زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دوره 5، شماره 2، پاییز و زمستان 1393

بررسی تغییر فعالیت آنزیم لاکاز در اندام‌های رویشی *Festuca arundinacea*، در شرایط آلودگی نفتی

فاطمه زرین کمر[1*]، فاطمه ری پور[2]، خسرو خواجه[3]

1- دانشیار گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
2- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
3- استاد، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

* تهران، صندوق پستی 175-14115
zarinkamar@modares.ac.ir
(دریافت مقاله: 91/10/4 پذیرش مقاله: 94/1/30)

چکیده- لاکاز یک پلی‌فنل‌اکسیداز حاوی چندین اتم مس (multi-copper oxidase) است که دارای ساختار گلیکوپروتئینی بوده و به نام بنزن‌دیول: اکسیژن اکسیدو-ردوکتاز (benzenediol:oxygen oxidoreductase) شناخته می‌شود. در تحقیقات انجام شده مشخص گردیده است که آنزیم لاکاز می‌تواند در سم زدایی از ترکیبات آلاینده آروماتیک- از جمله مشتقات نفتی- و تبدیل آن‌ها به موادی با سمیت کمتر، نقش داشته باشد. از طرفی، گیاه *Festuca arundinacea* با داشتن ریشه فیبری گسترده، موجب ایجاد محیط مناسب و افزایش تجزیه آلاینده‌های نفتی می‌شود. با در نظر داشتن این نکته که افزایش در فرایند تجزیه آلاینده‌ها می‌تواند به واسطه حضور و تغییر فعالیت آنزیم‌های مختلف گیاه صورت گیرد، در این تحقیق، تغییر فعالیت آنزیم لاکاز موجود در اندام‌های رویشی فستوکا تحت شرایط آلودگی خاک به غلظت‌های مختلف گازوئیل بررسی شده است. برای این منظور ابتدا بذرها در شرایط گلخانه ای درون گلدان‌های حاوی خاک آلوده به گازوئیل و گلدان‌های شاهد کشت شدند. پس از برداشت گیاهان در تیمارهای زمانی هفتگی به مدت چهار هفته، عصاره گیاهی حاوی لاکاز به طور جداگانه از بخش‌های هوایی و ریشه گیاهان استخراج شده و سپس تغییر فعالیت آنزیم با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. نتایج نشان می‌دهند که اعمال تیمارهای آلودگی در خاک، در بسیاری از موارد منجر به افزایش فعالیت لاکاز نسبت به نمونه شاهد می‌شود. به عبارتی گیاه با افزایش فعالیت لاکاز، توان خود را در تجزیه و همانندسازی هیدروکربن‌های آلاینده بیشتر می‌سازد.

کلیدواژگان: گازوئیل؛ لاکاز؛ هیدروکربن‌های نفتی؛ *Festuca arundinacea* .

1- مقدمه

از آلاینده‌های آلی متداولی که در خاک‌ها انباشته می‌شوند می‌توان به آفت کش‌ها، مواد پلاستیکی، سوخت‌ها، حلال‌ها و هیدروکربن‌های نفتی اشاره کرد.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-03]

هیدروکربن‌های نفتی منبع عظیم انرژی برای استفاده آدمی هستند و بدون آن‌ها استمرار حیات و زیست امروزی تقریباً غیرممکن است؛ به ویژه آنکه از آن‌ها به عنوان سوخت فسیلی استفاده می‌شود. این مواد در دامنه‌های متنوعی از آلکان‌های زنجیری اشباع شده تا ترکیبات آروماتیک چند حلقه‌ای و پیچیده طبقه‌بندی می‌شوند [1].

1-1- ترکیبات نفتی

یکی از مشتقات نفتی، گازوئیل یا دیزل است که از تقطیر نفت خام به دست می‌آید. این برش معمولاً بی‌رنگ یا زرد کمرنگ و شفاف است. نقطه جوش آن در محدوده 385-250 درجه سانتی‌گراد بوده و بخارهای قابل اشتعال در دمای بالای 56 °C دارد [2]. دامنه طول زنجیره هیدروکربنی گازوئیل در محدوده $C_{10} - C_{32}$ قرار دارد، و چگالی آن $gr.cm^{-3}$ 0/85است. گازوئیل حاوی 75% هیدروکربن‌های اشباع و 25% هیدروکربن‌های آروماتیک می‌باشد [۳،۴].

سوخت گازوئیلی زمانی که وارد محیط خاک می‌شود، در آن گسترش یافته و به آن تراوش می‌کند، ولی انتقال آن در مقطع عمودی خاک محدود است. در شرایط طبیعی سوخت گازوئیلی در خاک سطحی غنی از مواد آلی، جذب شده و همین امر مانع انتقال رو به پایین آن به قسمت‌های عمقی‌تر می‌شود که این امر ناشی از خصوصیات آبگریزی آن است. در نتیجه گازوئیل در سطح خاک و درون منطقه ریشه‌ای (ریزوسفر) باقی می‌ماند [5].

به دلیل انحلال پذیری پایین هیدروکربن‌های نفتی در آب، این ترکیبات به مقدار کمتر به صورت محلول جذب ریشه می‌شوند؛ بلکه جذب آن‌ها بیشتر به صورت تماس مستقیم با ریشه انجام می‌گیرد. بنابراین عمق ریشه و نیز تراکم آن باید مد نظر قرار گیرد. گراس‌ها گونه‌های علفی با ریشه‌های افشان و انبوهی هستند که به خوبی در خاک گسترش یافته و سطح تماس بیشینه را بین ریشه و ذرات خاک ایجاد می‌کنند. فستوکای بلند با نام علمی *Festuca arundinacea* گیاهی تک لپه بوده و از گندمیان می‌باشد. این گیاه با داشتن ریشه فیبری گسترده، موجب ایجاد محیط مناسب و افزایش تجزیه آلاینده‌های نفتی می‌شود، که این امر با تغییراتی در فعالیت آنزیم لاکاز همراه می‌شود.

1-2- آنزیم لاکاز

لاکاز (EC 1.10.3.2)؛ یک پلی فنل اکسیداز حاوی چندین اتم مس (Multi-copper oxidase) است که در بسیاری از گیاهان، قارچ‌ها، میکروارگانیسم‌ها و حشرات یافت شده است. این آنزیم دارای ساختار گلیکوپروتئینی دی مر یا تترامر است که به طور معمول در هر مونومر حاوی 4 اتم مس بوده و به نام‌های بنزن دیول: اکسیژن اکسیدو-ردوکتاز[1] و یا دی فنل: دی اکسیژن اکسیدو- ردوکتاز شناخته می‌شود و اکسیداسیون ترکیبات -فنلی و غیرفنلی- متنوعی مانند دی فنل‌ها، مونولیگنول‌ها، ایزوفلاونوئیدها و تانن‌ها را بر عهده دارد. در این واکنش‌ها پیش ماده‌ها اکسید شده، یک الکترون خود را از دست داده و رادیکال‌های فنوکسی[2] حاصل می‌شوند؛ که این رادیکال‌ها پلیمریزه شده و پلیمرهای فنلی را تشکیل می‌دهند و یا دوباره توسط لاکاز اکسایش یافته و کوئینون تولید می‌کنند و در نهایت، الکترون گرفته شده از پیش ماده باعث احیای اکسیژن و تولید آب خواهد شد. به این ترتیب آنزیم لاکاز می‌تواند در سم‌زدایی از ترکیبات سرطان‌زای فنلی و آلاینده‌های آروماتیک- از جمله مشتقات نفتی- و تبدیل آن‌ها به موادی با سمیت کمتر نقش داشته باشد. بنابراین می‌توان از آن به منظور زیست پالایی آلاینده‌های محیطی بهره برد [6-9].

یکی از پرکاربردترین پیش ماده‌ها برای آنزیم لاکاز،

1. Benzenediol:Oxygen Oxidoreductase
2. Phenoxy Radicals

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-03]

ترکیب ABTS است که با اسامی azinobis یا 3-ethylbenzathiazoline-6-sulfonic acid نیز معرفی می‌شود [10]. در غیاب پراکسید هیدروژن، ABTS به عنوان یک پیش ماده اختصاصی برای آنزیم لاکاز عمل می‌کند. محلول ABTS در حالت احیا شده دارای رنگ سبز بسیار روشن است، در صورتی که حالت اکسید آن رنگ سبز تیره پیدا می‌کند. از این ویژگی ABTS به منظور شناسایی فعالیت آنزیم لاکاز استفاده می‌شود [6].

2- مواد و روش‌ها

2-1- کشت و برداشت گیاه

در این تحقیق میزان و نحوه تغییر فعالیت آنزیم لاکاز موجود در اندام‌های رویشی *Festuca arundinacea*، در شرایط آلودگی خاک به غلظت‌های مختلف گازوئیل، بررسی شده است.

برای این منظور، ابتدا بذرها در گلخانه دانشگاه تربیت مدرس درون گلدان‌های شاهد (با غلظت صفر برای آلاینده) و گلدان‌های حاوی خاک آلوده به گازوئیل در غلظت‌های مختلف (10000، 20000 و 30000 میلی‌گرم بر کیلوگرم) کشت شدند. به این ترتیب که برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته شد و در هر گلدان حدود یک گرم بذر فستوکا درون مقدار تقریبی یک کیلوگرم خاک کشت شد.

برنامه برداشت گیاهان در تیمارهای زمانی هفتگی به مدت چهار هفته در نظر گرفته شد.

2-2- استخراج و سنجش آنزیمی

عصاره گیاهی حاوی لاکاز به طور جداگانه از بخش‌های هوایی و ریشه گیاه تهیه شد؛ برای این منظور از نمونه‌های گیاهی فریز شده استفاده شده و عمل ساییدن گیاه و سانتریفیوژ برای استخراج لاکاز در بافر سدیم استات 100 میلی‌مولار با pH=5، در دمای 4 درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. پس از سانتریفیوژ، از محلول رویی به منظور سنجش فعالیت لاکاز استفاده شد و ترکیب ABTS 4 میلی‌مولار به عنوان پیش ماده انتخاب شد.

فعالیت آنزیم با دستگاه اسپکتروفتومتر (طیف سنج) به صورت تغییر در جذب در طول موج 420 نانومتر بعد از گذشت 1 دقیقه، نسبت به میلی گرم پروتئین سنجیده شد [۱۲،۱۱]. مقدار کمی پروتئین‌های محلول در بافت با روش برادفورد[1] (1976) اندازه‌گیری شد [13].

2-3- مطالعات آماری

این تحقیق با استفاده از آزمون فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 و مقایسه میانگین‌ها به وسیله آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. همچنین رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل صورت گرفت.

3- نتایج و بحث

3-1- تغییر فعالیت لاکاز در ریشه

بررسی تغییر فعالیت آنزیم لاکاز ریشه در هر کدام از هفته‌ها نشان می‌دهد که اعمال تیمارهای آلودگی در خاک، در بیشتر موارد منجر به افزایش فعالیت لاکاز نسبت به نمونه شاهد می‌شود؛ به طوری که در تیمارهای 10000 و 30000 پی‌پی‌ام در تمامی هفته‌ها افزایش معناداری نسبت به شاهد نشان می‌دهند. اما مقایسه این دو تیمار نسبت به یکدیگر، تغییر معناداری نشان نمی‌دهد؛ یعنی هر دو تیمار، اثر مشابهی روی فعالیت لاکاز ریشه داشته‌اند و در تمامی هفته‌ها بیشترین مقدار فعالیت لاکاز در ریشه مربوط به همین تیمارها است (شکل 1).

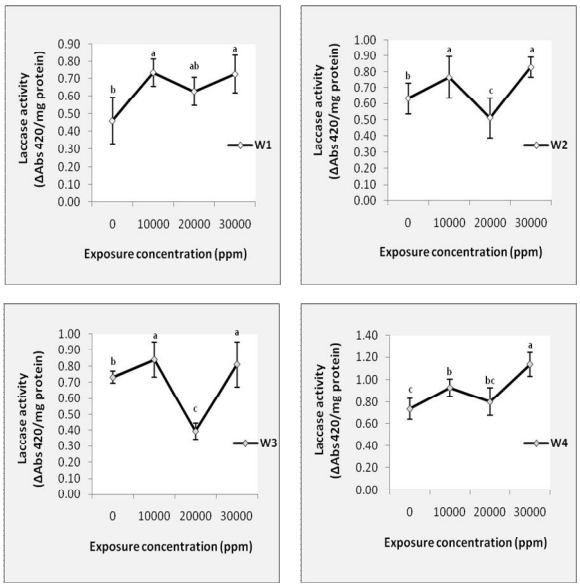
3-2- تغییر فعالیت لاکاز در اندام هوایی

بررسی تغییر فعالیت آنزیم لاکاز در اندام هوایی فستوکا،

1. Bradford

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-03]

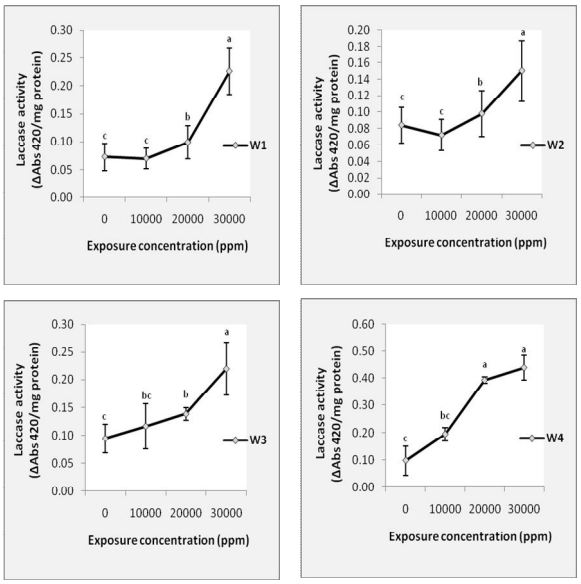
بیانگر وجود یک روند افزایشی در هر چهار هفته است؛ به طوری که تقریباً در همه هفته‌ها، دو تیمار آخر نسبت به شاهد و تیمار 10000 پی‌پی‌ام افزایش معناداری نشان می‌دهند. به این ترتیب در هر چهار هفته، بیشترین مقدار فعالیت لاکاز در برگ فستوکا مربوط به بالاترین تیمار آلودگی می‌باشد (شکل 2).



شکل 1 تغییرات فعالیت لاکاز ریشه فستوکا در تیمار آلودگی خاک در هفته‌های اول تا چهارم
در نمودار مربوط به هر هفته، تفاوت میان میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند، معنی‌دار نیست.

3- مقایسه فعالیت آنزیم لاکاز در ریشه و اندام هوایی

مقایسه فعالیت لاکاز در ریشه و اندام هوایی، بیانگر آنست که مقدار فعالیت لاکاز در ریشه فستوکا به مراتب بیشتر از اندام هوایی است. این ویژگی در تمامی هفته‌ها و تیمارهای مورد آزمون دیده می‌شود. محاسبات نشان می‌دهند که در نمونه شاهد مربوط به هفته‌های مختلف، فعالیت لاکاز در ریشه، حدود 6 تا 8 برابر بیشتر از فعالیت لاکاز موجود در اندام هوایی می‌باشد. این ضریب در نمونه‌های تیمار، بین 2 تا 10 متغیر است.



شکل 2 تغییرات فعالیت لاکاز برگ فستوکا در تیمار آلودگی خاک در هفته‌های اول تا چهارم
در نمودار مربوط به هر هفته، تفاوت میان میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند، معنی‌دار نیست.

4- جمع‌بندی نتایج

به طور کلی می‌توان گفت که در بسیاری از موارد، با افزایش غلظت هیدروکربن‌های نفتی موجود درخاک، مقدار فعالیت آنزیم لاکاز در بافت گیاهی نیز بیشتر می‌شود. می‌توان این احتمال را داد که به این ترتیب، متناسب با افزایش شدت آلودگی، با افزایش فعالیت لاکاز، توان گیاه در تجزیه و همانند سازی هیدروکربن‌های آلاینده بیشتر شده و این امر سبب می‌شود تا گیاه غلظت بالاتری از آلودگی را تحمل نماید. همین امر می‌تواند یکی از دلایل مقاومت گیاه به آلاینده نیز باشد.

5- منابع

[1] ابوالحمد، گ. (1375). مبانی پالایش نفت. چاپ اول، دانشگاه تهران.

[2] چاقری، ز. (1386). بررسی تأثیرات اکوفیزیولوژیکی گازوئیل بر برخی گونه‌های زراعی و به کارگیری

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-03]

باکتری PDO1 در جهت رفع و یا کاهش آلودگی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته زیست‌شناسی (فیزیولوژی گیاهی)، دانشکده علوم، دانشگاه شهید بهشتی، تهران.

[3] Adam, G. and Duncan, H. (2002) Influence of diesel fuel on seed germination. Environmental Pollution, 120: 363-370.

[4] Babic, S., Petrovic, M. and Macan, M.K. (1998) Ultrasonic solvent extraction of pesticides from soil. Journal of Chromatography A. 823: 3-9.

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

[6] Dwivedi, U.N., Singh, P., Pandey, V.P. and Kumar, A. (2010) Structure–function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 10.

[7] Hattori, M., Tsuchihara, K., Noda, H., Konishi, H., Tamura, Y., Shinoda, T., Nakamura, M. and Hasegawa, T. (2010) Molecular characterization and expression of laccase genes in the salivary glands of the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps* (Hemiptera: Cicadellidae). Insect Biochemistry and Molecular Biology, 40: 331-338.

[8] Hoopes, J.T. and Dean, J.F.D. (2001) Staining Electrophoretic Gels for Laccase and Peroxidase Activity Using 1,8-Diaminonaphthalene. Analytical Biochemistry, 293: 96-101.

[9] Iqbal, M.J., Ahsan, R., Afzal, A.J., Jamai, A., Meksem, K., El-Shemy, H.A. and Lightfoot, D.A. (2008) Multigeneic QTL: The Laccase Encoded within the Soybean Rfs2/rhg1 Locus Inferred to Underlie Part of the Dual Resistance to Cyst Nematode and Sudden Death Syndrome. Current Issues in Molecular Biology, 11(1): 11-19.

[10] Majeau, J.A., Brar, S.K. and Tyagi, R.D. (2010) Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. Bioresource Technology, 101: 2331–2350.

[11] Odusanya, O.O. (2003) Supercritical Carbon Dioxide Treatment of Oil Contaminated Drill Cuttings. A thesis for the degree of Master Science, Faculty of Graduated Studies and research. University of Alberta.

[12] Safari Sinegani, A. A., Emtiazi, G. and Hajrasuliha, S. (2006) Comparative Studies of Extracellular Fungal Laccases under Different Conditions. Journal of Agricultural Science and Technology, 9: 69-76.

[13] Wan, Y.Y., Lu, R., Xiao, L., Du, Y.M., Miyakoshi, T., Chen, C.L., Knill, C.J. and Kennedy, J.F. (2010) Effects of organic solvents on the activity of free and immobilised laccase from *Rhus vernicifera*. International Journal of Biological Macromolecules, 47: 488-495.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-03]