *Piriformospora indica* و ریشه گیاه ذرت (*Zea Mays* L.) بر حذف هیدروکربن‌های نفتی از خاک

جواد زمانی بابگهری [۱]، محمدعلی حاج عباسی [۱] و ابراهیم علایی [۲]
۱- استاد گروه علوم خاک دانشگاه صنعتی اصفهان، ۲- پژوهشگر محیط زیست پژوهشگاه صنعت نفت

## چکیده
در گیاه‌پالایی خاک‌های آلوده به آلاینده‌های آلی نظیر مواد نفتی مهمترین فرایندهای تاثیرگذار در کاهش و حذف هیدروکربن‌ها از خاک فرایندهای وابسته به حضور ریشه می‌باشند. این مطالعه برای بررسی تاثیر حضور ریشه‌های گیاه ذرت و تلقیح این گیاه با قارچ *P. indica* در گیاه‌پالاییک خاک آلوده نفتیبا استفاده از ریزوباکس(Rhizobox) انجام شد. نتایج نشان داد که حضور قارچ اندوفیت موجب افزایش ۴۰ درصدی در عملکرد کل گیاه ذرت (ریشه و اندام هوایی) شده است. پارامترهای زیستی خاک نظیر جمعیت باکتریایی خاک و آنزیم دهیدروژناز با کشت گیاه افزایش معنی‌داری در مقایسه با تیمار شاهد (بدون گیاه) نشان داد. حضور ریشه‌ها به ویژه در گیاهان تلقیح شده موجب کاهش مقدار آلودگی در مقایسه با شاهد و خاک توده شد. کل هیدروکربن‌های تجزیه شده در خاک ریزوسفری در مقایسه با مقدار اولیه آن، در تیمارهای تلقیح شده و بدون تلقیح به ترتیب حدود ۵۰ و ۴۰ درصد بود.
واژه های کلیدی: تخریب ریشه‌ای، ریزوباکس، اندوفیت، *P. indica*، خاک‌های آلوده به مواد نفتی

## مقدمه
امروزه آلودگی محیط زیست ازجمله مسائل مهمی است که جوامع مختلف باآن روبه‌روهستند. انسان دراثرفعالیت‌های روزمره خود مقادیرقابل توجهی ازآلاینده‌های مختلف رابه منابع آب، خاک وهوا وارد می‌نماید. آلاینده‌ها می‌توانندبه صورت تصادفی ویادراثربی‌دقتی ویابه طورغیرقانونی وارد محیط خاک شوند. لذا باید اقداماتی برای کنترل آلودگی در این زمینه به کارگرفته شودونظارت جدی برحفظ منابع طبیعی به ویژه خاک صورت گیرد. آلودگیخاک‌هابهموادنفتیدرطیفرایندصنعتیشدنیکروندپرسرعتداشتهکه می‌تواندبهعنوانیکخطربسیارمهمبرایجوامعانسانیدرجهانمحسوبشود. هیدروکربن‌هاینفتیشایع‌ترینآلاینده‌هایآلیموجوددرمحیطزیستمی‌باشند (Adams et al., ۲۰۰۸). امروزهمقادیرزیادیازخاک‌هاییکهتوسطاینموادآلودهشده اندباعثشناجعهزیستمحیطیدربسیاریازنقاطجهانبهویژهکشورهاینفت‌خیزمانندا یرانشده است. تجزیه هیدروکربن‌های نفتی می‌تواند با کاشت گیاهان و توسط فرایندهای بیولوژیکی موجود در ریزوسفر گیاهان با سرعت بیشتری انجام شود(Harvey et al., ۲۰۰۲). ریشه گیاهان محیط مناسب و ایده‌آلی جهت تجزیه ترکیبات آلی فراهم می‌کنند. ریشه‌های گیاه علاوه بر اینکه شرایط تغذیه‌ای ریزجانداران در ریزوسفر را ترفیع می‌دهند، حضور ریشه در خاک با بهبود شرایط ساختمانی آن سبب بهبود نفوذپذیری و تهویه خاک نیز خواهد شد. گیاهانهمچنینممکناستباترشحآنزیم‌هاازریشهخودبهمحیطریزوسفر (Rhizosphere) سببتخریب، تغییروتجزیهاینآلاینده‌هادرخاکشوند(Crowley et al., ۱۹۹۷). ریزوسفردرواقعبهخاکیگفتهمی‌شودکهدرتماسویادرمجاورتریشه‌هایزندهقراردارد. مقادربسیارزیادیازجمعیتمیکروبیوفعالیت‌هایمتابولیکیدرمحیط ریزوسفردرمقایسهباخاکتودهوجوددارد. بنابراین می‌توان گفت که وجود فعالیت زیستی بیشتر در ناحیه ریزوسفر می‌تواند به عنوان یک پتانسیل و استراتژی مهم جهت اصلاح درجای خاک‌های دارای هیدروکربن‌های نفتی توسط فرایند گیاه‌پالایی مورد استفاده قرار گیرد. در نتیجه استفاده از گیاهان و نیز حضور ریزجانداران همراه آن‌ها مانند اندوفیت‌ها می‌تواند به عنوان یک تکنولوژی سبز و امید بخش جهت پاک‌سازی خاک‌های آلوده مورد استفاده قرار گیرد. مطالعاتنسبتاًزیادیدررزمینهتاثیرحضورگیاهبرکاهشآلودگی‌هایمختلفنظیرآلودگی‌هاینفتیدرخاکانجامشدهاستامادراینبینتوجهبهتاثیرح ضورقارچ‌هایاندوفایتبهویژهقارچاندوفایت *Piriformospora indica* برفرایندگیاه‌پالایی‌خاک‌هایآلودهبهموادنفتیونیزتاثیر مستقیم ریشه و نیز تاثیرفاصلهازریشهبراینفرایندکمترمدنظربودهاست. بههمینمنظوردراینتحقیق، مطالعه‌ایدرزمینهتاثیرحضورقارچ *P. indica* درریشه‌هگیاهذرت، برکاهشآلودگی‌هاینفتیدریکخاکآلودهبااستفادهازیکآزمایشگلخانه‌ایباکشتگیاهدرریزوباکس (Rhizobox)، انجامشده است. در این ارتباط تاثیر کشت گیاه و حضور اندوفایت بر جمعیت کلباکتری‌هایهتروتروفهوازی، باکتری‌هایهوازی تجزیه‌کننده نفت، آنزیم دهیدروژناز و ترکیبات فنولی محلول در آب نیز مورد ارزیابی قرار گرفته است.

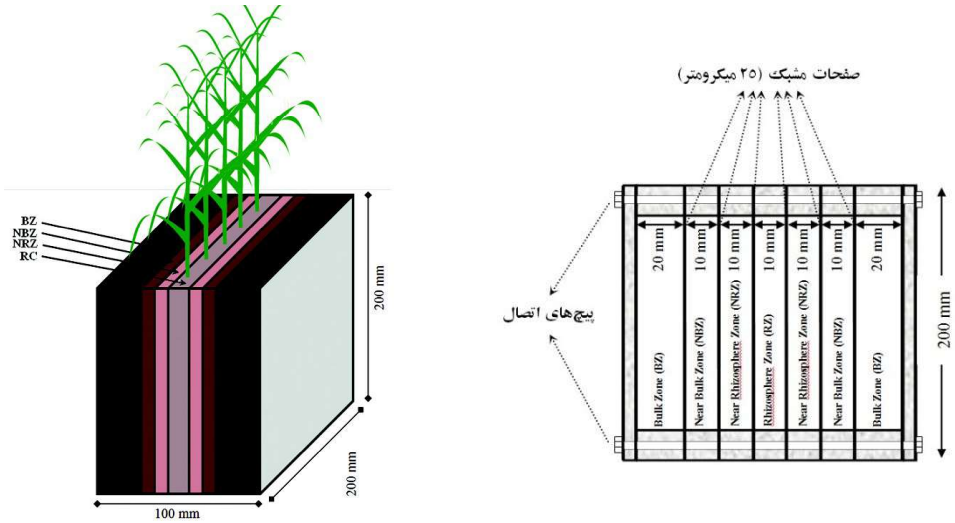
## مواد و روش‌ها
منظورخاک مورد مطالعه دراینپژوهشاز اطرافپالایشگاهشهیدهاشمینژاد (خانگیران-سرخس) انتخابشد. دراطرافاینپالایشگاهودرمحلحفاری‌ها، استخرهاییجهتنگهداشتهرزآب‌هایحاصلازحفاریوجودداشتهکهبعدازپایانحفاری رهامی‌شوند. پایه اصلی هرزآب‌های خروجی از حفاری چاه‌ها در این پالایشگاه گازوئیل است که وجود این ماده در پساب مورد نظر موجب آلودگی

خاک محل استخرهای نگهداشت شده است.نمونه‌برداریازخاکآلودهاینمنطقهازعمقمناسب (۳۰-۰ سانتی‌متری) انجامشد. ویژگی‌هایاولیه فیزیکی،شیمیاییوبیولوژیکیاینخاکبعد از انتقال به دانشگاه صنعتی اصفهان، بااستفادهازروش‌هایاستانداردردرآزمایشگاه خاکشناسی دانشگاه صنعتی اصفهانتعیینشد (جدول ۱).

**جدول ۱- برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در این پژوهش**

| پارامتر | واحد | مقدار |
|---|---|---|
| شن | % | ۴±۸۱ |
| سیلت | % | ۲±۱۱ |
| رس | % | ۳±۸ |
| بافت خاک | --- | شن لومی |
| pH | --- | ۲/۰±۴/۷ |
| شوری (EC) | $dS\ m^{-1}$ | ۰۵/۰±۲۵/۱ |
| کربن آلی | % | ۵۶/۰±۹۵/۲ |
| نیتروژن کل | $mg\ kg^{-1}$ | ۳۱±۲۰۰ |
| فسفر | $mg\ kg^{-1}$ | ۷/۳±۰/۱۱ |
| ظرفیت تبادل کاتیونی | $cmol\ kg^{-1}$ | ۱/۳±۲/۹ |
| کل هیدروکربن‌های نفتی | $mg\ g^{-1}$ | ۶/۰±۶/۲۱ |

درساخت سیستم ریزوباکس موردنظرازطرح پیشنهادییوسفوچاینو ۱۹۸۸ استفاده شد (Youssef and Chino, ۱۹۸۸). به منظوراجراء این پژوهش یکریزوباکس دوطرفه طراحی و ساخته شد که این ریزوباکس دارای چهار بخش مختلف شامل ناحیه ریزوسفر (Rhzisphere Zone- RZ) ۱۰ میلی‌متر، ناحیه نزدیک ریزوسفر(Near Rhizosphere Zone-NRZ) ۱۰ میلی‌متر، ناحیه نزدیک خاک توده (Near Bulk Zone-NBZ) ۱۰ میلی‌متر) و ناحیه خاک توده (Bulk Zone-BZ) ۲۰ میلی‌متر بود. سیستم‌های ریزوباکس به گونه‌ای طراحی شده‌اندکه بتوان خاک ریزوسفر را از خاک توده جدا کرده به صورتی که جنبه‌هایمتفاوتی از برهم‌کنش خاک وریشه را راحت‌ترموردبررسی قرار داد. شکل ۱ شمای کلی و ابعاد ریزوباکس مورد استفاده در این پژوهش را نشان می‌دهد.



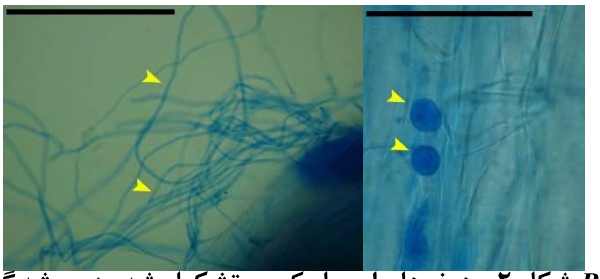

**شکل ۱- شماییکلیوابعادریزوباکسمورداستفادهدر اینپژوهش**

مایه تلقیح قارچ *P. indica* در آزمایشگاه بیولوژی خاک دانشگاه صنعتی اصفهان آماده شد (اسپور اولیه قارچ از کشور آلمان تهیه شده بود، Deutsche Sammlungfü rMikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany). در این مطالعه از بذور ذرت (*Zea Mays* L.) رقم سینگل کراس ۷۰۴ استفاده شده. بذور ذرت قبل از جوانه‌دار کردن استریل شدند. بعد از استریل کردن بذرها، برای جوانه دار شدن، درون پتری دیش و روی محیط آگار قرار داده شدند. بعد از گذشت ۲ روز بذور جوانه‌دار شده بعد از اضافه کردن مایه تلقیح به مدت سه ساعت روی شیکر دوار با دور آرام (۸۰ دور در دقیقه) قرار داده شدند تا امکان اتصال بهتر اسپورهای قارچ به سطح ریشه و تلقیح فراهم شود. مایه مورد استفاده برای بذرهای بدون تلقیح محلول توئین ۲۰ با غلظت ۰۲/۰ درصد در نظر گرفته شد. در پایان آزمایش و بعد از گذشت ۶۴ روز، برای اندازه‌گیری پارامترهای زیستی یعنی تنفس میکروبی پایه

خاک، جمعیت باکتری‌های کل و باکتری‌های تجزیه کننده مواد نفتی، آنزیم دهیدرژناز، و نیز مقدار ترکیبات فنولی محلول در آب و مقدار کل هیدروکربن‌های نفتی با باز کردن ریزوباکس‌ها از تمامی بخش‌ها مقدار کافی نمونه خاکانجام شد. همچنین ریشه‌ها و اندام هوایی نیز بعد از شستشو کامل به صورت جداگانه در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت خشک و توزین شد.
طرح مورد استفاده در این پژوهش کاملاً تصادفی به صورت آزمون فاکتوریل به گونه‌ای که دو فاکتور قارچ اندوفیت در دوسطح (با و بدون قارچ) و فاصله از ریشه در چهار سطح مورد ارزیابی قرار گرفت. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS انجام شد.

## نتایج و بحث

نتایج بررسی میکروسکوپی انجام شده بر روی ریشه‌های ذرت نشان داد که تلقیح این گیاه توسط قارچ *P. indica* به خوبی انجام شده بود (شکل ۲). نتایج نشان داد که ریشه تمامی گیاهان رشد یافته در تیمار با اندوفایت به خوبی با قارچ تلقیح شده بود و درصد کلونیزاسیون در این مطالعه برای گیاهان با اندوفایت ۱۳±۶۴ درصد بود و هیچگونه اثری از تلقیح در گیاهان بدون اندوفایت وجود نداشت.



**شکل ۲- هیف‌ها و اجسام کروی تشکیل شده در ریشه گیاه ذرت تحت تاثیر تلقیح قارچ *Piriformospora indica* (زمان برداشت: ۲۰ روز بعد از شروع آزمایش)**

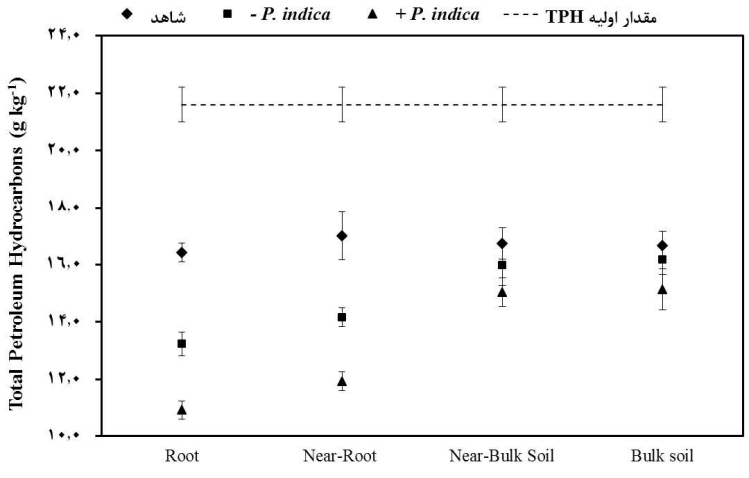
همانطور که در شکل ۳ نیز دیده می‌شود تلقیح موجب افزایش معنی‌دار عملکرد اندام هوایی و ریشه‌های ذرت شده بود. گیاهان تلقیح شده با قارچ دارای عملکرد کل (ریشه و اندام هوایی) بیشتری نسبت به گیاهان بدون اندوفیت بودند و عملکرد کل ذرت در گیاهان تلقیح شده حدود ۴۰ درصد بیشتر از گیاهان بدون تلقیح بود. تلقیح گیاه همچنین اثر مثبتی و معنی‌داری بر ارتفاع گیاه داشت (شکل ۳). ارتفاع گیاه در ذرت‌های تلقیح شده حدود ۳۳ سانتی‌متر بوده که این مقدار ۴/۱ برابر بیشتر از ارتفاع گیاه در گیاهان بدون قارچ *P. indica* بود. بررسی کلروفیلی برگ‌های ذرت کشت شده در خاک آلوده به مواد نفتی توسط شاخص SPAD نشان داد که گیاهان تلقیح شده، شاخص سبزینگی بیشتری نسبت به گیاهان بدون اندوفیت دارند و شاخص SPAD ثبت شده برای گیاهان با اندوفیت ۳۸ بود و این در حالی بود که مقدار این شاخص برای گیاهان بدون تلقیح ۳۳ ثبت شد.شاخص‌های زیستی خاک در بخش‌های مختلف ریزوباکس تحت تاثیر کشت گیاه قرار گرفته بود اما تاثیر حضور مستقیم ریشه بر این پارامترها بیشتر از زمانی بود که خاک در فواصل دورتر از ریشه قرار داشت (جدول ۲ و ۳). همچنین تلقیح گیاه نیز با افزایش رشد ریشه‌ای گیاه موجب افزایش نسبی در این پارامترها شده بود که این تاثیربه ویژه در فواصل نزدیک ریشه یعنی ناحیه ریزوسفری و نزدیک ریزوسفر برای پارامترهای فعالیت آنزیم دهیدروژناز، جمعیت باکتری‌های تجزیه کننده نفت و ترکیبات فنولی محلول در آبدر مقایسه با تیمارهای بدون تلقیح معنی‌دار بود.
افزایش فعالیت‌های بیولوژیکی در حضور ریشه‌های گیاه ذرت تجزیه هیدروکربن‌های درون خاک را به همراه خواهد داشت. در این مطالعه کشت گیاه موجب کاهش مقدار کل هیدروکربن‌های نفتی در خاک به ویژه در فواصل نزدیک ریشه شده بود. شکل ۳ غلظت کل هیدروکربن‌های نفتی در نواحیمختلف ریزوباکس را نشان می‌دهد. کشت گیاه در دو حالت با و بدون اندوفیت موجب کاهش مقدار کل هیدروکربن‌های نفتی در خاک شده بود اما گیاهان تلقیح شده با اندوفیت به مقدار بیشتری موجب کاهش مواد نفتی از خاک شده بودند.به عنوان مثال درصد کل هیدروکربن‌های تجزیه شده در خاک ریزوسفری در مقایسه با مقدار اولیه آن، در تیمارهای تلقیح شده و بدون تلقیح به ترتیب حدود ۵۰ و ۴۰ درصد بود.

**جدول ۲- تنفس میکروبی خاک، ترکیبات فنولی محلول در آب و فعالیت آنزیم دهیدروژناز در فواصل مختلف از ریشه گیاه ذرت تحت تاثیر تلقیح این گیاه با قارچ اندوفیت *P. indica***

| بخش‌های ریزوباکس | تنفس میکروبی خاک (mg $CO_2$-C $kg^{-1}$ $day^{-1}$) | | | ترکیبات فنولی محلول در آب ($\mu$g vanillic acid $g^{-1}$ dry) (soil | | | فعالیت آنزیم دهیدروژناز ($\mu$g TPF $g^{-1}$ dry soil) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | شاهد | *P.-indica* | *P.+indica* | شاهد | *P.-indica* | *P.+indica* | شاهد | *P.-indica* | *P.+indica* |
| ریزوسفر (R) | $^{e}$۹/۵±۴/۴۵ | $^{ab}$۹/۴±۴/۹۵ | $^{a}$۶/۸±۵/۱۰۲ | $^{f}$۹/۰±۳/۶ | $^{bc}$۴/۰±۴/۸ | $^{a}$۷/۰±۹/۹ | $^{e}$۲۶±۵۴۴ | $^{cd}$۲۶±۶۴۳ | $^{a}$۲۹±۷۹۴ |
| نزدیک ریزوسفر (NR) | $^{de}$۴/۵±۹/۴۷ | $^{b}$۶/۷±۸/۹۱ | $^{ab}$۳/۵±۹/۹۸ | $^{f}$۰/۱±۴/۶ | $^{cde}$۵/۰±۰/۸ | $^{ab}$۶/۰±۲/۹ | $^{e}$۳۷±۵۲۵ | $^{d}$۳۰±۶۰۷ | $^{b}$۲۳±۷۷۸ |
| نزدیک خاک توده (NB) | $^{e}$۸/۸±۴/۵۰ | $^{c}$۸/۳±۴/۷۵ | $^{c}$۷/۶±۳/۷۹ | $^{f}$۸/۰±۲/۶ | $^{def}$۴/۰±۲/۷ | $^{bc}$۶/۰±۵/۸ | $^{e}$۴۴±۵۱۴ | $^{e}$۴۱±۵۲۸ | $^{c}$۳۴±۶۷۴ |
| خاک توده (B) | $^{d}$۸/۲±۸/۵۶ | $^{c}$۷/۴±۰/۷۵ | $^{c}$۴/۵±۵/۷۷ | $^{f}$۰/۱±۴/۶ | $^{ef}$۳/۰±۹/۶ | $^{bcd}$۷/۰±۱/۸ | $^{e}$۲۲±۵۳۱ | $^{e}$۲۶±۵۱۶ | $^{e}$۲۲±۵۴۵ |

**جدول ۳- جمعیت کل باکترهای هتروتروف و باکتری‌های هوازی تجزیه‌کننده نفت در فواصل مختلف از ریشه گیاه ذرت تحت تاثیر تلقیح این گیاه با *P. indica* قارچ اندوفیت**

| بخش‌های ریزوباکس | جمعیت کل باکتری‌های هتروتروف (CFU × $10^{6}$ $g^{-1}$) | | جمعیت باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت (CFU × $10^{3}$ $g^{-1}$) | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | شاهد | *P. indica*- | *P. indica*+ | شاهد | *P. indica*- | *P. indica*+ |
| ریزوسفر (R) | $^{c}$۲/۰±۴/۰ | $^{a}$۶/۴±۰/۲۰ | $^{a}$۷/۵±۷/۲۲ | $^{g}$۳/۰±۵/۰ | $^{b}$۰/۱۰±۰/۷۰ | $^{a}$۰/۱۰±۰/۱۰۰ |
| نزدیک ریزوسفر (NR) | $^{c}$۳/۰±۸/۰ | $^{b}$۱/۲±۷/۸ | $^{b}$۸/۳±۳/۱۱ | $^{g}$۱/۰±۳/۰ | $^{c}$۶/۷±۷/۵۱ | $^{b}$۸/۵±۳/۷۳ |
| نزدیک خاک توده (NB) | $^{c}$۲/۰±۵/۰ | $^{c}$۹/۱±۸/۲ | $^{c}$۳/۱±۵/۲ | $^{g}$۱/۰±۵/۰ | $^{de}$۵/۵±۳/۱۶ | $^{d}$۵/۴±۳/۲۳ |
| خاک توده (B) | $^{c}$۱/۰±۶/۰ | $^{c}$۷/۰±۱/۱ | $^{c}$۶/۰±۴/۱ | $^{g}$۲/۰±۶/۰ | $^{g}$۳/۲±۲/۶ | $^{ef}$۸/۳±۷/۱۰ |




**شکل ۳- غلظت کل هیدروکربن‌های نفتی در نواحی ریزوباکس در تیمارهای مختلف (Root: ناحیه ریشه ای، Near-Root: ناحیه نزدیک ریشه، Bulk Soil: خاک توده و Near-Bulks Soil: خاک نزدیک توده)**

## منابع

Adams R.H., Guzman-Osorio F.J. and Zavala C.J. ۲۰۰۸. Water repellency in oil contaminated sandy and clayey soils. International Journal of Environmental Science and Technology, ۵(۴): ۴۴۵-۴۵۴.

Harvey P.J., Campanella B.F.,Castro P.M.L.,Harms H.,Lichtfouse E.,Sch ffiner A.R., Smrcek S. and Werk-Reichhart D. ۲۰۰۲. Phytoremediation of polyaromatic hydrocarbons, anilines and phenols. Environmental Science and Pollution Research, ۹(۱): ۲۹-۴۷.

Crowley D.E, Alvey S. and Gilbert E.S. ۱۹۹۷. Rhizosphere ecology of xenobiotic degrading microorganisms. *In*: Kruger E.L., Anderson T.A., and Coats J.R. (Eds.). Phytoremediation of soil and water contaminants. ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC.

Youssef R.A. and Chino M. ۱۹۸۸. Development of a new rhizobox system to study the nutrient status in the rhizosphere. Soil Science and Plant Nutrition, ۳۴ (۳): ۴۶۱-۴۶۵.

**Abstract**

In the plant-based methods for remediation of petroleum-contaminated soils plant root systems play a crucial role. In this study, a rhizobox experiment was conducted to investigate whether inoculation with the root-colonizing fungus *P. indica* could further enhance the degradation of petroleum hydrocarbons in the root zone of maize (*Zea mays* L.). The results showed that the inoculated plants produced around ۴۰% more root and shoot biomass than non-inoculated plants.The presence of roots strongly increased the counts of soil bacteria, dehydrogenase activity and petroleum degradation. The degradation of petroleum hydrocarbons in rhizosphere of the inoculated and non-inoculated plants were respectively about ۵۰ and ۴۰% in compared to the initial contamination.