

ارزیابی گیاه‌پالایی افاقیا در خاک‌های آلوده به نفت خام با تاکید بر برخی فلزات سنگین

مه‌ری عسکری^{۱*}، میترا نوری^۱، فاطمه بیگی^۲، فریبا امینی^۱

۱- دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، کدپستی ۳۸۱۵۶-۸-۸۳۴۹

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

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

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱/۱۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۹/۱۹

چکیده

هدف: نفت خام ترکیب پیچیده‌ای از هزاران ترکیب هیدروکربنی و غیرهیدروکربنی از جمله فلزات سنگین است که می‌توانند سرطان‌زا و جهش‌زا باشند. مشخص شده که گیاه‌پالایی جهت خروج و کاهش آلاینده‌های نفتی موثر و کارآمد است ولی انتخاب گیاهان جهت گیاه‌پالایی مشکل می‌باشد.

مواد و روش‌ها: اثرات آلودگی نفتی خاک (۰ درصد، ۱ درصد، ۲ درصد، ۳ درصد و ۴ درصد حجمی/وزنی) بر مقدار پرولین (روش Bathes)، پروتئین کل (روش برادفورد) و مقادیر سرب، کادمیم و روی (جذب اتمی) موجود در برگ‌های افاقیا ۹۰ روزه مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS11 و تست دانکن انجام شد.

نتایج: نتایج نشان می‌دهد که مقدار پرولین و پروتئین به طور معنی‌داری ($p \leq 0.05$) همراه با افزایش آلودگی، افزایش یافته است. بیشترین مقدار پرولین در گیاهان تیمار ۴ درصد اندازه‌گیری شد. تجمع پرولین، یک پاسخ فیزیولوژیک عمومی بسیاری از گیاهان در پاسخ به محدوده وسیعی از تنش‌های زیستی و غیرزیستی است. نتایج نشان داد که روی و سرب در برگ‌های افاقیا تجمع زیستی داشته‌اند. مقدار سرب برگ بطور قابل توجهی در گیاهان تحت تیمار ۱ درصد افزایش داشته، بطوری‌که در تیمار ۱ درصد غلظت سرب ۲۰/۸ برابر افزایش را نشان می‌دهد. هیچ اختلاف معنی‌داری در خصوص مقدار کادمیم بین تیمارها و گیاهان کنترل وجود نداشت.

نتیجه‌گیری: براساس نتایج فوق، افاقیا را می‌توان به عنوان یک انباشتگر در آلودگی نفتی استفاده نمود و در تحقیقات بعدی آن را برای گیاه‌پالایی خاک‌های آلوده به سرب انتخاب نمود.

واژگان کلیدی: افاقیا، آلودگی نفت خام، فلزات سنگین، گیاه‌پالایی

مقدمه

نفت خام ترکیبی پیچیده از هزاران ترکیب هیدروکربنی (۱) و غیرهیدروکربنی از جمله فلزات سنگین (۲) است که بر خواص فیزیکی و آبی خاک تأثیر گذاشته (۳)، سبب چسبندگی و اتصال ذرات خاک شده و به دنبال سخت و غیرقابل نفوذ شدن خاک، زهکشی آب و انتشار اکسیژن را مختل می‌کند (۴، ۵ و ۶). اختلالات خاک به دلیل تهویه ناقص (۷) ناشی از جایگزینی هوای خاک با نفت، فعالیت میکروارگانیسم‌های غیرهوازی، اختلال در توازن آب در سیستم خاک-گیاه، سمیت ناشی از سولفیدها و زیادی منگنز آزاد شده در تجزیه هیدروکربن‌ها است. این اختلالات منجر به تغییرات خواص فیزیکی، مورفولوژیکی و شیمی خاک می‌شود که در نتیجه آن نیترات، فسفر قابل دسترس و کلسیم کاهش می‌یابد (۳). همچنین نفت خام می‌تواند در بافت گیاه نفوذ کرده و وارد فضاهای درون سلولی شود. غشای سلولی به دلیل نفوذ هیدروکربن‌ها آسیب می‌بیند که منجر به نشت محتویات درون سلول می‌شود (۸). اثرات شیمیایی ناشی از عملکرد نفت و ترکیبات آن مثل فلزات سنگین، هیدروکربن‌های پلی‌سیکلیک آروماتیک توسط محققین مختلف مورد بررسی قرار گرفته است (۹ و ۱۰). تغییرات شیمیایی گیاهان در حضور نفت خام شامل ذخیره و تجمع فلزات سنگین، کاهش کلروفیل، پروتئین، کاروتنوئیدها و افزایش آمینواسیدها (۱۱) می‌باشد.

رشد عظیم صنایع و استفاده از ترکیبات آروماتیک بی‌شمار در رنگ‌ها، مواد قابل انفجار، مواد دارویی و آفت‌کش‌ها در محیط منجر به آلودگی‌های جدی شده است. روش‌های فیزیکی و شیمیایی متعدد برای مقابله با آلودگی‌های نفتی در خاک وجود دارد که بسیاری از آنها به سبب هزینه بالا و اثرات مضر جانبی، کمتر استفاده می‌شوند. در سال‌های اخیر به روش‌های زیستی نظیر گیاه‌پالایی (Phytoremediation) توجه بیش‌تری شده است. گیاه‌پالایی فن‌آوری جدیدی است که در آن از گیاهان مقاوم برای حذف یا کاهش غلظت آلاینده‌های آلی، معدنی و ترکیبات خطرناک محیط زیست از جمله فلزات سنگین، مواد نفتی و علف‌کش‌ها استفاده می‌شود (۱۲). امروزه استفاده از گیاهان سبز براساس توانایی فوق‌العاده آن‌ها در انباشت عناصر (گیاهان بسیار انباشتگر Hyperaccumulator) و حذف ترکیبات مضر از محیط و متابولیزه کردن آن‌ها به ملکول‌های متنوع، کاربرد فراوان دارد (۱۳). فلزات سنگین و آلودگی‌های

آلی، اهداف اصلی گیاه‌پالایی می‌باشند. اولین بار Adam و Duncan و همکاران (۱۴) نقش گیاهان را در پالایش آلودگی هیدروکربن‌های نفتی به دنبال بررسی تأثیر سوخت دیزلی بر جوانه‌زنی کتان مطرح نمودند. گیاهان به طور غیرمستقیم از طریق تغییر دادن شرایط فیزیکی و شیمیایی خاک، افزایش تهویه و فراهم کردن اکسیژن جهت تجزیه ترکیبات نفتی در کاهش آلودگی‌های نفتی مؤثر می‌باشند (۱۵). همچنین گیاهان با انباشت ترکیبات فوق در زیست‌توده خود، به طور مستقیم نیز خاک را از ترکیبات آلی پاک می‌کنند (۱۶). بیش‌تر تحقیقات گیاه‌پالایی، به سمت استفاده از لگوم‌ها که تثبیت‌کننده نیتروژن هستند گرایش دارند (۱۵، ۱۷، ۱۸ و ۱۹). در این پژوهش تأثیر غلظت‌های مختلف نفت خام بر مقدار پروتئین و پرولین گیاه افاقیا که یک گیاه زینتی متعلق به خانواده فاباسه از خانواده‌های گیاهی مقاوم به آلاینده‌های نفتی می‌باشد (۲۰ و ۲۱) مورد بررسی قرار گرفته است تا امکان استفاده از افاقیا به عنوان یک گیاه زینتی در پالایش آلودگی‌های مختلف نفت خام به خصوص فلزات سنگین موجود در نفت خام بررسی شود.

مواد و روش‌ها

بذرهای افاقیا *Robinia pseudoacacia* L. از پارک کلاله شهر سنجان واقع در استان مرکزی جمع‌آوری شد. نفت خام از پالایشگاه اراک تهیه گردید. خاک مورد آزمایش مخلوط مساوی از خاک مزرعه و پرلیت در نظر گرفته شد. بذرها توسط اتانول ۷۰ درصد به مدت ۲ دقیقه و سپس هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی سطحی و سپس ۵ بار با آب مقطر شستشو داده شدند (۲۲). اسکاریفیکاسیون (خراش دادن) بذرها با نوک اسکالپل در ناحیه‌ای غیر از ناف انجام شد (۲۳). دانه‌رست‌های دو روزه جوانه‌زده غیرآلوده به طور تصادفی در عمق ۲ سانتی‌متری خاک، درون گلدان‌های شاهد و گلدان‌های محتوی خاک آلوده به نفت خام (ابعاد گلدان‌ها: طول ۲۰ سانتی‌متر و قطر ۱۸ سانتی‌متر) در غلظت ۰ درصد، ۱ درصد، ۲ درصد، ۳ درصد، ۴ درصد، ۵ درصد، ۶ درصد، ۷ درصد و ۸ درصد (حجمی/وزنی) انتقال یافتند. درون هر گلدان ۱۰ گیاهک افاقیای دو روزه غیرآلوده کشت شد. پس از پوشاندن روی دانه‌رست‌ها توسط خاک همان گلدان، آبیاری با ۲۵۰ میلی لیتر محلول هوگلند (۲۴) برای هر گلدان صورت گرفت. گلدان‌ها در شرایط محیط در ۲۵ درجه سانتی‌گراد حرارت در شب و ۲۸

اندازه‌گیری پروتئین به روش برادفورد: به ۱۰۰ میلی لیتر بافر تریس ۰/۵ مولار با pH معادل ۶/۸، ۲ گرم SDS افزوده و حل گردید. ۲۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج به نمونه‌های تازه برگ‌های افاقیا افزوده و توسط میله شیشه‌ای استریل له و خوب مخلوط گردید. تمامی این مراحل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس محلول‌ها به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ شدند. به ۵ میلی لیتر محلول برادفورد، ۱۰۰ میکرولیتر عصاره فوق اضافه و پس از ۳۰ دقیقه در شرایط آزمایشگاه، جذب عصاره فوق در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری و با استفاده از منحنی استاندارد مقدار پروتئین بر حسب میلی گرم بر گرم بافت تر برگ محاسبه گردید. با حل نمودن ۱ میلی‌گرم پودر BSA درون ۵ میلی لیتر آب مقطر دو بار تقطیر، محلول استاندارد پروتئین تهیه شد. ۵ میلی لیتر محلول برادفورد و حجم‌های تعیین‌شده‌ای از ۲۰ تا ۲۰۰ میکرولیتر از محلول استاندارد به ترتیب درون لوله‌های آزمایش ریخته و با آب مقطر به حجم ۵۰۰ میکرولیتر رسانده شدند. پس از آن جذب هر محلول رنگی استاندارد در طول موج ۵۹۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل UV-160A SHIMADZ خوانده شد و منحنی استاندارد رسم گردید (۲۶).

اندازه‌گیری عناصر سنگین (روی، سرب، کادمیم): ۰/۲ گرم از ماده خشک گیاهی (برگ) توزین و به هر کدام ۴ میلی لیتر اسیدنیتریک ۶۵ درصد اضافه شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار داده شدند، سپس به مدت ۶-۵ ساعت در آون ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته تا NO₂ تبخیر شود. بعد از خنک شدن، نمونه‌ها با کاغذ صافی، صاف شده و با آب مقطر به حجم ۱۰ میلی لیتر رسانده شدند. محلول‌های استاندارد ۲۶۱/۴۴ گرم بر مول نیترات روی (N₂O₆Zn. 4H₂O)، ۳۰۸/۴۷ گرم بر مول نیترات کادمیم (Cd (NO₃)₂.4H₂O) و ۳۳۱/۲۱ گرم بر مول نیترات سرب (N₂O₆Pb) تهیه شدند و جذب آن‌ها به همراه نمونه‌ها توسط دستگاه جذب اتمی مدل Shimadzu AA680 خوانده شد. نمودار استاندارد بر اساس جذب رسم و فرمول خطی محلول‌ها به دست آمد. بیش‌ترین جذب نیترات سرب در طول موج ۲۸۳/۳ نانومتر، نیترات روی در طول موج ۲۱۳/۹ نانومتر و نیترات کادمیم در طول موج ۲۲۸/۸ نانومتر مشاهده شد (۲۰).

درجه سانتی‌گراد در روز و فتوپریود ۱۲ ساعت روشنایی/۱۲ ساعت تاریکی قرار گرفتند. آبیاری هر هفته با توجه به نیاز گیاه، به میزان ۲۵۰ میلی لیتر محلول نیمه هوگلند صورت گرفت. طرح آماری مورد استفاده طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار در نظر گرفته شد. بعد از گذشت سه ماه و برداشت گیاه، اندازه‌گیری پروتئین، پروتئین و فلزات سنگین سرب، روی و کادمیم در بافت برگ صورت گرفت. کلیه آزمون‌ها و تیمارها در سه تکرار انجام شد. جهت آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار SPSS ۱۱ و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده گردید.

اندازه‌گیری پروتئین به روش Bathes: ۰/۱ تا ۰/۱ گرم از برگ خشک پودر شده را با ۱۰ میلی لیتر اسید سولفوریک ۳ درصد در لوله آزمایش‌های مخصوص هر تیمار مخلوط کرده و درب لوله آزمایش‌ها را با فویل بسته و به مدت یک ساعت در تاریکی و در دمای محیط قرار داده شدند. سپس ۲ میلی لیتر از عصاره به دست آمده را همراه با ۲ میلی لیتر معرف نین‌هیدرین و ۲ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال در لوله آزمایش ریخته و به مدت ۱ ساعت در حمام آب گرم با درجه حرارت ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از خارج کردن از حمام و سرد شدن لوله‌ها، ۴ میلی لیتر تولوئن به آن اضافه کرده و ۲۰ ثانیه خوب تکان داده تا کاملاً مخلوط شود. در لوله آزمایش دو فاز تشکیل می‌شود فاز آلی صورتی رنگ در بالا و فاز آبی بی‌رنگ و شفاف که در قسمت پایین قرار دارد. فاز آلی جهت رنگ‌سنجی در دستگاه اسپکتروفوتومتر SHIMADZ UV-160A و طول موج ۵۲۰ نانومتر استفاده شد (۲۵). برای رسم منحنی استاندارد از پروتئین خالص با غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میکرومولار استفاده و تمام مراحل کار روی آن انجام گردید. سپس منحنی استاندارد پروتئین رسم و مقدار پروتئین محلول با کمک این نمودار و بر اساس فرمول زیر در یک گرم بافت گیاهی بدست آمد.

$$X = [(A.B)/C]/(D/5)$$

در فرمول بالا، X مقدار پروتئین بافت بر حسب میکروگرم در گرم بافت خشک، A مقدار پروتئین به دست آمده از نمودار استاندارد بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر، B مقدار تولوئن استفاده شده بر حسب میلی لیتر، C عدد ملکولی پروتئین و D مقدار نمونه گیاهی توزین شده بر حسب گرم است.

نتایج

خشک برگ در شاهد و گیاهان تحت تیمار ۴ درصد مشاهده شد (جدول ۲). مقدار پرولین برگ در گیاهان تحت تیمار ۱ درصد، ۲ درصد، ۳ درصد و ۴ درصد به ترتیب ۱/۰۹، ۳/۷۳، ۲/۴۹ و ۴/۲۵ برابر گیاه شاهد است.

اختلاف معنی‌داری ($p \leq 0.05$) در خصوص مقدار کل پروتئین بین گیاهان شاهد و گیاهان تحت تیمار نفت مشاهده شد (جدول ۱). کم‌ترین و بیش‌ترین میزان پروتئین به ترتیب ۲/۷ و ۴/۵۱ میلی‌گرم در گرم بافت تر برگ در گیاه شاهد و گیاهان تحت تیمار ۲ درصد نفت مشاهده شد (شکل ۱). میزان پروتئین در گیاهان تیمار شده با میزان ۱ درصد، ۲ درصد و ۳ درصد نفت به ترتیب ۳۴/۸۱ درصد، ۶۷/۰۴ درصد و ۴۰/۳۷ درصد نسبت به گیاه شاهد افزایش داشت.

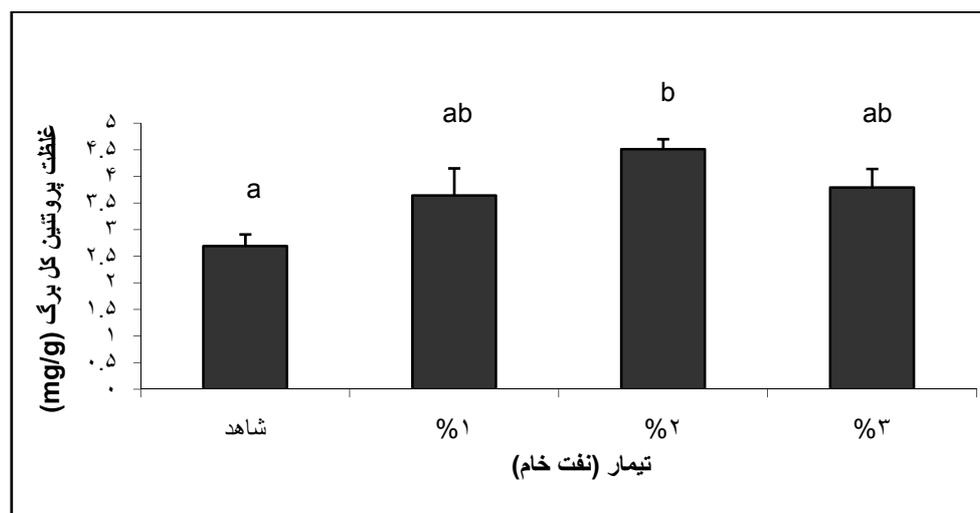
در غلظت‌های بالاتر از ۴ درصد گیاهان هیچ رشدی نداشتند. در غلظت ۴ درصد نیز رشد بسیار ناچیز بود و مقدار برگ‌ها تنها جهت سنجش پرولین کافی بود. بنابراین نتایج سنجش پروتئین و فلزات سنگین تنها در گیاهان شاهد و گیاهان تیمار شده با ۱ درصد، ۲ درصد و ۳ درصد نفت گزارش شده است. نتایج آنالیز واریانس (جدول ۱) اختلاف معنی‌داری ($p \leq 0.05$) بین مقدار پرولین موجود در برگ شاهد و گیاهان تحت تیمار نشان داد به طوری که میزان پرولین گیاهان رشد یافته در خاک آلوده از گیاه شاهد به مراتب بیش‌تر بود. با افزایش غلظت نفت خام مقدار پرولین برگ افزایش معنی‌داری نشان داد. کم‌ترین و بیش‌ترین میزان پرولین به ترتیب ۳۸/۸ و ۱۶۵ میکروگرم در گرم ماده

جدول ۱: جدول آنالیز واریانس اثر نفت خام بر مقادیر پرولین، پروتئین کل و غلظت عناصر روی Zn کادمیم Cd و سرب Pb در برگ افاقیا ۹۰ روزه.

Zn	Cd	Pb	پروتئین کل	پرولین	منابع تغییر
۳/۱۰۸ ^{ns}	۱/۴۹ ^{ns}	۳/۱۵ ^{ns}	۴/۷۶۰*	۶۲/۸۰۴**	اثر نفت خام
معنی‌دار در سطح ۱ درصد**			معنی‌دار در سطح ۵ درصد*		معنی‌دار نیست ^{ns}

جدول ۲: میانگین میزان پرولین (میکروگرم در گرم ماده خشک) برگ افاقیا در غلظت‌های مختلف نفت خام (۰ درصد، ۱ درصد، ۲ درصد، ۳ درصد و ۴ درصد). حروف یکسان عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌های مندرج را مطابق آزمون دانکن و برای کل جدول نشان می‌دهد. هر عدد میانگین ۳ تکرار می‌باشد.

شاخص	شاهد	۱درصد	۲درصد	۳درصد	۴درصد
پرولین	۳۸/۸ ^c ± ۰/۹۴	۴۲/۲ ^c ± ۱/۱۷	۱۴۴/۶ ^a ± ۲/۶۹	۹۶/۷ ^b ± ۶/۸۲	۱۶۵ ^a ± ۱۴/۴



شکل ۱: مقایسه غلظت پروتئین کل (میلی‌گرم بر گرم) بافت تر برگ گیاهان افاقیا شاهد و گیاهان رشد یافته در خاک آلوده به غلظت‌های مختلف نفت خام (۰ درصد، ۱ درصد، ۲ درصد، ۳ درصد). خطوط خطا نشان دهنده انحراف معیار است. حروف نامشابه، اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها مطابق آزمون دانکن را نشان می‌دهد. هر عدد میانگین ۳ تکرار می‌باشد.

جدول ۳: میانگین غلظت عناصر کادمیم، *Cd*، روی *Zn* و سرب *Pb* (*ppm*) در بافت خشک برگ افاقیا در غلظت‌های مختلف نفت خام (۰ درصد، ۱ درصد، ۲ درصد و ۳ درصد). حروف یکسان عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌های هر ردیف را مطابق آزمون دانکن نشان می‌دهد. هر عدد میانگین ۳ تکرار می‌باشد.

شاخص	شاهد	۱درصد	۲درصد	۳درصد
روی	۴/۰۲ ^b ±۰/۳۲	۴/۴۴ ^{ab} ±۰/۰۳	۵/۱۳ ^a ±۰/۳۹	۴/۱۹ ^{ab} ±۰/۲۳
سرب	۰/۳۵ ^b ±۰/۱۶	۷/۲۸ ^a ±۳/۸۲	۰/۵۳ ^b ±۰/۰۴	۰/۶۴ ^b ±۰/۰۲
کادمیم	۰/۱۲ ^a ±۰/۰۱	۰/۱۳۳ ^a ±۰/۰۰۸	۰/۱۳ ^a ±۰/۰۰۳	۰/۱۴ ^a ±۰/۰۰۶

فیزیولوژیکی متعددی برای تجمع پرولین در واکنش به تنش گزارش شده است که مهم‌ترین آن‌ها تاکید بر نقش پرولین به عنوان یک ماده تنظیم‌کننده اسمزی و عامل حفاظت‌کننده آنزیم‌های سیتوپلاسمی و ساختمان غشا می‌باشد. تجمع پرولین هنگامی رخ می‌دهد که پتانسیل آبی برگ به زیر حد آستانه لازم رسیده باشد. بالای این محدوده تغییرات پرولین اندک است (۲۹). پرولین هم‌چنین می‌تواند به عنوان یک جاروب‌کننده گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن (Reactive oxygen species) ROS (۳۰) و یک محافظ ملکولی جهت حفظ ساختار پروتئینی باشد (۲۸)

میزان پروتئین کل در گیاهان تحت تیمار ۱ درصد، ۲ درصد و ۳ درصد نفت خام نسبت به شاهد به ترتیب ۳۴/۸۱ درصد، ۶۷/۰۴ درصد و ۴۰/۳۷ درصد افزایش را نشان داد. افزایش غلظت پروتئین در گیاهان تحت تاثیر دی‌اکسیدسولفور موجود در نفت خام نیز گزارش شده است (۱۱) که این افزایش مربوط به سطح پروتئین سازگار است. با توجه به این که یکی از سازوکارهای گیاهان در سم‌زدایی اکسیدهای نیتروژن در برگ‌ها، سنتز پروتئین و اسیدهای آمینه می‌باشد، بنابراین افزایش اسیدهای آمینه و پروتئین در این مطالعه می‌تواند به دلیل اکسید سولفور و نیتروژن موجود در نفت خام باشد، یعنی افزایش میزان پروتئین در گیاهان تحت تنش را به وجود دی‌اکسیدگوگرد و نیتروژن در آلاینده هیدروکربنی نفت خام نسبت می‌دهند که به منظور سم‌زدایی اکسیدنیتروژن در برگ گیاهان ساخته می‌شوند (۱۱).

از بین عناصر مورد بررسی روی، بیش‌ترین و کادمیم کم‌ترین میزان جذب توسط گیاه و تجمع در برگ را نشان داد. گیاهان تحت تیمار ۲ درصد نسبت به شاهد، ۱/۲۸ برابر بیش‌تر، عنصر روی را در برگ‌های خود انباشته کرده است ولی در خصوص کادمیم، در هیچ گیاه تحت تیماری، انباشت صورت نگرفته بود. با توجه به ضروری بودن عنصر روی برای گیاهان و غیرضروری

کم‌ترین و بیش‌ترین میزان عنصر روی به ترتیب ۴/۰۲ و ۵/۱۳ ppm در بافت خشک برگ مربوط به گیاه شاهد و گیاهان تحت تیمار ۲ درصد بود. اختلاف معنی‌داری بین مقدار روی در برگ گیاهان شاهد و گیاهان تحت تیمار ۲ درصد مشاهده شد. گیاهان تحت تیمار ۲ درصد نسبت به شاهد، ۱/۲۸ برابر بیش‌تر، عنصر روی را در برگ‌های خود انباشته نموده بودند. همچنین اختلاف معنی‌داری بین مقدار سرب برگ‌های شاهد و گیاهان تحت تیمار ۱ درصد مشاهده شد. به طوری که کم‌ترین میزان عنصر سرب ۰/۳۵ ppm در شاهد و بیش‌ترین ۷/۲۸ ppm در بافت خشک برگ گیاهان تحت تیمار ۱ درصد مشاهده شد. به عبارت دیگر گیاهان تحت تیمار ۱ درصد نسبت به شاهد، ۲۰/۸ برابر عنصر سرب را در برگ‌هایش بیش‌تر انباشته نمود ولی در خصوص کادمیم، در هیچ گیاه تحت تیماری، انباشت صورت نگرفته بود. در گیاه شاهد بیش‌ترین عنصر یافت شده، روی بود. عنصر روی در همه گیاهان تحت تیمار نسبت به دو عنصر دیگر غلظت بیش‌تری داشت و غلظت کادمیم نسبت به سایر عناصر کمتر بود (جدول ۳).

بحث

برخی خصوصیات فیزیولوژیکی می‌تواند به عنوان یک نشان‌گر در تحمل آلودگی‌های محیطی استفاده شوند (۱۱). یکی از پاسخ‌های شناخته شده گیاهان به تنش‌های مختلف محیطی تجمع اسمولیت‌های سازگار مانند آمینواسیدهای پرولین، بتائین، گلاسیین و قند الکل‌ها است (۲۷). مقدار پرولین برگ در گیاهان تحت تیمار ۱ درصد، ۲ درصد، ۳ درصد و ۴ درصد به ترتیب ۱/۰۹، ۳/۷۳، ۲/۴۹ و ۴/۲۵ برابر مقدار پرولین برگ شاهد بود. بنابراین نفت خام موجود در خاک، به عنوان یک تنش محیطی، در افزایش تولید پرولین برگ افاقیا نقش مؤثری داشته است. از نظر محققین، در بسیاری از گیاهان پرولین آزاد در پاسخ به تأثیر تنش‌های زیستی و غیرزیستی انباشته می‌شود (۲۸). نقش‌های

germination and growth. Scientific Research and Essay(Academic J.). 2007; 2(4): 127-131.

3. Chupakhina GN, Maslennikov PV. Plant adaptation to oil stress. Russian J. of Ecology. 35:290-295. Translated from Ekologiya. 2004; 330-335.

4. Luepromchai E, Lertthamrongsak W, Pinphanichakarn P, Thaniyavarn S, et al. Biodegradation of PAHs in petroleum-contaminated soil using tamarind leaves as microbial inoculums. J. of Scienc Technology. 2007; 29: 515-527.

5. Anigboro A, Tonukari N. Effect of crude oil on invertase and amylase activities in cassava leaf extract and germinating cowpea seedlings. Asian J. of Biological Sciences. 2008; 1: 56-60.

6. Baek KH, Kim HS, Oh HM, Yoon BK, et al. Effects of crude oil, oil components, and bioremediation on plant growth. J. of Environmental Science and Health. 2004; 39(9): 2465-2472.

7. Victor JO, Sadiq AO. Effects of spent engine oil on the growth parameters chlorophyll and protein levels of *Amaranthus hybridus* L. J. of The Environmentalist. 2002; 22: 23-28.

8. Baker JM. The Effects of oils on plants. J. of Environmental Pollution. 1970; 1: 27-44.

9. Marwood CA, Solomon KR, Greenberg Bw. Chlorophyll fluorescence as a bioindicator of effects on growth in aquatic macrophytes from mixtures of PAHs. J. of Toxicology Chemical. 2001; 20: 890-898.

10. Meudec A, Poupard N, Dussauze, J, Deslandes E. Relationship between heavy fuel oil phytotoxicity and polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in *Salicornia fragilis*. J. of Science of the Total Environment. 2007; 381; 146-156.

11. Peretiemo-Clarke BO, Achuba FI. Phytochemical effect of petroleum on peanut (*Arachis hypogea*) seedlings. J. of Plant Pathology. 2007; 6 (2): 179-182.

12. Palford ID, Watson C. Phytoremediation of heavy metal contaminated land by tree a review. J. of Environmental. INT. 2003; 29: 529-40.

13. Gerhardt KE, Huang X, Glick BR, Greenberg BM. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. Plant Science. 2009; 176: 20-30.

14. Adam G, Duncan H. Influence of petroleum hydrocarbon on seed germination. J. of Environmental Pollution. 2002; 120: 363-370.

15. Shirdam R, Daryabeigi Zand A, Nabi Bidhendi G. Phytoremediation of hydrocarbon-contaminated

بودن کادمیم به نظر امری طبیعی است (۲۰). از طرفی در جذب کادمیم، عواملی مانند pH، مقدار هوموس خاک، میزان کادمیم محلول خاک و قابل دسترس برای گیاه، نیز تعیین کننده هستند (۲۰). اختلاف معنی داری بین مقدار سرب برگ گیاهان شاهد و گیاهان تحت تیمار ۱ درصد مشاهده شد. گیاهان تحت تیمار ۱ درصد نسبت به شاهد، ۲۰/۸ برابر عنصر سرب را در برگ هایش انباشته نموده بودند. این نتایج با مطالعه فلزات سنگین در افاقیا که در ترکیه انجام شده است مطابقت دارد (۲۰). در این مطالعه غلظت سرب در تیمار ۱ درصد معادل $7/28 \pm 3/82$ ppm یعنی بیش از حد طبیعی اندازه گیری گردید. لازم به ذکر است که غلظت کمتر از ۳ ppm سرب، غلظت طبیعی برای گیاهان گزارش شده است (۲۰). مقادیر ۱۴/۸۹-۶۲/۴۲ میکرو گرم بر گرم (۳۱) و ۲۱-۲۴۲ میکرو گرم (۲۰) سرب در برگ افاقیا نیز گزارش شده است. بنابراین افاقیا قادر است در محیط‌های آلوده، ضمن حفظ بقا و رشد معمولی خود، مقادیر بالای فلزات و سایر سموم را بدون داشتن علائم مرئی مشخص مثل کلروز و نکروز برگی در خود انباشت کند.

نتیجه گیری

با توجه به ویژگی‌های درخت زینتی افاقیا که به طور گسترده در نواحی شهری و روستایی رشد نموده و دارای محدوده جغرافیایی وسیع و توزیع اکولوژیک در کل جهان بوده و نیز کاشت و نگهداری آن آسان و کم هزینه است (۲۰)، به نظر می‌رسد که گیاه افاقیا بتواند در پالایش عناصر سرب و روی در خاک‌های آلوده به غلظت‌های پایین نفت خام موثر واقع شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله لازم می‌دانند از حوزه معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه اراک که حمایت مالی و اجرایی این تحقیق را به عهده داشتند صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

- Peng S, Zhou Q, Cai Z, Zhang Z. Phytoremediation of petroleum contaminated soils by *Mirabilis Jalapa* L. in greenhouse plot experiment. J. of Hazardous Materials. 2009; 168: 1490-1496.
- Akaninwor JO, Ayeleso AO, Monago CC. Effect of different concentrations of crude oil (Bonny light) on major food reserves in guinea corn during

- soils with emphasis on the effect of petroleum hydrocarbons on the growth of plant species. *J. of Phytoremediation*. 2008; 89: 21-29.
16. Singh OV, Jain RK. Phytoremediation of toxic aromatic pollutants from soil, *J. of Appl Microbiol Biotechnol*. 2003; 63: 128-135.
 17. Lee SH, Lee WS, Lee CH, Kim JG. Degradation of phenanthrene and pyrene in rhizosphere of grasses and legumes. *J. of Hazardous Materials*. 2008; 153: 892-898.
 18. Milner MJ, Kochian LV. Investigating heavy-metal hyperaccumulation using *Thlaspi caerulescens* as a Model System. *Annals of Botany*. 2008; 102(1): 3-13.
 19. Taneer FBG, Akonye, Love A. Effectiveness of *Vigna unguiculata* as a Phytoremediation Plant in the remediation of Crude oil polluted soil for Cassava (*Manihot Esculenta*; Crantz) Cultivation. *J. of Science Environment. Manage*. 2009; 13(1): 43-47.
 20. Celik A, Kartal AA, Akdogan, A, Kaska Y. Determining the heavy metal pollution in Denizli (Turkey) by using *Robinia pseudo-acacia* L. *J. of Environment International*. 2005; 31: 105-112.
 21. Anoliefo GO, Isikhuemhen OS, Ohimain EI. Sensitivity studies of the common bean (*Vigna unguiculata*) and maize (*Zea mays*) to different soil types from the crude oil drilling sites at Kutchalli. Nigeria, *J. of Soils Sediments*. 2006; 6 (1):30-36.
 22. Wang Y, Oyaizu H. Evaluation of the phytoremediation potential of four plant species for dibenzofuran-contaminated soil. *J. of Hazardous Materials*. 2009; 168: 760-764.
 23. Finch Savage WE, LeubnerMetzger G. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*. 2006; 171: 501-523.
 24. Hoagland DR, Arnon DI. The water-culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station Circular. 1950; 347: 1-32.
 25. Bathes LS, Waldren RP, Teare ID. Rapid determination of free proline for water stress studies. *J. of Plant and Soil*. 1973; 39: 205-207.
 26. Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry Quantities*. 1976; 72: 248-254.
 27. Hussein SH, Terry N. Phytomonitoring the unique colonization of oil-contaminated saline environment by *Limoniastrum monopetalum* L. Boiss in Egypt. *J. of Environment International*. 2002; 28: 127-135.
 28. Verbruggen N, Hermans C. Proline accumulation in plants. *J. of Amino Acids*. 2008; 35: 753-759.
 29. Levitt J. Salt and ion stresses response of plant to environmental stresses. Academic press. 1980; 2: 365-488.
 30. Smirnoff N, Cumbes QJ. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *J. of Phytochemistry*. 1989; 28: 1057-1060.
 31. Aksoy A, Sahin U, Duman F. *Robinia pseudo-acacia* L. as a Possible Biomonitor of Heavy Metal Pollution in Kayseri. *Turk J. of Botanical*. 2000; 24: 279-284.

Evaluation of the Phytoremediation of *Robinia pseudoacacia* L. in Petroleum- contaminated Soils with Emphasis on the Some Heavy Metals

Askary M^{1*}, Noori M¹, Biegi F², Amini F¹

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

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

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

Received: 9 Dec. 2011

Accepted: 3 Apr. 2012

Abstract

Aim: Petroleum is a complex mixture of thousands of hydrocarbon and non-hydrocarbon compounds, including heavy metals which potentially are carcinogenic and mutagenic. Phytoremediation has been shown to be effective for degradation or removing petroleum contaminants. Selection of plant species for phytoremediation, however, is complicated.

Material and Methods: The effects of petroleum pollution of soil (0%, 1%, 2%, 3% and 4% V/W) on the proline, total protein, lead, cadmium and zinc contents in *Acacia* leaves were investigated using methods of Bathes, Bradford and Atomic Absorption, respectively. The data were statistically analyzed using SPSS v11 and Duncan's test.

Results: The results showed that the total protein and proline contents increased significantly ($p \leq 0.05$) as the level of pollution increased. The highest proline content was measured at 4% treated plants. Proline accumulation is a common physiological response in many plants against a wide range of biotic and abiotic stresses. The results showed that lead and zinc accumulated by leaves. The leaf lead values were markedly, 20.8-fold, enhanced in 1%. There was not significant differences among cadmium levels in treatments and the control plants.

Conclusion: Based upon these results, *Robinia pseudoacacia* L. can be used as bioaccumulator in petroleum pollution and were selected for the further investigation of the phytoremediation of pb-contaminated soil.

Keywords: Heavy Metals, Petroleum pollution, Phytoremediation, *Robinia pseudoacacia* L