DOI: 10.22059/IJSWR.2019.278721.668157 تحقیقات آب و خاک ایران، دوره ۵۰، شماره ۱۰، اسفند ۱۳۹۸ (ص ۲۶۴۵-۲۶۶۰)

Reduction of Crude Oil Pollution in Soil by Phytoremediation, Bioaugmentation and Bioaugmented Phytoremediation

HADI KOOHKAN[1*], AHMAD GOLCHIN[1], MOHAMMAD SEDIGH MORTAZAVI[2], ROGHYEH HEMATI[3], FATEMEH SHAHRYARI[3]

1. Soil Science Department, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Znajan, Iran.
2. Persian Gulf and Oman Sea Ecological Research Institute, Iranian fisheries science Research Institute, Agricultural Education and Extension Research Organization, Bandar Abbas, Hormozgan, Iran
3. Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Znajan, Iran.

(Received: Apr. 25, 2019- Revised: Aug. 3, 2019- Accepted: Aug. 10, 2019)

ABSTRACT

To investigation the efficiency of phytoremediation, bioremediation and bioaugmented phytoremediation to remove crude from the soil, a factorial experiment was conducted in a completely randomized design with three replications. The treatments consisted of 3 levels of oil concentrations in the soil (0, 4 and 8% by weight), four treatments of plant (no plant, bermudagrass (*Cynodon dactylon*), sorghum (*bicolor Sorghum*) and barley *(Hordeum vulgare)*) and 3 treatments of fungi (no fungi, native fungi and Non-native fungi (*Phanerochate chrysosporium*)). In this study, the isolated fungi from polluted soil was *Aspergillus niger*. Samples of five kilograms of soil were polluted with different amounts of crude oil and poured into plastic pots. After six weeks, some pots were inoculated with fungi, then all pots were planted with the proposed gramineae species. The results showed that the application of plants significantly increased the removal percentage of crude oil compared to the control. The removal percentage of crude oil was corresponded to cultivated soils of sorghum, bermudagrass, and barley, in desending order. Inoculated soils with fungi increased the removal percentage of crude oil significantly as compared to the control. The native fungus had more efficiency than the non-native fungus in terms of degradation of crude oil. Also, their combined application of bioaugmentation and phytoremediation (bioaugmented phytoremediation) was significantly more than the application of each method alone (phytoremediation and bioremediation); which indicate the better efficiency of the bioaugmented phytoremediation method than the phytoremediation and bioremediation method individually.

Key word: Petroleum pollution, Bioaugmentation, Phytoremediation.

*Corresponding author's Email: koohkan_7001@yahoo.com

کاهش آلودگی نفت خام در خاک به روش‌های گیاه‌پالایی، زیست‌پالایی و گیاه‌پالایی زیست‌افزونی‌شده

هادی کوهکن[1*]، احمد گلچین[1]، محمدصدیق مرتضوی[2]، رقیه همتی[3]، فاطمه شهریاری[3]

۱. گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

۲. پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور ،سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران.

۳. گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۲/۵- تاریخ بازنگری: ۱۳۹۸/۵/۱۲- تاریخ تصویب: ۱۳۹۸/۵/۱۹)

چکیده

به منظور بررسی کارایی گیاه‌پالایی، زیست‌پالایی و گیاه‌پالایی زیست‌افزونی‌شده در حذف نفت خام از خاک، یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار به اجرا درآمد. فاکتورها شامل سه سطح آلودگی خاک به نفت (صفر، ۴ و ۸ درصد وزنی)، چهار تیمار گیاهی (بدون گیاه، برموداگراس (*Cynodon dactylon*)، سورگوم (*Sorghum bicolor*) و جو (*Hordeum vulgare*)) و سه تیمار قارچ (بدون قارچ، قارچ بومی و قارچ غیربومی *Phanerochate chrysosporium*)) بودند. در این تحقیق قارچ جداسازی شده از خاک آلوده از گونه *آسپرژیلوس نایجر* (*Aspergillus niger*) بود. برای انجام آزمایش نمونه‌های پنج کیلویی خاک با مقادیر مختلف نفت خام آلوده شدند و در گلدان‌های پلاستیکی ریخته شدند و پس از گذشت شش هفته با قارچ‌ها تلقیح شده و سپس در خاک‌های آلوده تلقیح شده با قارچ و تلقیح نشده سه گونه گیاهی گرامینه کاشته شدند. نتایج نشان داد که کاربرد گیاهان سبب افزایش معنی‌دار درصد حذف نفت خام نسبت به شاهد گردید. درصد حذف نفت خام در خاک‌های کشت شده به ترتیب نزولی مربوط به سورگوم، برموداگراس و جو بود. تلقیح خاک با قارچ‌ها درصد حذف ترکیبات نفتی را به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش دادند. قارچ بومی در تجزیه و مصرف مواد نفتی نسبت به قارچ غیربومی مورد مطالعه کارآیی و عملکرد بهتری داشت. همچنین کاربرد توأم آن‌ها (گیاه‌پالایی زیست‌افزونی‌شده) نسبت به کاربرد هر یک از روش‌ها به‌تنهایی (گیاه‌پالایی و زیست پالایی) درصد حذف نفت خام را بطور معنی‌داری افزایش داد؛ که نشان می‌دهد کارایی روش گیاه‌پالایی زیست‌افزونی‌شده نسبت به گیاه‌پالایی و زیست‌پالایی به‌تنهایی به‌طور معنی‌داری بالاتر بود.

واژه‌های کلیدی: آلودگی نفتی، زیست‌افزونی، گیاه‌پالایی.

مقدمه

آلودگی خاک، آب، هوا و رسوبات توسط ترکیبات سمی و خطرناک یکی از مشکلات مهم و جدی در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه می‌باشد (Zouboulis and Moussas, 2011). هیدروکربن‌های نفتی به یک معضل جهانی برای محیط زیست تبدیل شده است. این ترکیبات در محیط به‌شدت مقاوم بوده و برای سلامتی انسان مضر هستند (Hentati *et al*., 2013). قرار دادن هیدروکربن‌های نفتی برای مدت طولانی می‌تواند باعث اختلال در بافت خاک، هدایت هیدرولیکی اشباع خاک، تخلخل و فشردگی شده و یک محیط ناپایدار و نامساعد برای رشد بیولوژیکی ایجاد شود (Gaskin and Bentham, 2010). آلودگی خاک با نشت نفت از نگرانی‌های عمده جهان امروز است و خاک آلوده به نفت، خطر جدی برای سلامت انسان محسوب می‌شود؛ همچنین موجب آلودگی آب‌های زیرزمینی می‌شود و استفاده از آن را محدود می‌کند؛ به‌علاوه باعث خسارات اقتصادی و مسائل زیست محیطی می‌شود (Thapa *et al*., 2012). به‌طور معمول فناوری‌هایی که برای اصلاح خاک استفاده می‌شوند شامل موارد زیر هستند: روش‌های فیزیکی (سوزاندن، ابزارهای جمع کننده و غیره) و شیمیایی (استخراج از طریق حلال‌ها و غیره) که جهت حذف سریع آلاینده‌ها به کار برده می‌شود به دلیل گران قیمت بودن و تجزیه ناقص آلاینده‌ها، کارایی محدود دارند. و بیشتر توجهات به روش زیستی (تهویه زیستی، افزایش زیست توده میکروبی و غیره) برای حذف آلاینده‌های آلی در خاک معطوف است (García-Sánchez *et al*., 2018; Shekoohiyan *et al*., 2016).

گیاهان متنوعی که پتانسیل گیاه‌پالایی مکان‌های آلوده به

* نویسنده مسول: koohkan_7001@yahoo.com

هیدروکربن‌های نفتی دارند شناخته شده‌اند. اکثر مطالعات گراس-ها و لگوم‌ها را با پتانسیل خوب تشخیص داده‌اند زیرا سیستم ریشه‌ای فیبری وگسترده‌ای دارند. سیستم ریشه‌ای گراس‌ها بالاترین سطح ویژه (سطح ریشه در یک متر مکعب از خاک) را نسبت به انواع دیگر گیاهان داشته و در خاک تا عمق سه متری نفوذ می‌کنند (Media *et al*., 2003).

Moubasher *et al*. (2015) تحقیقی روی کشت گیاه *Bassia scoparia* L. در خاک‌های آلوده با سطوح مختلف نفت خام (۰، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ درصد وزنی) انجام دادند و نشان دادند که در سطح ۱ درصد وزنی آلودگی نفتی در خاک با کشت گیاه *Bassia scoparia* L. درصد حذف نفت خام (۵۷/۷ درصد) بالاترین بود. Tang *et al*. (2010) گزارش دادند که کشت گیاه چچم در خاک-های آلوده به نفت خام، درصد حذف نفت خام را از ۴۱ درصد به ۵۸ درصد رساند.

گیاهان نه تنها سوبسترا و ساختار خاک را تحت تاثیر قرار می‌دهند بلکه قادرند که ترکیبات نفتی در خاک را تجزیه کنند (Caudle and Maricle, 2014). گیاهان از طریق بکارگیری مکانیزم‌های مختلف مانند تحریک میکروارگانیسم‌های ریزوسفری، جذب ترکیبات نفتی، ترشح آنزیم‌های تجزیه‌کننده نفت خام و تصعید در حذف نفت خام از خاک موثر و کارا هستند (Martin *et al*. 2014). همچنین گیاهانی که به منظور گیاه‌پالایی در خاک به کار می‌روند، می‌توانند در تولید زیست‌توده و ترسیب کربن[1] در خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی مورد استفاده قرار گیرند (Afzal *et al*., 2014). هر چند آلاینده‌های آلی در خاک حالالیت کمی دارند ولی کارایی گیاهان در گیاه‌پالایی را کاهش می‌دهند اما با تلقیح میکروارگانیسم‌ها به خاک و همبستگی بین گیاه با میکروارگانیسم‌ها می‌توان محدودیت آلاینده‌ها بر رشد گیاهان را کاهش داد و کارایی گیاهان در حذف آلاینده‌ها را افزایش داد (Al-Baldawi *et al*., 2015; Paredes-Páliz *et al*., 2018).

استفاده از میکروارگانیسم‌ها و گیاهان برای حذف آلاینده از محیط، از آن جهت که از روش‌های دوستدار محیط زیست بوده و کم‌هزینه می‌باشند در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه محققان قرار گرفته‌است و به آن زیست‌پالایی[2] گفته می‌شود. چنانچه فقط از گیاهان برای پاک‌سازی محیط استفاده گردد، به آن روش گیاه-پالایی[3] می‌گویند (Thijs *et al*., 2016).

در حالت طبیعی پس از نشت مواد نفتی، فعالیت میکروارگانیسم‌های بومی و یا عواملی هم‌چون فوتواکسیداسیون (تجزیه نوری)، منجر به حذف آلودگی می‌شود. میکروارگانیسم‌ها می‌توانند با تجزیه مواد نفتی موجب کاهش آلودگی نفتی شوند. آن‌ها می‌توانند مواد مضر خاک را تثبیت، تغییر و یا از بین ببرند و در نتیجه آن‌ها را از دسترس سایر موجودات خارج نموده و سبب کاهش مخاطرات زیست‌محیطی شوند. در طی زیست‌پالایی مناطق آلوده با نفت، ترکیبات مضر می‌توانند توسط آنزیم‌ها در داخل میکروارگانیسم‌ها یا خاک متابولیز شده و حضور گیاه نیز باعث افزایش اکسیژن خاک می‌شود و به‌دنبال آن فعالیت میکروارگانیسم‌ها افزایش می‌یابد. اکسیژن یک عامل تعیین کننده در رشد و فعالیت میکروارگانیسم‌های هوازی خاک و همچنین عامل تعیین‌کننده تجزیه تعداد زیادی از ترکیبات شیمیایی از جمله ترکیبات آروماتیک است (Hashem, 2007).

استفاده از میکروارگانیسم‌ها در زیست پالایی می‌تواند خطر آلودگی خاک به هیدروکربن‌های نفتی را کاهش دهد (Suja *et al*., 2014). فعالیت بیولوژیکی خاک، توسط پارامترهای محیطی، فیزیک و شیمیایی خاک تحت تأثیر قرار می‌گیرد. استفاده از قارچ‌ها به‌عنوان یک روش اصلاح زیستی، گزینه‌ای برای تمیز کردن آلاینده‌های زیست‌محیطی است. در دو دهه گذشته به اصلاح زیستی با استفاده از قارچ‌ها، توجه کمی شده است زیرا بسیاری از تحقیقات اصلاح زیستی، بر استفاده از باکتری‌ها متمرکز بوده است (Mittal and Singh, 2009). توانایی میکروارگانیسم‌های متعددی مخصوصاً باکتری‌ها برای تجزیه هیدروکربن‌ها شناخته شده است (Palanisamy *et al*., 2014) اما تحقیقات در خصوص قارچ‌ها نسبتاً جدیدتر است (Lee *et al*., 2015). زیست‌پالایی توسط قارچ‌ها نسبت به باکتری‌ها کم‌هزینه‌تر و کاراتر است. قارچ‌ها روی انواع مختلف مواد آلی رشد می‌کنند و تحت شرایط مختلف محیطی مانند تنش‌های محیطی نظیر کمبود مواد غذایی و شوری بالا زنده می‌مانند و میسیلوم خود را توسعه دهند (Potin *et al*., 2004).

برخی مطالعات صورت گرفته در مناطق آلوده به ترکیبات نفتی نشان داد که انواع مختلف میکروارگانیسم‌ها از جمله قارچ‌ها، قادرند در مناطق آلوده رشد کنند (Mancera-Lopez *et al*., 2008). بسیاری از گونه‌های قارچی که از محیط‌های آلوده به نفت شناخته شده‌اند، توانایی تجزیه هیدروکربن‌های نفتی را دارند. بیش از ۲۰۰ گونه از باکتری‌ها، قارچ‌ها و حتی جلبک‌ها می‌توانند هیدروکربن‌ها را تجزیه کنند (Onifade and Abubakar,2007).

1. Carbon sequestration
2. Bioremediation
3. Phytoremediation

قارچها به‌علت طیف زیادی از آنزیم‌های مؤثر در محیط زیست، که به آن‌ها در تغذیه کمک می‌کند، مسئول تجزیه چندین فرآورده طبیعی هستند (Johnsen *et al*., 2005). تعدادی از پژوهشگران نیز با انجام تحقیقات محیطی اعلام کرده‌اند که سویه‌های مختلف قارچ‌های ریشه‌سفید قادر به رشد در حضور آلودگی خاک به هیدروکربن‌ها می‌باشند (Baheri and Meysami, 2002). در بین گونه‌های مختلف، قارچ‌های *فانروکیت کریسوسپریوم*، *ترامتس ورسیکلر*، *آسپرژیلوس*، *پنی‌سیلیوم*، *فوزاریوم*، *پاسیلومیسیس* و *تالارومسیس* و گونه‌های مخمر *کاندیدا*، *یاررویا*[1] و *پیچیا*[2] در تجزیه هیدروکربن‌ها فعال هستند (Adenipekun and Lawal, 2012; Marchand *et al*., 2017).

Chengwei *et al*. (2001) بیان نمودند که آلودگی‌های آلی اغلب در خاک‌های کشت شده با گیاه نسبت به خاک‌های فاقد گیاه سریع‌تر ناپدید می‌شوند. آن‌ها ۵ گونه گیاهی شامل مرغ، ارزن، سودان‌گراس، چاودار، تال‌فستوکا را در خاک‌های حاوی آترازین و فنانترن مورد مطالعه قرار دادند و برای تجزیه‌ی این مواد از میکروارگانیسم‌های ریزوسفری استفاده نمودند. به‌طور کلی آن‌ها به این نتیجه رسیدند که حضور گیاهان در خاک به‌علت تأثیر ریزوسفر باعث افزایش میزان تجزیه ترکیبات نفتی در خاک می گردد.

Allamin *et al*. (2014) گونه‌های *آسپرژیلوس*، *پنی‌سیلیوم* و *ریزوپوس* را به‌عنوان تجزیه‌کننده‌های هیدروکربن‌های مختلف مانند تولیدات نفتی شناخته کردند. آن‌ها گزارش دادند که *آسپرژیلوس نایجر* و *پنی سیلیوم نتاتوس* نسبت به قارچ‌های *آسپرژیلوس اریزا* و *ریزوپوس ارزیزا* توانایی بالاتری در حذف ترکیبات نفتی در خاک داشتند.

Bokhary and Sarwat (2012) گزارش دادند که سرعت رشد *A.flavus* در محیط‌های حاوی گازوئیل و نفت سنگین تا غلظت ۰/۱ درصد افزایش یافت و در غلظت ۰/۲ درصد نیز رشد این قارچ ادامه یافت. به عقیده Chaillan *et al*. (2004) جنس‌های *آسپرژیلوس* و *پنی سیلیوم* رایج‌ترین قارچ‌های موجود در خاک‌های مناطق گرمسیری هستند، که می‌توانند هیدروکربن‌ها را تجزیه کنند. Gargouri *et al*. (2015) گزارش دادند که با تلقیح خاک با قارچ‌های جداسازی شده از خاک آلوده به نفت، درصد حذف نفت از خاک در مدت ۶۰ روز بطور معنی داری افزایش یافت. آن‌ها همچنین اظهار کردند که مخمر *Candida tropicalis* قادر است ۹۷ درصد کل هیدروکربن‌های نفتی در خاک را حذف کند.

Obire *et al*. (2008) هم گزارش کردند که کارآمدترین متابولیزه‌کننده‌های هیدروکربن‌ها جنس‌های *آسپرژیلوس* و *پنی‌سیلیوم* می‌باشند. قارچ‌ها تجزیه‌کنندگان بالقوه تحت شرایط نامطلوب، از جمله در pH پایین و فقر مواد مغذی هستند. آن‌ها در هر سیستم آلوده حضور دارند و ممکن است ترکیبات نفت و مشتقات سرسخت آن را به‌عنوان یک منبع انرژی استفاده کنند. علاوه بر این، زمانی که با مخمرها و باکتری‌ها مقایسه می‌شوند، آن‌ها توانایی بیشتری برای انطباق با محیط زیست را دارند (Fraga *et al*., 2011). Al-Nasrawi (2012) گونه‌های قارچی مصرف‌کننده نفت خام را از خلیج مکزیک بررسی کرد آن‌ها *آسپرژیلوس نایجر* را به‌عنوان مؤثرترین کاهش‌دهنده وزن نفت خام به میزان ۸/۶۰ درصد معرفی کردند. همچنین *پنی‌سیلیوم دوکیومبنس* به میزان ۷/۹۰ درصد و *کوچلیوبولوس لواتانوس* به میزان ۴/۷۰ درصد، وزن نفت خام را کاهش دادند. درحالی‌که کمترین کاهش مربوط به سویه‌ای از *فوزاریوم سولانی*، ۱/۹۰ درصد نشان داده شد. Lotfinasabasl *et al*. (2012) پتانسیل اصلاح زیستی خاک آلوده شده با ۲۰٪ نفت را توسط گونه‌های مختلف قارچی به‌صورت زیر تعیین کردند:

آسپرژیلوس نایجر> رایزوپوس > آسپرژیلوس ترئوس > پنی سیلیوم.

ایران به عنوان کشوری با منابع نفتی فراوان، دارای مناطق متعددی است که آلوده به نفت خام هستند. در ایران، آلودگی خاک‌های اطراف پالایشگاه‌ها، محل‌های اکتشاف و مسیر لوله‌های انتقال نفت کاملاً مشهود است. خلیج فارس تأمین‌کننده نیمی از نفت مورد نیاز جهان است و فعالیت‌های اکتشاف و بهره‌برداری نفت در این منطقه با شرایط پیچیده‌تری صورت می‌گیرد. علاوه بر این، خلیج‌فارس قربانی شدیدترین آلودگی نفتی تاریخ نیز شده است (Bohem *et al*., 1998). علیرغم تحقیق و مطالعات گسترده در دهه اخیر، در استفاده از قارچ‌های خاکزی در تجزیه هیدروکربن‌های نفت، پژوهش‌های محدودی در این راستا در ایران به‌عنوان یک کشور پیشرو تولیدکننده نفت صورت گرفته است. پس هدف از این مطالعه تعیین کارایی قارچ‌های بومی و غیربومی همراه با مکانیزم گیاه‌پالایی، زیست‌پالایی و گیاه‌پالایی زیست‌افزونی‌شده در تجزیه نفت خام است.

مواد و روش‌ها

تهیه خاک

جهت انجام این آزمایش، نمونه خاکی از یک منطقه غیرآلوده از باغو واقع در شرق بندرعباس (N27°150' 39.5", E56°24' 30.1")

1 . *Yarrowia*

2 . *Pichia*

از عمق صفر تا ۳۰ سانتی‌متری تهیه شد و پس از خشک کردن خاک در هوا و عبور دادن از الک دو میلی‌متری برخی از ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن از جمله بافت خاک به‌روش هیدرومتری (Bouyoucos, 1962)، ماده آلی به روش اکسیداسیون مرطوب (Walkley and Black, 1934)، قابلیت هدایت الکتریکی در عصاره اشباع به‌وسیله هدایت‌سنج الکتریکی (مدل HQ14D، ساخت کمپانی Hach آمریکا)، پ‌هاش در خمیر اشباع به‌وسیله پ‌هاش‌متر (مدل HQ11D، ساخت کمپانی Hach آمریکا)، ظرفیت تبادل کاتیونی خاک به‌روش استات سدیم (Chapman, 1965)، کربنات کلسیم معادل به‌روش خنثی‌سازی توسط اسید کلریدریک (Allison and Moodie, 1965)، نیتروژن کل به‌روش کجلدال (Bremner, 1965) (مدل 625m ساخت کمپانی behr آلمان) و فسفر قابل استفاده توسط عصاره‌گیر بی‌کربنات سدیم (Olsen *et al*., 1954) تعیین شد (جدول ۱). ضمناً عناصر کم‌مصرف با DTPA عصاره‌گیری و غلظت آن‌ها به‌وسیله دستگاه جذب اتمی (مدلSolaar ساخت کمپانی Thermo آمریکا) تعیین گردید (جدول ۱).

روش انجام آزمایش

در این آزمایش پتانسیل گیاه‌پالایی، زیست‌پالایی و گیاه‌پالایی زیست‌افزونی‌شده در حذف نفت خام از خاک مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش از قارچ‌ها برای زیست‌افزونی خاک‌های آلوده به نفت استفاده شد. برای این منظور یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی به اجرا در آمد. فاکتورهای مورد بررسی شامل سطوح آلودگی خاک به نفت (صفر، ۴ و ۸ درصد وزنی)، (Basumataty *et al*., 2012) نوع گونه گیاهی مورد استفاده در گیاه‌پالایی (بدون گیاه، برموداگراس (*Cynodon dactylon*)، سورگوم (Sorghum *bicolor*) و جو (*Hordeum vulgare*)) و گونه قارچ مورد استفاده در زیست‌افزونی (بدون قارچ، یک گونه قارچ بومی و یک گونه قارچ غیربومی) بود. بذر گیاهان مورد مطالعه از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی تهیه شد. گونه قارچ از خاک‌های آلوده به نفت در جنوب کشور جداسازی شد که جهت انتخاب گونه بومی یک پیش آزمایش انجام داده و گونه‌ای که پتانسیل بالاتری در تجزیه مواد نفتی دارند انتخاب شد (از طریق اندازه‌گیری تنفس میکروبی) و گونه غیربومی (*Phanerochate chrysosporium*) نیز از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. برای انجام آزمایش نمونه‌های پنج کیلویی خاک به‌صورت مصنوعی و با مقادیر مختلف نفت خام آلوده شده و در گلدان‌های پلاستیکی ریخته شد. پس از گذشت شش هفته و به تعادل رسیدن خاک‌های آلوده شده (Basumataty *et al*., 2012)، این خاک‌ها با گونه‌های مختلف قارچ (گونه بومی و گونه غیربومی) تلقیح شده و سپس در آن‌ها گونه‌های گیاهی مختلف کاشته شد. در طول دوره رشد رویشی گیاهان، میانگین دمای شب و روز ۳۰ درجه سانتیگراد، میانگین دمایی گلخانه ۲۶ درجه سانتیگراد، میانگین رطوبتی نسبی هوا ۵۰ درصد و طول دوره روشنایی ۱۵ ساعت بود. البته پس از گذشت شش هفته و به تعادل رسیدن خاک، غلظت مواد نفتی در خاک آلوده شده اندازه‌گیری شد. در پایان دوره آزمایش، گیاهان در مرحله رشد رویشی برداشت شدند و علاوه بر اندازه‌گیری پارامترهای رشد گیاه، خاک گلدان‌ها عصاره-گیری شد و میزان نفت خام (Moopam, 2010) در آن‌ها گردید.

برای اندازه‌گیری غلظت کل هیدروکربن‌های نفتی درخاک، این ترکیبات با حلال‌های هگزان و دی‌کلرومتان با استفاده از دستگاه سوکسله عصاره‌گیری شدند (Christopher *et al*., 1988). برای این منظور نمونه خاک ۲۰ گرم توزین و داخل کاغذ مخصوصی به نام تیمبل قرار داده شد. پرزهای این نوع کاغذ به شکلی است که حلال از آن عبور می‌کند، ولی ذرات خاک از آن عبور نمی‌نمایند. تیمبل پس از آماده شدن در سوکسله (مدل SER148/6، ساخت کمپانی velp ایتالیا) قرار داده شد و به ازای ۲۰ گرم خاک توزین شده، ۱۲۵ میلی‌لیتر از هر حلال به فلاسک دستگاه اضافه گردید. با تنظیم دمای دستگاه به ۷۰ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد رسید و ترکیبات نفتی خاک عصاره‌گیری شدند. سپس دستگاه خاموش و مایع داخل فلاسک از کاغذ صافی واتمن ۴۲ عبور داده شد. از استاندارد نفت خام در غلظت‌های مختلف تهیه کرده و میزان جذب آن‌ها توسط دستگاه قرائت توسط دستگاه UVF (اسپکترو فوتومتر فلورسانس) (مدلF-7000، ساخت شرکت Hitachi ژاپن) با طول موج نشر ۳۶۰ نانومتر و طول موج تحریک ۳۱۰ نانومتر قرائت شد و منحنی کالیبراسیون رسم گردید. و بر این اساس غلظت کل هیدروکربن‌های باقی مانده در هر کدام از تیمارها اندازه‌گیری شد (Moopam, 2010).

انتخاب گیاه

در مطالعات گیاه‌پالایی، گیاهان باید به گونه‌ای انتخاب شوند که از حداکثر جوانه زنی، رشد، توسعه و سطح ویژه ریشه برخوردار باشند و نسبت به شرایط خاک منطقه سازگار باشند و امکان تکمیل دوره رشد آن‌ها در شرایط آلودگی وجود داشته باشد. گونه‌های گراس مانند گیاه سورگوم و جو، تراکم ریشه بالایی دارند. و علاوه بر توانایی رشد و سازش با شرایط اقلیمی مختلف توانایی حذف آلاینده‌های آلی ناشی از ترکیبات نفتی را نیز به خوبی دارند (Media *et al*., 2003). چمن جزو تیره گندمیان

محسوب شده و به‌عنوان گیاه مؤثر در گیاه‌پالایی خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی پیشنهاد شده است. چمن گیاه علفی بوده و دارای سیستم ریشه‌ای فیبری است که به تعامل جامعه میکروبی و آلاینده کمک می‌کند (White *et al*., 2006).

نمونه‌برداری از خاک:

در این تحقیق برای جداسازی قارچ بومی خاک آلوده به نفت خام، از پالایشگاه بندرعباس که تحت تأثیر غلظت‌های بالایی از انواع ترکیبات هیدروکربنی نفتی قرار داشتند نمونه‌برداری صورت گرفت. نمونه‌برداری از نقاطی که برای مدت زمان طولانی در معرض ترکیبات نفتی قرار داشتند و از عمق ۳۰-۰ سانتی‌متری سطح خاک صورت گرفت. سپس نمونه‌های تهیه شده ظرف مدت ۴۸ ساعت به آزمایشگاه بیولوژی منتقل شدند و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جداسازی و خالص‌سازی قارچ‌های بومی خاک‌های آلوده به نفت

از محیط سیب‌زمینی دکستروز آگار[1] (PDA) به‌منظور جداسازی قارچ‌های تجزیه‌کننده نفت خام از خاک استفاده شد. برای جداسازی اولیه قارچ‌های تجزیه‌کننده نفت خام از Oil agar استفاده شد. محیط Oil agar شامل ۱٪ نفت خام و محیط نمکی معدنی است. محیط نمکی معدنی شامل NaCl ۱۰ گرم، KCl۰/۲۹ گرم، $MgSO_4.7H_2O$ ۰/۴۲ گرم، KH_2PO_4 ۰/۸۳ گرم، NaH_2PO_4 ۱/۲۵ گرم، $NaNO_3$ ۰/۴۲ گرم، Agar ۲۰ گرم، آب مقطر ۱۰۰۰ میلی‌لیتر و pH ۷/۲ می‌باشد. همچنین محیط بوشنل هاس با ۲٪ (۲،۴- دی کلروفنل ایندوفنل)، ۰/۱ درصد Tween 80% و ۱٪ نفت خام برای تائید جداسازی قارچ‌های تجزیه‌کننده نفت خام مورد استفاده قرار گرفت.

۱۰ گرم از نمونه خاک را درون ارلنی که حاوی ۹۰ میلی-لیتر آب مقطر می‌باشد منتقل نموده تا رقت 10^{-1}حاصل شود. سپس نمونه به مدت ۶۰ دقیقه روی تکان‌دهنده مکانیکی با دور ۱۲۰rpm، برای جداسازی میکروارگانیسم‌ها از ذرات خاک، شیک شدند. سپس نمونه تهیه‌شده روی محیط PDA حاوی ۱٪ تتراسیکلین کشت داده شدند. پلیت‌های تلقیح شده حاوی محیط PDA به مدت ۵ الی ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. کلنی‌های قارچ رشد کرده بر روی محیط فوق به‌طور جداگانه بر روی محیط کشت PDA جدید منتقل شد تا طی چند مرحله خالص‌سازی گردد (خالص‌سازی به روش زیر کشت صورت می‌گیرد) (Dutta and Anwar, 2014).

استخراج دی‌ان‌ای (DNA)، واکنش زنجیره‌ای پلی مراز و توالی یابی نواحی Internal Transcribed Spacer(ITS)

برای این منظور جدایه مورد نظر روی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار کشت شد و به مدت ۷ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شد و DNA جدایه‌ها مطابق روش اصلاح‌شده موری و تامپسون (Murray and Thompson, 1980) استخراج شد. توالی نواحی ITS1، ITS2 و ژن 5.8S با استفاده از آغازگرهای (5’-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3’) ITS1 و (5’-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3’) ITS4 (White *et al*., 1990) انجام شد. واکنش زنجیرهای پلی‌مراز بهینه‌شده، در حجم ۵۰ میکرولیتر شامل ۰/۴ میکرولیتر DNA الگو، ۱۶/۳۵ میکرولیتر ddH_2O، ۸ میکرولیتر از هر آغازگر، ۱ میکرولیتر دی اکسی نوکلئوتید تری فسفات (DNTPS)، ۰/۲۵ میکرولیتر واحد آنزیم DNA پلی‌مراز (Promega)، ۸ میکرولیتر بافر واکنش 5X و ۸ میکرولیتر کلرید منیزیم ($MgCl_2$) انجام گرفت. واکنش مزبور در دستگاه ترموسایکر انجام شد. چرخه دمایی بکار رفته برای تکثیر ژن شامل ۳۵ چرخه به شرح زیر بود: واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سیلیسوس به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی DNA ژنومی در دمای ۹۴ درجه سیلیسوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها به رشته الگو در دمای ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه و گسترش رشته جدید در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه.

نواحی تکثیریافته ITS1، ITS2 و ژن 5.8S را با استفاده از کیت خالص‌سازی (Quiagn) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده خالص‌سازی شد. محصول به‌دست آمده به‌منظور تعیین توالی DNA، به شرکت پیشگام فرستاده شد. اطلاعات توالی به‌دست آمده با توالی‌های موجود در GenBank با استفاده از ابزار BLAST مقایسه شدند و در نهایت نتایج به دست آمده از شناسایی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

جهت انتخاب یک گونه بومی پیش آزمایشی انجام داده و گونه‌ای که پتانسیل بالاتری در تجزیه مواد نفتی دارند انتخاب شد (از طریق اندازه‌گیری تنفس میکروبی) و مورد استفاده و شناسایی قرار گرفت. در این تحقیق، با توجه به پیش‌آزمایش انجام شده، قارچ جداسازی شده از خاک آلوده از جنس آسپرژیلوس بود و گونه آن آسپرژیلوس نایجر (*Aspergillus niger*) بود.

1 . Potato Dextrose Agar

برای تجزیه آماری داده‌ها نیز از نرم افزار SAS و آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن استفاده شد.

جدول ۱. برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد مطالعه.

ویژگی	واحد	مقدار
رس	%	۲۲
سیلت	%	۴۱
بافت خاک	-	لوم
کربن آلی	%	۰/۰۱
کربنات کلسیم معادل	%	۴۶
ظرفیت تبادل کاتیونی	$cmol_+ kg^{-1}$	۱۰/۱
pH	-	۷/۴
هدایت الکتریکی	$dS\ m^{-1}$	۱/۱
آهن قابل جذب	$mg\ kg^{-1}$	۵/۸
مس قابل جذب	$mg\ kg^{-1}$	۱/۸۳
روی قابل جذب	$mg\ kg^{-1}$	۰/۹۴
منگنز قابل جذب	$mg\ kg^{-1}$	۴/۹
فسفر قابل جذب	$mg\ kg^{-1}$	۶/۵
پتاسیم قابل جذب	$mg\ kg^{-1}$	۳۸۰
نیتروژن کل	%	۰/۰۳۳

نتایج و بحث

تأثیر گیاه‌پالایی و زیست افزونی بر حذف نفت خام

جدول آنالیز واریانس (جدول ۲) نشان می‌دهد که تأثیر گیاه‌پالایی بر حذف نفت خام در خاک معنی‌دار است. همان‌طور که در شکل (۱) مشاهده می‌شود کاربرد گیاهان سبب افزایش معنی‌دار درصد حذف نفت خام نسبت به شاهد گردید. بیشترین درصد حذف نفت خام در خاک‌های کشت شده سورگوم (۶۰/۶ درصد) مشاهده شد و بعد از آن به‌ترتیب مربوط به برموداگراس (۵۶/۱۴ درصد) و جو (۵۲/۶) بود.

به دلیل وجود اختلاف معنی‌دار آماری بین اثر حضور پوشش گیاهی (سورگوم، جو و برموداگراس) و تیمار بدون گیاه (شاهد)، می‌توان کاهش غلظت هیدروکربن‌های نفتی را مربوط به نقش مؤثر سورگوم، جو و برموداگراس بر حذف آلاینده‌های نفتی موجود دانست. البته نوع گیاه نیز دارای اثر معنی‌دار بر کاهش غلظت کل هیدروکربن‌های نفتی خاک بود به شکلی که اختلاف معنی‌داری بین سورگوم، جو و برموداگراس در کاهش غلظت هیدروکربن‌های نفتی در تیمار آلوده به نفت خام دیده شد. تجزیه و تخریب آلاینده‌های نفتی در حضور سورگوم نسبت به جو و برموداگراس بیشتر بود. سورگوم، جو و برموداگراس به‌ترتیب کاهش حدود ۶۰، ۵۶ و ۵۲ درصدی غلظت کل هیدروکربن‌های نفتی (TPH) نسبت به غلظت اولیه این ترکیبات در شروع دوره آزمایش شدند. حضور پوشش گیاهی از طریق افزایش قابلیت دسترسی زیستی هیدروکربن‌ها، ترشحات ریشه، تحریک رشد و فعالیت میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های نفتی و بهبود خواص فیزیکی خاک، می‌تواند سبب افزایش تخریب این آلاینده‌های آلی در خاک شود. در همین راستا مطالعات بسیاری درباره نقش گیاهان در پالایش خاک آلوده به نفت انجام شده است.

همان‌طور که در جدول (۲) مشاهده می‌شود برهمکنش سطوح مختلف نفت خام با گیاهان مورد مطالعه معنی‌دار است. شکل (۲) نشان می‌دهد که در هر سطح آلودگی با کشت گیاهان درصد حذف نفت خام در خاک به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. به‌عنوان مثال در سطح ۴ و ۸ درصد آلودگی نفتی، بدون گیاه درصد حذف نفت خام به‌ترتیب برابر با ۲۳ و ۲۱ درصد بود ولی با کشت گیاه برموداگراس درصد حذف نفت خام در سطوح ۴ و ۸ درصد آلودگی نفتی به‌ترتیب به ۶۰ و ۵۲ درصد رسید. در هر گونه گیاهی بالاترین درصد حذف نفت خام در پایین‌ترین سطح آلودگی خاک به نفت خام (۴ درصد) دیده شد که در گلدان‌های بدون کشت گیاه برابر با ۲۳ درصد و در گلدان‌های کشت شده سورگوم، جو و برموداگراس به ترتیب برابر با حدود ۶۴، ۵۶ و ۶۰ درصد بود. همان‌طور که در شکل (۲) مشاهده می‌شود در هر گونه گیاهی با افزایش سطح آلودگی نفتی درصد حذف نفت خام کاهش می‌یابد. در گلدان‌هایی که جو کشت شده بود درصد حذف نفت خام در سطح ۴ درصد آلودگی نفتی از ۵۶ درصد به ۴۸ درصد در سطح ۸ درصد آلودگی نفتی رسید. این امر به علت آلودگی زیاد و ایجاد حالت بازدارندگی برای فعالیت گیاه و میکروارگانیسم‌ها بود، اما با این حال در همه تیمارهای حاوی گیاه در تمام غلظت‌های آلودگی نفتی میزان حذف TPH بالاتر از نمونه‌های شاهد بود. کشت سورگوم در تمام سطوح آلودگی نفتی، بالاترین درصد حذف نفت خام را داشت. پس سورگوم نسبت به جو و برموداگراس در حذف نفت خام در خاک کارایی بالاتری دارد.

گیاهان سورگوم، جو و برموداگراس دارای سیستم ریشه‌ای گسترده می‌باشند، گیاهان با سیستم ریشه‌ای گسترده به دلیل سطح ویژه‌شان باعث افزایش فعالیت میکروبی ناحیه ریشه شده و به این طریق باعث افزایش تجزیه ترکیبات نفتی در خاک می‌شوند (Hutchinson *et al*., 2001). همچنین گیاهان آلاینده‌ها را از طریق ریشه خود جذب نموده، سپس طی فرایندهایی آن را ذخیره (Phytoextraction) یا تجزیه (Phytodegradation) می‌کنند (Erakhrumen, 2007).

این گیاهان دارای سیستم ریشه‌ای افشان خیلی وسیع هستند که در حجم زیادی از خاک نفوذ می‌کنند. پس قابلیت دسترسی ریشه این گیاهان به هیدروکربن‌های نفتی بیشتر است

و در نتیجه درصد حذف نفت خام افزایش می‌یابد. گیاهان متنوعی که پتانسیل گیاه‌پالایی مکان‌های آلوده به هیدروکربن-های نفتی را دارند شناخته شده‌اند. اکثر مطالعات گراس‌ها و لگوم ها را با پتانسیل خوب تشخیص داده‌اند. به نظر می‌رسد گراس‌های چمنی گیاه مناسبی برای این منظور باشند زیرا سیستم ریشه‌ای فیبری و گسترده‌ای دارند. سیستم ریشه‌ای گرامینه‌ها بالاترین سطح ویژه (سطح ریشه در یک متر مکعب از خاک) را نسبت به انواع دیگر گیاهان داشته و در خاک تا عمق سه متری نفوذ می کنند. هم‌چنین این گیاهان تنوع ژنتیکی بالایی دارند که این ویژگی در استقرار گیاه بسیار حائز اهمیت است (Abedi-koupai and charkhabi, 2005).

Euliss *et al*. (2008) در یک آزمایش گلخانه‌ای نشان دادند که کشت گیاهان switchgrass (*Panicum virgatum*)، gamagrass (*Tripsacum dactyloides*) و sedge (*Carex stricta*) در مدت یک سال حدود ۷۰ درصد هیدروکربن‌های نفتی را کاهش دادند. در حالی که در تیمار شاهد ۲۰ درصد از هیدروکربن‌های نفتی کاهش یافت.

Moubasher *et al*. (2015) اظهار کردند که گیاهان می‌توانند با انتقال بیشتر اکسیژن به ریزوسفر از طریق کانال‌های عبوری ریشه در خاک آلوده، بهبود خاکدانه‌سازی، امکان تجزیه و تخریب بیشتر آلاینده‌های نفتی در خاک را از طریق افزایش فعالیت میکروارگانیسم‌ها فراهم آورند. میکروارگانیسم‌ها در حضور منابع کربن، آنزیم‌هایی تولید کرده که مسئول حمله به مولکول-های هیدروکربن می‌باشند. کارایی فرآیند گیاه‌پالایی به‌میزان زیادی بستگی به حضور و فعالیت جامعه میکربی وابسته به گیاه دارد (Moubasher *et al*., 2015). تحقیقات نشان داده است که حذف هیدروکربن‌های آروماتیک در خاک‌های تحت کشت دو برابر خاک‌های بایر یا بدون کشت بود (Andria *et al*., 2009).

گیاهان به‌طور غیرمستقیم از طریق تغییر دادن شرایط فیزیکی و شیمیایی خاک، افزایش تهویه و فراهم کردن اکسیژن جهت تجزیه ترکیبات آلی در کاهش آلودگی‌های نفتی مؤثر می باشند. هم‌چنین گیاهان با انباشت ترکیبات فوق در زیست‌توده خود، به‌طور مستقیم خاک را از ترکیبات آلی پاک می‌کنند (Vaziri *et al*., 2013).

در خاک‌های آلوده به مواد آلی شیمیایی، گیاهان اثرات گیاه‌پالایی (Phytoremediation) خود را بر روی آلاینده‌ها، با تحریک میکروارگانیسم‌های ریزوسفر جهت تجزیه این آلاینده اعمال می‌کنند که به آن فرایند (Rhizodegradation) می‌گویند (Vaziri *et al*., 2013). Hutchinson *et al*. (2001) در آزمایش-های گلخانه‌ای شش ماهه توانستند به‌طور متوسط ۴۹ درصد کل هیدروکربن‌های نفتی را در خاک‌های آلوده مورد تجزیه قرار دهند. آن‌ها بیشترین میزان تجزیه ترکیبات آلی را در ریزوسفر گیاه مرغ پنجه‌ای (*Cynodon dactylon*)، به‌میزان ۸۰ درصد و در تال فستوکا (*Festuca arundinacea*)، به میزان ۶۲ درصد گزارش نمودند. به‌طور کلی تخریب کل هیدروکربن‌های نفتی در حضور گیاه ۷/۱ برابر بیشتر از تیمار شاهد بود.

Kardani and Takdastan (2015) گزارش دادند که درصد حذف نفت خام در تیمار ۵ درصد آلودگی نفتی در خاک با کشت گیاه علفی *Vetiveria zizonioides* در مدت زمان ۱۲۰ روز به میزان ۹۱ درصد بود و کمترین درصد حذف مربوط به تیمار شاهد با ۱۰ درصد آلودگی نفتی بود که درصد حذف نفت خام ۸/۲ درصد بود. با توجه به نتایج به دست آمده در غلظت ۷ درصد و ۱۰ درصد آلودگی نفتی راندمان حذف TPH در مقایسه با ۵ درصد آلودگی نفتی کمتر بود. Moubasher *et al*. (2015) گزارش دادند که با کشت گیاه *Bassia scoparia* درصد حذف نفت خام از ۴۶ درصد در تیمار شاهد به ۵۸ درصد رسید.

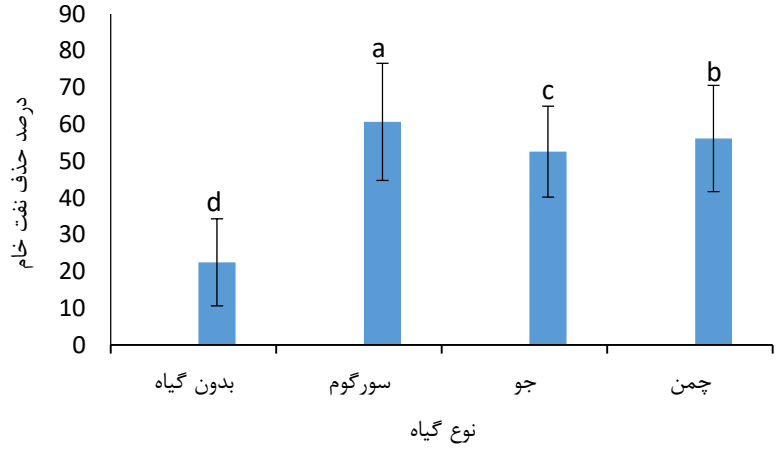
جدول ۲. تجزیه واریانس درصد حذف نفت خام در خاک.

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
		درصد حذف نفت خام
سطح نفت	۱	۶۰۸/۶۳۲***
سطح قارچ	۲	۵۰۱۸/۰۸۴**
سطح گیاه	۳	۵۳۸۸/۸۱۹**
نفت*قارچ	۲	۹۵/۷۴۷**
نفت*گیاه	۳	۳۸/۳۹۲**
قارچ*گیاه	۶	۹۰/۳۹۳**
نفت*قارچ*گیاه	۶	۷۶/۸۱۳**
خطا	۴۸	۱۸/۰۷۹

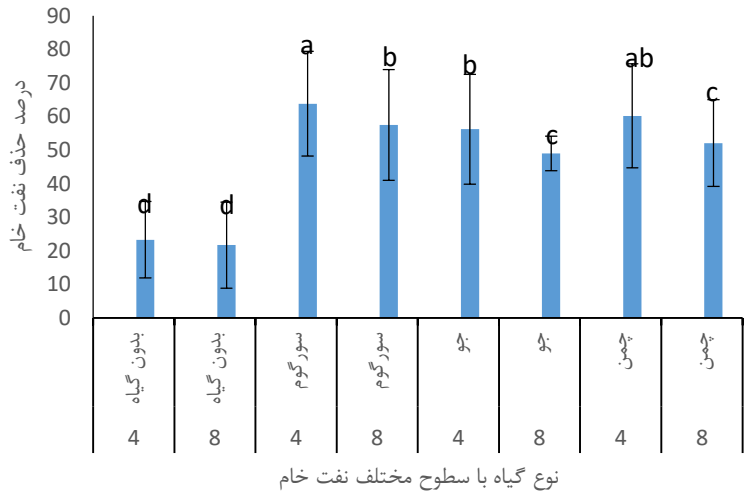
***، ** و ***: به ترتیب در سطح پنج، یک و یک دهم درصد معنی‌دار است.**

جدول (۲) نشان می‌دهد که اثر تلقیح خاک با قارچ‌ها بر درصد حذف نفت خام در خاک معنی‌دار است. همان‌طور که در شکل (۳) مشاهده می‌شود تلقیح خاک با قارچ‌ها (قارچ بومی و غیربومی) درصد حذف ترکیبات نفتی را به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش داد. علت افزایش درصد حذف نفت خام در حضور قارچ‌ها را می‌توان این‌گونه تفسیر کرد که میسیلوم‌های قارچی دارای توانایی رشد درون خاک و سراسر ماتریکس جامد برای متابولیز ترکیبات هیدروکربنی PAHs می‌باشند (Vila *et al*., 2010) و همچنین تجزیه آنزیمی هیدروکربن‌ها توسط قارچ‌ها موجب افزایش درصد حذف نفت خام در خاک می‌شود (Olukunle and Oyegoke, 2016). همچنین اختلاف درصد حذف نفت خام در خاک بین قارچ غیربومی (*Phanerochate*

chrysosporium) و قارچ بومی (*Aspergillus niger*) معنی‌دار بود و درصد حذف نفت خام در خاک با قارچ غیربومی و بومی به ترتیب برابر با ۵۰ درصد و ۶۲ درصد بود که می‌توان نتیجه‌گیری کرد که این قارچ بومی در تجزیه و مصرف مواد نفتی نسبت به قارچ غیربومی مورد مطالعه در این پژوهش کارآیی و عملکرد بهتری داشت. اختلاف بین این دو قارچ در تجزیه نفت خام می‌تواند به دلیل تفاوت در توانایی آنزیم‌های تجزیه‌کننده نفت خام و مسیرهای تجزیه‌ای باشد که توسط میکروارگانیسم‌های مختلف استفاده می‌شود (Olukunle and Oyegoke, 2016). که این واقعیت می‌تواند حاکی از مقاومت بالای این قارچ بومی نسبت به قارچ غیربومی در برخورد با خاک آلوده به هیدروکربن‌های نفتی باشد. در پژوهش انجام شده نشان داده شد که قارچ *Aspergillus niger* جدا شده از خاک توانایی زیادی در حذف ترکیبات نفتی در خاک دارد که با نتایج Al-Nasrawi (2012) که بیان کردند قارچ *Aspergillus niger* توانایی بالایی در حذف ترکیبات نفتی دارند هم‌خوانی دارد.



شکل۱. تأثیر گیاه پالایی بر حذف نفت خام در خاک.



شکل ۲. تأثیر گیاه‌پالایی بر حذف نفت خام در سطوح مختلف آلودگی نفتی.

جدول (۲) نشان می‌دهد که برهم‌کنش سطوح مختلف آلودگی نفتی با تلقیح خاک با قارچ معنی‌دار است. شکل (۴) نشان می‌دهد که در هر سطح آلودگی نفتی، تلقیح خاک با هر دو گونه قارچ، درصد حذف نفت خام را به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش داد. به‌عنوان مثال در سطح ۸ درصد آلودگی نفتی، تلقیح خاک با قارچ‌های *Phanerochate chrysosporium* و *Aspergillus niger*، درصد حذف نفت خام را از ۳۲ درصد (در تیمار بدون تلقیح خاک با قارچ) به ترتیب به ۴۵ و ۶۵ درصد رسید. در هر تیمار تلقیح خاک با قارچ، با افزایش سطح آلودگی خاک به نفت درصد حذف نفت خام به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. به‌طور مثال در تیمار تلقیح خاک با قارچ *Phanerochate chrysosporium* با افزایش سطح آلودگی نفتی از ۴ درصد به ۸ درصد میزان حذف آلودگی نفتی از ۵۴ درصد به ۴۵ درصد رسید. همین روند نیز در خاک‌های تلقیح شده با قارچ *Aspergillus*

niger دیده شد. کاهش درصد حذف نفت خام با افزایش سطح آلودگی نفتی می‌تواند به‌علت اثر سمی بودن نفت خام بر قارچ‌ها باشد که با افزایش سطح آلودگی نفتی اکثر میکروارگانیسم‌های در خاک از بین می‌روند یا غیرفعال می‌شوند (Obire and Anyanwu, 2009). در هر سطح آلودگی خاک به نفت خام بالاترین درصد حذف ترکیبات نفتی در خاک‌های آلوده تلقیح شده با قارچ بومی *Aspergillus niger* دیده شد. که در سطوح ۴ و ۸ درصد آلودگی نفتی، با تلقیح خاک با قارچ *Aspergillus niger*، درصد حذف نفت خام به ترتیب برابر با ۶۵ و ۵۷ درصد بود.

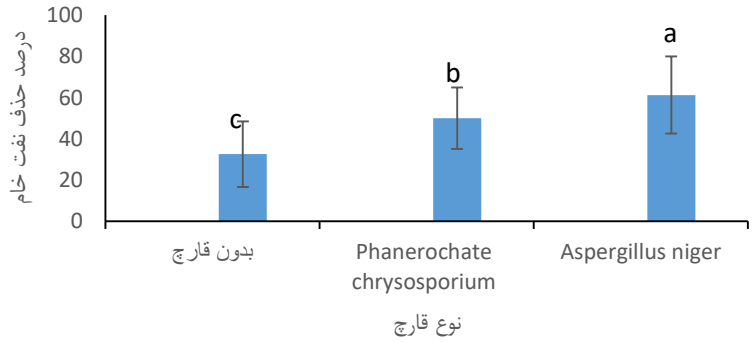
قارچ‌ها از نفت خام به‌عنوان سوبسترا برای رشد استفاده می‌کنند و جهت تجزیه مولکول‌های پیچیده نفت خام آنزیم‌های برون سلولی ترشح می‌کنند و بنابراین نفت خام را به فرم‌های ساده‌تر یا ترکیباتی تبدیل می‌کنند که بتوانند از آن‌ها برای رشد و تغذیه استفاده کنند (Adekunle and Adebambo, 2007). Ojewumi *et al.* (2018) گزارش دادند که *Aspergillus niger* به‌طور معنی‌داری ترکیبات هیدروکربن‌های نفتی را کاهش می‌دهند و کارایی این قارچ در حذف ترکیبات نفتی نسبت به باکتری *Pseudomonas aeruginosa* بالاتر بود. Ezekoye *et al.* (2018) نشان دادند که *Aspergillus niger* و *Penicillium notatum* در بین قارچ‌های جداسازی شده از خاک آلوده به نفت خام، کارایی بالایی در حذف هیدروکربن‌های نفتی در خاک دارد در حالی که *Aspergillus fumigate*، *Aspergillus oryzae* و *Rhizopus oryzae* توانایی متوسط در تجزیه ترکیبات نفتی در خاک دارند. آن‌ها همچنین بیان کردند که میزان کل هیدروکربن‌های نفتی قبل از زیست‌پالایی ۱۶۶۱۸ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک بود و بعد از تلقیح به ۱۵۴/۱۴ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک رسید.

Winquist *et al.* (2014) در آزمایشی بر روی خاک آلوده به هیدروکربن‌های آروماتیک با غلظت ۳۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک نشان دادند که با تلقیح خاک به قارچ *Phanerochaete velutina*، هیدروکربن‌های آروماتیک چهار حلقه‌ای به‌میزان ۹۶ درصد و هیدروکربن‌های آروماتیک پنج و شش حلقه‌ای در مجموع به میزان ۳۹ درصد و در تیمار شاهد هیدروکربن‌های آروماتیک چهار حلقه‌ای به میزان ۵۵ درصد و هیدروکربن‌های آروماتیک پنج و شش حلقه‌ای در مجموع به میزان ۷ درصد کاهش یافت.

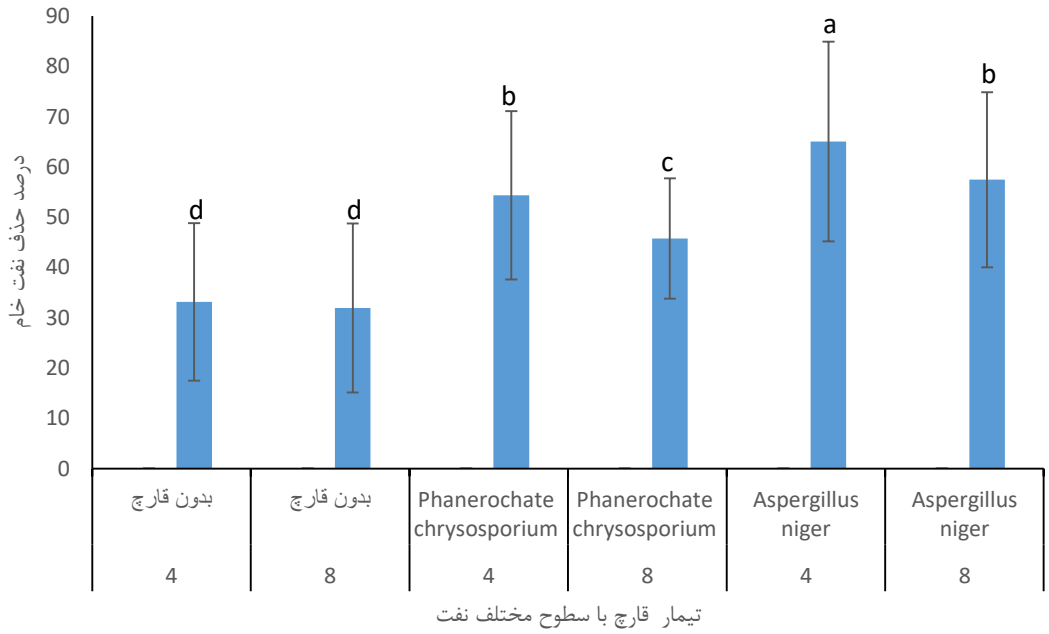
Steliga (2012) بیان کرد که در میان قارچ‌های رشته‌ای، *کلادوسپوریوم* و *آسپرژیلوس* در تجزیه زیستی هیدروکربن‌های آلیفاتیک شرکت می‌کنند. درحالی‌که قارچ‌های متعلق به جنس‌های *کانینگهاملا*، *پنی سیلیوم*، *فوزاریوم* و *آسپرژیلوس* می‌توانند در تجزیه هیدروکربن‌های آروماتیک شرکت کنند. در این بررسی نیز بالاترین تجزیه نفت خام در خاک‌های تیمار شده با قارچ *Aspergillus niger* بود.

Adekunle and Adebambo (2007) بیان کردند که میکروارگانیسم‌ها هیدروکربن‌ها را تجزیه می‌کنند و از انرژی آن برای تولید اجزای سلولی استفاده می‌کنند. پس از تجزیه کامل، کربن اکسیدشده و آب و انرژی برای استفاده در ایجاد زیست‌توده سلولی آزاد می‌شود. با این حال، در این مطالعه راندمان تجزیه زیستی بالایی مشاهده گردید که مربوط به قارچ *Aspergillus niger* بود.

Obire *et al.* (2008) هم گزارش کردند که کارآمدترین متابولیزه‌کننده‌های هیدروکربن‌ها جنس‌های *آسپرژیلوس* و *پنی سیلیوم* می‌باشند. قارچ‌ها تجزیه‌کنندگان بالقوه تحت شرایط نامطلوب، از جمله در pH پایین و محیط‌هایی با فقر مواد مغذی هستند. آن‌ها در هر سیستم آلوده حضور دارند و ممکن است ترکیبات نفت و مشتقات سرسخت آن را به‌عنوان یک منبع انرژی استفاده کنند. علاوه بر این، زمانی که با مخمرها و باکتری‌ها مقایسه می‌شوند، آن‌ها توانایی بیشتری برای انطباق با محیط زیست دارند (Fraga *et al.*, 2011).



شکل ۳. تأثیر زیست پالایی بر حذف نفت خام در خاک



شکل۴. تأثیر زیست پالایی بر حذف نفت خام در سطوح مختلف آلودگی نفتی در خاک

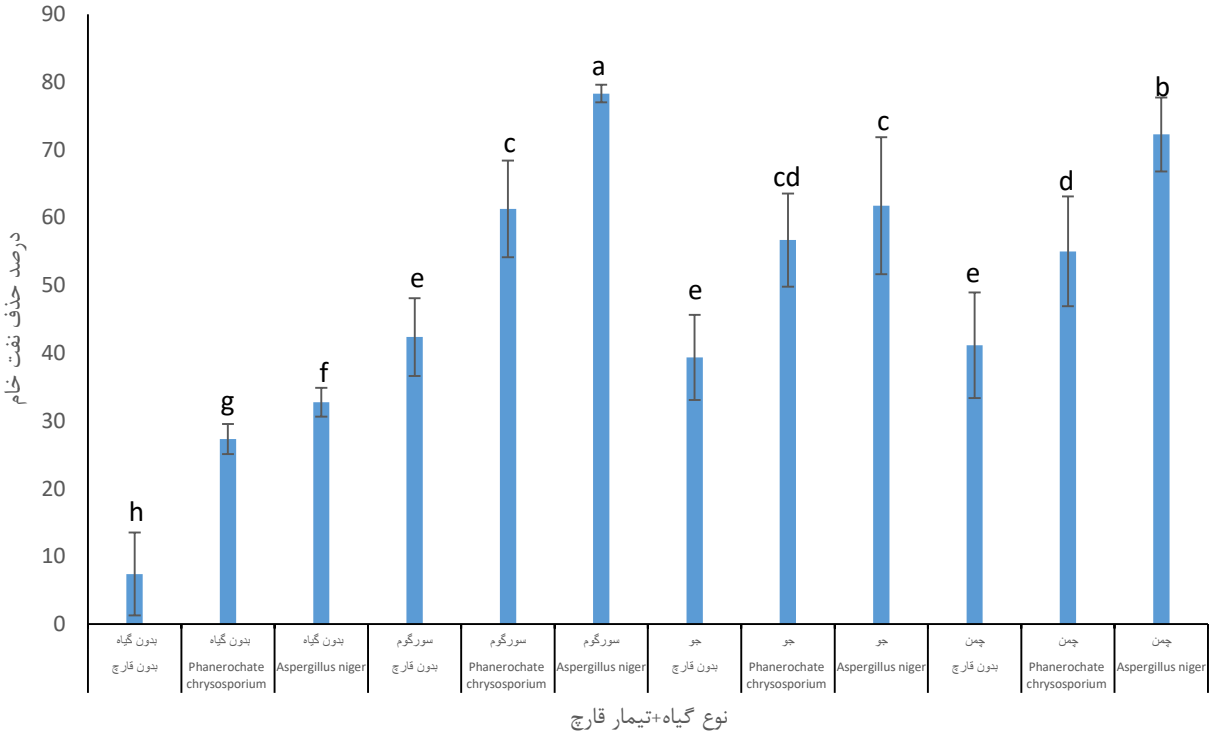
جدول (۲) نشان می‌دهد که اثر متقابل گونه گیاهی با قارچ‌های تلقیح شده به خاک بر حذف نفت خام معنی‌دار است. همان‌طور که در شکل (۵) مشاهده می‌شود کشت گیاهان مورد مطالعه به‌تنهایی (گیاه‌پالایی)، تلقیح خاک با قارچ به‌تنهایی (زیست‌پالایی) و کاربرد توأم آن‌ها (گیاه‌پالایی زیست‌افزونی‌شده) درصد حذف نفت خام را به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش داد. همچنین کاربرد توأم آن‌ها (گیاه‌پالایی زیست‌افزونی‌شده) نسبت به کاربرد هر یک از روش به‌تنهایی (گیاه‌پالایی و زیست-پالایی) اختلاف معنی‌داری بر درصد حذف ترکیبات نفتی دارد. که نشان می‌دهد کارایی روش گیاه‌پالایی زیست‌افزونی شده نسبت به گیاه‌پالایی به‌تنهایی و زیست‌پالایی به‌تنهایی به‌طور معنی‌داری بالاتر بود. به‌عنوان مثال درصد حذف نفت در خاک آلوده با کشت برموداگراس به‌تنهایی و با تلقیح خاک با قارچ *Aspergillus niger* به‌تنهایی به ترتیب برابر با حدود ۴۱ درصد و ۳۳ بود و اما با کاربرد توأم آن‌ها (کشت برموداگراس+تلقیح خاک با قارچ *Aspergillus niger*) درصد حذف نفت خام در خاک به ۷۲ درصد رسید. این بدین معنا است که ترشحات ریشه مانند آنزیم‌ها و سورفکتانت‌ها و بهبود شرایط فیزیکی و شیمیایی خاک توسط گیاهان، باعث افزایش فعالیت قارچ‌ها و در نتیجه تجزیه بیشتر نفت خام توسط قارچ‌ها می‌شود (Mohsenzadeh *et al*., 2010). همچنین افزایش درصد حذف نفت خام در حضور قارچ‌ها به این علت است که میسیلوم قارچ‌ها در مواد نامحلول مانند نفت خام نفوذ می‌کند و با افزایش دسترسی قارچ‌ها به نفت خام و تهویه خاک، باعث افزایش تجزیه نفت خام با ترشح آنزیم‌های برون سلولی می‌شود (Young and Crawford, 2004).

همان‌طور که در شکل (۵) دیده می‌شود در هر گونه گیاهی بالاترین درصد حذف نفت خام در تیمار تلقیح خاک با قارچ بومی *Aspergillus niger* بود. بالاترین درصد حذف نفت خام در کاربرد توأم گیاه سورگوم با قارچ بومی *Aspergillus niger* مشاهده شد که حدود ۷۹ درصد بود. کارایی بالاتر قارچ *Aspergillus niger* نسبت به قارچ *Phanerochate chrysosporium* به‌دلیل سازگار بودن این قارچ با محیط‌های آلوده به ترکیبات نفتی (بومی بودن) و سیستم آنزیمی آن می‌باشد (Esparza- Carcia *et al*., 2007).

Alarcon *et al*. (2008) بیان کردند که قارچ میکوریزا از طریق تغییر ساختار میکروبی ریزوسفر و میکوریزوسفر، ایجاد محیط مناسب برای رشد و فعالیت میکروارگانیسم‌ها به‌واسطه افزایش حجم ریشه و ریزوسفر و افزایش ترشحات ریشه سبب افزایش تجزیه نفت خام می‌شود. همچنین Bravo *et al*. (2017) بیان کردند که قارچ‌ها از ترکیبات نفتی به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده می‌کنند و گیاهان با ترشحات ریشه‌ای شرایط را برای تجزیه ترکیبات نفتی توسط قارچ‌ها مساعد می‌کنند. گونه‌های علفی به همراه قارچ‌های اندوفیت نسبت به کاربرد گیاه علفی به‌تنهایی کارایی بالاتری در حذف هیدروکربن‌های نفتی در خاک آلوده به مواد نفتی دارند (Soleimani *et al*., 2010).

Mohsenzadeh *et al*. (2010) فعالیت ۱۳ گونه مختلف قارچ را تحت غلظت‌های متفاوت نفت بررسی کردند و گزارش

دادند که قارچ‌ها کم و بیش مقاوم به سطوح مختلف نفت هستند و تمام گونه‌های قارچ مورد مطالعه در سطح یک درصد آلودگی نفتی، کلونی کافی تشکیل می‌دهند و در سطح ۱۰ درصد آلودگی نفتی تنها گونه‌های محدودی فعالیت رشدی دارند و در بین آن‌ها *Fusarium equiseti* و *Fusarium oxysporum* بالاترین مقاومت به آلودگی نفتی دارند. و در تمام گلدان‌هایی که گیاهان با قارچ تلقیح شد درصد حذف مواد نفتی بیشتر بود و این کاهش در گیاهان تلقیح شده با *Fusarium equiseti* و *Fusarium oxysporum* قابل‌توجه بود. آن‌ها نتیجه گرفتند که کاربرد توأم قارچ و گیاه نسبت به هر یک از آن‌ها به‌تنهایی کارایی بیشتری در حذف نفت در خاک دارد.



شکل ۵. تأثیر گیاه‌پالایی زیست‌افزونی شده بر حذف نفت خام در خاک

جدول تجزیه واریانس نشان می‌دهد که برهم‌کنش نوع گیاه، سطوح تلقیح خاک با قارچ و سطوح آلودگی نفتی بر درصد حذف نفت خام در سطح یک درصد معنی‌دار است (جدول ۲). همان‌طور که در جدول (۳) مشاهده می‌شود کمترین درصد حذف نفت خام در خاک مربوط به تیمار بدون گیاه و بدون تلقیح خاک با قارچ در سطوح ۴ درصد و ۸ درصد نفت خام بود که به ترتیب برابر با ۹/۵ درصد و ۵/۲ درصد بود. اما با کاشت گیاه به‌تنهایی، تلقیح خاک با قارچ به‌تنهایی و گیاه‌پالایی زیست‌افزونی شده درصد حذف نفت خام در خاک را افزایش داد. به‌عنوان مثال در تیمار بدون گیاه و بدون قارچ در سطح ۴ درصد نفت خام، درصد حذف نفت خام در خاک برابر با ۵/۲ درصد بود و با کاشت سورگوم (به‌تنهایی) درصد حذف نفت خام در خاک به ۴۵ درصد رسید و با تلقیح خاک با قارچ *Aspergillus niger* (به‌تنهایی) درصد حذف نفت خام در خاک به ۳۳ درصد رسید و با کاشت گیاه سورگوم همراه با تلقیح خاک با قارچ *Aspergillus niger* درصد حذف نفت خام در خاک به ۷۹/۵ درصد رسید. که نشان می‌دهد تجزیه ترکیبات نفتی در خاک با کاربرد توأم گیاه و تلقیح خاک با قارچ نسبت به کاشت گیاه و تلقیح خاک با قارچ به‌تنهایی مؤثرتر است.

نتیجه‌گیری

بیشترین درصد حذف نفت خام در خاک‌های کشت شده سورگوم مشاهده شد و بعد از آن به‌ترتیب مربوط به برموداگراس و جو بود. همچنین در هر گونه گیاهی بالاترین درصد حذف نفت خام در پایین‌ترین سطح آلودگی خاک به نفت خام (۴ درصد) دیده شد. تلقیح خاک با قارچ‌ها (قارچ بومی و غیربومی) درصد حذف ترکیبات نفتی را به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش داد و در هر سطح آلودگی خاک به نفت خام، بالاترین درصد حذف ترکیبات نفتی در خاک‌های آلوده تلقیح شده با قارچ بومی

Aspergillus niger دیده شد. در هر گونه گیاهی بالاترین درصد حذف نفت خام در تیمار تلقیح خاک با قارچ بومی *Aspergillus niger* بود. در این تحقیق، از بین قارچ‌های بومی که از خاک آلوده به نفت خام جدا سازی شدند، قارچ *Aspergillus niger* توانایی بالاتری در تجزیه ترکیبات نفتی داشت و با توجه به پتانسیل و کارایی بالای این قارچ در حذف ترکیبات نفتی می‌توان از این قارچ بومی در میدان نفتی که دارای سطوح بالایی از آلودگی نفت خام هستند استفاده نمود. نتایج به‌دست آمده مبین نقش مثبت و عملکرد مناسب گیاهان و قارچ‌های انتخابی در حذف نفت خام از خاک است. بنابراین افزایش در حذف آلاینده‌های نفتی در حضور گیاهان (مخصوصاً سورگوم) و قارچ‌های مورد آزمایش (مخصوصاً *Aspergillus niger*) نقش بسیار مهمی در بهبود وضعیت خاک آلوده به ترکیبات نفتی دارد و استفاده از این گیاهان و قارچ‌ها برای کاهش هیدروکربن‌های نفتی خاک آلوده در منطقه پالایشگاه بندرعباس پیشنهاد می‌شود.

جدول ۳. اثر نوع گیاه و گونه قارچ بر حذف نفت خام در سطوح مختلف آلودگی نفتی.

گیاه	قارچ	نفت		درصد حذف نفت خام
بدون گیاه	بدون قارچ	۴	m	۹/۵۵
بدون گیاه	بدون قارچ	۸	m	۵/۲۷
بدون گیاه	*P. chrysosporium*	۴	l	۲۷/۶۸
بدون گیاه	*P. chrysosporium*	۸	l	۲۶/۹۵
بدون گیاه	*niger*	۴	kl	۳۲/۶۰
بدون گیاه	*A. niger*	۸	kl	۳۲/۸۹
سورگوم	بدون قارچ	۴	ghi	۴۵/۰۶
سورگوم	بدون قارچ	۸	ijk	۳۹/۶۸
سورگوم	*P. chrysosporium*	۴	cd	۶۶/۹۱
سورگوم	*P. chrysosporium*	۸	ef	۵۵/۶۶
سورگوم	*A. niger*	۴	a	۷۹/۴۹
سورگوم	*A. niger*	۸	ab	۷۷/۱۰
جو	بدون قارچ	۴	jk	۳۶/۰۳
جو	بدون قارچ	۸	ijk	۳۹/۶۸
جو	*P. chrysosporium*	۴	de	۶۱/۷۱
جو	*P. chrysosporium*	۸	fg	۵۱/۶۳
جو	*A. niger*	۴	bc	۷۰/۹۰
جو	*A. niger*	۸	gf	۵۲/۶۲
برموداگراس	بدون قارچ	۴	hij	۴۲/۱۴
برموداگراس	بدون قارچ	۸	ijk	۴۰/۱۷
برموداگراس	*P. chrysosporium*	۴	de	۶۱/۲۱
برموداگراس	*P. chrysosporium*	۸	fgh	۴۸/۸۰
برموداگراس	*A. niger*	۴	ab	۷۷/۲۴
برموداگراس	*A. niger*	۸	cd	۶۷/۲۷

حروف مشابه در هر ستون، عدم معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

سپاسگزاری

از سازمان محیط زیست استان هرمزگان و کلیه کارشناسان محترم محیط زیست بندرعباس که در انجام هرچه بهتر این تحقیق ما را یاری کردند نهایت تشکر می‌نماییم.

REFERENCES

Abedi-Koupai, J. and Charkhabi, A. M. (2005). Phytoremediation of petroleum contaminated soils. Proceedings of Aquifer Vulnerability and Risk, 2nd International Workshop and 4th Congress on the Protection and Management of Groundwater. September 21-23. Parma, Italy.

Adekunle, A. A. and Adebambo, O. A. (2007). Petroleum hydrocarbon utilization by fungi isolated from detarium senegalense (J. F Gmelin)

seeds. *Journal of American Science*, 3(1): 69-76.

Adenipekun, C. O. and Lawal, R. (2012). Uses of mushrooms in bioremediation: A Review. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 7(3): 62-68

Afzal, M., Khan, Q.M. and Sessitsch, A. (2014). Endophytic bacteria: prospects and applications for the phytoremediation of organic pollutants. *Chemosphere*, 117: 232–242.

Alarcon, A., Davies F. T., Autenneth R. L. and Zuberer D.A. (2008). Arbuscular Mycorrhiza and Petroleum-Degrading Microorganisms Enhance Phytoremediation of Petroleum-Contaminated Soil. *International Journal of Phytoremediation*, 10: 251-263.

Al-Baldawi, I. A., Abdullah, S. R. S., Anuar, N., Suja, F. and Mushrifah, I. (2015). Phytodegradation of total petroleum hydrocarbon (TPH) in diesel-contaminated water using Scirpus grossus. *Ecological Engineering*, 74: 463–473.

Allamin, I. A., Ijah, U. J. J., Ismail, H. Y. and Isa, M. A. (2014). Distribution of hydrocarbon degrading fungi in soil in Kukawa, Borno state, Nigeria. *Merit Research Journal Environmental Science Toxicology*, 2: 135–140.

Allison, L. E., and Moodie. C. D. (1965). Carbonate. P 1379-1396, In: C. A. Black *et al*. (ed), *Methods of soil analysis*, Part 2, American Society of Agronmy, Madison, WI.

Al-Nasrawi, H. A. (2012). Biodegradation of crude oil by fungi isolated from Gulf of Mexico. *Journal of Bioremediation and Biodegradation*, 3(4): 147-152.

Andria, V., Reichenauer, T. G. and Sessitsch, A. (2009). Expression of alkane monooxygenase (alkB) genes by plant-associated bacteria in the rhizosphere and endosphere of Italian ryegrass (Lolium multiflorum L.) grown in diesel contaminated soil. *Environmental Pollution*, 157: 3347-3350.

Baheri, H. and Meysami, P. (2002). Feasibility of fungi bioaugmentation in composting a flare pit soil. *Journal of Hazardous Material*, 89: 279-286.

Bohem, P. D., Page, D. S., Gilfillan, E. S., Bence, A. E., Burns, W. A. and Mankiewicz, P. J. (1998). Study of effects of the Exxon -Valdez oil spill on benthic sediments in two bays in prince William Sound, Alaska. 1. Study, design, chemistry and source finger-printing. *Environmental Science and Technology*, 32: 567-576.

Bokhary, H. A. and Sarwat, P. (2012). Fungi from petroleum-contaminated Saudi Arabian soils. Arid Soil Research and Rehabilitation, 7:191-195.

Bouyoucos, C. J. (1962). Hydrometer method improved for making particle size analysis of soils. *Agronomy Journal*, 54: 464-465.

Bravo, A., Brands, M., Wewer, V., Dormann, P. and Harrison, M. J. (2017). Arbuscular mycorrhiza-specific enzymes FatM and RAM2 fine-tune lipid biosynthesis to promote development of arbuscular mycorrhiza. *New Phytologist*, 214: 1631–1645.

Bremner, J. M. 1965. Total nitrogen. In: C. A. Black *et al*. (eds*), Methods of soil analysis*. Part 2, (pp 1148-1158). American Society of Agronomy. Mandison,WI.

Caudle, K.L. and Maricle, B.R. (2014). Physiological relationship between oil tolerance and flooding tolerance in marsh plants. *Environmental and Experimental Botany*, 107: 7–14.

Chaillan, F., Fleche, A. L., Bury, E., Phantavong, Y., Grimont, P., Saliot, A. and Oudot, J. (2004). Identification and biodegradation potential of tropicalaerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Research in Microbiology*, 155(7): 587-595.

Chapman, H. D. (1965). Cation exchange capacity. In: C. A. Black *et al*. (eds.) *Method of soil analysis*. Part 2, (pp. 891-901). American Society of Agronomy. Madison, WI.

Chengwei, F., Radosevich, M. and Fuhrmann, J. (2001). Atrazine and phenanthrene degradation in grass rhizosphere soil. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 4(6): 604-610.

Christopher, S., Hein, P., Marsden, J. and Shurleff, A. S. (1988). Evaluation of methods 3540 (soxhlet) and 3550 (Sonication) for evaluation of appendix IX analyses from solid samples. S-CUBED, Report for EPA contract 68- 03-33-75, work assignment No.03, Document No. SSS-R-88-9436.

Dutta, S. D. and Anwar, M. N. (2014). Biodegradation of petroleum hydrocarbon by indigenous fungi isolated from ship breaking yards of Bangladesh. *International Research Journal of Biological Sciences*, 3: 22-30.

Erakhrumen, A. A. (2007). Phytoremediation: an environmentally sound technology for pollution prevention, control and remediation in developing countries. *Educational Research and Review*, 2 (7):151-156

Esparza- Carcia, F., Chavez- Gommez, B.; Rodriguez-Vazques, R. and Barrera- Cortes, J. (2007). Fungi and bacteria isolated from two highly polluted soils for hydrocarbon degradation. *Journal of Acta Chimica Slovenica*, 54: 201-209.

Euliss, K., Ho, C., Schwab, A.P., Rock, S. and Banks, M. K. (2008). Greenhouse and field assessment of phytoremediation for petroleum contaminants in a riparian zone. *Bioresource Technology*, 99:1961–1971

Ezekoye, C. C., Chikere, C. B. and Okpokwasili, G. C. (2018). Fungal diversity associated with crude oil-impacted soil undergoing in-situ bioremediation. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 10 148–152.

Fraga, M. E., Zonta, E. and Balieiro, F. C. (2011). Isolation and selection of filamentous fungi from petroleum contaminated soil. *Bioresearch Bulletin*, 4(1): 227-235.

García-Sánchez, M., Košnář, Z., Mercl, F., Aranda, E. and Tlustoš, P. (2018). A comparative study to evaluate natural attenuation, mycoaugmentation, phytoremediation, and microbial- assisted

phytoremediation strategies for the bioremediation of an aged PAH-polluted soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147: 165–174.

Gargouri, B., Mhiri, N., Karray, F., Aloui, F., Sami, S. (2015). Isolation and characterization of hydrocarbon degrading yeast strains from petroleum contaminated Industrial Wastewater. *Biomed Research International*, 6:1-11.

Gaskin, S. E. and Bentham, R. H. (2010). Rhizoremediation of hydrocarbon contaminated soil using Australian native grasses. *Science of the Total Environment*, 408: 3683-3688.

Hashem A.R. (2007). Bioremediation of Petroleum Contaminated Soils in the Arabian Gulf Region: A Review. *Journal of Kuwait Science*, 19: 81-91.

Hentati, O., Lachhab, R., Ayadi, M. and Ksibi, M. (2013). Toxicity assessment for petroleum-contaminated soil using terrestrial invertebrates and plant bioassays. *Environmenta*l *Monitorning and Assessment*, 185: 2989-2998.

Hutchinson, S. L.; Banks, M. K. and Schwab, A. P. (2001). Bioremediation and biodegradation. Phytoremediation of aged petroleum sludge: Effect of inorganic fertilizer. *Journal of Environmental Quality*, 30: 395-403.

Johnsen A. R, Wick L. Y and Harms H. (2005). Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution*, 133(1): 71- 84.

Kardani, M. and Takdastan, A. (2015) Removal of Total Petroleum Hydrocarbons Using *Vetiveria Zizanioides* and Microbial Population Changes in Soil Contaminated with Oil in Ahvaz**. *Journal of Mazandaran University of Medical Science***, 25(131): 87-97.

Lee, H., Yun, Y., Jang, S., Kim, S. and Jae-Jin, G. K. (2015). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in creosote-contaminated soil by peniophora incarnata KUC8836. *Bioremediation Journal*, 19: 18-26.

Lotfinasabasl, S, Gunale, V. R. and Rajurkar N. S. (2012). Assessment of petroleum hydrocarbon degradation from soil and tarball by fungi. *Bioscience Discovery*, 3(2): 186-192.

Mancera-Lopez, M. E., Esparza-Garcia, F., Chavez-Gomez, B. and Rodriguez-Vazquez, R. (2008). Bioremediation of an aged hydrocarboncontaminated soil by a combined system of biostimulation – bioaugmentation with filamentous fungi. *International Biodeterioration Biodegradation*, 61: 151-160.

Marchand, C., St-Arnaud, M., Hogland, W., Bell, T.H. and Hijri, M. (2017). Petroleum biodegradation capacity of bacteria and fungi isolated from petroleum-contaminated soil. *International Biodeterioration Biodegradation*, 116: 48–57.

Martin, B. C., George, S. J. and Price, C. A. (2014). The role of root exuded low molecular weight organic anions in facilitating petroleum hydrocarbon degradation: current knowledge and future directions. *Science of the Total Environmental*, 472: 642–653.

Media, V. F., Maestri, E., Marmiroli, M., Dietz, A. C. and Mc Cutcheon, S. C. (2003). Plant tolerances to contaminants. P. 189-233, In: S. C., Mc Catcheon, and J. L.,Schnoor (eds). Phytoremediation, transformation and control of contaminants, Wiley- Interscience. 1024pp

Mittal, A., and Singh, P. (2009). Studies on biodegradation of crude oil by *Aspergillus niger*. *The South Pacific Journal of Natural Science*, 271: 57-60.

Mohsenzadeh, F., Nasseri, S., Mesdaghinia, A., Nabizadeh, R., Zafari, D., Khodakaramian, G. and Chehregani, A. (2010). Phytoremediation of petroleum-pollutedsoils: Application of *Polygonum aviculare* and its root-associated (penetrated) fungal strains for bioremediation of petroleum-pollutedsoils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73: 613–619.

Moopam, P. (2010) .Manaul of oceanographic observation and pollutant analyses methods. 3th (ed.), Kuwit, 321p.

Moubasher, H. A., Hegazy, A.K., Mohamed, N.H., Moustafa, Y.M., Kabiel, H.F. and Hamad, A.A. (2015). Phytoremediation of soils polluted with crude petroleum oil using Bassia scoparia and its associated rhizosphere microorganisms. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 98: 113-120.

Murray, M.G., and Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8: 4321–4325.

Obire, O. and Anyanwu, E. C. (2009). Impact of various concentrations of crude oil on fungal populations of soil. *International Journal of Environmental Science*, 6: 211-218.

Obire, O., Anyanwu, E. C. and Okigbo, R. N. (2008). Saprophytic and crude oil-degrading fungi from cow dung and poultry droppings as bioremediatingagents. *International Journal of Agricultural Technology*, 4(2): 81-89.

Ojewumi, M. E., Anenih, E. V. Taiwo, O. S., Adekeye, B. T. Awolu, O. O. and Ojewumi, E. O. (2018). Bioremediation study of raw and treated crude petroleum oil polluted soil with *Aspergillus niger* and *Pseudomonas aeruginosa. Journal of Ecological Engineering, 19:226-235.*

Olsen, S. R., C. V. Cole, F. S. Watanabe, and L. A. Dean. (1954). Estimation of available phosphorus in soil by extraction with sodium bicarbonate. USDA. Circ. 939. U. S. Gover. Prin. Office, Washington, DC, U. S. A.

Olukunle, O.F. and Oyegoke, T.S. (2016). Biodegradation of Crude-oil by Fungi Isolated from Cow Dungcontaminated Soils. *Nigerian Journal. Biotechnology*, 31: 46 –58

Onifade, A.K. and Abubakar, F.A. (2007). Characterization of hydrocarbon-degrading microorganisms isolated from crude oil contaminated soil and remediation of the soil by enhanced natural attenuation. *Research in Microbiology*, 2(2): 149- 55.

Palanisamy, N., Ramya, J., Kumar, S., Vasanthi, N., Chandran, P. and Khan, S. (2014). Diesel biodegradation capacities of indigenous bacterial species isolated from diesel contaminated soil. *Journal of Environmental Health Science Engineering*, 12: 142-151.

Paredes-Páliz, K., Rodríguez-Vázquez, R., Duarte, B., Caviedes, M. A., Mateos-Naranjo, E. and Redondo-Gómez, S. (2018). Investigating the mechanisms underlying phytoprotection by plant growth-promoting rhizobacteria in Spartina densiflora under metal stress. *Plant Biology*, 20, 497–506.

Potin, O., Rafin, C. and Veignie, E. (2004). Bioremediation of an agedpolycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 54:45–52.

Shekoohiyan, S., Moussavi, G. and Naddafi, K. (2016). The peroxidase- mediated biodegradation of petroleum hydrocarbons in a H2O2-induced SBR using in-situ production of peroxidase: biodegradation experiments and bacterial identification. *Journal of Hazardous Materials*, 313: 170–178.

Soleimani, M., Afyuni, M., Hajabbasi, M. A., Nourbakhsh, F., Sabzalian, M. R. and Christensen, J. H. (2010). Phytoremediation of an aged petroleum contaminated soil using endophyte infected and non-infected grasses. *Chemosphere*, 81:1084-1090.

Steliga, T. (2012). Role of fungi in biodegradation of petroleum hydrocarbons in Drill Waste. *Polish Journal of Environmental Studies*, 21(2): 471-479.

Suja, F., Rahim, F., Taha, M. T., Hambali, N., Razali, R., Khalid, A. and Hamzah, A. (2014). Effects of local microbial bioaugmentation and biostimulation on the bioremediation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in crude oil contaminated soil based on laboratory and field observations. *International Biodeterioration and. Biodegradation*, 90: 115–122.

Tang, J., Wang, R., Niu, X. and Zhou, Q. (2010). Enhancement of soil petroleum emediation by using a combination of ryegrass (Lolium perenne) and different microorganisms. *Soil and Tillage Research*, 110: 87–93.

Thapa, B., Kumar, K. C. A. and Ghimire, A. (2012). A review on bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil. *Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology*, 8(1): 164-170.

Thijs, S., Sillen, W., Rineau, F., Weyens, N. and Vangronsveld, J. (2016). Towards an enhanced understanding of plant-microbiome interactions to improve phytoremediation: engineering the metaorganism. *Frontiers Microbiology*, 7: 1–15.

Vaziri, A., Panahpour, E. and Mirzaee Beni, M. H. (2013). Phytoremediation, a Method for Treatment of Petroleum Hydrocarbon Contaminated Soils. *International Journal of Farming and Allied Sciences*, 2 (21): 909-913.

Vila, J., María Nieto, J., Mertens, J., Springael, D. and Grifoll, M. (2010). Microbial community structure of a heavy fuel oil-degrading marine consortium: linking microbial dynamics with polycyclic aromatic hydrocarbon utilization. *Fems Microbiology Ecology*, 73: 349–362.

Walkley, A. and Black, T. A. (1934). An examination of the deligaref method for determination organic matter and a propose modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*, 37: 29-38.

White, P. M., Wolf, D. C., Thoma, G. J. and Reynolds, C. M. (2006). Phytoremediation of alklated polycyclic aromatic hydrocarbons in a crude oilcontaminated soil. *Water, Air and Soil. Pollution Journal*, 169: 207-220.

White, T.M., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), PCR protocols: *a guide to methods and applications*. (Vol. 38). (pp. 315–321). Academic Press, San Diego, CA.

Winquist, E., Björklöf, K., Schultz, E., Räsänen, M., Salonen, K., Anasonye, F., Cajthaml, T., Steffen, K. T., Jørgensen, K.s. and Tuomela, M. (2014). Bioremediation of PAH-contaminated soil with fungi e From laboratory to field scale. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 86: 238-247

Young, I. M. and Crawford, J. W. (2004). Interactions and self-organization in the soil-microbe complex. *Science*, 304: 1634-1637.

Zouboulis, A. I. and Moussas, P. A. (2011). Groundwater and soil pollution: Bioremediation. In: J. O. Nriagu (Ed.). *Encyclopaedia of Environmental Health*. Amsterdam, London: Elsevier Science, pp. 1037-1044.