

تأثیر آلاینده نفتی فنانترن بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه وتیور (*Chrysopogon zizanioides*)

نادره نادری^۱، ساسان محسن‌زاده^{۱*}، علی مرادشاهی^۱، هاجر زمانی^۱ و مهدی زارعی^۲

^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شیراز، ^۲ گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۰۶، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۰/۱۰/۲۹)

چکیده

وتیور گیاهی از تیره گندمیان است که به دلیل مقاومت بالا، سازگاری با محیط‌زیست و قابلیت بالای جذب آلودگی‌ها، می‌تواند در فرآیندهای حذف آلاینده‌های محیطی مورد استفاده قرار گیرد. از بین ترکیبات نفتی، هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای به دلیل پایداری در محیط به عنوان آلوده‌کنندگان اولیه شناخته شده‌اند. فنانترن معمولاً بیش‌ترین غلظت و آلاینده‌ترین در بین ترکیبات آروماتیک نفتی است. در این پژوهش، گیاه وتیور در گلدان با غلظت‌های فنانترن صفر (کنترل منفی)، صفر با استون (کنترل مثبت)، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک خاک کاشته شد و اثرات فیزیولوژیکی آن مورد بررسی قرار گرفت. در بالاترین غلظت فنانترن میزان کلروفیل و کاروتنوئید به ترتیب ۲۰ درصد و ۲۱ درصد کاهش ولی ترکیبات فنولی، پرولین و فعالیت آن‌تی‌اکسیدانی افزایش یافت. وزن ریشه و بخش هوایی در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم فنانترن، کاهش معنی‌داری نسبت به شاهد داشت اما در غلظت‌های بعدی، شیب کاهشی آن کمتر شد. طول ریشه و حجم ریشه نیز روند کاهشی را نشان داد. چون فنانترن در ریشه انباشته شده است، لذا کاهش رشد بیشتری را نسبت به اندام هوایی نشان می‌دهد. حداکثر تجمع فنانترن در ریشه گیاه وتیور، ۵۱۹ میلی‌گرم بر کیلوگرم در حداکثر غلظت فنانترن (۴۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک خاک) مشاهده شد. با توجه به مقاومت وتیور به غلظت‌های بالای فنانترن و تجمع در ریشه آن، می‌تواند به عنوان گزینه بسیار مناسبی برای فرآیند گیاه پالایی ترکیبات نفتی بکار برده شود.

واژه‌های کلیدی: آلودگی نفتی، اثرات فیزیولوژیکی، گیاه پالایی، هیدروکربن‌های آروماتیک، گندمیان

مقدمه

آلومینیوم، منگنز و فلزات سنگینی از جمله آرسنیک، کادمیوم، کروم، نیکل، سرب، جیوه، سلنیم و روی موجود در خاک دارد (Truong and Baker, 1998; Truong et al., 2009). براساس ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی وتیور، از آن به صورت موفقیت‌آمیزی جهت احیای معادن تخریب‌شده سرب، روی، بوکسیت (Shu, 2003)، طلا، بتونیت، مس، الماس و پلاتین استفاده شده است (Truong et al., 2009). با وجود

گیاه وتیور *Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty از تیره گندمیان (Poaceae) است (Cheng et al., 2003). این گیاه به دلیل داشتن پتانسیل گیاه‌پالایی مورد توجه قرار گرفته است (Truong et al., 2009). راندمان گیاه وتیور در جذب مواد غذایی محلول مانند نیتروژن، پتاسیم، فسفر و یا فلزات سنگین در آب‌های آلوده، بسیار بالا است. وتیور مقاومت زیادی به

*نویسنده مسئول، نشانی پست الکترونیکی: mohsenz@shirazu.ac.ir

می‌آید (Atlas, 1981; Varjani et al., 2015). گیاه وتیور، یک علف تند رشد با یک سیستم ریشه‌ای وسیع و پیچیده است که توانایی جذب ۲،۴،۶-تری نیتروتولون را دارد (Makris et al., 2007). این گیاه توانایی گیاه‌پالایی فنول و هیدروکربن‌های نفتی را نیز دارد (Brandt et al., 2006; Singh et al., 2008). در مطالعه‌ای که به بررسی تأثیر ماندگاری گیاه وتیور تحت شرایط استفاده از غلظت‌های مختلف شیرابه پسماند شهری شهر شیراز انجام شد، گزارش شد که این گیاه می‌تواند تا غلظت شیرابه ۴۵ درصد را تحمل کرده و زنده بماند (محسن-زاده و همکاران، ۱۳۹۵). در مناطق نفتی اهواز غلظت‌های ۱، ۵ و ۱۰ درصد نفت خام را به خاک اضافه کردند و میزان حذف TPH (Total Petroleum Hydrocarbons) از خاک آلوده، در حضور و عدم حضور گیاه وتیور اندازه‌گیری شد و مشخص گردید که گیاه وتیور در غلظت‌های اضافه‌شده نفت خام زنده مانده و پالایش خاک را انجام می‌دهد (Takdastan et al., 2017). گیاه وتیور با تجمع کبالت و افزایش آن به‌طور معنی‌داری در گیاه‌پالایی کمک می‌کند (نادری و همکاران، ۱۳۹۲). همچنین گیاه وتیور قادر است فلز سنگین نیکل را از خاک حذف کرده و با انباشت آن در ریشه، به پاکسازی محیط‌زیست کمک نماید (نظری و همکاران، ۱۳۹۶).

در کار تحقیقاتی دیگری به مطالعه نقش گیاه سورگوم (*Sorghum vulgare*) در حذف آلاینده فوق با روش گیاه‌پالایی پرداخته شده است. به‌منظور بررسی تأثیر آلاینده بر فعالیت‌های فیزیولوژیک گیاه، ابتدا میزان کلروفیل و بیوماس تولیدی و سپس برای تعیین ریسک اکولوژیکی روش، میزان تجمع آلاینده مذکور در گیاه و خاک مطالعه شد. نتایج بدست آمده نشان داد که گیاه مذکور میزان حذف آلاینده در خاک را در شرایط اعمال‌شده تا ۲۰ درصد افزایش داده است و ثابت گردید که آلاینده در ناحیه ریزوسفر گیاه تجزیه شده است (علایی و همکاران، ۱۳۸۹).

طبق گزارش EPA (Environmental Protection Agency)، صنایع پالایشگاه نفت یکی از ده منبع اصلی آزادکننده مواد سمی به محیط است. در چند سال گذشته،

اینکه غلظت عناصر در وتیور به اندازه بیشتر انباشتگرها نیست، اما رشد سریع و تولید ماده فراوان (تولید ماده خشک سالیانه تا ۱۰۰ تن در هکتار) به وتیور این فرصت را داده است که حجم زیادتری از مواد غذایی و فلزات سنگین را از زمین‌های آلوده نسبت به بیش انباشتگرها برداشت کند. وتیور به‌صورت رضایت‌بخشی بر روی پسماندهای سدیمی با درصد سدیم قابل تبادل ۴۸٪ و معدن زغال با سطح سدیمی ۳۳٪ رشد می‌کند (Truong, 2004). استفاده از گیاهان به‌منظور حذف آلودگی‌ها از خاک‌های آلوده، انباشته‌کردن آن‌ها در ریشه و برداشت آن‌ها از ساقه و برگ را گیاه‌پالایی می‌گویند (Lasat, 2002; Tang et al., 2003). گیاه‌پالایی فناوری نوپایی است که به‌دلیل مزیت‌های مقرون به‌صرفه بودن، زیبایی و کاربرد طولانی مدت آن، باید برای پاکسازی مکان‌های آلوده در نظر گرفته شود (Boonyapookana et al., 2005; Su and Wong, 2004). گیاه‌پالایی معایبی نیز دارد که از آن جمله می‌توان به زمان بر بودن، تحت‌تأثیر اقلیم بودن، محدودبودن به منطقه ریشه و تأثیر احتمالی بر زنجیره غذایی اشاره کرد (احمدی و بیدلی، ۱۳۸۴). وتیور تحمل سازگاری با اقلیم‌هایی با شرایط متفاوت را دارا بوده و همچنین قادر است دامنه دمایی ۱۴- تا ۵۵ درجه سانتی‌گراد را تحمل کند (Truong and Baker, 1996). همچنین، دمای بهینه برای رشد وتیور ۲۵ درجه سانتی‌گراد است (Truong et al., 2009). مقاومت وتیور به اسیدیته خاک نیز بسیار بالا است (Du and Truong, 2003). راندمان وتیور در جذب مواد محلول مانند ترکیبات نیتروژن‌دار، پتاسیم، فسفات و همچنین فلزات سنگین موجود در آب‌های آلوده بالا گزارش شده است (Truong and Baker, 1998; Truong et al., 2009). وتیور به‌طور گسترده‌ای در آفریقا، هند، میانمار، سریلانکا و جنوب شرقی آسیا توزیع شده است (Moore et al., 2006). این گیاه بومی ایران نیست اما به‌دلیل اینکه بذر تولید نمی‌کند و در نتیجه عقیم بوده و مهاجم نیست، می‌تواند به عنوان یک گیاه‌پالای مناسب در ایران مورد استفاده قرار گیرد. نفت به‌عنوان یک منبع انرژی بسیار مهم و همچنین به‌عنوان ماده‌خام در پالایشگاه‌های نفت و صنایع شیمیایی وابسته، بشمار

فنانترن از هیدروکربن‌های آروماتیک است که معمولاً بیش‌ترین غلظت را در بین هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای در خاک‌های آلوده دارا است (Subramaniam *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2008). طی مطالعاتی که در زمینه تجزیه هیدروکربن‌های آروماتیک انجام شده، مشخص گردیده است که تجزیه زیستی فنانترن توسط ریز جانداران به کمک یک سری از آنزیم‌ها انجام می‌شود که در نهایت باعث تبدیل شدن فنانترن به مواد غیرسمی می‌گردد فنانترن با توجه به خواص شیمیایی و سرطان‌زایی که دارد معمولاً در تحقیقات زیست پالایی به‌عنوان سوبسترای میکروبی برای مطالعات متابولیسم ترکیبات PAHs مورد استفاده قرار می‌گیرد (Samanata *et al.*, 1999). فنانترن در لیست آلاینده‌ترین ترکیبات قرار گرفته است و باعث اثرات زیان‌آور زیستی می‌شود. افرادی که در معرض آلودگی این ماده قرار می‌گیرند، پوست آن‌ها به نور حساس شده و مقدار کمی آلرژی ایجاد می‌کند. در سیستم‌های باکتریایی تحت شرایط مشخص جهش‌زایی می‌شود (Coral *et al.*, 2012; Karagoz, 2005; Pinyakong *et al.*, 2012). فنانترن، از احتراق ناقص سوبستراهای آلی مانند زغال‌سنگ، نفت، گاز، چوب، زباله و از صنایع پتروشیمی و پالایشگاه‌های نفت ایجاد می‌شود (Santos *et al.*, 2008). قدرت تحمل اکثر گیاهان تا غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک فنانترن گزارش شده است و غلظت‌های بالاتر از آن باعث کاهش شدید زنده‌مانی گیاهان می‌شود (Muratova *et al.*, 2009). با کاشت گیاهان در محیط حاوی فنانترن، مقداری فنانترن در ریشه برخی گیاهان ذخیره می‌شود و مقداری از آن به ترکیبات هیدروکربنی دیگر تبدیل می‌شود (Wei and Pan, 2010). با تبدیل شدن فنانترن به ترکیبات دیگر، خواص آن تغییر می‌کند اما در مورد میزان تغییر سمیت و اثر آن بر تغذیه علف‌خواران و به‌دنبال آن، تغذیه گوشت‌خواران اطلاعات دقیقی در دسترس نیست.

با توجه به اینکه آلودگی بر اثر آلاینده‌های نفتی در محیط‌زیست به‌دلیل توسعه و پیشرفت صنعت رو به افزایش است و اینکه گیاه وتیور توانایی رشد و مقاومت زیادی در برابر خاک‌های آلوده از خود نشان داده است، تحقیق حاضر با

آلودگی هیدروکربن‌های نفتی، به‌دلیل سمیت آن برای ریز جانداران و دیگر موجودات از جمله انسان، به جدی‌ترین نگرانی‌های جهانی تبدیل شده است (Saeki *et al.*, 2009; Hasanuzzaman *et al.*, 2007; Varjani and Upasani, 2016). نفت خام مخلوطی از تعداد زیادی ترکیبات آلی (عمدتاً هیدروکربن‌ها) همراه با نیتروژن و سولفور و همچنین ترکیبات غیر آلی مانند فلزات است (Chandra *et al.*, 2013). هیدروکربن‌ها می‌توانند ترکیباتی بدون انشعاب یا انشعاب‌دار، آلیفاتیک‌های اشباع یا غیراشباع، آلیسیکلیک، آروماتیک و پلی‌آروماتیکی باشند (Zhang *et al.*, 2011; Waigi *et al.*, 2015; Lamichhane *et al.*, 2016; Wilkes *et al.*, 2016). هیدروکربن‌های نفتی به چهار شاخه اصلی تقسیم‌بندی می‌شوند: آلکان‌ها، ترکیبات آروماتیک از قبیل بنزن، تولوئن، اتیل بنزن، زایلن‌ها و هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon) (PAHs)، رزین‌ها شامل ترکیباتی که دارای نیتروژن، سولفور و اکسیژن بوده و در نفت حل می‌شوند و آسفالت‌ها که مولکول‌های پیچیده و درشتی به‌صورت کلوئیدی در نفت خام هستند (Gentili *et al.*, 2006; Abdel-Shafy and Mansour, 2016; Varjani, 2017). از بین آلودگی‌های هیدروکربن‌های نفتی، ۱۶ هیدروکربن آروماتیک چندحلقه‌ای، به‌دلیل پایداری در محیط، به‌عنوان آلوده‌کنندگان اولیه شناخته شده‌اند (Zhang *et al.*, 2011; Abdel-Shafy and Mansour, 2016; Lamichhane *et al.*, 2016; Varjani, 2017). این آلاینده‌ها به‌دلیل داشتن سمیت، تبخیر کم، مقاومت به تجزیه میکروبی و تمایل بالا به تشکیل رسوب، در بین سایر هیدروکربن‌های نفتی نگرانی بیشتری را سبب گردیده‌اند (Atlas, 1981; Louvado *et al.*, 2015; Abdel-Shafy and Mansour, 2016; Varjani and Upasani, 2016). اکنون، نگرانی‌ها درباره سلامتی انسان و خطرات محیطی فعالیت‌های صنعتی مرتبط با اکتشاف نفت خام و همچنین تخلیه عمدی یا تصادفی نفت در طول مراحل انتقال، تولید و پالایش آن رو به افزایش است (Baderna *et al.*, 2011; Ghosh *et al.*, 2015; Varjani *et al.*, 2015).

هدف بررسی تأثیر آلاینده نفتی فنانترون بر میزان رشد و همچنین ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه وتیور صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در گلخانه تحقیقاتی دانشکده علوم دانشگاه شیراز، در سال ۱۳۹۶، به مدت نه ماه انجام شد. پژوهش به صورت طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی در هفت سطح و سه تکرار اجرا شد که در آن اثر غلظت‌های مختلف فنانترون خاک بر روی گیاه وتیور، به مدت شش ماه مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۱۰۰ عدد گلدان نهالی وتیور از مرکز پرورش وتیور اهواز تهیه گردید. برگ‌های خشک وتیور حذف شده و در گلدان‌های نهالی جدید کاشته شد. جهت همسان‌بودن گلدان‌ها، در هر گلدان چهار بوته وتیور قرار داده شد و به مدت سه ماه مورد مراقبت قرار گرفت. خاک مورد نظر از منطقه دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز تهیه، همگن‌سازی و الک شد و جهت تعیین بافت و ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آن به آزمایشگاه تحویل داده شد (جدول ۱). فنانترون (شماره ثبت: ۸-۰۱-۸۵) با خلوص ۹۸ درصد محصول شرکت مرک آلمان به عنوان آلاینده مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۲). جهت ساخت تیمارهای مختلف فنانترون در خاک، فنانترون در استون حل و بر روی خاک اسپری شد. مقدار فنانترون مورد نیاز برای هر غلظت وزن شد و در ظروف جداگانه قرار داده شد، در هر ظرف به مقداری استون ریخته شد تا تمام فنانترون‌های موجود در ظرف حل شود، سپس از غلظت کمتر شروع کرده و در ظرف محلول‌پاش ریخته و بر خاک پهن شده بر روی نایلون اسپری شد و به همین ترتیب تا غلظت آخر اسپری انجام شد. در نهایت، هر کدام از غلظت‌های خاک آلوده‌شده به فنانترون، بطور کامل و چندین بار همگن‌سازی شد (Li et al., 2020). به دلیل ایجاد آلودگی مصنوعی (اسپری کردن فنانترون)، ۲۴ ساعت زمان داده شد تا استونی که برای حل کردن فنانترون استفاده شده بود، تبخیر گردد. سپس گیاه وتیور در خاک آلوده کاشته شد. در مطالعات قبلی، حداکثر تا غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم

خاک فنانترون استفاده شده است (Li et al., 2020; Wei and Pan, 2010; ۱۳۸۹). با توجه به مقاومت بالای وتیور و جنبه نوآوری کار، پژوهش اخیر شامل هفت سطح تیمار بود که عبارتند از: شاهد (خاک بدون آلاینده و بدون استون)، شاهد دوم (خاک بدون آلاینده و با حلال استون) و غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میلی‌گرم فنانترون در کیلوگرم وزن خشک خاک. جهت انجام پژوهش تعداد ۲۱ عدد از همسان‌ترین گلدان‌ها انتخاب شدند و پس از شستن ریشه‌ها، با توجه به رشد سریع ریشه وتیور و جهت محدود نشدن رشد آن، وتیور در گلدان‌های ۵ کیلویی در هفت سطح خاک مورد نظر کاشته شدند. اندازه‌گیری‌ها بر روی گیاهان حدود یک ساله انجام گرفت.

وزن خشک ریشه و بخش هوایی: مقدار یک گرم از بافت تر ریشه و یک گرم از بافت تر بخش هوایی جداسازی و بعد از خشک‌شدن در آون، وزن آن‌ها اندازه‌گیری شد و با توجه به آن وزن خشک کل ریشه و بخش هوایی محاسبه گردید. به دلیل اینکه برای برخی اندازه‌گیری‌های بعدی باید نمونه به صورت تر استفاده می‌شد لذا از روش وزن تر مستقیماً برای اندازه‌گیری استفاده کردیم.

حجم و طول ریشه: ریشه‌های هر تیمار پس از جداسازی و شستن، درون بشر یک لیتری مدرج که ۵۰۰ میلی‌لیتر آن از آب پر شده بود، فرو برده شد و میزان افزایش حجم آب درون بشر به عنوان حجم ریشه و اندازه بلندترین ریشه به عنوان طول ریشه گیاه در نظر گرفته شد.

محتوی نسبی آب برگ (RWC): مقدار یک گرم برگ بلافاصله بعد از جداشدن از گیاه به قطعات یک سانتی‌متری بریده و در لوله‌های استوانه‌ای شیشه‌ای حاوی ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر سرد قرار گرفت و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت پس از گرفتن آب ظاهری، وزن اشباع برگ‌ها اندازه‌گیری و سپس برگ‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در آون تهویه‌دار قرار داده شد پس از آن وزن خشک هر کدام اندازه‌گیری گردید (Barrs and Weatherle, 1962).

جدول ۱- آنالیز خاک

۲۲/۱۰	درصد لای	۳/۲	هدایت الکتریکی (میلی‌زیمنس در سانتی‌متر)
۱۵/۷۰	درصد رس	۷/۹۸	پی‌اچ
شنی لومی	بافت	۶۲/۲۰	درصد شن

جدول ۲- مشخصات فنانترن

فرمول شیمیایی	تعداد حلقه بنزن	وزن مولکولی (گرم در مول)	نقطه ذوب (درجه سانتی‌گراد)	نقطه جوش (درجه سانتی‌گراد)	میزان حلالیت در آب ۱۵ درجه سانتی‌گراد (میلی‌گرم در لیتر)
C ₁₂ H ₁₁	۳	۱۷۸/۲	۱۰۱	۳۴۰	۱/۶

کلروفیل و کارتنوئید: ابتدا ۰/۱ گرم برگ با ازت مایع در هاون پودر کرده و به درون فالدکون ریخته شد و با استون ۸۰ درصد به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده و محلول حاصل را درون اسپکتروفتومتر قرار داده و با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه (RPM) به مدت ۱۰ دقیقه سانتیفریوژ شد. جذب محلول رویی با دستگاه اسپکتروفتومتر شیماتزو ژاپن در طول موج ۶۶۳ و ۶۴۵ برای کلروفیل (Arnon, 1967) و طول موج ۴۷۰ برای کارتنوئید (Litchenthaler and Wellburn, 1983) خوانده شد.

فعالیت آنزیم کاتالاز: یک گرم برگ با ازت مایع در هاون پودر شد و با ۱۰ میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات ۲۰۰ میلی‌مولار کاملاً مخلوط گردید. سپس ۱۰ میکرولیتر تریتون ایکس-۱۰۰ به آن اضافه و مخلوط گردید. محلول حاصل را از پارچه ململ عبور داده و به عنوان عصاره خام برای تعیین فعالیت آنزیم کاتالاز استفاده شد. کلیه مراحل در درون ظرف یخ صورت گرفت. ۱۰۰ میکرولیتر عصاره خام، ۱ میکرولیتر هیدروژن پراکسید ۰/۳ مولار و ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات ۲۰۰ میلی‌مولار مخلوط گردید و توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۴۰ نانومتر در فواصل زمانی ۵ ثانیه به مدت ۱/۵ دقیقه جذب نور آن ثبت شد و میزان فعالیت آنزیم کاتالاز برحسب میکرومول H₂O₂ در دقیقه بر گرم وزن تر گزارش شد (Aebi, 1984).

ترکیبات فنولی: ۵۰۰ میلی‌گرم پودر خشک ساییده شده برگ را در یک لوله آزمایش ریخته، ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد به آن افزوده شد. لوله‌های آزمایش به مدت ۵ دقیقه در

دستگاه امواج فراصوت (اولتراسونیک) با شدت ۴۰ کیلوهرتز قرار دادیم و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰ سانتیفریوژ شد. محلول رویی برای سنجش مورد استفاده قرار گرفت. ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره را در لوله آزمایش ریخته و ۲/۵ میلی‌لیتر معرف فولین و ۲ میلی‌لیتر سدیم کربنات ۷/۵ درصد به آن افزوده شد. محتویات لوله آزمایش مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری، سپس جذب عصاره در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد. برای محاسبه غلظت ترکیبات فنولی از منحنی استاندارد گالیک اسید استفاده گردید (Gao et al., 2000).

پرولین: ابتدا ۰/۵ گرم برگ گیاه وتیور توسط ازت مایع در هاون پودر گردید و درون فالدکون ریخته شد، سپس ۱۰ میلی‌لیتر از سولفوسالسیلیک اسید ۳ درصد به آن اضافه گردید و در دستگاه سانتیفریوژ با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. ۲ میلی‌لیتر از محلول فوقانی سانتیفریوژ شده را به همراه ۲ میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر استیک اسید گلاسیال در لوله آزمایش ریخته و مخلوط می‌کنیم. محلول حاصل به مدت یک ساعت در حمام آب گرم با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از یک ساعت لوله‌های آزمایش را مستقیم به ظرف حاوی یخ منتقل کرده تا واکنش خاتمه یابد، سپس ۴ میلی‌لیتر تولوئن به محتوای داخل لوله اضافه گردید و به مدت ۳۰ ثانیه با دستگاه ورتکس به هم زده شد. جذب نوری محلول فوقانی در طول موج ۵۲۰ نانومتر

توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد و با استفاده از منحنی استاندارد میزان پرولین برحسب میکرومول بر گرم وزن تر محاسبه شد (Bates et al., 1973).

فنانترن موجود در گیاه: نمونه‌های گیاهی توسط ازت مایع در هاون پودر شدند. سپس مقدار مشخصی پودر نمونه گیاهی در حلال استون و دی‌کلرومتان با نسبت حجمی (۱:۱) ریخته و جهت استخراج فنانترن به مدت یک ساعت در دستگاه امواج فراصوت قرار داده شد. فاز رویی جدا و پس از سه بار تکرار مراحل استخراج، جهت آنالیز از دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) با مشخصات ستون ۲۵۰×۴/۶ میلی‌متر استفاده گردید.

داده‌های بدست آمده، با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS 16 تجزیه شدند و میانگین‌ها با آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال پنج درصد مورد مقایسه قرار گرفت. جهت رسم نمودارها از برنامه Excel استفاده گردید.

نتایج و بحث

شاخص‌های رشد: همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود با افزایش غلظت فنانترن، وزن خشک اندام هوایی و ریشه روند کاهشی محسوسی را نشان داد. تنش هیدروکربن‌های آروماتیک نفتی می‌تواند با ایجاد تنش در گیاه، باعث کاهش دفاع آنتی‌اکسیدانی شود که در پژوهش‌هایی به اثر تنش هیدروکربن‌های آروماتیک نفتی اشاره شده است (Liu et al., 2009; Jiang and Zhang, 2002; Alkio et al., 2005). کاهش دفاع آنتی‌اکسیدانی باعث آسیب سلول‌ها و بافت‌ها می‌شود. مولکول فنانترن همچنین ممکن است با میانکنش با گیرنده‌های آبسزیک اسید، باعث ایجاد تنش کم آبی در گیاه شود (Vanova et al., 2009). به خوبی مشخص شده است که در خاک‌های آلوده نفتی به دلیل خاصیت سمی هیدروکربن‌ها، میزان جذب آب و مواد غذایی کاهش می‌یابد و در نهایت، باعث کاهش رشد گیاه می‌گردد (Kirk et al., 2005). تأثیر مشابهی نیز برای آلودگی‌های محیطی دیگر مانند فلزات سنگین بر روی گیاه ذرت دیده شده است (Polti et al., 2011). نفت

خام و فرآورده‌های آن می‌توانند باعث کاهش رشد بخش هوایی و ریشه گیاه شوند که می‌تواند به تأخیر در رشد سلولی نیز مربوط باشد (Athar et al., 2016). با توجه به جدول ۳ نسبت وزن خشک اندام هوایی به ریشه روند افزایشی را نشان می‌دهد. با توجه به اینکه ریشه مستقیماً در معرض آلاینده قرار دارد کاهش رشد بیشتری نسبت به اندام هوایی داشته است. همچنین این احتمال وجود دارد که گیاه برای حفظ توده زیستی و فتوسنتز خود، بخش بیشتری از توده زیستی را به اندام هوایی اختصاص دهد. مطالعه‌ای که بر روی گیاه جو انجام شده نشان داد که توزیع زیست‌توده و همچنین فعالیت فیزیولوژیکی گیاهان رشد یافته در خاک‌های آلوده، نه تنها به سطح آلودگی، بلکه به نوع آلودگی نیز وابسته است (Pereira et al., 2010). حجم ریشه و تیور از اولین غلظت فنانترن (۲۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک)، تا ۶۲٪ کاهش یافت و پس از آن در غلظت‌های بالاتر، روند کاهشی شیب کمتری پیدا کرد. وزن خشک بخش هوایی و ریشه در غلظت ۴۰۰۰ میلی‌گرم فنانترن در کیلوگرم خاک نسبت به شاهد به ترتیب ۶۴/۶ و ۸۹/۴ درصد کاهش داشت. این یافته‌ها نشان می‌دهد که تکوین بخش‌های مختلف ریشه و افزایش قطر آن، نسبت به سایر شاخص‌های رشد، بیشتر تحت تأثیر سمیت فنانترن قرار می‌گیرد. میزان RWC در سطوح مختلف فنانترن اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. در مطالعه‌ای که روی ذرت انجام شد، مشخص گردید که میزان وزن خشک کل گیاه از ۰/۸۸ گرم در شاهد به ۰/۰۶ گرم در غلظت ۷۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک فنانترن کاهش یافت که نشان‌دهنده کاهش ۹۳ درصدی است. در همین مطالعه، میزان نسبی آب برگ با افزایش غلظت فنانترن، تغییر منظمی را نشان نداد اما میزان CO₂ ورودی به برگ نیز کاهش ۹۵ درصدی را نشان داد (Dupuy et al., 2015). طول ریشه از پایین‌ترین تا بالاترین غلظت فنانترن، کاهش تدریجی را نشان می‌دهد اما این کاهش در کمترین غلظت (۲۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک) و بیش‌ترین غلظت (۴۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک) محسوس‌تر است. در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک به نظر می‌رسد که شوک یکباره به دلیل وجود

جدول ۳- اثر فنانترن بر محتوی نسبی آب برگ و صفات رشدی اندام هوایی و ریشه گیاه وتیور

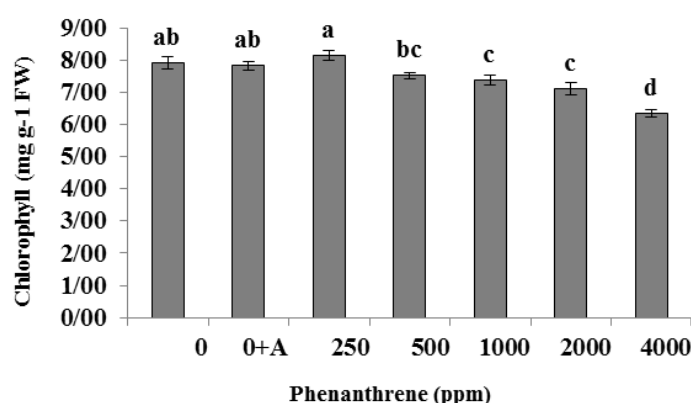
غلظت فنانترن در خاک (میلی گرم در کیلوگرم)	محتوی نسبی آب برگ (درصد)	وزن خشک اندام هوایی (گرم)	وزن خشک ریشه (گرم)	وزن خشک اندام هوایی به ریشه	حجم ریشه (میلی لیتر)	طول ریشه (سانتی متر)
صفر	۸۲/۲۳ ^a	۲۵/۶۸ ^a	۴۳/۸۲ ^a	۰/۶۱ ^c	۴۰۷ ^a	۹۲ ^a
صفر + استون	۷۹/۲۸ ^a	۲۴/۹۵ ^a	۴۰/۰۴ ^a	۰/۶۴ ^c	۴۱۰ ^a	۹۰ ^a
۲۵۰	۸۷/۳۵ ^a	۱۸/۶۵ ^b	۲۶/۷۴ ^b	۰/۶۹ ^c	۱۵۳ ^b	۷۳ ^b
۵۰۰	۸۳/۲۰ ^a	۱۷/۳۴ ^{bc}	۱۸/۲۰ ^c	۰/۹۵ ^{bc}	۱۴۲ ^{bc}	۶۷ ^b
۱۰۰۰	۸۵/۷۵ ^a	۱۱/۷۱ ^{bcd}	۹/۴۰ ^d	۱/۳۵ ^b	۱۲۲ ^{cd}	۶۵ ^b
۲۰۰۰	۸۴/۶۹ ^a	۱۲/۵۰ ^{cd}	۸/۶۷ ^d	۱/۴۰ ^b	۱۱۰ ^{de}	۶۲ ^b
۴۰۰۰	۸۱/۴۹ ^a	۹/۱۰ ^d	۴/۶۳ ^d	۱/۹۹ ^a	۸۸ ^e	۴۲ ^c

*در هر ستون حروف مشترک نشان‌دهنده عدم معنی‌داری است.

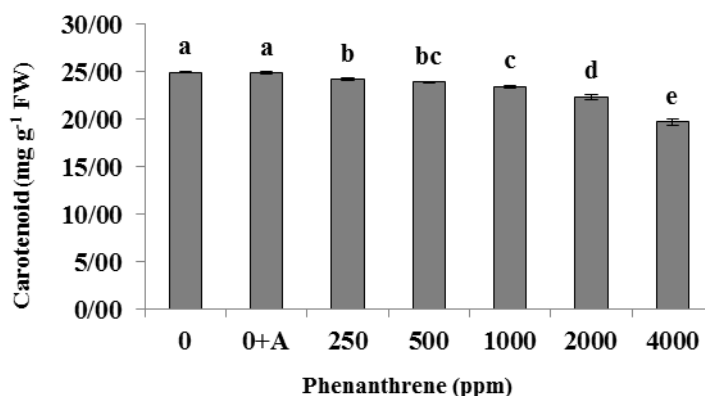
فنانترن در خاک باعث کاهش ناگهانی طول ریشه شده و در غلظت ۴۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک، تنش شدید فنانترن می‌تواند دلیل بر کاهش بیشتر طول ریشه باشد. در پژوهشی طول ریشه گیاه ذرت در آلودگی نفتی فنانترن مورد بررسی قرار گرفت و کاهش ۴۰ درصدی را نشان داد (Baoune et al., 2019).

کلروفیل و کاروتنوئید: همان‌طور که در شکل ۱ و ۲ مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت فنانترن، میزان کلروفیل و کاروتنوئید روند کاهشی دارد و در غلظت ۴۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک که بالاترین غلظت فنانترن است، نسبت به گیاهان شاهد کاهش ۲۰ و ۲۱ درصدی به‌ترتیب در میزان کلروفیل و کاروتنوئید مشاهده شد که می‌تواند به‌دلیل مقاومت بالای گیاه وتیور و تلاش برای فعالیت فتوسنتزی باشد. محتوای کلروفیل برگ‌ها به‌عنوان شاخصی برای تنش گیاهان در نظر گرفته می‌شود (Huang et al., 2004). پژوهشی بر روی گیاه ذرت نشان داد که هیدروکربن‌های نفتی باعث کاهش معنی‌دار مقدار کلروفیل و کاروتنوئید می‌شوند که با روند پژوهش حاضر برای وتیور سازگار است (Baoune et al., 2019). همچنین در گیاه یونجه غلظت ۴۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک فنانترن، باعث کاهش ۲۸ درصدی مقدار کلروفیل شده است (Li et al., 2020). اما در پژوهش حاضر در غلظت ۴۰۰۰

میلی‌گرم در کیلوگرم خاک فنانترن، کاهش میزان کلروفیل برگ در مقایسه با شاهد تنها ۲۰ درصد بود که نشان می‌دهد گیاه وتیور مقاومت فوق‌العاده‌ای در برابر آلاینده نفتی فنانترن از خود نشان داده است. اثر فنانترن بر روی آرابیدوپسیس، باعث سرکوب ژن‌های درگیر در چرخه کالوین، تنفس نوری و ساخت آمینواسیدها و نوکلئوتیدها می‌شود که کاهش میزان کلروفیل در پژوهش‌های مختلف را توجیه می‌کند. با گذشت زمان، به‌دلیل کاهش فعالیت فتوسنتزی ناشی از کاهش آنزیم‌ها و عملکرد آنها، گیاه وتیور سعی در حفظ میزان کلروفیل می‌نماید (Dumas et al., 2016). در غلظت ۳۷ میلی‌گرم در کیلوگرم فنانترن وزن خشک خاک، هیچ تغییری در میزان کلروفیل گیاه نی مشاهده نمی‌شود درحالی‌که در همان غلظت در گیاه سودا (*Suaeda salsa*) ۷۳ درصد کاهش کلروفیل دیده می‌شود (Zhu et al., 2014) که نشان می‌دهد گیاهان مختلف، مقاومت متفاوتی در برابر تنش آلاینده فنانترن نشان می‌دهند. گیاهان وتیور و نی که هر دو از خانواده گندمیان هستند، مقاوم به آلاینده‌های نفتی بوده و گیاه‌پالا هستند. **فعالیت آنزیم کاتالاز:** در شکل ۳ با افزایش غلظت فنانترن، میزان فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش می‌یابد. سرعت این افزایش تا غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک فنانترن بسیار کند بود اما از غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک فنانترن،



شکل ۱- اثر فنانترن خاک بر میزان کلروفیل گیاه وتیور. هر عدد نشان‌دهنده میانگین $\pm$ انحراف معیار. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار براساس آزمون (LSD) در سطح $\alpha = 0/05$ است. بارها در هر ستون نمودار نشان‌دهنده خطای استاندارد است.

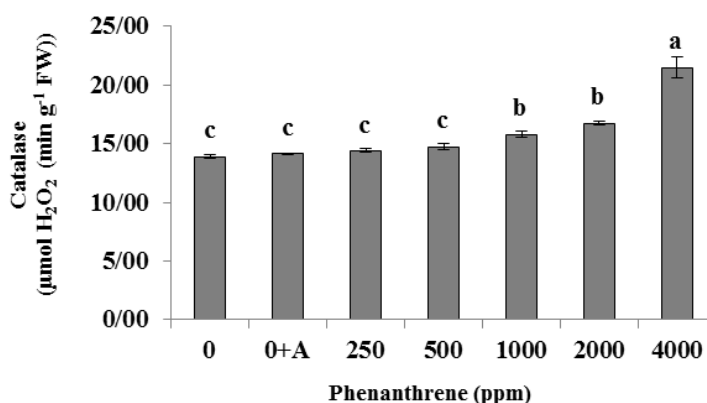


شکل ۲- اثر فنانترن خاک بر میزان کارتنوئید گیاه وتیور. هر عدد نشان‌دهنده میانگین $\pm$ انحراف معیار. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار براساس آزمون (LSD) در سطح $\alpha = 0/05$ است. بارها در هر ستون نمودار نشان‌دهنده خطای استاندارد است.

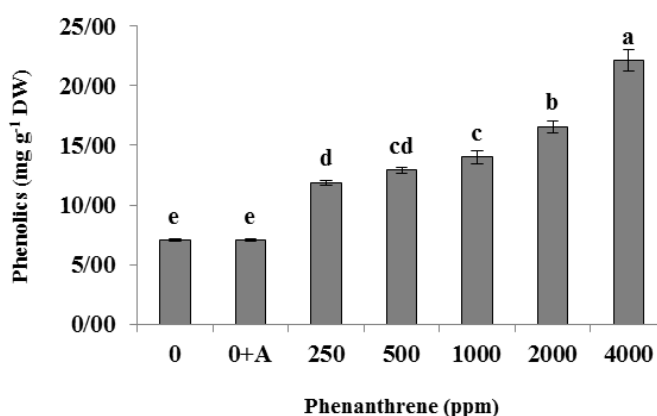
آنزیمی است که H_2O_2 را در سلول‌های گیاهی به آب و اکسیژن تبدیل می‌نماید (Li and Yi, 2012). البته پژوهش‌هایی از جوانه‌زنی بذر گندم نشان داده است که با افزایش غلظت فنانترن، میزان فعالیت کاتالاز کاهش می‌یابد (Wei et al., 2014). دلیل این کاهش فعالیت می‌تواند به ضعیف بودن جوانه‌های تازه برگردد (سبحانی و همکاران، ۱۳۹۸).

ترکیبات فنولی: بر طبق شکل ۴ میزان ترکیبات فنولی در غلظت ۲۵۰ فنانترن، افزایش ۶۹ درصدی را نسبت به شاهد نشان داد. شیب این افزایش در غلظت‌های ۵۰۰ و فنانترن کم‌تر ولی در غلظت ۴۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک بیش‌ترین میزان فنول مشاهده شد و مقدار این ترکیبات نسبت ۱۰۰۰

سرعت افزایش فعالیت آنزیم افزایش معنی‌دار داشت و بالاترین میزان فعالیت کاتالاز در غلظت ۴۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک فنانترن مشاهده شد که نسبت به تیمار ۲۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک فنانترن افزایش ۲۸ درصدی داشت که بیان‌کننده قدرت گیاه وتیور در غلظت بالای فنانترن جهت حذف رادیکال‌های آزاد است. گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در طی تنش‌ها در گیاهان تولید می‌شوند و می‌توانند به‌صورت رادیکال‌های سوپراکسید، باعث آسیب رساندن به بخش‌های مختلف سلول‌های گیاهی شوند. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) اولین دفاع گیاهان در برابر ROS است که باعث تبدیل O_2^- به H_2O_2 و O_2 می‌شود (Alscher et al., 2002). کاتالاز



شکل ۳- اثر فنانترن خاک بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز گیاه وتیور. هر عدد نشان‌دهنده میانگین $\pm$ انحراف معیار. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار براساس آزمون (LSD) در سطح $\alpha = 0/05$ است. بارها در هر ستون نمودار نشان‌دهنده خطای استاندارد است.

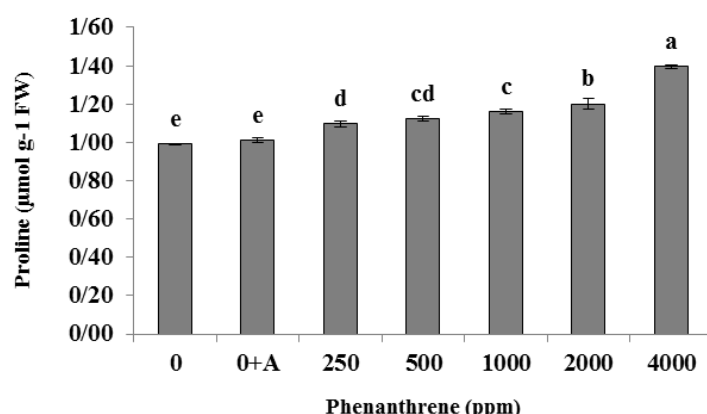


شکل ۴- اثر فنانترن خاک بر میزان ترکیبات فنولی گیاه وتیور. هر عدد نشان‌دهنده میانگین $\pm$ انحراف معیار. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار براساس آزمون (LSD) در سطح $\alpha = 0/05$ است. بارها در هر ستون نمودار نشان‌دهنده خطای استاندارد است.

کاروتنوئید شده است. ترکیبات فنولی گروه بزرگی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند که نقش مهمی را در مقابله با تنش‌ها بازی می‌کنند. پژوهش‌ها نشان داده است که میزان این ترکیبات در گیاهان طی تنش‌ها افزایش می‌یابد. این ترکیبات می‌توانند گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) را خنثی نموده و از اثر تخریبی آن‌ها بر گیاه جلوگیری نمایند (Krol et al., 2014). اگرچه بسیاری از تحقیقات افزایش چند برابری فنول‌ها طی تنش را گزارش کرده‌اند اما بعضی از پژوهش‌ها نیز نشان می‌دهد که افزایش فنول‌ها طی تنش‌ها در برخی گیاهان کمتر است (Ramakrishna and Ravishankar, 2011).

پرولین: با توجه به شکل ۵ با افزایش غلظت فنانترن در

به شاهد تا سه برابر افزایش یافت. افزایش مقدار فنول در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک، نشانگر تنش وارد شده به گیاه است و در غلظت ۴۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک فنانترن، شدت بالای این تنش باعث افزایش چشمگیر این ترکیبات در گیاه شده که باعث مقاومت وتیور به تنش و حفاظت گیاه در برابر آن شده است. در شرایط تنش، در صورتی که ترکیبات فنولی افزایش پیدا نکند، رادیکال‌های آزاد تولید شده طی تنش، باعث آسیب به بخش‌های مختلف سلول گیاهی مانند DNA، غشای سلولی و کلروپلاست‌ها می‌شود در نتیجه، افزایش فنول‌ها در غلظت‌های بالای فنانترن، باعث کاهش بسیار کم میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی کلروفیل و



شکل ۵- اثر فنانترن خاک بر میزان پرولین گیاه وتیور. هر عدد نشان‌دهنده میانگین $\pm$ انحراف معیار. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار براساس آزمون (LSD) در سطح $\alpha = 0/05$ است. بارها در هر ستون نمودار نشان‌دهنده خطای استاندارد است.

از طریق برهمکنش با اتصالات زنجیرهای جانبی پروتئین‌ها منجر به القای تغییرات فضایی در پروتئین آنزیم شده و بهبود فعالیت آنزیم و ثبات ساختار آن‌ها را در شرایط تنش موجب می‌شود (Hayat et al., 2012). تحت تنش فلزات سنگین، میزان پرولین در وتیور تا پنج برابر افزایش یافته است (Banerjee et al., 2016).

فنانترن: در پژوهش حاضر، در هیچ کدام از تیمارهای فنانترن، تجمع فنانترن در بخش هوایی مشاهده نشد اما با افزایش غلظت فنانترن، میزان آن در ریشه گیاه افزایش یافت. میزان تجمع فنانترن در تیمارهای مختلف ریشه گیاه وتیور برابر با ۱۳، ۳۱، ۸۴، ۲۳۴ و ۵۱۹ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌ترتیب برای غلظت‌های فنانترن ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم بود. گزارش‌ها درباره علت عدم حضور فنانترن در بخش هوایی گیاه متفاوت است. در پژوهشی بیان شده است که فنانترن با ضریب ۴/۴۶ برابر در ریشه ذخیره می‌شود و نمی‌تواند به سمت بخش‌های هوایی گیاه سورگوم حرکت کند که با یافته‌های پژوهش حاضر همسو است (علایی و همکاران، ۱۳۸۹). اما مطالعات دیگری نشان داده‌اند که فنانترن به مقدار کمی می‌تواند در بخش هوایی گیاه نیز تجمع یابد (Alsgayer et al., 2020). با توجه به اینکه یکی از روش‌های گیاه‌پالایی در گیاهان، تخریب گیاهی (Phytodegradation) است، این احتمال وجود دارد که فنانترن پس از انتقال به بخش هوایی

خاک، میزان پرولین افزایش یافت به‌طوری‌که از غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک تا ۲۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک فنانترن، یک روند افزایشی را نشان می‌دهد و در غلظت ۲۰۰۰، ۲۰ درصد افزایش پرولین نسبت به شاهد دیده می‌شود. در غلظت ۴۰۰۰ فنانترن، روند افزایش مقدار پرولین سریع‌تر شده و ۴۰ درصد افزایش پرولین را نسبت به شاهد نشان می‌دهد. انباشت پرولین در بافت‌های گیاهی یک نشانه مشخص از تنش‌های محیطی است (Jaleel et al., 2007; Routley, 1966). تحقیقات نشان می‌دهد که پرولین نقشی سازگارکننده در تحمل گیاه در برابر تنش‌ها بازی می‌کند (Verbruggen and Hermans, 2008). علاوه بر نقش پرولین در برقراری تعادل اسمزی، تجمع پرولین تحت شرایط تنش در برقراری و ثبات ساختارهای سلولی (غشاها و پروتئین‌ها)، حذف رادیکال‌های آزاد، بافری نمودن پتانسیل احیایی سلول (Hayat et al., 2012)، انتقال پیام درون سلول و تأمین منبع ذخیره کربن و نیتروژن مؤثر است (Celik and Unsal, 2013). کاهش حالت اسیدی سیتوپلاسم و نگهداری غلظت مناسب $NADP^+/NADPH$ درون سلول از دیگر نقش‌های پرولین در طول شرایط تنش محسوب می‌شود (Hare and Cress, 1997). ساختار سه بعدی پروتئین‌ها در نتیجه برهمکنش یونی، هیدروفوبیک/هیدروفیلیک و یا برهمکنش بین زنجیرهای جانبی آمینواسیدهای تشکیل‌دهنده آن‌ها شکل می‌گیرد. پرولین

گیاه، در آنجا تجزیه شده و حتی به یک منبع کربنی برای گیاه تبدیل گردد. در سیستم تالاب مصنوعی با غلظت ۲۰۰ میلی گرم در کیلوگرم فناترن، ریشه وتیور می‌تواند فناترن را تا ۶۴ میلی گرم در کیلوگرم و ریشه گیاه نی می‌تواند آن را ۱۹۲ میلی گرم در کیلوگرم انباشت کند (Alsghayer et al., 2020). با غلظت ۳۲۲ میلی گرم در کیلوگرم فناترن در خاک، این ترکیب تا ۱۶/۵ میلی گرم در کیلوگرم در ریشه گیاه کلم انباشت می‌شود (Wei and Pan, 2010).

نتیجه‌گیری

هدف این پژوهش تأثیر آلاینده نفتی فناترن بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه وتیور بوده است. این گیاه هم می‌تواند به عنوان گیاهی برای فضای سبز در محیط‌های با آلودگی نفتی بکار برده شود و هم نقش گیاه پالایی دارد. پژوهش اخیر نشان داد که گیاه وتیور نسبت به سایر گیاهان مقاومت استثنایی در برابر آلاینده نفتی فناترن را دارا است. اگر چه شاخص‌های رشد و رنگیزه‌های فتوسنتزی وتیور در تنش آلاینده نفتی فناترن روندی کاهشی داشت اما این کاهش نسبت به غلظت فناترن بکار رفته و در مقایسه با سایر گیاهان بسیار کم بود. خصوصیات فیزیولوژیک گیاه وتیور شامل میزان

منابع

- احمدی، ا. م. و بیدلی، ع. (۱۳۸۴) گیاه پالایی، روشی نوین در اصلاح خاک‌ها و آب‌های آلوده. چهارمین همایش بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران، کرمان، ایران.
- بسال‌پور، ع. ا.، حاج عباسی، م. ع.، درستکار، و. و ترابی، غ. (۱۳۸۹) اصلاح خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی و روش ترکیبی زمین پالایی - گیاه پالایی. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، علوم آب و خاک ۵۳: ۱۴۲-۱۲۹.
- سبحانی، ا.، صالحی لیسار، س. ی. و موافقی، ع. (۱۳۹۸) بررسی مقایسه‌ای تأثیر فناترن و پیرن بر جوانه‌زنی، رشد و فعالیت آنزیم‌های پاداکساینده گیاهچه‌های گندم زراعی (*Triticum aestivum* L.). مجله علمی پژوهشی اکوفیزیولوژی گیاهی ۳۹: ۱۳۷-۱۲۶.
- علایی، ا.، وکیلی، ف. و شریف، م. (۱۳۸۹) گیاه‌پالایی خاک‌های آلوده به فناترن با استفاده از گیاه سورگوم. مجله محیط‌شناسی ۵۳: ۷۹-۸۸.
- محسن‌زاده، س.، نادری، ن. و نظری، م. (۱۳۹۵) پاسخ‌های فیزیولوژیکی گیاه وتیور به شیرابه پسماند شهری. زیست‌شناسی گیاهی ایران ۲۸: ۷۹-۹۶.
- نادری، ن.، نظری، م. و محسن‌زاده، س. (۱۳۹۲) رشد ریشه گیاه وتیور و نقش گیاه‌پالایی آن در پاسخ به غلظت‌های مختلف شیرابه پسماند شهری. نخستین همایش تخصصی زیست‌پالایی، تهران، ایران.

پرولین، ترکیبات فنولی و فعالیت آنزیم کاتالاز با افزایش غلظت فناترن موجود در خاک روند افزایشی داشت که بیانگر قدرت بالای گیاه وتیور در مقابله با تنش آلودگی نفتی است. با توجه به اینکه فناترن بیشتر در ریشه گیاه انباشت شده است، ریشه دچار سمیت بیشتری شده و در نتیجه کاهش رشد بیشتری را نسبت به اندام هوایی نشان می‌دهد. کلروفیل کاهش داشته است اما اثر سمیت فناترن بر بیوشیمی فتوسنتز هم صورت گرفته است. مانند زنجیره انتقال الکترون و چرخه کلوین حداکثر تجمع فناترن در ریشه گیاه وتیور ۵۱۹ میلی گرم در کیلوگرم بود که در غلظت ۴۰۰۰ میلی گرم در کیلوگرم خاک فناترن خاک مشاهده شد. این روند افزایشی نشان داد که گیاه وتیور احتمالاً در غلظت‌های بالاتر از ۴۰۰۰ میلی گرم در کیلوگرم خاک فناترن نیز امکان زنده ماندن و جذب این آلاینده از خاک را دارا است. با توجه به مقاومت وتیور به غلظت‌های بالای فناترن و تجمع در ریشه آن، می‌تواند به عنوان گزینه بسیار مناسبی برای فرآیند گیاه‌پالایی ترکیبات نفتی بکاربرده شود. همان‌طور که قبلاً ذکر گردید گیاه وتیور بذر تولید نمی‌کند و از طریق پاجوش تکثیر می‌شود لذا خطر گسترش خارج از کنترل را ندارد.

نظری، م.، نادری، ن. و محسن‌زاده، س. (۱۳۹۶) گیاه‌پالایی گیاه وتیور در پاسخ به غلظت‌های مختلف شیرابه پسماند شهری. اولین همایش ملی توسعه پایدار و مدیریت شهری، سیرجان، کرمان، ایران.

- Abdel-Shafy, H. I. and Mansour, M. S. M. (2016) A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum* 25: 107-123.
- Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105: 121-126.
- Alkio, M., Tabuchi, T. M., Wang, X. and Colon-Carmona, A. (2005) Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in *Arabidopsis* include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms. *Journal of Experimental Botany* 56: 2983-2994.
- Alscher, R. G., Erturk, N. and Heath, L. S. (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 1331-1341.
- Alsghayer, R., Salmiaton, A., Mohammad, T., Idris, A. and Ishak, C. F. (2020) Removal efficiencies of constructed wetland planted with *phragmites* and *vetiver* in treating synthetic wastewater contaminated with high concentration of PAHs. *Sustainability* 12: 3357-3375.
- Arnon, A. N. (1967) Method of extraction of chlorophyll in the plants. *Agronomy Journal* 23: 112-121.
- Athar, H. R., Ambreen, S., Javed, M., Hina, M., Rasul, S., Zafar, Z. U., Manzoor, H., Ogbaga, C. C., Afzal, M., Al-Qurainy, F. and Ashraf, M. (2016) Influence of sub-lethal crude oil concentration on growth, water relations and photosynthetic capacity of maize (*Zea mays* L.) plants. *Environmental Science and Pollution Research International* 23: 18320-18331.
- Atlas, R. M. (1981) Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective. *Microbiological Reviews* 45: 180-209.
- Baderna, D., Maggioni, S., Boriani, E., Gemma, S., Molteni, M., Lombardo, A., Colombo, A., Bordonali, S., Rotella, G., Lodi, M. and Benfenati, E. (2011) A combined approach to investigate the toxicity of an industrial landfill's leachate: Chemical analyses, risk assessment and in vitro assays. *Environmental Research* 111: 603-613.
- Banerjee, R., Goswami, P., Pathak, K. and Mukherjee, A. (2016) Vetiver grass: An environment clean-up tool for heavy metalcontaminated iron ore mine-soil. *Ecological Engineering* 90: 25-34.
- Baoune, H., Aparicio, J. D., Acuna, A., Hadj-khelil, A. O. E., Sanchez, L., Polti, M. A. and Alvarez, A. (2019) Effectiveness of the *Zea mays-Streptomyces* association for the phytoremediation of petroleum hydrocarbons impacted soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 184: 109591.
- Barrs, H. D. and Weatherley, P. E. (1962) A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Australian Journal of Biological Sciences* 15: 413-428.
- Bates, L. S. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207.
- Boonyapookana, B., Parkpian, P., Techapinyawat, S., Delaune, R. D. and Jugsujinda, A. (2005) Phytoaccumulation of lead by sunflower (*Helianthus annuus*), tobacco (*Nicotiana tabacum*), and vetiver (*Vetiveria zizanioides*). *Journal of Environmental Science and Health* 40: 117-137.
- Brandt, R., Merkl, N., Schultze-Kraft, R., Infante, C. and Broll, G. (2006) Potential of vetiver (*Vetiveria zizanioides* (L.) Nash) for phytoremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soils in Venezuela. *International Journal of Phytoremediation* 8: 273-284.
- Celik, O. and Unsal, S. G. (2013) Expression analysis of proline metabolism-related genes in salt-tolerant soybean mutant plants. *Plant Omics Journal* 6: 364-370.
- Chandra, S., Sharma, R., Singh, K. and Sharma, A. (2013) Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon. *Annals of Microbiology* 63: 417-431.
- Cheng, H., Yang, X., Liu, A., Fu, H. and Wan, M. (2003) A study on the performance and mechanism of soil-reinforcement by herb root system. In: *Proceedings of the 3th International Vetiver Conference*, Guangzhou, China.
- Coral, G. and Karagoz, S. (2005) Isolation and characterization of phenanthrene-degrading bacteria from a petroleum refinery soil. *Annals of Microbiology* 55: 255-259.
- Du, L. V. and Truong, P. N. (2003) Vetiver grass system for erosion control on severe acid sulfate soil in southern Vietnam. In: *Proceedings of the 3th International Vetiver Conference*, Guangzhou, China.
- Dumas, A. S., Taconnat, L., Barbas, E., Rigai, G., Catrice, O., Bernard, D., Benamar, A., Macherel, D., Amrani, E. A., and Berthome, R. (2016) Unraveling the early molecular and physiological mechanisms involved in response to phenanthrene exposure. *BMC Genomics* 17: 818.
- Dupuy, J., Ouvrard, S., Leglise, P. and Sterckeman, T. (2015) Morphological and physiological responses of maize (*Zea mays*) exposed to sand contaminated by phenanthrene. *Chemosphere* 124: 110-115.
- Gao, X., Ohlander, M., Jeppsson, N., Bjork, L. and Trajkovski, V. (2000) Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruit of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during maturation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48: 1458-1490.
- Gentili, A. R., Cubitto, M. A., Ferrero, M. and Rodriguez, M. S. (2006) Bioremediation of crude oil polluted seawater

- by a hydrocarbon-degrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes. *International Biodeterioration and Biodegradation* 57: 222-228.
- Ghosh, P., Gupta, A. and Thakur, I. S. (2015) Combined chemical and toxicological evaluation of leachate from municipal solid waste landfill sites of Delhi, India. *Environmental Science and Pollution Research* 22: 9148-9158.
- Hare, P. D. and Cress, W. A. (1997) Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulator* 21: 79-102.
- Hasanuzzaman, M., Ueno, A., Ito, H., Yamamoto, Y., Yumoto, I. and Okuyama, H. (2007) Degradation of long-chain n-alkanes C₃₆ and C₄₀ by *Pseudomonas aeruginosa* strain WatG. *International Biodeterioration and Biodegradation* 59: 40-43.
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J. and Ahmad, A. (2012) Role of proline under changing environments: A review. *Plant Signaling and Behavior* 7: 1456-1466.
- Huang, X. D., El-Alawi, Y., Penrose, D. M., Glick, B. R. and Greenberg, B. M. (2004) Responses of three grass species to creosote during phytoremediation. *Environmental Pollution* 130: 453-463.
- Jaleel, C. A., Gopi, R., Sankar, B., Manivannan, P., Kishorekumar, A., Sridharan, R. and Pan-neerselvam, R. (2007) Studies on germination, seedling vigor, lipid peroxidation and proline metabolism in *Catharanthus roseus* seedlings under salt stress. *South African Journal of Botany* 73: 190-195.
- Jiang, M. and Zhang, J. (2002) Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. *Journal of Experimental Botany* 53: 2401-2410.
- Kirk, J. L., Klironomos, J. N., Lee, H. and Trevors, J. T. (2005) The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil. *Environmental Pollution* 133: 455-465.
- Krol, A., Amarowicz, R. and Weidner, S. (2014) Changes in the composition of phenolic compounds and antioxidant properties of grapevine roots and leaves (*Vitis vinifera* L.) under continuous of longterm drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 36: 1491-1499.
- Lamichhane, S., BalKrishna, K. C. and Sarukkalige, R. (2016) Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) removal by sorption: A review. *Chemosphere* 148: 336-353.
- Lasat, M. M. (2002) Phytoextraction of toxic metals: A review of biological mechanisms. *Journal of Environmental Quality* 31: 109-120.
- Li, L. H. and Yi, H. L. (2012) Effect of sulfur dioxide on ROS production, gene expression and antioxidant enzyme activity in *Arabidopsis* plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 58: 46-53.
- Li, L., Zhu, P., Wang, X. and Zhang, Z. (2020) Phytoremediation effect of *Medicago sativa* colonized by *Piriformospora indica* in the phenanthrene and cadmium cocontaminated soil. *BMC Biotechnology* 20: 20.
- Li, Y. T., Li, F. B., Chen, J. J., Yang, G. Y., Wan, H. F., Zhang, T. B., Zeng, X. D. and Liu, J. M. (2008) The concentrations, distribution and sources of PAHs in agricultural soils and vegetables from Shunde, Guangdong, China. *Environmental Monitoring and Assessment* 139: 61-76.
- Litchenthaler, H. K. and Wellburn, A. R. (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transaction* 603: 591-592.
- Liu, H., Weisman, D., Ye, Y., Cui, B., Huang, Y., Colon-Carmona, A. and Wang, Z. (2009) An oxidative stress response to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure is rapid and complex in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* 176: 375-382.
- Louvado, A., Gomes, N. C. M., Simoes, M. M. Q., Almeida, A., Cleary, D. F. R. and Cunha, A. (2015) Polycyclic aromatic hydrocarbons in deep sea sediments: Microbe-pollutant interactions in a remote environment. *Science of the Total Environment* 526: 312-328.
- Makris, K. C., Shakya, K. M., Datta, R., Sarkar, D. and Pachanoor, D. (2007) Chemically catalyzed uptake of 2,4,6-trinitrotoluene by *Vetiveria zizanioides*. *Environmental Pollution* 148: 101-106.
- Moore, G., Sanford, P. and Wiley, T. (2006) *Vetiver grass (Vetiveria zizanioides)*. Department of Agriculture and Food Western Australia, Bulletin 4690, Perth.
- Muratova, A., Golubev, S., Wittenmayer, L., Dmitrieva, T., Bondarenkova, A., Hirche, F., Merbach, W. and Turkovskaya, O. (2009) Effect of the polycyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene on root exudation of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Environmental and Experimental Botany* 66: 514-521.
- Pereira, R. C., Monterroso, C. and Macias, F. (2010) Phytotoxicity of hexachlorocyclohexane: Effect on germination and early growth of different plant species. *Chemosphere* 79: 326-33.
- Pinyakong, O., Tiangda, K., Iwata, K. and Omori, T. (2012) Isolation of novel phenanthrene-degrading bacteria from seawater and the influence of its physical factors on the degradation of phenanthrene. *Science Asia* 38: 36-43.
- Polti, M. A., Atjian, M. C., Amoroso, M. J. and Abate, C. M. (2011) Soil chromium bioremediation: Synergic activity of actinobacteria and plants. *International Biodeterioration and Biodegradation* 65: 1175-1181.
- Ramakrishna, A. and Ravishankar, G. A. (2011) Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling and Behavior* 6: 1720-1731.

- Routley, D. G. (1966) Proline accumulation in wilted ladino clover leaves. *Crop Science* 6: 358-361.
- Saeki, H., Sasaki, M., Komatsu, K., Miura, A. and Matsuda, H. (2009) Oil spill remediation by using the remediation agent JE1058BS that contains a biosurfactant produced by *Gordonia* sp. strain JE-1058. *Bioresource Technology* 100: 572-577.
- Samanata, S. K., Chakraborti, A. K. and Jain, R. K. (1999) Degradation of phenanthrene by different bacteria: Evidence for novel transformation sequences involving the formation of 1-naphthol. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53: 98-107.
- Santos, E. C., Jacques, R. J. S., Bento, F. M., Peralba, M. D. C. R., Selbach, P. A., Sa, E. L. and Camargo, F. A. O. (2008) Anthracene biodegradation and surface activity by an iron-stimulated *Pseudomonas* sp. *Bioresource Technology* 99: 2644-2649.
- Shu, W. (2003) Exploring the potential utilization of vetiver in treating acid mine drainage (AMD). In: Proceedings of the 3th International Vetiver Conference, Guangzhou, China.
- Singh, S., Melo, J. S., Eapen, S. and D'Souza, S. F. (2008) Potential of vetiver (*Vetiveria zizanoides* L. Nash) for phytoremediation of phenol. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71: 671-676.
- Su, D. C. and Wong, J. W. (2004) Selection of mustard oilseed rape (*Brassica juncea* L.) for phytoremediation of cadmium contaminated soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 72: 991-998.
- Subramaniam, K., Stepp, C., Pignatello, J. J., Smets, B. and Grasso, D. (2004) Enhancement of polynuclear aromatic hydrocarbon desorption by complexing agents in weathered soil. *Environmental Engineering Science* 21: 515-523.
- Takdastan, A., Kardani, M. and Janadeleh, H. (2017) Removal of total petroleum hydrocarbons from polluted urban soils of the outskirts of Ahvaz, southwestern Iran. *International Journal of Human Capital in Urban Management* 2: 155-162.
- Tang, S., Xi, L., Zheng, J. and Li, H. (2003) Response to elevated CO₂ of Indian mustard and sunflower growing on copper contaminated soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 71: 988-997.
- Truong, P. and Baker, D. (1996) Tolerance of vetiver grass to some adverse soil conditions. In: Proceedings of the 1st International Vetiver Conference of a miracle grass, Bangkok, Thailand.
- Truong, P. and Baker, D. (1998) Vetiver grass for stabilization of acid sulfate soils. In: Proceedings of 2nd National Conference of Acid Sulfate Soils, Coffs Harbour, Australia.
- Truong, P. N. V. (2004) Vetiver grass technology for mine tailings rehabilitation. In: Proceedings of the 1st Asia-Pacific Conference on Ground and Water Bio-Engineering.
- Truong, P. T., Van, T. and Pinners, E. (2009) Introduction to vetiver grass and its properties. *Iranian Agricultural Sciences* 1-172.
- Vanova, L., Kummerova, M., Klems, M. and Zezulka, S. (2009) Fluoranthene influences endogenous abscisic acid level and primary photosynthetic processes in pea (*Pisum sativum* L.) plants in vitro. *Plant Growth Regulation* 57: 39-47.
- Varjani, S. J. (2017) Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology* 223: 277-286.
- Varjani, S. J. and Upasani, V. N. (2016) Biodegradation of petroleum hydrocarbons by oleophilic strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514. *Bioresource Technology* 222: 195-201.
- Varjani, S. J., Rana, D. P., Jain, A. K., Bateja, S. and Upasani, V. N. (2015) Synergistic ex-situ biodegradation of crude oil by halotolerant bacterial consortium of indigenous strains isolated from on shore sites of Gujarat, India. *International Biodeterioration and Biodegradation* 103: 116-124.
- Verbruggen, N. and Hermans, C. (2008) Proline accumulation in plants: A review. *AminoAcids* 35: 753-759.
- Waigi, M. G., Kang, F., Goikavi, C., Ling, W. and Gao, Y. (2015) Phenanthrene biodegradation by sphingomonads and its application in the contaminated soils and sediments: A review. *International Biodeterioration and Biodegradation* 104: 333-349.
- Wei, H., Song, S., Tian, H. and Liu, T. (2014) Effects of phenanthrene on seed germination and some physiological activities of wheat seedling. *Comptes Rendus Biologies* 337: 95-100.
- Wei, S. and Pan, S. (2010) Phytoremediation for soils contaminated by phenanthrene and pyrene with multiple plant species. *Journal of Soils and Sediments* 10: 886-894.
- Wilkes, H., Buckel, W., Golding, B. T. and Rabus, R. (2016) Metabolism of hydrocarbons in n-alkane-utilizing anaerobic bacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 26: 138-151.
- Zhang, Z., Hou, Z., Yang, C., Ma, C., Tao, F. and Xu, P. (2011) Degradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8. *Bioresource Technology* 102: 4111-4116.
- Zhu, L., Chen, Z., Wang, J., Ding, J., Yu, Y., Li, J., Nengwen, X., Jiang, L., Zheng, Y. and Rimmington, G. M. (2014) Monitoring plant response to phenanthrene using the red edge of canopy hyperspectral reflectance. *Marine Pollution Bulletin* 86: 332-341.

Effect of phenanthrene oil pollutant on physiological and biochemical characteristics of vetiver plant (*Chrysopogon zizanioides*)

Nadereh Naderi¹, Sasan Mohsenzadeh^{*1}, Ali Moradshahi¹, Hajar Zamani¹ and Mehdi Zarei²

¹Department of Biology, Faculty of Science, Shiraz University

²Department of Soil Science and Engineering, Faculty of Agriculture, Shiraz University

(Received: 27/11/2021, Accepted: 19/01/2022)

Abstract

Vetiver plant belongs to Poaceae family with high resistance, environmental compatibility and high ability for pollution absorption, therefore it can be used in environmental pollutions removal processes. Among petroleum compounds, polycyclic aromatic hydrocarbons are known as primary pollutants due to their stability in the environment. Phenanthrene usually has the highest concentration and most polluting among the petroleum aromatic compounds. In this study, vetiver was planted in pot with phenanthrene concentrations of zero (negative control), zero with acetone (positive control), 250, 500, 1000, 2000 and 4000 mg/kg soil dry weight and its physiological effects were investigated. At the highest concentration of phenanthrene the amount of chlorophyll and carotenoids decreased 20% and 21%, respectively, but phenolic compounds, proline and antioxidant activity were increased. Root and shoot weights at a concentration of 250 mg phenanthrene were significantly reduced compared to the control, but at subsequent concentrations, their decreasing slope were reduced. Root length and root volume also decreased. As phenanthrene was accumulated in root, it caused more decreases compare to shoot. Maximum accumulation of phenanthrene in vetiver root was 519 ppm in 4000 mg/kg soil dry weight phenanthrene concentration. Due to the resistance of vetiver to high concentrations of phenanthrene and its accumulation in roots, this plant can be used as a very suitable plant for the phytoremediation process of petroleum compounds.

Keywords: Petroleum pollution, Physiological effects, Phytoremediation, Aromatic hydrocarbons, Poaceae

Corresponding author, Email: mohsenz@shirazu.ac.ir