تحقیقات آب و خاک ایران | دوره ۵۳ | شماره ۱ | فروردین ۱۴۰۱ (ص ۱۸۷-۱۷۱)

https://dx.doi.org/10.22059/ijswr.2022.335562.669163

(مقاله علمی - پژوهشی)

The Study of the Phytoremediation Efficiency of Crude Oil Contaminated Soil by Inoculating the Soil with *Brachybacterium muris* and *Pseudomonas putida*

HADI KOOHKAN[1*], MOHAMMAD SEDIGH MORTAZAVI[1], AHMAD GOLCHIN[2], GHOLAMALI AKBARZADEH-CHOMACHAEI[1], FERESHTEH SARAJI[1], MOHSEN GOZARI[1]

1.Persian Gulf and Oman Sea Ecological Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Education and Extension Research Organization (AREEO), Bandar Abbas, Iran.

2. Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Zanjan University of Zanjan, Zanjan, Iran.

(Received: Dec. 18, 2021- Revised: Feb. 6, 2022- Accepted: Feb. 7, 2022)

ABSTRACT

Petroleum products are considered to be the most widely used and expensive chemicals in the modern world, but pollution from the extraction and transportation of crude oil has become a global environmental problem. In this experiment, the efficiency of phytoremediation, bioremediation and bio-enhanced phytoremediation in removing crude oil from soil was investigated. For this purpose, a factorial experiment was performed in a completely randomized design with three replications. Factors include three levels of soil oil pollution (zero, 4 and 8% by weight), four plant treatments (without plants, bermudagras (*Cynodon dactylon*), sorghum (*Bicolor Sorghum*) and barley (*Hordeum vulgare*)) and three bacterial treatments (without bacteria). Were native bacteria (*Brachybacterium muris*) and non-native bacteria (*Pseudomonas putida*). The results showed that the percentage of crude oil removal by plant cultivation, soil inoculation with bacteria and combined application of plant and bacteria increased significantly compared to the control. Plant culture was more effective than bacterial inoculation in reducing the concentration of petroleum products and the efficiency of bacteria increased significantly with plant culture. At each level of contamination, the highest percentage of oil removal was observed with the combined application of sorghum and *Brachybacterium muris*. In all plant treatments, the highest oil removal percentage was measured at 4% oil pollution and *Brachybacterium muris* inoculation. Oil pollution significantly reduced leaf dry weight and chlorophyll concentration, but the use of bacteria (especially native bacteria) significantly reduced the negative effects of oil pollution on plants compared to non-inoculation treatments. Oil pollution increased the proline concentration in the leaves of plants and decreased the proline concentration with the use of native bacteria. Establishment of plant with microorganisms can be considered as a key component of the strategy to remove hydrocarbons. Consequently, these bacterial and plant species can be used for the biodegradation of soils contaminated with crude oil.

Keywords: Petroleum Pollution, *Brachybacterium Muris*, Bermudagras, Sorghum, Bioaugmented Phytoremediation.

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

بررسی کارایی گیاه‌بهسازی خاک آلوده به نفت خام با مایه‌زنی خاک با *براکی‌باکتریوم موریس* و *سودوموناس پوتیدا*

هادی کوهکن[1*]، محمد صدیق مرتضوی[1]، احمد گلچین[2]، غلامعلی اکبرزاده چماچایی[1]، فرشته سراجی[1]، محسن گذری[1]

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

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

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۹/۲۷-تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۱۱/۱۷- تاریخ تصویب: ۱۴۰۰/۱۱/۱۸)

چکیده

فرآورده‌های نفتی از پرکاربردترین و گران‌بهاترین مواد شیمیایی در دنیای مدرن به شمار می‌آیند ولی آلودگی‌های وابسته به استخراج و حمل نفت خام به یک دشواری جهانی برای محیط‌زیست تبدیل شده است. در این آزمایش کارایی گیاه-بهسازی، زیست پالایی و گیاه‌بهسازی زیست‌افزونی شده در حذف نفت خام از خاک بررسی شد. برای این کار، یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. 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 باکتری (بدون باکتری، باکتری بومی (*Brachybacterium muris*) و باکتری غیربومی (*سودوموناس پوتیدا*)) بودند. نتایج نشان داد که درصد حذف نفت خام با کشت گیاه، مایه‌زنی خاک با باکتری و کاربرد هم‌زمان گیاه و باکتری به گونه چشم‌گیری در برابر شاهد افزایش یافت. کشت گیاه در برابر مایه‌زنی باکتری در کاهش غلظت مواد نفتی کاراتر بود و کارایی باکتری‌ها با کشت گیاه به گونه چشم‌گیر افزایش یافت. در هر سطح از آلودگی، بیشترین درصد حذف نفت با کاربرد هم‌زمان سورگوم و باکتری *Brachybacterium muris* دیده شد. در همه تیمار گیاهی، بالاترین درصد حذف نفت در سطح ۴ درصد آلودگی نفتی و مایه‌زنی *Brachybacterium muris* اندازه‌گیری شد. آلودگی نفتی وزن خشک و غلظت کلروفیل برگ را به گونه چشم‌گیری کاهش داد ولی کاربرد باکتری‌ها (به ویژه باکتری بومی) اثرات منفی آلودگی نفتی بر گیاهان را به گونه چشم‌گیری در برابر تیمارهای بدون مایه‌زنی کاهش داد. آلودگی نفتی غلظت پرولین در برگ گیاهان را افزایش داد و با کاربرد باکتری بومی غلظت پرولین کاهش یافت. استقرار گیاه به همراه ریز جانداران می‌تواند به‌عنوان جز کلیدی استراتژی حذف هیدروکربن‌های نفتی در نظر گرفته شود. پس این گونه باکتری‌ها و گیاهان را می‌توان برای زیست پالایی خاک‌های آلوده به نفت خام بکار برد.

واژه‌های کلیدی: آلودگی نفتی، *براکی باکتریوم موریس*، برموداگراس، سورگوم، گیاه‌بهسازی زیست افزونی.

مقدمه

در کشورهای نفت‌خیز، نفت خام یک عامل مهم در آلودگی خاک به‌حساب می‌آید. خاک آلوده به ترکیبات نفتی می‌تواند از طریق تأثیر بر روی گیاهان، آب‌های سطحی و زیرزمینی و ریز جانداران خاک، صدمات جبران‌ناپذیری بر محیط‌زیست وارد سازد (Minai-Tehrani *et al.*, 2006). خاک به‌عنوان بستری همیشگی برای آلاینده‌ها عمل می‌کند و حرکت دینامیکی و چرخه هیدرولوژیکی باعث انتقال آلاینده‌ها به خاک و آب‌های زیرزمینی می‌گردد. هنگامی که یک ترکیب نفتی وارد خاک می‌شود به سه‌فاز مختلف محلول، جامد و گاز تقسیم می‌گردد. نفت خام حاوی ترکیبات پیچیده هیدروکربنی و فلزات سنگین است که می‌تواند بر خواص فیزیکی و بیولوژیکی خاک تأثیر گذاشته و سبب چسبندگی و اتصال ذرات خاک به یکدیگر شده و موجبات غیرقابل‌نفوذ شدن خاک، کاهش زهکشی و تهویه خاک، خفتگی گیاهان را فراهم کند (Luepromchai *et al.*, 2007). از جمله عواملی که سبب آلودگی خاک‌ها به مواد نفتی می‌شوند را می‌توان به نشت مواد نفتی از لوله‌های انتقال، سرریز از مخازن ذخیره نفت در پالایشگاه-ها و حمل مواد نفتی، تصادف خودروهای حامل نفت خام و رهاسازی ضایعات و پسماندهای پالایشگاه‌ها در محیط‌زیست اشاره کرد (White *et al.*, 2006).

روش‌های مختلفی برای پاک‌سازی مناطق آلوده به نفت ارائه شده است که روش‌های فیزیکی (سوزاندن، ابزارهای

* نویسنده مسول: koohkan_7001@yahoo.com

جمع‌کننده و غیره)، شیمیایی (استخراج از طریق حلال‌ها و غیره) و زیستی (تهویه زیستی، افزایش زیست‌توده میکروبی و غیره) را شامل می‌شوند. روش‌های مکانیکی و شیمیایی که جهت حذف آلودگی‌های نفتی استفاده می‌شوند کارایی محدودی دارند و گران می‌باشند. زیست پالایی با کاربرد گیاهان سبز و ریز جانداران در اصلاح خاک و حذف آلاینده‌های زیست‌محیطی یک روش کم-هزینه و بی‌خطری برای بیولوژی خاک و اکوسیستم است (Cunningham *et al.*, 1996). از جمله روش‌های متداول برای کاهش آثار سوء آلاینده‌های هیدروکربنی، زیست پالایی یا استفاده از جانداران برای حذف آلاینده‌های هیدروکربنی است (Alexander, 1999). در این روش خاک آلوده با مواد اصلاح‌کننده مانند خاک غیرآلوده، مواد غذایی، کودها و غیره مخلوط شده و سپس خاک زیرورو یا شخم زده می‌شود (Land farming). چون شرایط تجزیه مانند pH، رطوبت، میزان هوادهی و عوامل دیگر بهینه می‌شوند، فرایند تجزیه، تغییر شکل و غیر متحرک شدن آلاینده‌ها با سرعت بیشتری توسط ریز جانداران هوازی انجام می گیرد. زیرورو کردن خاک محدودیتی زیادی ندارد و این کار ارزان‌قیمت بوده و امکان موفقیت آن زیاد است (Harmsen, 1991). در سال‌های اخیر، توجه به گونه‌های مختلف ریز جانداران جهت حذف آلاینده‌های نفتی از خاک روبه افزایش است. توانایی در تجزیه آلاینده‌های نفتی به گروه محدودی از ریز جانداران محدود نمی‌شود و گروه‌های متفاوتی از باکتری‌ها و قارچ‌ها این توانایی را از خود نشان داده‌اند (Medina-Bellver *et al.*, 2005). استفاده از ریز جانداران به‌منظور حذف یا سمیت‌زادیی آلاینده‌ها به علت ظرفیت‌های متنوع متابولیکی آنها یک روش در حال گسترش برای حذف و تجزیه تعداد زیادی از آلاینده‌ها مانند تولیدات صنایع نفتی می‌باشد (Medina-Bellver *et al.*, 2005).

Razmjoo and Adavi (2012) در آزمایشی ده رقم برموداگراس را در خاک آلوده به نفت خام کشت نمود و گزارش داد که بیشترین مقدار کاهش مربوط به ریزوسفر رقم-3200w18 4 در سطح ۴۰ درصد مواد نفتی بود به‌طوری که حدود ۵۵ درصد کاهش در کل هیدروکربن‌های نفتی مشاهده شد. 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 خاک‌های آلوده به نفت خام، درصد حذف نفت خام را از ۴۱ درصد به ۵۸ درصد رساند. Liste and Felgentreu (2006) گزارش دادند که ریشه گیاهان، اسیدهای آروماتیک و سورفکتانت‌های[1] فسفولیپیدی ترشح می-نمایند که مقدار آن‌ها نسبت به تولیدات میکروبی قابل‌توجه بوده و قادر هستند تحرک و قابلیت دسترسی زیستی به ترکیبات آلاینده آلی را افزایش دهند. Hamdi *et al.*, (2007) گزارش دادند اضافه نمودن جمعیت ریز جانداران بومی تجزیه‌کننده به خاک آلوده به PAHs، باعث کاهش معنی‌دار این آلاینده گردید. این محققین عنوان نمودند که میکروب‌های تجزیه‌کننده بومی در مقایسه با گونه‌های غیربومی در رقابت موفق‌تر عمل کردند. در یک آزمایش Escalante *et al.*, (2005) گزارش دادند که بیشترین میزان کاهش TPH در خاک‌های کشت شده که توسط باکتری-های تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های نفتی مایه‌زنی شده بودند، مشاهده گردید. این میزان تجزیه TPH در حضور گیاه مایه‌زنی شده ۲ برابر گیاه مایه‌زنی نشده بود. این محققین همچنین عنوان کردند رابطه متقابل مفید بین گیاه *Cyperus laxus* و باکتری‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های نفتی باعث بهبود روند گیاه‌بهسازی گردید. در واقع جامعه میکروبی ریزوسفر از گیاه حمایت می‌کند و متقابلاً گیاه از جامعه میکروبی حمایت می‌کند که یک رابطه دوطرفه مفید به وجود می‌آورد. ریز جانداران از ترشحات گیاه سود برده و در مقابل محیط ریشه را با فعالیت‌های متابولیکی خود سمیت‌زدایی می‌نمایند.

در کشوری نفت‌خیز مثل ایران با پیامدهای مخرب زیست‌محیطی ناشی از استحصال و پالایش نفت، باعث آلودگی بخش‌هایی از منابع خاک و آب به‌خصوص در جنوب کشور به هیدروکربن‌های نفتی شده است؛ لذا اتخاذ یک استراتژی صحیح جهت ازبین‌بردن این مشکل و دستیابی به توسعه پایدار در این زمینه ضروری است. بدون شک این استراتژی باید مبتنی بر شناخت دقیق امکانات و شرایط موجود بوده و تا حد ممکن کمترین ریسک را در به‌هم‌زدن تعادل محیط‌زیست داشته باشد. به همین دلیل هدف این پژوهش بررسی اثر گیاه‌بهسازی، زیست پالایی و گیاه‌بهسازی زیست‌افزونی شده در پاک‌سازی هیدروکربن‌های نفتی از خاک می‌باشد.

مواد و روش‌ها

آماده‌کردن خاک

برای انجام این آزمایش، نمونه خاکی از یک منطقه ناآلوده از باغو واقع در شرق بندرعباس (عرض جغرافیایی "۳۹/۵ ´۱۵ °۲۷ شمالی و طول جغرافیایی" ۳۰/۱ ´۲۴ °۵۶ شرقی) از عمق صفر تا ۳۰

1 . surfactants

سانتیمتری انتخاب شد و پس از خشک‌کردن خاک در هوا و عبور از الک دو میلی‌متری برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی مانند بافت خاک به روش هیدرومتری (Bouyoucos, 1962)، ماده آلی (Walkley and Black, 1934) قابلیت هدایت الکتریکی در عصاره اشباع به‌وسیله هدایت سنج الکتریکی، پ‌هاش در گل اشباع به‌وسیله پ‌هاش‌متر، ظرفیت تبادل کاتیونی خاک به روش استات سدیم (Chapman, 1965)، کربنات کلسیم معادل به روش خنثی-سازی با اسیدکلریدریک (Allison and Moodie, 1965)، نیتروژن کل به روش کجلدال (Bremner, 1965)، فسفر فراهم با عصاره‌گیر بی‌کربنات سدیم نیم مولار (Olsen *et al.*, 1954)، پتاسیم با عصاره‌گیر استات آمونیوم نرمال (Hemke and Spark, 1996) تعیین شد. ضمناً عناصر کم کاربرد با DTPA عصاره‌گیری (Lindsay and Norvell, 1978) و غلظت آنها به‌وسیله دستگاه جذب اتمی تعیین گردید (جدول ۱).

به‌منظور بررسی پتانسیل گیاه‌بهسازی، زیست پالایی و گیاه‌بهسازی زیست‌افزونی شده بر حذف ترکیبات نفتی از خاک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در گلخانه به اجرا در آمد.

جداسازی باکتری‌های بومی خاک آلوده

نمونه‌برداری از خاک

در این پژوهش برای جداسازی باکتری بومی به کار برده شده برای زیست‌افزونی خاک‌های آلوده از سایت آلوده به ترکیبات نفتی که تحت‌تأثیر غلظت‌های بالایی از انواع ترکیبات هیدروکربنی 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 به آزمایشگاه بیولوژی انتقال یافت و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

محیط بوشنل هاس (BH)[۱]: برای افزایش شمار باکتری و بالا بردن احتمال جداسازی آنها تمامی نمونه‌ها در محیط کشت مخصوص باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت (محیط بوشنل هاس حاوی یک درصد نفت خام) کشت داده شدند. محیط BH جهت جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های نفتی به کار می‌رود و ترکیب آن در یک لیتر به شرح زیر است (Atlas, 2005): $CaCl_2$ ۰/۰۲ گرم، KH_2PO_4 ۱ گرم، K_2HPO_4 ۱ گرم، $(NH_4)NO_3$ ۱ گرم، $MgSO_4.7H_2O$ ۰/۲ گرم، $FeCl_3$ ۰/۰۵ گرم، pH ۷±۰/۲، آب مقطر استریل شده ۱۰۰۰ میلی‌لیتر. محیط کشت اشاره شده در بالا در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد و در فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت ۱۵ دقیقه استریل شد.

باکتری‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های نفتی به‌وسیله محیط BH که دارای نفت خام به‌عنوان منبع کربن است از خاک جداسازی شدند. یک گرم خاک آلوده به مواد نفتی در ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتر حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر BH و ۱۰۰ میکرولیتر نفت ریخته شد و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد برای یک هفته خوابانیده شد. بعد از یک هفته سری رقت‌ها تا 10^{-6} آماده شد. سپس ۰/۱ میلی-لیتر از رقت‌های 10^{-6} و 10^{-5} روی محیط کشت BH دارای آگار به طور یکنواخت پخش شد. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۵ الی ۷ روز خوابانیده شد (Mujahid *et al.*, 2015). سپس کلنی‌های رشد کرده خالص‌سازی شدند. باکتری‌ها به روش زیر کشت خالص‌سازی شدند و در نهایت ۱۵ باکتری جداسازی شد.

بررسی میزان کارایی باکتری‌ها در محیط معدنی حاوی نفت خام

محیط کشت پایه معدنی مایع حاوی ۶٪ حجمی نفت خام به‌عنوان منبع کربن تهیه شد (Ilyina *et al.*, 2003; Mukred *et al.*, 2008; Idise *et al.*, 2010). کشت خالص باکتری‌های موردنظر به محیط کشت پایه معدنی مایع درون ارلن، مایه‌زنی شد. ارلن‌های کشت شده به مدت ۲۰ روز در دمای ۲۶-۲۸ درجه سانتیگراد بر روی شیکر با ۱۶۰ دور در دقیقه (rpm) قرار داده شد. در انتهای روز بیستم، کدورت آنها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰nm (OD_{600})، قرائت گردید (Ilyina *et al.*, 2003). در این مرحله بر اساس اعداد حاصل از میزان جذب دستگاه اسپکتروفتومتر در انتهای روز بیستم، جمعیت تقریبی باکتری‌ها در هر میلی‌لیتر توسط روش استاندارد McFarland محاسبه شد (McFarland, 1907). بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از قرائت دستگاه اسپکتروفتومتر، ۹ سویه که بیشترین جمعیت را داشتند انتخاب شدند.

شناسایی باکتری‌های دارای پتانسیل حذف نفت خام

میزان تخریب هیدروکربن‌های نفتی خاک با تنفس میکروبی ارتباط مثبت دارد و در خاک‌هایی که میزان تنفس میکروبی بیشتر بود درصد حذف ترکیبات نفتی افزایش یافت (Benyahia et al., 2005 Lin et al., 2010;). برای تأیید توانایی ریز جانداران جدا شده جهت تجزیه نفت، ۹ جدایه باکتری از نمونه‌های رشدیافته، جداگانه به خاک‌های آلوده به نفت خام (۴ و ۸ درصد وزنی) مایه‌زنی شدند که به مدت یک هفته در دمای ۲۶ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. و میزان تنفس بعد از یک هفته اندازه‌گیری شد و از میان جدایه‌هایی که بیشترین تنفس در خاک را داشتند

---

۱. Bushnell-Hass

یک جدایه به‌عنوان جدایه برتر انتخاب شد و در کشت گلخانه‌ای گیاهان استفاده شد (Kirimura et al., 1999).

جهت اندازه‌گیری تنفس در خاک، ۲۵ گرم خاک را توزین و در ظروف مخصوص تنفس ریخته شد. به هر یک از خاک‌ها تا ۰/۷ ظرفیت مزرعه آب مقطر افزوده شد. به‌منظور جمع‌آوری CO_2 تولید شده طی فرایند تنفس میکروبی ریز جانداران خاک در هر یک از ظروف، یک لوله آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر سود یک نرمال قرار داده و در ظروف محکم بسته شد. سپس ظروف در دستگاه انکوباسیون به مدت یک هفته و در دمای ۲۶ درجه سانتیگراد قرار داده شد. پس از دوره انکوباسیون به هر یک از نمونه‌ها ۱۰ میلی‌لیتر کلرید باریم ۱۰ درصد و چند قطره معرف فنل فتالئین افزوده و با اسیدسولفوریک ۰/۲۵ نرمال تیتر شدند. در نهایت میزان میلی‌گرم کربن تولید شده به‌صورت CO_2 طی فرایند تنفس میکروبی برحسب اسید مصرفی محاسبه شد (Sarvi Moghanlo *et al.*, 2012) و یک باکتری به‌عنوان باکتری برتر انتخاب شد.

شناسایی باکتری

خصوصیات مورفولوژیک باکتری از لحاظ شکل، اندازه و همچنین رنگ‌آمیزی گرم مورد بررسی قرار گرفت. تست‌های بیوشیمیایی باکتری مانند اکسیداز، کاتالاز، احیاء نیترات، هیدرولیز نشاسته، مصرف اوره و H_2S نیز انجام شد (Leahy and Colwell 1990).

جهت جداسازی DNA باکتری در ابتدا باکتری در محیط نوترینت براث در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و ۱۶۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. سپس یک میلی‌لیتر از محیط کشت واجد باکتری در میکروتیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتر ریخته شد و محلول رویی دور ریخته و رسوب نگهداری شد. باتوجه‌به اینکه هدف شناسایی مولکولی باکتری با استفاده از توالی 16S rDNA بود نمونه DNA استخراج شده از این باکتری جهت PCR به کار رفت. و مراحل استخراج DNA بر اساس دستورالعمل کیت High pure PCR Product محصول شرکت Roche آلمان صورت گرفت. به‌منظور تعیین غلظت و نیز بررسی میزان خلوص آن، جذب در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

پس از استخراج DNA، در مرحله تکثیر قطعه 16S rDNA توسط PCR از پرایمرهای (5-16SF CCGAATTCGTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCT GGCTCAG-3′) 16SR (3- CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCTTGTTACG ACTT-5′) استفاده شد.

پس از این مرحله (استخراج DNA) میکروتیوپ‌ها درون دستگاه PCR قرار داده شد و به دستگاه برنامه دمایی موردنظر داده شد. برنامه مورداستفاده در این بررسی به این صورت بود: دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه (جهت دناتوره)، دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه (جهت بازشدن رشته DNA)، دمای ۵۳ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه (اتصال پرایمر)، دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه (پلیمریزه شدن توسط آنزیم) ۳۵ بار تکرار سیکل از مرحله ۲ تا ۴ و در نهایت دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه تا تمام رشته‌ها کامل شوند. با استفاده از ژل الکتروفورز آگارز کیفیت DNAها استخراج شده را به‌صورت کیفی و یا چشمی مورد بررسی قرار گرفت. محصول PCR در نهایت در ژل آگارز ۰/۸ درصد بارگذاری شد و در زیر نورUV ، توالی حاصل با توالی‌های مارکر مقایسه شد. نمونه خالص شده جهت تعیین توالی به شرکت پیش‌گام فرستاده شد. نتایج حاصل از تعیین توالی در بانک ژنی بلاست شده و همولوژی آن بررسی شد و قرابت‌های بالاتر از ۹۸ درصد به‌عنوان جنس باکتری جداسازی شده انتخاب شدند (Chen *et al.*, 2017).

انجام آزمایش

در این آزمایش پتانسیل گیاه‌بهسازی، زیست پالایی و گیاه‌بهسازی زیست‌افزونی شده در حذف نفت خام از خاک مورد بررسی قرار گرفت و از باکتری‌ها برای زیست‌افزونی خاک‌های آلوده به نفت استفاده شد. برای این کار، یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. فاکتورهای بررسی شده شامل سطوح آلودگی خاک به نفت (صفر، ۴ و ۸ درصد وزنی)، (Basumatata *et al.*, 2012) نوع گونه گیاهی به کار رفته در گیاه‌بهسازی (بدون گیاه، برموداگراس (*Cynodon dactylon*)، سورگوم (*Sorghum bicolor*) و جو (*Hordeum vulgare*)) و گونه‌های باکتری به کار رفته در زیست پالایی (بدون باکتری، یک‌گونه بومی و یک‌گونه غیربومی) بود. یک‌گونه باکتری از خاک‌های آلوده به نفت در جنوب کشور جداسازی شد که جهت گزینش گونه بومی یک پیش آزمایش انجام شد و گونه‌هایی که پتانسیل بالاتری در تجزیه مواد نفتی داشتند گزینش شدند (از راه اندازه‌گیری تنفس میکروبی) و یک‌گونه غیربومی (*سودوموناس پوتیدا*) نیز تهیه و بکار رفت. باکتری غیربومی موردنظر از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران فراهم شد. از دلایل اصلی *سودوموناس پوتیدا* انتخاب توانایی آن‌ها در افزایش آزادسازی ترشحات ترکیبات آلی ساده توسط ریشه‌های گیاهان و همچنین پتانسیل مصرف هیدروکربن‌های نفتی است (Radwan, 2009).

در آغاز هر کدام از این باکتری‌ها در محیط کشت نوترینت آگار کشت شدند. سپس با شرایط کاملاً استریل کلنی‌های مربوط به هر کدام از باکتری‌ها برداشته و به طور جداگانه، به محیط مایع

نوترینت براث مایه‌زنی شد و پس از ۴۸ ساعت شمار باکتری‌ها به روش OD_{600} و جدول مک فارلند برآورد شد. استاندارد مک فارلند McFarland مرجعی برای تخمین کدورت و میزان باکتری معلق در مایعات می‌باشد. برای تهیه سوسپانسیون میکروبی، ابتدا ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش، باکتری از کشت ذخیره به محیط کشت شیبدار نوترینت آگار مغذی (مرک آلمان) تلقیح شد. پس از رشد کلنی‌های باکتری، سطح محیط کشت را با محلول نرمال سالین شسته و سوسپانسیون غلیظ میکروبی حاصل گردید. سپس مقداری از سوسپانسیون باکتری، داخل لوله استریل درب دار حاوی نرمال سالین ریخته شده و کدورت آن با اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و تا هنگام برابر شدن کدورت محلول با کدورت محلول نیم مک فارلند، با نرمال سالین رقیق و سوسپانسیون باکتری با غلظت 1×10^{8} cfu/ml تهیه گردید. باکتری‌ها در سوسپانسیون برای رسیدن شمار 10^{8} باکتری در گرم خاک به خاک گلدان‌ها اسپری و به‌خوبی آمیخته شد تا باکتری‌ها در خاک به طور یکنواخت پخش شوند و ۱۰ روز برای سازگاری باکتری‌ها در تیمارهای نفتی در نظر گرفته شد. دوباره خاک گلدان‌ها کاملاً آمیخته شد تا شرایط رطوبتی و محتوای اکسیژن کاملاً یکسان باشد. 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 آلوده نمودن خاک با سطوح نفتی، به مدت شش هفته گذاشته شد که ترکیبات فرار نفتی از خاک رها شوند و بخشی از ترکیبات نفتی جذب سطحی ذرات خاک شوند (Basumatary *et al.*, 2012). سپس این خاک‌ها با گونه‌های مختلف باکتری با تراکم 10^{8} سلول در هر گرم خاک مایه‌زنی شدند (Wu *et al.*, 2016) و سپس در آنها گونه‌های گیاهی گوناگون کاشته شد.

باتوجه‌به نتایج آزمون خاک نیتروژن به گونه اوره، فسفر به‌صورت مونو پتاسیم فسفات، آهن از منبع کلات آهن FeEDDHA، روی، منگنز و مس از نمک سولفاتی به ترتیب به‌اندازه ۱۵۰، ۵۰، ۱۰، ۱۰، ۵ و ۵ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک به گونه یکنواخت به تمام گلدان‌ها افزوده گردید. سپس در آنها گونه‌های گیاهی گوناگون کاشته شد. در پایان دوره آزمایش (۹۰ روز) علاوه بر اندازه‌گیری وزن خشک گیاه، خاک گلدان‌ها عصاره‌گیری و غلظت کل هیدروکربن‌های مانده در آنها اندازه‌گیری گردید. در دوره آزمایش رطوبت گلدان‌ها از راه توزین آنها و برآورد رطوبت موردنیاز، در مرز ۶۰-۷۰ درصد گنجایش مزرعه نگه داشته شد. لازم به یادآوری است که پس از گذشت شش هفته و به تعادل رسیدن خاک غلظت مواد نفتی در خاک آلوده شده نیز اندازه‌گیری شد. در پایان دوره آزمایش افزون بر اندازه‌گیری پارامترهای رشد گیاه، خاک گلدان‌ها عصاره‌گیری و غلظت هیدروکربن‌های کل (Moopam, 2010) در آنها اندازه‌گیری گردید.

اندازه‌گیری پرولین

ابتدا ۰/۵ گرم از نمونه گیاهی وزن شد و همراه ازت مایع در هاون چینی کاملاً پودر گردید. سپس پودر حاصل را درون لوله آزمایش ریخته و ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوسالسیلیک به آن اضافه کرده و ۲۰ دقیقه شیکر نموده و بعد ۱۰ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ کرده سپس ۲ میلی‌لیتر از عصاره صاف شده برداشته و در یک لوله آزمایش ریخته سپس به هر لوله ۲ میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک اضافه شد. لوله‌های آزمایش در بن ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار داده شدند، پس از یک ساعت لوله‌ها جهت خاتمه واکنش در داخل حمام یخ گذاشته شدند. پس از سرد شدن لوله‌ها، به آنها ۴ میلی‌لیتر تولوئن افزوده شد و ۳۰ ثانیه به هم زده و پس از تشکیل دو فاز مجزا قسمت رنگی برداشته شد و توسط اسپکتروفتومتر میزان جذب آنها در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت گردید (Bates *et al.*, 1973).

اندازه‌گیری کلروفیل

مقدار نیم گرم از ماده‌تر گیاهی در هاون چینی با استفاده از نیتروژن مایع خرد و له شد. سپس ۲۰ میلی‌لیتر استن ۸۰٪ به نمونه اضافه، سپس در دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. عصاره جدا شده فوقانی حاصل از سانتریفیوژ جدا شده و مقدار جذب توسط اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر قرائت گردید (Arnon, 1956) و مجموع کلروفیل a و کلروفیل b به‌عنوان کلروفیل کل گزارش شد.

تعیین غلظت هیدروکربن‌های نفتی

برای اندازه‌گیری هیدروکربن‌های نفتی، عصاره‌گیری این ترکیبات به کمک حلال‌های آلی و با بهره‌گیری از دستگاه سوکسله انجام شد. حلال‌های آلی بکار رفته هگزان و دی‌کلرومتان بودند. برای این منظور ۲۰ گرم خاک وزن شد و درون کاغذ ویژه‌ای به نام تیمبل گذاشته شد. پرزهای این نوع کاغذ به شکلی است که حلال از آن عبور می‌کند، ولی ذرات خاک از آن گذر نمی‌نمایند. تیمبل پس از آماده‌شدن در سوکسله گذاشته شد و به‌ازای ۲۰ گرم خاک توزین شده، ۱۲۵ میلی‌لیتر از هر حلال به فلاسک دستگاه افزوده گردید. با تنظیم دمای دستگاه روی ۷۰ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد، ترکیبات نفتی خاک عصاره‌گیری شد. سپس دستگاه خاموش و مایع درون فلاسک از کاغذ صافی واتمن ۴۲ گذر داده شد. از نفت خام در غلظت‌های گوناگون استانداردهای لازم تهیه و اندازه جذب

آنها با دستگاه UVF (اسپکتروفوتومتر فلورسانس) با طول موج نشر ۳۶۰ نانومتر و طول موج برانگیخته ۳۱۰ نانومتر خوانده شد و منحنی کالیبراسیون رسم گردید و بر این پایه غلظت کل هیدروکربن‌های مانده در نمونه‌های خاک اندازه‌گیری شد (Moopam, 2010).

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

رس (٪)	سیلت (٪)	OC[۴] (٪)	CCE[۳]	CEC[۲] $cmol_+ kg^{-1}$	pH	EC[۱] ($dS\ m^{-1}$)	آهن فراهم ($mg\ kg^{-1}$)	مس فراهم ($mg\ kg^{-1}$)	روی فراهم ($mg\ kg^{-1}$)	منگنز فراهم ($mg\ kg^{-1}$)	فسفر ($mg\ kg^{-1}$)	پتاسیم ($mg\ kg^{-1}$)
۲۲	۴۱	۰/۱	۴۶	۱۰/۱	۷/۴	۱/۱	۵/۸	۱/۸۳	۰/۹۴	۴/۹	۶/۵	۳۸۰

روش تجزیه‌وتحلیل اطلاعات

تجزیه‌وتحلیل داده‌های مربوط به تنفس خاک (پیش آزمایش) در نرم‌افزار SAS 9.2 صورت پذیرفت. در این آزمون اثر نوع باکتری و سطوح نفتی به‌عنوان اثر اصلی و اثر متقابل این دو تیمار بر تنفس خاک بررسی شد. داده‌های این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت و جدول تجزیه واریانس آماده و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح ۵ درصد انجام شد.

داده‌های جمع‌آوری شده در آزمایش تأثیر گونه گیاه، نوع باکتری و سطوح نفت بر حذف نفت خام از خاک و پارامترهای رشد گیاه با استفاده از نرم‌افزارهای Excel و SAS 9.2 مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت و جداول تجزیه واریانس تشکیل شد و همچنین مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام پذیرفت.

نتایج و بحث

انتخاب گونه باکتری

۹ جدایه باکتری از نمونه‌های رشدیافته، جداگانه به خاک‌های آلوده به نفت خام (۴ و ۸ درصد وزنی) مایه‌زنی شدند که به مدت یک هفته در دمای ۲۶ درجه سانتیگراد انکوبه شدند و میزان تنفس را بعد از یک هفته اندازه‌گیری شد و یک باکتری به‌عنوان باکتری برتر انتخاب شد.

همان‌طور که در جدول ۲ (جدول تجزیه واریانس) مشاهده می‌شود نوع باکتری، سطوح نفت و اثر متقابل آنها بر تنفس خاک در سطح یک درصد معنی‌دار است. جدول مقایسه میانگین‌های اثر متقابل باکتری و نفت نشان می‌دهد (جدول ۳) که در هر تیمار باکتری با افزایش سطح آلودگی نفتی در خاک تنفس خاک نسبت به شاهد (بدون آلودگی+بدون مایه‌زنی خاک با باکتری) افزایش یافت و در هر تیمار باکتری، بالاترین میزان تنفس خاک در سطح ۴ درصد آلودگی نفتی در خاک اندازه‌گیری شد. کاهش تنفس در سطح بالاتر آلودگی نفتی (۸ درصد وزنی) احتمالاً به دلیل اثر سمیت نفت خام بر باکتری‌های مایه‌زنی شده به خاک می‌باشد. به‌طورکلی مایه‌زنی خاک با باکتری میزان تنفس خاک را به طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش داد. بالاترین تنفس در تیمار ۴ و ۸ درصد آلودگی نفتی به همراه مایه‌زنی خاک با باکتری B6 اندازه‌گیری شد که میزان تنفس به ترتیب حدوداً ۵/۸ و ۵/۰۰ برابر نسبت به تیمار شاهد (بدون آلودگی نفتی+بدون مایه‌زنی خاک با باکتری) افزایش یافت (جدول ۳). جدول ۳ نشان می‌دهد که با مایه‌زنی خاک با باکتری‌های مورد آزمایش، تنفس خاک به طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت. زیرا باکتری‌ها از ترکیبات نفتی به‌عنوان منبع انرژی و کربن استفاده می‌کنند و بیشترین میزان تنفس در هر سطح آلودگی نفتی (۴ و ۸٪ وزنی) در تیمار باکتری B6 اندازه‌گیری شد و کمترین آن در تیمار شاهد اندازه‌گیری شد. در نتیجه این‌گونه باکتری جهت شناسایی و برای ادامه تحقیق، مورداستفاده قرار گرفت.

در خاک آلوده نسبت به خاک تیمار شاهد (بدون آلودگی نفتی) میزان تنفس میکروبی افزایش یافت زیرا آلودگی باعث تحریک جامعه میکروبی خاک می‌شود و فعالیت برخی از ریز جانداران را کاهش و برخی را افزایش می‌دهد. افزایش فعالیت ریز جانداران احتمالاً به دلیل نقش آلودگی به‌عنوان سوبسترا و منبع انرژی و کربن برای جامعه میکروبی است. مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که میزان تخریب هیدروکربن‌های نفتی خاک با تنفس میکروبی و تعداد باکتری‌های نفت‌خوار ارتباط دارد (Benyahia *et al.*, 2005، Lin *et al.*, 2010).

در تعدادی از مطالعات میزان تولید CO_2 در خاک آلوده به هیدروکربن‌های نفتی به‌عنوان ویژگی مناسب برای پی‌بردن به میزان یا سرعت تجزیه زیستی مرسوم شده است (Pena-Castro *et al.*, 2006).

جدول ۲- جدول تجزیه واریانس میانگین مربعات تنفس خاک

[۱] Electrical conductivity
[۲] Cation exchange capacity
[۳] Equivalent to calcium carbonate
[۴] .Organic carbon

منبع	درجه آزادی	میانگین مربعات تنفس خاک
نوع باکتری	۹	۱۹/۵۴**
سطوح نفت خام	۱	۶۵/۱۲**
نوع باکتری * سطوح نفت خام	۹	۳/۳۷**
خطا	۴۰	۰/۸۵

و ** به ترتیب درصد پنج و یک درصد معنی‌دار است.

شناسایی سویه‌های جداسازی شده

در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای یک سویه B6 تکثیر قطعه 16S rDNA با موفقیت همراه بود و قطعه ۱۵۰۰ جفت بازی در الکتروفورز مشاهده شد (شکل ۱).

پس از انتخاب باکتری، نتایج خصوصیات میکروسکوپی و تست‌های بیوشیمیایی نشان داد، B6 یک باکتری گرم مثبت، هوازی با رنگدانه‌های زرد، میله‌ای نامنظم، با کلنی ریز، فاقد اسپور، اکسیداز مثبت، کاتالاز مثبت، عدم قابلیت احیای نیترات به نیتریت، عدم تولید H_2S، هیدرولیز نشاسته منفی و اوره آز منفی بود.

ویژگی‌های سویه جدا شده برای تجزیه نفت خام با توالی‌یابی ژن16S rDNA تعیین شد. مقایسه توالی ناحیه 16S rDNA تکثیرشده با جفت آغازگر 16S rDNA با توالی بانک اطلاعاتی ژنومی موجود در NCBI گونه *Brachybacterium muris* را تأیید نمود.

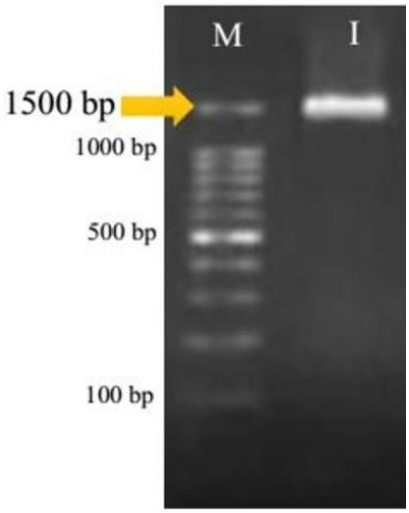
Brachybacterium muris از رده *Actinobacteria*، راسته *Micrococcales*، خانواده *Dermabacteraceae*، جنس *Brachybacterium* و گونه *B. muris* می‌باشد.

جدول ۳- مقایسه میانگین‌های اثر متقابل باکتری‌ها و سطوح نفت بر تنفس خاک ($mgC\text{-}CO_2/kg\ soil$)

سطح نفت*باکتری	NB*4	NB*8	B1*4	B1*8	B2*4	B2*8	B3*4	B3*8	B4*4	B4*8	B5*4	B5*8	B6*4	B6*8	B7*4	B7*8	B8*4	B8*8	B9*4	B9*8
تنفس	۱/۶۲^{g}	۱/۵۳^{g}	۶/۴۹^{d}	۴/۸^{e}	۸^{b}	۵/۴۹^{de}	۶/۸۱^{d}	۵/۵۷^{e}	۸/۸^{c}	۴/۱۷^{e}	۷/۳۶^{c}	۵/۹۴^{hi}	۹/۴^{a}	۷/۶۵^{c}	۷/۹۸^{c}	۳/۳۷^{f}	۵/۱۱^{de}	۴/۳۷^{e}	۷/۶^{c}	۵/۵^{de}

مقایسه میانگین با استفاده از آزمون LSD (a=5%) انجام شد و در هر ستون و ردیف اعداد دارای دست‌کم یک حرف مشترک لاتین دارای اختلاف معنی‌دار نمی‌باشند.

NB: تیمار بدون باکتری، B1: باکتری یک جدا سازی شده از خاک آلوده، B2: باکتری دو جداسازی شده از خاک آلوده، ... و B9: باکتری نه جداسازی شده از خاک آلوده



شکل ۱- تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR سویه باکتری B6، (M) DNA نشانگر و (I) سویه B6 است.

درصد حذف نفت خام

جدول تجزیه واریانس نشان داد که تأثیر گیاه‌بهسازی، زیست پالایی و کاربرد توام آنها در سطوح مختلف آلودگی نفتی بر حذف ترکیبات نفتی معنی‌دار است (جدول ۴). همان‌طور که در جدول ۵ مشاهده می‌شود در هر سطح آلودگی نفت خام، طرف نظر از تیمار باکتری با کاشت گیاهان سورگوم، جو و چمن درصد حذف نفت خام در خاک نسبت به تیمار بدون کشت گیاه به طور معنی-داری افزایش یافت و در هر سطح آلودگی نفتی، بیشترین درصد حذف نفت خام در خاک به ترتیب مربوط به گیاهان سورگوم، چمن و جو بود. می‌توان علت بالا بودن تجزیه و حذف مواد نفتی در خاک‌های کشت شده نسبت به خاک شاهد را این‌گونه تفسیر کرد که شرایط خاک در حضور گیاه نسبت به خاک‌های بدون کشت مناسب‌تر است؛ بنابراین رشد، جمعیت و فعالیت میکروبی

در گلدان‌های تحت کشت افزایش می‌یابد. با رشد ریشه گیاه منافذ خاک بزرگ‌تر می‌شوند و اکسیژن لازم برای واکنش اکسیداسیون به سطوح پایین‌تر خاک انتقال می‌یابد. همچنین ریشه گیاهان ترکیبات آلی و آنزیم‌هایی ترشح می‌کنند که ازیک‌طرف به حذف مواد نفتی کمک می‌کند و از طرف دیگر بستر مناسبی برای رشد و فعالیت ریز جانداران فراهم می‌کند (Robinson *et al.*, 2003). تفاوت بین گیاهان در حذف نفت خام در خاک می‌تواند مربوط به تفاوت در سیستم ریشه‌ای گیاهان، ترشحات ریشه و آنزیم‌ها تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های نفتی باشد (Media et al., 2003).

ریز جانداران در حضور منابع کربن، آنزیم‌هایی تولید کرده که مسئول حمله به مولکول‌های هیدروکربن می‌باشند. کارایی فرآیند گیاه‌بهسازی به میزان زیادی بستگی به حضور و فعالیت جامعه میکربی وابسته به گیاه دارد. تحقیقات نشان داده است که حذف هیدروکربن‌های آروماتیک در خاک‌های تحت کشت دو برابر خاک‌های بایر یا بدون کشت بود (Andria *et al.*, 2009).

جدول تجزیه واریانس (جدول ۴) نشان می‌دهد که اثر مایه‌زنی خاک با باکتری‌ها بر درصد حذف نفت خام در خاک معنی‌دار است. همان‌طور که در جدول ۵ مشاهده می‌شود مایه‌زنی خاک با باکتری‌ها (باکتری‌های بومی و غیربومی) درصد حذف ترکیبات نفتی را به طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش داد. جدول ۵ نشان می‌دهد که در هر سطح آلودگی نفتی، در حضور یا عدم حضور گیاه، با مایه‌زنی خاک با باکتری درصد حذف نفت خام در خاک نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری یافت و همچنین کارایی مایه‌زنی خاک با باکتری در حذف نفت خام در سطوح پایین آلودگی نفت خام در خاک (۴ درصد) بیشتر از سطوح بالای آلودگی نفت خام در خاک (۸ درصد) بود. در هر سطح آلودگی، مایه‌زنی خاک با باکتری *براکی باکتریوم موریس* بیشترین کارایی در حذف نفت خام در خاک داشت (جدول ۵). اختلاف بین باکتری‌های بومی و غیربومی در تجزیه نفت خام می‌تواند به دلیل تفاوت در توانایی آنزیم‌های تجزیه‌کننده نفت خام و مسیرهای تجزیه‌ای باشد که توسط ریز جانداران مختلف استفاده می‌شود (Olukunle and Oyegoke, 2016).

ریز جانداران قادرند از هیدروکربن‌های نفتی به‌عنوان منبع کربن و انرژی استفاده کنند و این ریز جانداران به طور وسیعی در طبیعت وجود دارند. همچنین از دلایل حذف بیشتر نفت خام در حضور تیمار باکتری می‌توان گفت، اضافه‌شدن باکتری‌ها باعث افزایش حلالیت بخش غیرقابل‌دسترس آلاینده‌ها به‌واسطه ترشح بیوسورفکتانت‌ها و بالطبع آن افزایش تجزیه هیدروکربن نفتی کل می‌شود (Banat,1994).

برهم‌کنش گیاه و مایه‌زنی خاک با باکتری اهمیت زیادی در کارایی گیاه در حذف آلودگی نفتی دارد. همان‌طور که در جدول ۵ مشاهده می‌شود در هر سطح آلودگی نفتی، کاشت گیاه و مایه‌زنی باکتری‌ها درصد حذف ترکیبات نفتی را افزایش داد. در هر سطح نفت خام، بیشترین میزان کاهش نفت خام در تیمار کاشت سورگوم و برموداگراس مایه‌زنی شده با *براکی باکتریوم موریس* بود و کمترین میزان کاهش مربوط به تیمار شاهد بود. همان‌طور که در جدول ۵ دیده می‌شود مایه‌زنی خاک با باکتری‌ها در تیمارهای حاوی و فاقد گیاه سبب افزایش حذف نفت خام از خاک شد. پس مایه‌زنی باکتری‌ها به خاک آلوده فرایند حذف نفت خام از خاک را تسریع می‌کند. علت بالا بودن تجزیه و حذف مواد نفتی در خاک‌های کشت شده نسبت به خاک شاهد فعالیت‌های توأم شیمیایی، بیولوژیکی و فیزیکی می‌باشد. درصورتی‌که در خاک‌های شاهد تجزیه ترکیبات نفتی تنها به دلیل تصعید[۱] و تجزیه نوری است (Peng *et al.*, 2009). همان‌طور که در جدول ۵ مشاهده می‌شود کشت گیاهان به‌تنهایی نسبت به مایه‌زنی خاک با باکتری‌ها به‌تنهایی کارایی بالاتری در حذف نفت خام از خاک دارد. در هر تیمار گیاهی بالاترین درصد حذف نفت در مایه‌زنی خاک با باکتری *براکی باکتریوم موریس* مشاهده شد. به عبارتی کارایی باکتری بومی (*براکی باکتریوم موریس*) نسبت به باکتری غیربومی (*سودوموناس پوتیدا*) بالاتر بود.

همان‌طور که در جدول ۵ مشاهده می‌شود کمترین درصد حذف نفت خام در خاک مربوط به تیمار بدون گیاه و بدون مایه-زنی خاک با باکتری در سطوح ۴ درصد و ۸ درصد نفت خام بود که به ترتیب برابر با ۴/۶۶ درصد و ۳/۴۶ درصد بود. اما با کاشت گیاه به‌تنهایی، مایه‌زنی خاک با باکتری به‌تنهایی و گیاه‌بهسازی زیست‌افزونی شده درصد حذف نفت خام در خاک را افزایش داد. به‌عنوان‌مثال در تیمار بدون گیاه و بدون باکتری در سطح ۴ درصد نفت خام، درصد حذف نفت خام در خاک برابر با ۴/۶۶ درصد بود و با کاشت سورگوم (به‌تنهایی) درصد حذف نفت خام در خاک به ۳۸/۵۶ درصد رسید و با مایه‌زنی خاک با باکتری بومی *براکی باکتریوم موریس* (به‌تنهایی) درصد حذف نفت خام در خاک به ۲۳/۲۳ درصد رسید و با کاشت گیاه سورگوم همراه با مایه‌زنی خاک با باکتری *براکی باکتریوم موریس* درصد حذف نفت خام در خاک به ۷۴/۵۰ درصد رسید که نشان می‌دهد تجزیه ترکیبات نفتی در خاک با کاربرد توأم گیاه و مایه‌زنی خاک با باکتری نسبت به کاشت گیاه و مایه‌زنی خاک با باکتری به‌تنهایی مؤثرتر است. در هر تیمار گیاه مایه‌زنی خاک با باکتری بومی (*براکی باکتریوم موریس*) نسبت به باکتری غیربومی (*سودوموناس پوتیدا*) کارایی بالاتری بر حذف نفت خام از خاک داشت (جدول ۵). در سطح ۴

---

۱ volatilization

درصد آلودگی نفتی، کاربرد توأم سورگوم و مایه‌زنی خاک با باکتری *براکی باکتریوم موریس* و *سودوموناس پوتیدا* به ترتیب حدود ۶۳ و ۹۳ درصد حذف نفت خام از خاک را نسبت به تیمار بدون مایه‌زنی خاک با باکتری افزایش داد. در تمام تیمارها با افزایش سطح آلودگی در خاک درصد حذف نفت خام در خاک به طور معنی‌داری کاهش یافت. به‌عنوان‌مثال در تیمار کشت سورگوم به همراه مایه‌زنی خاک با باکتری *براکی باکتریوم موریس* در سطح ۴ درصد آلودگی نفتی میزان آلودگی نفتی حدود ۱۶ برابر نسبت به تیمار بدون آلودگی نفتی کاهش یافت درحالی‌که در تیمار ۸ درصد آلودگی نفتی این میزان به حدود ۱۲ برابر نسبت به تیمار بدون آلودگی نفتی کاهش یافت.

جدول ۴- جدول آنالیز واریانس میانگین مربعات درصد حذف نفت خام از خاک

منبع	درجه آزادی	میانگین مربعات درصد حذف نفت خام
گونه گیاه	۳	۵۲۶۴/۳۸**
نوع باکتری	۲	۴۶۱۵/۸۵**
سطوح نفت خام	۱	۲۴۱۲/۸۰**
گونه گیاه* نوع باکتری	۶	۹۶/۰۴**
گونه گیاه * سطوح نفت خام	۳	۲۹۷/۵۷**
نوع باکتری * سطوح نفت خام	۲	۱۸۱/۹۴**
گونه گیاه * نوع باکتری * سطوح نفت خام	۶	۵۲/۶۹**
خطا	۴۸	۱۷/۷۲۸

***و ** به ترتیب درصد پنج و یک درصد معنی‌دار است.**

جدول ۵- برهم‌کنش گونه گیاه، مایه‌زنی خاک با باکتری و سطوح نفت بر درصد کاهش نفت خام در خاک

نوع گیاه	نوع باکتری	سطوح نفت خام (٪)	درصد حذف نفت
بدون گیاه	بدون باکتری	۴	۴/۶۶l
	سودوموناس پوتیدا	۴	۱۹/۱۳k
	براکی باکتریوم موریس	۴	۲۳/۲۳jk
	بدون باکتری	۸	۳/۴۶l
	سودوموناس پوتیدا	۸	۱۸/۶۳k
	براکی باکتریوم موریس	۸	۲۴/۴۶jk
سورگوم	بدون باکتری	۴	۳۸/۵۶defg
	سودوموناس پوتیدا	۴	۶۳/۰۳bc
	براکی باکتریوم موریس	۴	۷۴/۵۰a
	بدون باکتری	۸	۲۶/۱۰ijk
	سودوموناس پوتیدا	۸	۴۰/۶۰defg
	براکی باکتریوم موریس	۸	۵۷/۲۰c
جو	بدون باکتری	۴	۳۶/۱۳efg
	سودوموناس پوتیدا	۴	۶۳/۵۰bc
	براکی باکتریوم موریس	۴	۶۷/۵۰ab
	بدون باکتری	۸	۲۸/۵۰hij
	سودوموناس پوتیدا	۸	۴۶/۱۰d
	براکی باکتریوم موریس	۸	۴۳/۳۰de
برموداگراس	بدون باکتری	۴	۳۵/۳۰fgh
	سودوموناس پوتیدا	۴	۶۷/۸۰ab
	براکی باکتریوم موریس	۴	۷۱/۸۰a
	بدون باکتری	۸	۳۳/۳۰ghi
	سودوموناس پوتیدا	۸	۴۲/۹۶def
	براکی باکتریوم موریس	۸	۶۰/۴۰bc

مقایسه میانگین با بهره‌گیری از آزمون LSD (a=5%) انجام شده است و در هر ستون و ردیف اعداد دارای دست‌کم یک حرف مشترک لاتین دارای اختلاف معنی‌دار نمی‌باشند.

Palmroth *et al.*, (2002) کاهش ۴۰ و ۹۸ درصدی غلظت آلاینده‌های نفتی در حضور گیاهان علفی به ترتیب در تیمار بدون تلقیح شده میکروبی و تیمار تلقیح میکروبی پس از یک دوره آزمایش ۶۰ روزه گزارش نمودند. Peng *et al.*, (2009) تحقیقی بر

روی سه خاک آلوده به مواد نفتی انجام دادند. آنها گزارش دادند که کارایی گیاه *Mirabilis Jalapa* L. در حذف آلودگی نفتی در یک دوره رشد ۱۲۷ روزه در سه خاک حدود ۴۱/۶۱ تا ۶۳/۲۰ درصد بود درحالی‌که میزان حذف در خاک شاهد یا بدون گیاه حدود ۱۹/۷۵ تا ۳۶/۹۰ درصد بود و این نشان می‌دهد که در خاک‌های موردمطالعه حذف ترکیبات نفتی در تیمارهای حاوی گیاه حدود ۱/۶۷ تا ۲/۱۳ برابر تیمار شاهد است. Wilts *et al.*, (1998)نیز دریافتند که گونه‌های مختلف یونجه اثری مثبت بر کاهش غلظت آلاینده‌های ناشی از نفت خام در خاک دارند. طوری که در حضور این گیاهان، غلظت آلاینده‌های نفتی حدود ۳۳ تا ۵۶ درصد نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت.

وزن خشک گیاه

همان‌طور که در جدول ۷ مشاهده می‌شود سطوح مختلف نفت خام وزن خشک گیاهان را به طور معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش داد. با افزایش سطح آلودگی نفتی کاهش وزن خشک گیاه بیشتر بود. در تیمار بدون مایه‌زنی خاک با باکتری سطوح ۴ و ۸ درصد آلودگی نفتی وزن خشک جو را حدود ۶۳ و ۶۹ درصد نسبت به شاهد کاهش داد. از طرف دیگر مایه‌زنی خاک با باکتری‌ها وزن خشک گیاهان را به طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت. اثر متقابل باکتری و گیاه در سطوح مختلف نفت خام بر وزن خشک گیاهان نشان می‌دهد (جدول ۷) که در تمام تیمار گیاه، با مایه‌زنی خاک با باکتری‌ها وزن خشک گیاهان به طور معنی‌داری افزایش یافت. به‌عنوان‌مثال در تیمار بدون آلودگی نفتی مایه‌زنی خاک با باکتری‌های *سودو موناس پوتیدا* و *براکی باکتریوم موریس* وزن خشک برموداگراس به ترتیب حدود ۱۴ و ۱۳ درصد نسبت به شاهد افزایش یافت.

همان‌طور که در جدول ۷ مشاهده می‌شود مایه‌زنی خاک با باکتری‌ها سبب کاهش اثرات منفی سطوح مختلف نفت خام بر وزن خشک گیاه شد. کاربرد باکتری‌های *سودوموناس پوتیدا* و *براکی باکتریوم موریس* در سطح ۸ درصد آلودگی نفتی وزن خشک سورگوم را به ترتیب حدود ۲/۴۵ و ۲/۱۸ برابر نسبت به تیمار بدون مایه‌زنی با باکتری افزایش داد. علت افزایش وزن خشک گیاه در حضور باکتری مربوط به کاهش اثرات سمی سطوح آلودگی نفتی و همچنین باکتری‌ها با بهبود وضعیت آبی گیاه و افزایش محتوای کلروفیل برگ‌ها و همچنین به‌واسطه محلول کردن فسفات نامحلول خاک و تولید هورمون‌های گیاهی می‌تواند جذب بیشتر مواد غذایی توسط گیاه را تحریک کرده و منجر به بهبود فرایند فتوسنتز و در نتیجه افزایش رشد و عملکرد گیاه شود (Hung *et al.*, 2004). می‌توان گفت که در تمام گیاهان موردمطالعه در همه سطوح آلودگی نفتی بالاترین وزن خشک مربوط به تیمار مایه‌زنی خاک با باکتری *سودوموناس پوتیدا* می باشد زیرا این باکتری علاوه بر توانایی بر حذف نفت خام از خاک قادر به فراهمی برخی عناصر غذایی مانند نیتروژن برای گیاهان است (Hung *et al.*, 2004).

در برخی مواقع ممکن است سطوح پایین آلودگی موجب افزایش رشد گردد. در این صورت احتمالاً به علت اینکه ابتدا گیاه با یک تنش جزئی مواجه شده است، سازوکارهای مختلفی می‌تواند در اطراف محیط ریشه و در درون گیاه از جمله افزایش ترشح اسید، افزایش تولید سیدروفورهای گیاهی، جذب بیشتر عناصر غذایی، جذب بیشتر آب صورت گیرد که نتیجهٔ این سازوکارها رشد بیشتر گیاه است ولی با افزایش شرایط تنش احتمالاً به علت عدم تعادل در تولید و حذف گونه‌های اکسیژن واکنشگر در پی تنش و یا کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانتی در درون گیاه، تنش اکسیداتیو به وجود آمده و سبب خسارت به اجزاء مختلف سلول، اختلال در جذب آب و عناصر شده و در نهایت کاهش رشد را به همراه داشته است (Hirt and Shinozaki, 2004). کاهش رشد می‌تواند ناشی از اختلال در فرآیندهای فیزیولوژیکی از قبیل عدم تعادل یونی، تغییر در وضعیت آب گیاه، اختلال در جذب عناصر، اختلال در عمل روزنه‌ها، کاهش کارایی فتوسنتز، کاهش پتانسیل اسمزی محیط ریشه، سمیت ویژه یونی و کمبود یون‌های غذایی باشد (Hirt and Shinozaki, 2004).

در ارتباط با باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام نیز گزارش شده است که این باکتری‌ها علاوه بر دارا بودن صفات محرک رشدی با تجزیه ترکیبات هیدروکربنی جذب شده به درون گیاه از سمیت آن‌ها برای گیاه کاسته و منجر به بهبود رشد آن می‌گردند. علاوه بر این، انتقال ژن‌های تجزیه‌کننده به درون گیاه میزبان، تنظیم ترشح آنزیم‌های تجزیه‌کننده و حتی تولید بیوسورفکتانت از روش‌های تأثیر باکتری‌های عنوان شده است (Feng *et al.*, 2017). Liu *et al.*, (2013) نیز نشان دادند که مایه‌زنی گیاه فستوکا با باکتری‌های ریزوسفری تولیدکننده آنزیم ACC- دآمیناز از جنس *سودوموناس*، رشد ریشه گیاه را به میزان ۱۹ درصد افزایش می‌دهد که افزایش دوبرابری تجزیه ترکیبات هیدروکربنی نسبت به تیمار بدون مایه‌زنی را به دنبال داشت. Mishra and Nautiyal (2009) گزارش کردند طول ریشه، ساقه و وزن خشک گیاه نخود در خاک آلوده به نفت کاهش یافت ولی افزودن مایه تلقیح به خاک آلوده باعث بهبود وضعیت رشد گیاه گردید. Kavousi Bafti *et al.*, (2014) نشان دادند که وزن خشک اندام هوایی گیاه در تیمار نفت خام و بدون حضور باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت کاهش یافت و وزن خشک ریشه در تیمار نفت

و باکتری افزایش یافت. برخی مطالعات دیگر نشان داده است که کاربرد کنش بین گیاه و باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت باعث کاهش رشد گیاه می‌شود و برای مثال Gao *et al.*, (2006) گزارش کردند که در خاک‌های آلوده به فانترون و پیرن وزن خشک ریشه و ساقه هنگامی که گیاه برنج به‌صورت منفرد کشت شد در مقایسه با حالتی که با باکتری‌های تجزیه‌کننده در خاک آلوده کشت داده شد کاهش قابل‌ملاحظه‌ای داشت. آنها علت این کاهش را آثار فوق سمی ترکیبات آروماتیک چندحلقه‌ای بر ریشه و ساقه گیاه عنوان کردند.

کلروفیل در گیاه

تأثیر آلودگی نفتی، نوع گیاه و باکتری و اثر متقابل آنها بر غلظت کلروفیل برگ تازه گیاهان معنی‌دار بود (جدول ۶). صرف‌نظر از تیمار مایه‌زنی خاک با باکتری، در هر گیاه افزایش سطح آلودگی نفتی غلظت کلروفیل را به طور معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش داد. به‌عنوان‌مثال در تیمار گیاه جو و مایه‌زنی خاک با سودوموناس پوتیدا، در سطوح ۴ و ۸ درصد آلودگی نفتی غلظت کلروفیل در برگ تازه جو به ترتیب حدود ۲۲ و ۴۵ درصد نسبت به شاهد کاهش یافت (جدول ۷). محققان گزارش می دهند که آلودگی نفت خام در خاک، مانند سایر انواع عوامل استرس‌زا، تولید ROS را افزایش می‌دهد و منجر به تخریب غشا و اکسیداسیون کلروفیل می‌شود (Tatari et al., 2018). عوامل استرس‌زای محیطی مانند آلاینده‌های نفتی با تولید ROS، پروتئین‌های گیاه را از بین برند. علاوه بر این، افزایش آلاینده‌های نفتی در خاک، جذب نیتروژن را کاهش می‌دهد. نیتروژن یکی از مهمترین اجزای تولید کلروفیل است. بنابراین، کاهش در جذب آن، باعث کاهش تولید کلروفیل در گیاهان می‌شود (Tatari et al., 2018).

یکی از اثرات منفی آلاینده‌های نفتی بر گیاه کاهش پیگمانه‌ای فتوسنتزی است (Martia *et al.*, 2009). Ilangovan and Vivekanandan (1992) گزارش دادند آبیاری خاک با آب آلوده به پساب‌های نفتی باعث کاهش کلروفیلa و کلروفیل کل گردید. اما کلروفیل b تغییر چندانی نشان نداد. این امر باعث کاهش نسبت کلروفیلa/b در گیاهان خاک‌های آلوده شد.

وجود نفت خام در خاک ممکن است علت مهار سنتز کلروفیل در گونه‌های گیاهی باشد. نفت خام مخلوطی از ترکیبات آلیفاتیک، معطر و با وزن مولکولی بالا است که آنزیم‌های لازم برای سنتز کلروفیل را مهار می‌کند (Anthony, 2001). Al-Hawas *et al.*, (2012) گزارش دادند که افزایش غلظت نفت خام، محتوای کلروفیل a، کلروفیل b، کاروتنوئیدها و کل رنگدانه ها به طور قابل‌توجهی کاهش می‌دهد. سطح کاهش محتوای کلروفیل در گیاهان نشانه آلودگی محیطی بوده است (Al-Hawas *et al.*, 2012). Njoku *et al.*, (2012) اظهار کردند که کاهش کلروفیل کل برگ‌ها شاید به دلیل شرایط قلیایی ایجاد شده در اثر انحلال مواد شیمیایی موجود در نفت در شیره سلولی باشد که مسئول تخریب کلروفیل است درنتیجه محتوای کلروفیل کل برگ‌های آلوده کمتر از برگ‌های شاهد است.

همان‌طور که در جدول ۷ مشاهده می‌شود در هر سطح آلودگی نفتی در خاک، مایه‌زنی خاک با باکتری غلظت کلروفیل برگ تازه گیاهان را به طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش داد. بالاترین غلظت کلروفیل در هر گیاه و در تمام سطوح نفتی مربوط به مایه‌زنی خاک با باکتری *سودوموناس پوتیدا* بود. و کمترین غلظت کلروفیل در تیمار بدون مایه‌زنی خاک با باکتری و بالاترین سطح آلودگی نفتی (۸ درصد) مشاهده شد. به‌عنوان‌مثال در سطح ۴ درصد آلودگی نفتی، مایه‌زنی خاک با باکتری *سودوموناس پوتیدا* و *براکی باکتریوم موریس* غلظت کلروفیل در برگ تازه سورگوم به ترتیب حدود ۱/۲۹ و ۱/۰۵ برابر نسبت به تیمار بدون مایه‌زنی خاک با باکتری افزایش داد.

علت اختلاف اثر باکتری‌ها بر غلظت کلروفیل در خاک‌های آلوده به نفت خام می‌تواند مربوط به تفاوت باکتری‌ها در حذف نفت خام از خاک و همچنین در فراهمی عناصر غذایی برای گیاهان و تولید سیدروفور باشد. اثرات مفید باکتری‌های موردمطالعه بر این پارامتر می‌تواند به خاطر افزایش توانایی گیاه در حضور باکتری در تغییر ترکیبات نفتی باشد که سبب کاهش سمیت این ترکیبات می‌شود و همچنین مشارکت آنها در افزایش جذب نیتروژن در گیاه و تولید هورمون‌های گیاهی باشد. که این عوامل می‌تواند جذب بیشتر مواد غذایی از جمله آهن توسط گیاه را تحریک کرده و منجر به افزایش میزان کلروفیل برگ گیاهان شود (Hewedy, 1999).

Huang *et al.*, (2004) در پژوهش دیگری گزارش دادند تحت تنش آلودگی کروزوت نسبت کلروفیلa/b در گیاهان به‌عنوان حساسیت و پاسخ دفاعی گیاه افزایش یافت. باتوجه‌به نتایج این مطالعه، ممکن است بتوان این‌گونه برداشت نمود که سورگوم تحت بررسی در این آزمایش نسبت به جو و چمن مقاومت بیشتری در برابر آلودگی هیدروکربن‌های نفتی دارد. از سوی دیگر بر اساس شاخص‌های نسبی رشد حساسیت جو به آلودگی خاک بیشتر بوده و وزن خشک اندام هوایی این گیاه کاهش بیشتری نشان می‌دهد. به گزارش Mishra and Nautiyal (2009) با افزایش غلظت گازوئیل خاک میزان کلروفیل کل در برگ‌های نخود کاهش اما در حضور مایه تلقیح (*Trichoderma ressei*) مقدار کلروفیل ۵۰ درصد افزایش یافت.

پرولین در برگ تازه گیاهان

هنگامی که گیاهان در معرض عوامل استرس‌زای محیطی قرار می گیرند، پرولین به‌عنوان یک مولکول سیگنال در زنده ماندن سلول-ها نقش دارد. تجمع پرولین در برگ‌های گیاه در تنظیم اسمزی گیاهان نقش دارد که منجر به اصلاح اسمزی و افزایش تحمل تنش‌های محیطی می‌شود (Liu *et al.*, 2010). محتوای پرولین با ایجاد آلاینده‌های نفتی در خاک افزایش می‌یابد، که می‌توان آن را واکنش گیاه به عدم جذب آب در خاک‌های آلوده به نفت در نظر گرفت. محتوای پرولین با افزایش غلظت ترکیبات نفتی در خاک افزایش یافت. با افزایش غلظت پرولین جذب آب توسط ریشه افزایش می‌یابد و منجر به تنظیم اسمزی گیاهان می‌شود. همچنین، پرولین می‌تواند پروتئین‌ها را در برابر استرس اکسیداتیو محافظت کند و ROSها را از سلول‌ها حذف کند (Kaul *et al.*, 2008).

جدول آنالیز واریانس (جدول ۶) نشان می‌دهد که تأثیر نوع گیاه، مایه‌زنی خاک با باکتری، سطوح نفت خام و اثر متقابل آنها بر غلظت پرولین در برگ تازه گیاهان معنی‌دار است. جدول ۷ نشان می‌دهد که صرف‌نظر از نوع گیاه و باکتری با افزایش سطح آلودگی نفتی در خاک میانگین غلظت پرولین در برگ تازه گیاهان نسبت به شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت. در تیمار بدون کاربرد باکتری، سطوح نفتی ۴ و ۸ درصد غلظت پرولین در برگ تازه سورگوم را به ترتیب حدود ۳/۲۰ و ۶ برابر نسبت به شاهد افزایش داد. در هر گیاه بالاترین غلظت پرولین در بالاترین سطح آلودگی نفتی (۸ درصد) اندازه‌گیری شد. کمترین غلظت پرولین در هر گیاه در سطح بدون آلودگی نفتی مشاهده شد (جدول ۷). احتمالاً سطوح بالای آلودگی نفتی سبب افزایش فشار اسمزی محلول خاک شده و گیاه در پاسخ به این استرس غلظت پرولین را در برگ افزایش داده است. دلایل فیزیولوژیکی متعددی برای تجمع پرولین در واکنش به تنش گزارش شده است که مهم‌ترین آنها تاکید بر نقش پرولین به‌عنوان یک ماده تنظیم‌کننده اسمزی و عامل حفاظت کننده آنزیم‌های سیتوپلاسمی و ساختمان غشا می‌باشد. اختلاف بین گیاهان در پاسخ به آلودگی نفتی می‌تواند مربوط به تفاوت در سطوح واکنش‌پذیری و تحمل آنها به آلودگی نفتی باشد. حتی این تفاوت بین واریته‌های مختلف یک‌گونه گیاهی نیز وجود دارد.

در هر سطح آلودگی نفتی، مایه‌زنی خاک با باکتری بومی *(براکی باکتریوم موریس)* میانگین غلظت پرولین در برگ تازه گیاهان را به طور معنی‌داری نسبت به باکتری غیربومی *(سودوموناس پوتیدا)* کاهش داد. اما مایه‌زنی خاک با باکتری *سودوموناس پوتیدا* میانگین غلظت پرولین را به طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش داد (جدول ۷). به عبارتی دیگر باکتری بومی از افزایش معنی‌دار غلظت پرولین در برگ تازه گیاهان جلوگیری کرد. اختلاف اثر بین باکتری‌ها بر غلظت پرولین در برگ تازه گیاهان می‌تواند مربوط به تفاوت توانایی آنها در فراهمی عناصر غذایی برای گیاهان و بهبود شرایط رشد ریشه جهت جذب عناصر غذایی (مخصوصاً نیتروژن) باشد. افزایش مقدار پرولین برگ گیاهان با مایه‌زنی خاک با باکتری ممکن است به دلیل نقش *سودوموناس پوتیدا* در فراهمی نیتروژن برای گیاهان باشد که با افزایش جذب نیتروژن توسط گیاهان مقدار پرولین در برگ گیاهان نیز افزایش یافت. Ma *et al.*, (2018) نشان دادند که آلودگی خاک به نفت به میزان ۴۰ گرم در کیلوگرم خاک، پرولین برگ گیاهان *Mirabilis jalapa* و *Orychophragmus violace* را به ترتیب به میزان ۹۸ درصد و ۷۵ درصد نسبت به شاهد افزایش داد. Gusain *et al.*, (2015) اظهار داشتند که استفاده از باکتری-های محرک رشد باعث افزایش میزان پرولین می‌گردد.

پروتئین در گیاهان تحت تاثیر دی اکسیدسولفور موجود در نفت خام نیز گزارش شده است (Peretiemo-Clarke and Achuba, 2007). که این افزایش مربوط به سطح پروتئین سازگار است. باتوجه‌به این که یکی از سازوکارهای گیاهان در سم‌زدایی اکسیدهای نیتروژن در برگ ها، سنتز پروتئین و اسیدهای آمینه می باشد، بنابراین افزایش اسیدهای امینه و پروتئین در این مطالعه می‌تواند به دلیل اکسید سولفور و نیتروژن موجود در نفت خام باشد، یعنی افزایش میزان پروتئین در گیاهان تحت تنش را به وجود دی اکسیدگوگرد و نیتروژن در آلاینده هیدروکربنی نفت خام نسبت می‌دهند کهبه‌منظورر سم‌زدایی اکسید نیتروژن در برگ گیاهان ساخته می‌شوند.

پرولین و قندهای محلول نشانگرهای بیوشیمیایی بسیار مهم در میزان تحمل گیاهان به تنش شوری می‌باشند. افزایش تولید میزان پرولین بیانگر آن می‌باشد که نفت خام اضافه شده به خاک، به‌عنوان یک عامل تنشی مؤثر عمل کرده و گیاه با تنش غیرزیستی مواجه شده است. حضور ریز جانداران محرک رشد که قادر به تجزیه ترکیبات نفتی و با تجزیه ترکیبات سمی و تجمع فلزات سنگین موجود در ترکیبات نفتی باعث کاهش تنش وارد شده به گیاه شده در نتیجه تجمع پرولین در گیاه کاهش می‌یابد (Kavi Kishor *et al.*, 2005).

جدول ۶- جدول آنالیز واریانس میانگین مربعات وزن خشک، غلظت کلروفیل و غلظت پرولین در برگ تازه گیاه

منبع	درجه آزادی	پرولین	کلروفیل	وزن خشک
نوع گیاه	۲	۰/۱۳**	۱/۶۳**	۹۰۲۲/۱۴**
نوع باکتری	۲	۳/۳۴**	۱/۵۰**	۸۲۵/۲۰**
سطوح نفت خام	۲	۳۴/۰۲**	۱۱/۶۵**	۴۵۳۱/۹۸**
نوع گیاه*نوع باکتری	۴	۰/۰۱۶۲*	۰/۱۰**	۷۹/۴۹**
نوع گیاه * سطوح نفت خام	۴	۰/۳۳**	۰/۰۰۱۸**	۹۰۷/۷۲**
نوع باکتری * سطوح نفت خام	۴	۰/۱۳**	۰/۱۳۵**	۱۳/۶۳**
نوع گیاه * نوع باکتری * سطوح نفت خام	۸	۰/۰۲۴*	۰/۰۷۹**	۲۴/۱۶**
خطا	۵۴	۰/۰۳۸	۰/۰۱۳	۱/۰۸

***و ** به ترتیب درصد پنج و یک درصد معنی‌دار است.**

جدول ۷- برهم‌کنش گونه گیاه، مایه‌زنی خاک به باکتری و سطوح نفت خام بر وزن خشک (g pot^{-1})، غلظت کلروفیل (mg g^{-1}Fw) و غلظت پرولین (µmol g^{-1}Fw)

نوع گیاه	نوع باکتری	درصد نفت	وزن خشک	غلظت کلروفیل	غلظت پرولین
	بدون باکتری	۰	۲۸/۷۸f	۲/۶۰cd	۰/۴۱j
	سودوموناس پوتیدا	۰	۳۶/۴۵d	۳/۲۰a	۰/۹۴i
	براکی باکتریوم موریس	۰	۳۳/۴۳e.	۲/۷۵bc	۰/۵۰j
	بدون باکتری	۴	۱۲/۲۷l	۱/۹۰fgh	۱/۳۱fgh
	سودوموناس پوتیدا	۴	۲۲/۸۶h	۲/۴۶de	۱/۷۱e
سورگوم	*براکی باکتریوم موریس*	۴	۱۸/۴۰ik	۲/۰۰f	۱/۴۰efg
	بدون باکتری	۸	۷/۹۲mn	۱/۰۳k	۲/۴۷cd
	سودوموناس پوتیدا	۸	۱۹/۴۳ij	۱/۹۴fg	۳/۳۰a
	براکی باکتریوم موریس	۸	۱۷/۳۱k	۱/۷۲hi	۲/۳۸cd
	بدون باکتری	۰	۱۱/۱۹l	۲/۰۴f	۰/۴۱j
	سودوموناس پوتیدا	۰	۲۰/۳۵i	۲/۷۹bc	۰/۹۶hi
	براکی باکتریوم موریس	۰	۱۹/۲۴ij	۲/۴۱de	۰/۴۷j
	بدون باکتری	۴	۴/۰۴o	۱/۷۵ghi	۱/۵۴ef
جو	*سودوموناس پوتیدا*	۴	۸/۶۴mn	۱/۸۴fghi	۲/۱۷d
	براکی باکتریوم موریس	۴	۷/۰۱mn	۱/۴۰j	۱/۵۶ef
	بدون باکتری	۸	۳/۴۰o	۱/۰۰k	۲/۴۵cd
	سودوموناس پوتیدا	۸	۶/۱۱n	۱/۱۵k	۳/۳۹a
	براکی باکتریوم موریس	۸	۷/۳۴mn	۱/۱۵k	۲/۶۴bc
	بدون باکتری	۰	۶۳/۰۸b	۲/۷۴bc	۰/۴۴j
	سودوموناس پوتیدا	۰	۷۱/۹۹a	۲/۹۳bc	۱/۰۳hi
	براکی باکتریوم موریس	۰	۷۱/۳۴a	۲/۸۰bc	۰/۴۳j
	بدون باکتری	۴	۳۲/۵۲e	۱/۸۵fghi	۱/۰۵hi
	سودوموناس پوتیدا	۴	۵۵/۲۳c	۲/۲۶e	۱/۴۷efg
	براکی باکتریوم موریس	۴	۵۳/۶۰c	۲/۰۱f	۱/۱۸ghi
برموداگراس	بدون باکتری	۸	۱۱/۴۴l	۱/۱۳k	۲/۸۵bc
	سودوموناس پوتیدا	۸	۲۵/۲۳g	۱/۷۱hi	۳/۵۴a
	براکی باکتریوم موریس	۸	۲۶/۳۶g	۱/۶۴i	۲/۶۳bc

مقایسه میانگین با بهره‌گیری از آزمون LSD (a=5%) انجام شده است و در هر ستون و ردیف اعداد دارای دست‌کم یک حرف مشترک لاتین دارای اختلاف چشمگیر نمی‌باشند.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش بهره‌گیری از جامعه میکروبی ویژه در کنار ریشه گیاه مایه بهبود شرایط بیولوژیکی خاک برای تجزیه آلاینده‌ها گردید. افزایش تجزیه نفت خام در حضور ریشه گیاه احتمال این فرضیه که گیاهان می‌توانند با افزایش فعالیت بیولوژیک خاک زیست پالایی را برانگیخته و به تجزیه زیستی کمک نماید را افزایش می‌دهد.

درصد حذف نفت خام در تیمارهای کاربرد هم‌زمان کشت گیاه و مایه‌زنی خاک با باکتری در برابر کاربرد گیاه‌بهسازی و زیست پالایی به‌تنهایی بیشتر بود. علت افزایش تجزیه نفت خام

در تیمارهای گیاه‌بهسازی زیست افزونی در مقایسه با گیاه‌بهسازی و زیست پالایی می‌تواند وابسته به رابطه سینرژیسمی یا همکاری باشد که میان گیاه و باکتری وجود داشت. در میان گیاهان بررسی شده سورگوم در برابر جو و برموداگراس کارایی بالاتری در حذف نفت خام داشت. همچنین نتایج این آزمایش نشان داد که باکتری بومی در مقایسه با باکتری غیربومی کارایی بالاتری در حذف نفت خام دارد. آلودگی نفتی در خاک وزن خشک گیاهان و غلظت کلروفیل در برگ تازه گیاهان را به گونه چشم‌گیری در مقایسه با شاهد کاهش داد اما با مایه‌زنی خاک با باکتری اثر منفی ترکیبات نفتی بر این پارامترها کاهش یافت. غلظت پرولین در برگ تازه گیاهان با افزایش آلودگی نفتی و مایه‌زنی خاک با باکتری *سودوموناس پوتیدا* افزایش یافت اما مایه‌زنی خاک با باکتری بومی *براکی باکتریوم موریس* غلظت پرولین را در برگ تازه گیاهان کاهش داد.

به هر حال گیاهان و باکتری‌های موردمطالعه هر کدام پتانسیل خوبی در افزایش تجزیه هیدروکربن‌های نفتی داشتند و می‌توانند مکمل مناسبی برای یکدیگر محسوب گردند، بنابراین یک رابطه هم افزایشی بین ریز جانداران و گیاه منجر به افزایش تجزیه آلودگی نفتی می‌گردد. اهمیت خاص زیست پالایی در محیط ریشه به مشارکت مهم ریشه و ریز جانداران بر می‌گردد. این روابط به خصوص برای تجزیه و تخریب ترکیبات مقاوم بیشترین اهمیت را خواهد داشت. بنابراین فرآیند گیاه‌بهسازی زیست‌افزونی می‌تواند به‌عنوان روشی موثر و در عین حال ساده و کم هزینه با حداقل خسارت به محیط‌زیست جهت پالایش آلاینده‌های نفتی باشد، با این فرض که کارایی گونه مورد بهره-گیری آزمایش شده باشد.

"هیچ‌گونه تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد"

REFERENCES

Alexander, M. (1999). Biodegradation and Bioremediation. Academic Press INC., San Diego, USA.

Al-Hawas, G.H.S., Shukry, W.M., Azzoz, M.M. and Al-Moaik, R.M.S. (2012). The effect of sublethal concentrations of crude oil on the metabolism of Jojoba (Simmodsia chinensis) seedlings. International Research Journal of Plant Science, 3(4), pp.54-62.

Allison, L. E., and Moodie, C. D. (1965). Carbonate. In Methods of soil analysis (Black, C. A. ed.). Part 2, Am. Soc. Agron., Madison, WI. p. 1379-1396.

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.

Arnon, D.I. (1956). Photosynthesis byisolated chloroplast. IV. General concept and comparison of three photochemicalreactions. Biochimica Biophysica Acta, 20: 449-461.

Atlas, R. M. (2005). Handbook of media for environmental microbiology (Atlas, R. M. ed.). CRC Press. The United States of America. pp. 664.

Basumatary, B, Saikia, R., Bordoloi, S., Das, H. C. and Sarma, H. P. (2012). Assessment of potential plant species for phytoremediation of hydrocarbon contaminated areas of upper Assam, India. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 87:1329-1334.

Bates, L.S., Walden, R.P., and Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free prolinefor water stress studies. Plant Soil, 39: 205-207.

Benyahia, F., Abdulkarim, M., Chaalal, Z. O. and Hasanain, H.. (2005). Bioremediation of Crude Oil Contaminated Soils: A Black Art or an Engineering Challenge? Process Safety and Environmental Protection, 83:364-370.

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

Bremner, J. M. (1965). Total nitrogen. In Methods of soil analysis (Black, C. A. ed.). Part 2, American Society of Agronomy, Mandison, WI. p. 1148-1158.

Chapman, H. D. (1965). Cation exchange capacity. In Method of soil analysis (Black, C. A. ed.). Part 2, Am. Soc. Agron., Madison, WI. p. 891-901

Chen W, Li J, Sun X, Min J, Hu X. (2017). High efficiency degradation of alkanes and crude oil by a salt-tolerant bacterium Dietzia species CN-3. International Biodeterioration and Biodegradation, 118:110-8.

Cunningham, S. D., Anderson, T. A., Schwab, P. A. and Hsu, F. C. (1996). Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. Advances in Agronomy, 56: 55-114.

Escalante, E. E., Gallegos-Martınez, M. E., Favela-Torres, E. and Gutierrez-Rojas, M. (2005). Improvement of the hydrocarbon phytoremediation rate by *Cyperus laxus* Lam. inoculated with a microbial consortium in a model system. Chemosphere, 59: 405–413.

Feng, N. X., Yu, J., Zhao, H. M., Cheng, Y. T., Mo, C. H., Cai, Q. Y. and Wong, M. H. (2017). Efficient phytoremediation of organic contaminants in soils using plant–endophyte partnerships. Science of the Total Environment, 1:352-368.

Gao, X. Z., Yu, S. C., Wu, K. C., Cheung, N. F. Y., Tam, P. Y. and Qian, M. H. (2006) Interactions of rice (Oryza sativa L.) and PAH-degrading bacteria (Acinetobacter sp.) on enhanced dissipation of spiked phenanthrene and pyrene in waterlogged soil. Science of the Total Environment, 372: 1-11.

Gusain, Y. S., Singh, U. S. and Sharma, A. K. (2015). Bacterial mediated amelioration of drought stress in drought tolerant and susceptible cultivars of rice

(Oryza sativa L.). African Journal Biotechnology, 14: 764-773.

Hamdi, H., Benzarti, S., Manusadianasc, L., Aoyamaa, I. and Jedidi, N. (2007). Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. Soil Biology and Biochemistry, 39:1926–1935.

Harmsen, J. (1991). Possibilities and limitations of landfarming for cleaning contaminated soils. In: Hinchee, R. E and Ollen-buttel, R. F. (Eds.). On site Bioreclamation. PP. 255–272.

Hemke, P. H. and Spark, D. L. (1996). Potassium. P 551-574. In D.L., Sparks et al., (Eds.). Method of soil analysis, Published by: Soil Science Societyof America, Inc. American Society of Agronomy, Inc. Madison, Wisconsin, USA.

Hewedy, A.M. (1999). Influence of singleand multi bacterial fertilizer on the growth and fruit yield of tomato. Egyptian Journal Applied Science, 14: 508-523.

Hirt, H., Shinozaki, K. (2004). Plant Responses to Abiotic Stress. Springer Science. 300p.

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.

Idise, O., Ameh, J., Yakubu, S. and Okuofu, C. (2010). Modification of Bacillus cereus and Pseudomonas aeruginosa isolated from a petroleum refining effluent for increased petroleum product degradation. African Journal of Biotechnology, 9(22): 3303-3307.

Ilangovan, K., and Vivekanandan, M. (1992). Effect of oil pollution on soil respiration and growth of Vigna mungo (L.) Hepper, The Science of the Total Environment, 116: 187-194.

Ilyina, A., Castillo, S.M.I., Villarreal, S.J.A., Ramirez, E.G. and Candelas, R. (2003).Isolation of soil bacteria for bioremediation of hydrocarbon contamination. (Corporation Mrxicana de Investigacion en Materiales S.A. de C.V. (COMIMSA).

Kaul, S., Sharma, S.S. and Mehta, I.K. (2008). Free radical scavenging poten-tial of L-proline: evidence from in vitro assays. Amino Acids, 34: 315–320.

Kavi Kishor, P.B., Sangam, S., Amrutha, R.N., Sri Laxmi, P., Naidu, K.R., Rao, K.R.S.S., Rao, S., Reddy, K.J., Theriappan, P. and Sreenivasulu, N. (2005). Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. Current Science, 88: 424-438.

Kavousi Bafti, M., Asrar, Z., Hassanshahian, M., Keramat. B. (2014). A study of the effects of crude oil pollution and oil-degrading bacteria on some biochemical and growth factors of Zea mays. Iranian Journal of Plant Biology, 6: 71-84.

Kirimura, K., Nakagawa, H., Tsuji, K., Kazuya, M., Kurane, R., Usami, S.H., (1999), Selective and continuous degradation of carbazole contained in petroleum oil by resting cells of Sphingomonas sp., CDH- Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 63(9): 1563-1568. 26.

Leahy, J.G., Colwell, R.R. (1990). Microbialdegradation of hydrocarbons in the environment. Microbial, 54: 305-315.

Lin, T. C., Pan, P. T., and Cheng, S. S. (2010). Ex situ bioremediation of oil-contaminated soil. Journal of hazardous materials, 176(1-3):27-34.

Lindsay, W. L. and Norvell, W.A. (1978). Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese, and copper. Soil Science Society of America Journal, 42: 421-428.

Liste, H. H. and Felgentreu, D. (2006). Crop growth, culturable bacteria, and degradation of petrol hydrocarbons (PHCs) in a long-term contaminated field soil. Applied Soil Ecology, 31:43–52.

Liu, W, Luo, Y, Teng, Y and Li, Z. (2010). Phytoremediation of oilfield sludge after prepared bed bioremediation treatment. International Journal of Phytoremediation. 12: 268-278.

Liu, W., Sun, J., Ding, L., Luo, Y., Chen, M., and Tang, C. (2013). Rhizobacteria (*Pseudomonas sp.* SB) assist phytoremediation of oily-sludge-contaminated soil by tall fescue (Testuca arundinacea L.). Plant and soil, 371(1-2): 533-542.

Luepromchai, E., Lertthamrongsak, W., Pinphanichakarn, P., and Thaniyavarn, S. (2007). Biodegradation of PAHs in petroleum-contaminated soil using tamarind leaves as microbial inoculums. Journal of Science Technology, 29: 515-527.

Ma, H., Wang, A., Zhang, M., Li, H., Du, S., Bai, L. and Chen, S. (2018). Compared the physiological response of two petroleum-tolerant contrasting plants to petroleum stress. International Journal of Phytoremediation, 20(10): 1043-1048.

McFarland J. (1907). Nephelometer: an instrumentfor media used for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. The Journal of the American Medical Association, 14:1176-8.

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, J. L., Schnoor (eds). Phytoremediation, transformation and control of contaminants, Wiley- Interscience. 1024pp.

Medina-Bellver, Antonio Delgado, P. M., Rodríguez-Sánchez, A., Reyes, E., Ramos, J. L. and Marqués. S. (2005). Evidence for in situ crude oil biodegradation after the Prestige oil spill. Environmental Microbiology, 7: 773–779.

Minai-Tehrani, D., Herfatmanesh, A., Azari-Dehkordi, F and Minooi, S. (2006). Effect of salinity on biodegradation of aliphatic fractions of crude oil in soil. Pakistan Journal Biology Science, 9:1531-1535.

Mishra, A. and Nautiyal, C. (2009) Functional diversity of the microbial community in the rhizosphere of chickpea grown in diesel fuelspiked soil amended with Trichoderma ressei using sole-carbon-source utilization profiles, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 25: 1175–1180.

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.

Mujahid, T. Y., Wahab, A., Padhiar, S. H., Subhan, S. A., Baloch, M. N., and Pirzada, Z. A. (2015). Isolation and Characterization of Hydrocarbon Degrading Bacteria from Petrol Contaminated Soil. Journal of Basic and Applied Sciences, 11: 223-231.

Mukred, A.M., Hamid, A.A., Hamzah, A. and Yusoff, W.M.W. (2008). Development of three bacteria consortium for the bioremediation of crude petroleum-oil in contaminated water. Online Journal of Biological Sciences, 8(4): 73-79.

Njoku, K.L., Akinola, M.O. and Busari, T.O. (20120. Effect of time of application of spent oil on the growth and performance of maize (Zea mays). African Journal of Environmental Science and Technology, 6:67-71.

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

Olukunle, O. F. and Oyegoke, T. S. (2016). Biodegradation of crude-oil by fungi Isolated from Cow Dung contaminated soils. Nigerian Journal Biotechnology, 31: 46 –58.

Palmroth, M. R. T., Pichtel, J. and Puhakka, J. A. (2002). Phytoremediation of subarctic soil contaminated with diesel fuel. Bioresource Technology, 84: 221-28.

Pena-Castro, J.M., Barrera-Figueroa, B.E., Fernandez, L.L., Ruiz, M.R., and Xoconostle, C.B. (2006) Isolation & identification of upregulated genes in bermudagrass roots (Cynodon dactylon L.) grown under petroleum hydrocarbon stress. Plant Science, 170: 724-731.

Peng, S., Zhou, Q., Cai, Z. and Zhang, Z. (2009). Phytoremediation of petroleum contaminated soils by *Mirabilis Jalapa L*. in a greenhouse plot experiment. Journal of Hazardous Materials, 168: 1490-1496.

Peretiemo-Clarke, B. O. and Achuba, F. I. (2007). Phytochemical effect of petroleum on peanut (Arachis hypogea) seedlings. Journal of Plant Pathology, 6: 179-182.

Radwan, S. S. (2009). Phytoremediatiom for oily desert soils. P. 289-298. In: Singh, A., Kuhad, R. C., Ward, O. P. (eds.). Advanced in Applied Bioremediation. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 361 pp.

Razmjoo, K., and Adavi, Z. (2012). Assessment of bermudagrass cultivars for phytoremediation of petroleum contaminated soils. International journal of phytoremediation, 14: 14-23.

Robinson, S. L., Novak, J. T., Widdowson, M. A., Crosswell, S. B. and Fetterolf, G. J. (2003). Field and laboratory evaluation of the impact of tall fescue on polyaromatic hydrocarbon degradation in an aged creosote-contaminated surface soil. Journal of Environmental Engineering, 129: 232-240.

Sarvi Moghanlo, V., Chorom, M., Falah, M., and Motamedy, H. (2012). Evaluation the effect of myccorhiza anddegrading bacteria in enhancing phytoremediation of oil compound in oil contaminated soil. Journal of Water and Soil, 26(4): 832-841. (In Persian with English abstract)

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.

Tatari, M, Fotouhi Ghazvini, R, Moosavi, A and Babaei, G. (2018). Comparison of some physiological aspects of drought stress resistance in two ground cover genus. Journal of Plant Nutrition, 41: 1215-1226.

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, 169: 207-220.

Wilts, C. C., Rooney, W. L., Chen, Z., Schwab, A. P. and Banks, M. K. (1998). Greenhouse evaluation of agronomic and crude oil phytoremediation potential among alfalfa genotypes. Journal of Environmental Quality, 27(1): 169-73.

Wu, M., Dick, W. A., Li, W., Wang, X., Yang, Q., Wang, T., Xu, L. Zhang, M. and Chen, L. (2016). Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil. International Biodeterioration and Biodegradation, 107: 158-164.