پالایش میکروبی خاک‌های آلوده به مواد نفتی و بررسی نقش رایزوسفر در کارایی ریز جانداران

حسین بشارتی[1]

دانشیار موسسه تحقیقات خاک و آب؛ besharati1350@yahoo.com

دریافت: 92/6/19 و پذیرش: 92/11/21

چکیده

آلودگی نفتی یکی از عمومی‌ترین و شایع ترین نوع از آلودگی‌ها، در زیست بوم‌های خشکی و آبی است. رفع آلودگی با روش‌های مختلف قابل انجام است. یکی از راه‌های ارزان و مقرون به صرفه، استفاده از ریز جانداران و گیاهان برای حذف و یا کاهش آلودگی نفتی است. خاک دارای طیف گسترده‌ای از ریز جانداران تجزیه کننده آلاینده‌های هیدروکربنی است که باکتری‌های *سودوموناس، رودوکوکوس، و نوکاردیا* از مهمترین آنها می‌باشند. این پژوهش با هدف بررسی میزان تأثیر میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده مواد نفتی در بهسازی خاک‌های آلوده به مواد نفتی در شرایط وجود و عدم وجود گیاه در خاک (نقش رایزوسفر) انجام شد. از مناطق آلوده اطراف پالایشگاه که به مدت طولانی در معرض نشت آلاینده‌های نفتی قرار داشتند، تعداد 15 نمونه خاک از عمق صفر تا30 سانتیمتری سطح خاک جمع‌آوری شد. سپس از نمونه‌های خاک در محیط‌های کشت مناسب باکتری‌های تجزیه کننده مواد نفتی جداسازی، خالص سازی و کارایی آنها در تجزیه مواد نفتی تعیین گردید. آزمایش گلدانی در قالب طرح کاملاً تصادفی به صورت فاکتوریل با سه فاکتور باکتری (چهار سطح)، گیاه (دوسطح) وآلودگی (چهار سطح آلودگی) انجام شد. شصت روز پس از شروع آزمایش گیاهان برداشت و وزن‌تر و خشک ریشه و اندام هوایی و نیز غلظت مواد آلاینده در خاک گلدان‌ها اندازه‌گیری گردید. نتایج نشان داد در خصوص وزن تر اندام هوایی اثر باکتری، آلودگی و نیز اثرات متقابل آنها در خصوص وزن خشک اندام هوایی آلودگی و اثرات متقابل آلودگی و باکتری و در مورد وزن تر و خشک ریشه‌ها اثر آلودگی در سطح یک در صد معنی‌دار بود. آلودگی باعث کاهش وزن‌تر و خشک ریشه و اندام هوایی گردید و با افزایش آلودگی کاهش وزن افزایش یافت، درحالیکه تلقیح باکتری‌ها به خاک با حذف مواد آلاینده باعث بهبود وزن ریشه و اندام هوایی گردید. در خصوص غلظت مواد آلاینده در خاک، اثر اصلی و اثرات متقابل تمام تیمارها در سطح 0/1 درصد معنی‌دار گردید. کشت گیاه و نیز تلقیح باکتری‌ها به خاک غلظت مواد آلاینده را بطور معنی‌دار کاهش داد. تلقیح باکتری خیلی بیشتر از کشت گیاه در کاهش آلاینده‌ها مؤثر بوده و کاشت گیاه کارکرد باکتری‌ها را بطور معنی‌دار افزایش نداد، بطوری که بین تیمارهای گیاه و گیاه+باکتری تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد.

واژه‌های کلیدی: زیست پالایی، فنانترن، پایرن، آلودگی نفتی

---

[1]. نویسنده مسئول، آدرس: کرج، مشکین دشت، بلوار امام خمینی (ره)، موسسه تحقیقات خاک و آب

مقدمه

آلودگی نفتی یکی از عمومی‌ترین و شایع ترین نوع از آلودگی‌ها، در زیست بوم‌های خشکی و آبی است. توسعه صنعت پتروشیمی از یک سو، و عدم رعایت الزامات زیست‌محیطی از سوی دیگر، سبب شده است تا در دهه‌های اخیر مقادیر زیادی از آلاینده‌های هیدروکربنی وارد محیط زیست شوند. مواد نفتی در حین حفاری و استخراج در سایت‌های نفتی و یا به هنگام نقل و انتقال زمینی و دریایی آنها، به رغم تدابیری که جهت کنترل آلودگی آنها در نظر گرفته می‌شود، به محیط اطراف نشت می‌کنند. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که فعالیت‌های صنعتی انسان، تنها عامل آلودگی محیط زیست به ترکیبات سمی و خطرناک به وسیله این دسته از آلاینده‌ها می‌باشد (المندورف و همکاران، 1994). در کشور ایران در بسیاری از مناطق، ایجاد صنایع پتروشیمی، احداث پالایشگاه‌ها و حفاری چاه‌های استخراج نفت و گاز، باعث افزایش مشکلات آلودگی[1] خاک‌های اطراف این مناطق می‌شود. عواملی نظیر دفع نامناسب فاضلاب‌ها و ضایعات مراکز صنعتی، پخش آلاینده توسط پالایشگاه‌ها و نیروگاه‌ها، نشت آلاینده از مخازن نفتی زیر زمینی و ایستگاه‌های سوخت‌گیری، تصادفات تانکرها و نفتکش‌ها و غیره به این مشکل دامن می‌زنند.

به محض ورود این آلاینده‌ها به محیط‌زیست، بخشی از آلاینده‌ها، خصوصاً قسمتی که از لحاظ ساختاری شبیه به ترکیبات طبیعی هستند، سریعاً توسط میکروارگانیسم-های موجود در آب و خاک و یا تحت تأثیر عوامل فیزیکی و شیمیایی تجزیه و حذف می‌شوند. اما بخش عمده آن، به کندی تجزیه می‌گردد و در نتیجه در محیط زیست باقی مانده و تجمع می‌نمایند. از مهمترین این آلاینده‌ها هیدروکربن-های حلقوی (PAHs) باوزن مولکولی بالامی‌باشند. این گروه از آلاینده‌ها شامل ترکیباتی هستند که تجزیه زیستی آنها بدلیل نفوذپذیری و جذب بسیار قوی در خاک، اغلب با موفقیت همراه نیست (ویلسون و جونز، 1993). تجمع این ترکیبات شیمیایی در محیط زیست، تهدیدی جدی برای سلامت انسان، موجودات و اکوسیستم‌های زنده است (میرسال، 2004). رفع آلودگی مواد مذکور با روش‌های مختلف از جمله روش‌های شیمیایی، فیزیکی، زیستی و یا ترکیبی از این روش‌ها قابل انجام است. یکی از راه‌های ارزان و مقرون به صرفه، استفاده از ریز موجودات و گیاهان (روش زیستی) برای حذف و یا کاهش آلودگی نفتی است (دیبل و بارتا، 1979). گیاه پالایی، تکنولوژی ارزان و مؤثر در کنترل آلودگی بوده و قادر به حذف طیف وسیعی از آلاینده‌های آلی می‌باشد و به دلیل دارا بودن مزیت‌هایی همچون کمترین بهم خوردگی خاک، حجم کم ضایعات، جذب اشعه خورشید، پایداری خیلی خوب، سادگی کاربرد، امکان استفاده در سطح وسیع و کمک به رشد گیاهان دیگر جهت رفع آلودگی‌ها مورد توجه خاص قرار گرفته است (شیمپا و همکاران،1993، گیبسون و سایلر، 1992).

البته این روش مشکلاتی نیز دارد که حساس بودن گونه‌های بسیار زیادی از گیاهان به آلاینده‌هایی مثل PAH_S [2]، رشد کمی گیاهان در شرایط آلودگی، تولید زیست توده ناکافی جهت پاکسازی مناسب، نیاز به زمان زیادی برای رشد مناسب از جمله این مشکلات می‌باشند. برخی از ریزموجودات نیز دارای توانایی حذف ترکیبات نفتی هستند. این دسته از موجودات می‌توانند ترکیبات نفتی را به عنوان منبع انرژی و مواد اولیه برای تکثیر و رشد خود استفاده نموده (سالحا، 2008) و ترکیبات نفتی را تجزیه وآلودگی خاک را تا حد زیادی کاهش دهند. خاک دارای طیف گسترده‌ای از این دسته ریزموجودات تجزیه کننده آلاینده‌های هیدروکربنی است که از مهمترین آن‌ها می‌توان به انواع باکتری‌های *سودوموناس*، *رودوکوکوس*، و *نوکاردیا* اشاره نمود.

توسعه و گسترش بکارگیری فن آوری *Bioremediation*، مستلزم کنترل فعل و انفعالات پیچیده میکروبی برای تجزیه ترکیبات آلاینده و تسریع فرایند پاکسازی است (گروزر و همکاران، 1995). بطور کلی زیست پالایی می‌تواند در کاهش آلودگی بصورت در جا تأثیرگذار باشد و در این روش نیازی به خارج کردن و انتقال خاک و بر هم خوردن ساختمان خاک نمی‌باشد. در دو دهه اخیر کاربرد زیست پالایی تا حدی گسترش یافته، زیرا اطلاعات بیشتری در خصوص عملکرد میکروب‌ها در خاک، بخصوص در مناطقی که به انواع PAHs آلوده بودند، بدست آمده است. مهمترین شاخص‌ها برای زیست پالایی عبارتند از:

۱. طبیعت آلاینده موجود در محیط
۲. ساختمان و بافت خاک و هیدرولوژی آن (حرکت آلودگی از طریق خاک وآب‌های زیرزمینی)
۳. میزان فراهمی عناصر غذایی
۴. نوع و ترکیب میکروبی موجود در خاک (کوپیر و همکاران،2001، دوا-ستوناتان 2002، بلومر 1976).

برای اینکه تکنیک زیست پالایی بطور عموم مورد پذیرش قرار بگیرد باید مؤثر بودن و قابل پیش‌بینی

[1] contamination

[2] Poly cyclic Aromatic Hydrocarbons

بودن عملکرد این روش‌ها اثبات شود (هیتزر و سایلر 1993، ویک و همکاران 2007).

در فرایند گیاه پالایی، گیاهان با اعمال مکانیسم-های مختلف (تجزیه فراریشه‌ای،[1] تجزیه گیاهی،[2] کنترل هیدرولیکی،[3] فیلتراسیون ریشه‌ای، جذب گیاهی [4] تصعید گیاهی،[5] تثبیت گیاهی و..) باعث کاهش آلاینده‌ها در خاک‌های آلوده می‌شوند. میکروارگانیسم‌ها نیز بامکانیسم-های مختلف باعث تجزیه مواد نفتی می‌شوند. کاربرد توأمان گیاهان و میکروارگانیسم‌ها در بسیاری از موارد بیشتر از کاربرد جداگانه هریک از آنها در پالایش خاک‌های آلوده به مواد نفتی مؤثر می‌باشد زیرا میکروارگانیسم‌ها علاوه بر تجزیه مواد نفتی، از طریق کمک به استقرار گیاه در خاک و بهبود شرایط رشدی گیاهان و گیاهان نیز با تولید ترشحات ریشه و تغییر تعداد و تنوع میکروب‌ها در ریزوسفر باعث تشدید تجزیه مواد نفتی می‌شوند و در واقع نوعی هم افزایی در تجزیه مواد نفتی ایجاد می‌شود. اما بروز این حالت به شرایط خاک، نوع گیاه، نوع میکروارگانیسم، نوع مواد نفتی آلاینده خاک و مدت زمان آلودگی خاک بستگی دارد. این پژوهش با هدف بررسی میزان تأثیر میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده مواد نفتی در بهسازی خاک‌های آلوده به مواد نفتی در شرایط وجود و عدم وجود گیاه در خاک (نقش رایزوسفر) انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه‌های خاک و جداسازی باکتری

از مناطق آلوده جنوب پالایشگاه تهران که به مدت طولانی در معرض نشت آلاینده‌های نفتی از مخازن پالایشگاه تهران قرار داشتند، تعداد 15 نمونه خاک از عمق صفر تا30 سانتیمتری سطح خاک جمع‌آوری شد. برای جداسازی باکتری‌های نفت خوار در هر نمونه خاک، سوسپانسیون 1:1 (خاک به آب) در دمای 75 درجه سانتیگراد و به مدت 30 دقیقه به هم زده شد تا ضمن کاهش ویسکوزیته هیدروکربن‌ها و وارد شدن آنها به فاز آبی، هیدروکربن‌های سمی، سبکتر و فرارتر[6] از محیط خارج شوند (وثوقی و همکاران،. 1383). محتوی دو قسمتی سوسپانسیون توسط قیف بوخنر و کاغذ صافی واتمن 42 تحت مکش، عصاره‌گیری شد و عصاره بدست آمده پس از اضافه شدن 15 گرم آگار بر لیتر در اتوکلاو با دمای 121 درجه سانتیگراد و فشار 1/2 اتمسفر به مدت 30 دقیقه استریل و سپس در ظروف پتری استریل توزیع گردید. سری رقت (از رقت 10^{-4} تا 10^{-7}) تهیه شده هر نمونه خاک، بر محیط کشت تهیه شده از همان خاک تلقیح گردید. پس از گذشت چند روز (بسته به نمونه هر خاک) کلنی‌ها ظاهر شدند. برای انتخاب باکتری‌های برتر، به سرعت رشد کلنی‌های باکتری و نیز حداکثر قطر کلنی در انتهای روز بیستم، اکتفا شد (ایلیانا و همکاران 2003). باکتری‌های انتخاب شده به روش زیرکشت[7] خالص سازی شدند.

بررسی میزان کارایی باکتری‌ها در محیط معدنی حاوی مواد هیدروکربنی، محیط کشت پایه معدنی حاوی 7 % حجمی گازوئیل به عنوان منبع کربن مایع تهیه شد. کشت خالص باکتری‌های مورد نظر به محیط کشت پایه معدنی مایع درون ارلن، تلقیح شد. ارلن‌های کشت شده به مدت 15 روز در دمای 30-28 درجه سانتیگراد بر روی شیکر با 180 دور در دقیقه (*rpm*) قرار داده شد. در انتهای هر 5 روز، کدورت آنها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج 600*nm*، قرائت گردید (وثوقی و همکاران، 1383؛ مسلمی و همکاران، 1384؛ ایلیانا و همکاران 2003). در این مرحله بر اساس اعداد حاصل از میزان جذب دستگاه اسپکتروفتومتر در انتهای روز پانزدهم، جمعیت تقریبی باکتری‌ها در هر میلی لیتر توسط روش استاندارد McFarland[8] محاسبه شد. بر اساس مقایسه نتایج به دست آمده از قرائت دستگاه اسپکتروفتومتر در انتهای روز پانزدهم، شش سویه به عنوان برترین‌ها انتخاب شدند.

کشت برروی محیط حاوی پایرن و فنانترن

محیط کشت پایه معدنی حاوی فنانترن و پایرن (با غلظت 100 و200 میلی گرم در لیتر) بصورت جامد و مایع تهیه و باکتری‌های منتخب در محیط‌های مذکور کشت شدند. همه شش جدایه برروی سطح محیط کشت جامد حاوی پایرن و فنانترن کلونی تشکیل دادند (ایلیانا و همکاران 2003). در محیط مایع نیز ارلن‌های تلقیح شده به مدت 14 روز با شدت 250 دور در دقیقه در دمای 25 درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند. مقدارکاهش پایرن وفنانترن در نمونه‌ها اندازه‌گیری گردید (جدول1). از جدایه‌هایی که توانایی بیشتری در تجزیه پایرن وفنانترن

1. Rhizodegradation
2. Phytodegradation
3. Hydraulic control
4. Phytaoccumulation
5. Phytovolatilization
6. volatile
7. subculture
8. Mcfarland Barium Sulfate Standards

داشتند دو جدایه به عنوان جدایه برتر انتخاب شدند و در کشت گلخانه‌ای گندم استفاده شدند.

کشت گلخانه‌ای گندم

مقدار کافی از یک خاک زراعی لوم شنی (از عمق صفر تا30 سانتی‌متری) تهیه و پس از هوا خشک شدن و عبور از الک 2 میلی متری در گلدان‌های 4 کیلوگرمی توزین گردید. همچنین خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیک خاک شامل قابلیت هدایت الکتریکی، *pH*، درصد ماده آلی (روش Walkly Black)، بافت خاک (روش هیدرومتری)، فسفر قابل جذب گیاه (روش اولسن)، نیتروژن کل (کجلدال)، پتاسیم (استات آمونیوم نرمال) و غلظت قابل جذب عناصر میکرو آهن، روی، منگنز، مس، کادمیوم و سرب به روش عصاره‌گیری با *DTPA* و با دستگاه جذب اتمی اندازه‌گیری شدند (جدول11). برای کشت گلخانه‌ای گندم از طرح بلوک-های کامل تصادفی به صورت فاکتوریل با سه فاکتور استفاده گردید:

1- فاکتور باکتری: چهار سطح باکتری (B_0, B_3, B_6, Mix B_3B_6)

2- فاکتور گیاه: دوسطح با و بدون گیاه (G_0,G_1)

3- فاکتور آلودگی چهار سطح آلودگی پایرن و فنانترن ($P\&Ph_0$,$P\&Ph_{50}$, $P\&Ph_{100}$, $P\&Ph_{150}$)

B_0: فاقد باکتری B_3: دارای جدایه باکتری سودوموناس فلوروسنس (*Pseudomonas flourescens*)

B_6: دارای جدایه باکتری باسیلوس سرئوس (*Bacillus cereus*) Bmix: مخلوط هر دو جدایه

G_1: کشت شده با گیاه گندم G_0: فاقد گیاه

$P\&Ph_0$: عدم حضور پایرن و فنانترن $P\&Ph_{50}$: مقدار پایرن 50ppm و مقدار50ppm فنانترن در خاک

$P\&Ph_{100}$: مقدار پایرن 100ppm وفنانترن 100ppm

$P\&Ph_{150}$: مقدار پایرن 150ppm وفنانترن 150ppm

برای اعمال سطوح آلودگی 50.100.150 میلی-گرم در کیلوگرم از هر آلاینده ابتدا مقادیر مورد نیاز برای هر گلدان 4 کیلوگرمی در استن حل گردید. سپس روش زیر برای اعمال تیمار سطوح مختلف آلودگی برای هر چهار کیلوگرم خاک توزین شده انجام شد: ابتدا چهار کیلوگرم خاک به دو قسمت دو کیلویی تقسیم گردید و سپس از هر کدام از واحدهای دو کیلویی خاک، 200گرم معادل 10 درصد وزنی جدا شد. محلول پایرن و فنانترن که پیشتر محاسبه گردیده بود را به دو قسمت تقسیم کرده و هر قسمت با هر یک از200 گرم (10 درصد وزنی) جدا سازی شده مخلوط گردید. بعد از تبخیر استون، هریک از 200 گرم خاک آغشته با پایرن و فنانترن را با مقادیر غیر آلوده باقیمانده از واحدهای 2کیلوگرم خاک مخلوط کرده و بعد از آن مجددا دو قسمت2 کیلویی را با هم مخلوط و جهت اطمینان از یکنواختی توزیع آلاینده در تیمارهای مورد بررسی، خاک مجددا از الک 2میلی متری عبور داده شد. لازم به ذکر است که توزیع یکنواخت پایرن را بااستفاده از روش ارایه شده (ونگ و جونز 1994) انجام گرفت.

تهیه‌زاد مایه باکتری

برای کشت گلخانه‌ای گندم دو باکتری برتر انتخاب شده شناسایی شدند. یکی از آنها سویه باسیل گرم منفی (از جنس *سودوموناس*: *Pseudomonas flourescens* و دیگری سویه گرم مثبت (از جنس *Bacillus cereus*) بود. برای تکثیر آنها یک لوپ از کشت خالص باکتری مورد نظر به محیط کشت Nutrient Broth درون ارلن، تلقیح گردید. سپس ارلن‌ها به مدت 16 ساعت در دمای°C 28 برروی شیکر دورانی با سرعت 120 دور در دقیقه قرار داده شدند. منحنی رشد باکتری‌ها رسم گردید و در طول موج 600nm در حالیکه صفر دستگاه با محلول NB تنظیم گردیده بود کدورت محیط کشت قرائت شد. مطابق با روش McFarland، محیط کشت تازمانی که دستگاه اسپکتروفتومتر عدد 0/198 (جمعیت 3×10^8 CFU/ ml) را نشان دهد توسط آب مقطر استریل رقیق گردید.

کشت گیاه

بذور سالم گندم رقم پیشتاز به مدت 10-15 ثانیه در الکل اتیلیک 96 درجه قرار داده شد، سپس به مدت 1/5- 2 دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم 5 درصد غوطه ور شدند. برای حذف ماده ضدعفونی کننده، 7 تا 8 بار با آب مقطر استریل شستشو گردیدند. در هر گلدان تعداد 5 بذر جوانه‌دار کاشته و یک میلی‌لیتر از زادمایه باکتری با جمعیت3×10^8 cfu/ml به همراه هر بذر به خاک وارد گردید و روی آن‌ها با خاک پوشانده شد. در تیمارهایی که گیاه کشت نشده بود به همین مقدار از زاد مایه معادل پنج میلی لیتر و با جمعیت 3×10^8cfu/ml به گلدان اضافه گردید. در طی دو ماه دوره رشد گیاه تنظیم رطوبت گلدان‌ها به روش وزنی صورت می‌گرفت. نیتروژن (کود اوره)، و فسفر (K_2HPO_4)، براساس آزمون خاک به خاک گلدان‌ها اضافه شد. نور مورد نیاز گیاه گندم حدود 10000-14000 لوکس می‌باشد. در این تحقیق نور با لوکس در حد مورد نیاز و به مدت 12 ساعت روشنایی تأمین و تنظیم گردید. با توجه به اینکه دمای مطلوب گندم بین 28-27سانتیگراد می‌باشد، شرایط گلخانه به گونه‌ای تنظیم گردید که نوسان دما بین حداقل 25 درجه سانتیگراد تا حداکثر 30درجه سانتیگراد باشد. وزن تر و وزن خشک

و نیز مقدار مواد آلاینده در خاک گلدان‌ها با دستگاه HPLC[1] اندازه‌گیری شد.

نتایج و بحث

باکتری‌هایی که در محیط کشت حاوی گازوییل رشد کرده و توانسته بودند از آن بعنوان منبع کربن استفاده نمایند، در محیط کشت جامد حاوی پایرن و فنانترن کشت شده و پس از ایجاد کلنی در محیط مذکور (کیفی) به منظور ارزیابی کمی توانایی آنها در تجزیه پایرن و فنانترن، در محیط مایع حاوی ترکیبات فوق کشت شده و بعد از دو هفته میزان پایرن و فنانترن باقیمانده در محیط کشت باکتری‌ها اندازه‌گیری شد که نتایج این اندازه گیری‌ها در جدول 1 ارایه شده است. براساس نتایج، باکتری‌های B_3,B_6, انتخاب شدند (جدول 1).

نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارها بر وزن خشک ریشه و اندام هوایی گندم نشان داد که اثر اصلی باکتری‌ها بر وزن خشک بخش هوایی گندم معنی‌دار نبود، در حالیکه اثر اصلی آلودگی و نیز اثرات متقابل آلودگی و باکتری بر وزن خشک بخش هوایی در سطح یک درصد معنی‌دار بود. در خصوص وزن خشک ریشه فقط اثر آلودگی در سطح 0/1 درصد معنی‌دار گردید و اثر سایر تیمارها معنی‌دار نبود (جدول 2).

مقایسه میانگین اثرآلودگی بر وزن خشک ریشه و اندام هوایی نشان داد سطوح مختلف آلودگی خاک با پایرن و فنانترن در مقایسه با شاهد بدون آلودگی باعث کاهش وزن خشک اندام هوایی گندم گردیدند ولی در خصوص وزن خشک اندام هوایی بین سطوح مختلف آلودگی تفاوت معنی‌دار نبود و هر سه سطح آلودگی از لحاظ آماری در یک سطح قرار گرفتند (جدول 3). متوسط وزن خشک ریشه از 0/784 گرم در گلدان در تیمار شاهد بدون آلودگی به 0/321 گرم در گلدان در تیمار سطح سوم آلودگی کاهش یافت و این کاهش از لحاظ آماری معنی‌دار بود (جدول 3).

مقایسه میانگین اثرات متقابل باکتری و آلودگی بر وزن خشک اندام هوایی گیاه گندم نشان داد که گلدان‌هایی که فاقد مواد آلاینده پایرن و فنانترن بوده و با باکتری‌های سودوموناس تلقیح شده‌اند، با وزن خشک حدود 4/5 گرم در گلدان بیشترین، در حالی که گلدان‌هایی که 150 میلی‌گرم در کیلوگرم بایرن و فنانترن به خاک آنها اضافه شده و با هیچ باکتری تلقیح نشده‌اند، با وزن خشک حدود 1/2 گرم در گلدان، کمترین وزن خشک بخش هوایی گندم را به خود اختصاص دادند. بهترین تیمار در مقایسه با شاهد (بدون آلودگی و بدون باکتری) 62 درصد افزایش داشت. بطور کلی با افزایش سطوح آلودگی، وزن خشک کاهش و با تلقیح باکتری وزن خشک افزایش معنی‌دار نشان داد. بطورکلی تلقیح باکتریها باعث کاهش اثرات سوء آلاینده ها بر گیاه گردید (جدول 4).

پس از پایان دوره آزمایش، از خاک تمام گلدان‌ها (هم گلدان‌های حاوی گیاه و هم گلدان‌های بدون گیاه) نمونه خاک تهیه و میزان مواد آلاینده پایرن و فنانترن در خاک گلدان‌ها با دستگاه HPLC اندازه‌گیری گردید. تجزیه واریانس نتایج اندازه‌گیری غلظت پایرن و فنانترن نشان داد که (بجز اثر متقابل گیاه و باکتری بر غلظت فنانترن) اثر اصلی و اثرات متقابل تمامی تیمارها بر غلظت پایرن و فنانترن در سطح 0/1 درصد معنی‌دار گردید (جداول 5).

متوسط غلظت پایرن و فنانترن در گلدان‌های حاوی گیاه بطور معنی‌داری بیشتر از غلظت آنها در گلدان‌های بدون گیاه بود (جدول 6). به عبارت دیگر تجزیه این ترکیبات در گلدان‌های بدون گیاه بیشتر از گلدان‌های حاوی گیاه بوده است. نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که سیستم گیاه‌پالایی پتانسیل فعالیت‌های تجزیه‌ای را با تغییر دادن ترکیب جامعه میکروبی افزایش می‌دهد و باعث کاهش آلاینده‌های هیدروکربنی موجود در خاک، در حضور گیاهان می‌شود. البته در تحقیق حاضر تجزیه آلاینده‌های پایرن و فنانترن در خاک بدون گیاه بیشتر بوده است. یکی از دلایل احتمالی این موضوع این می‌تواند باشد که باکتری‌های تجزیه کننده ترکیبات نفتی عمدتاً از ترشحات ریشه استفاده کرده و کمتر مواد نفتی را بعنوان منبع کربن و انرژی مورد استفاده قرار داده‌اند، در حالیکه در خاک بدون گیاه استفاده از آلاینده‌ها توسط باکتری‌ها بیشتر بوده و لذا تجزیه ترکیبات آلاینده (پایرن و فنانترن) بیشتر صورت گرفته است. گیاه یونجه در ظروفی از مخلوط نفت سیاه و خاک (3/3 گرم هیدروکربن‌های نفتی در هر کیلوگرم خاک) برای مدت 120 روز کشت گردید. وجود یونجه، تجزیه زیستی هیدروکربن‌های نفتی را در زمان 20 تا 80 روز افزایش داد. در حضور گیاه حذف هیدرو کربن‌های نفتی 20 درصد سریع‌تر از خاک کشت نشده بود. بعد از 80 روز، تجزیه‌ی هیدروکربن‌ها در خاک کشت شده و خاک بدون گیاه یکسان بود و اختلاف معنی‌داری بین خاک کشت شده و خاک بدون گیاه در تجزیه‌ی هیدروکربن‌های نفتی مشاهده نشد. در آزمایشی در حضور ذرت، تجزیه‌ی زیستی هیدروکربن‌های نفتی تا 20 درصد افزایش یافت (چاینو و همکاران 1997).

---

[1]. High Performance Liquid chromatography

جدول 1- نتایج اندازه‌گیری پایرن و فنانترن باقیمانده در محیط کشت باکتری‌ها

مشخصات نمونه	مقدار کل پایرن بر حسب میلی‌گرم	مشخصات نمونه	مقدار کل فنانترن بر حسب میلی‌گرم
Pyrene-B3T2	77/3	Phenanthrene-B3T2	70/6
Pyrene-Blank	72/4	Phenanthrene-B4T1	90/2
Pyrene-B5T2	83/0	Phenanthrene-B2T2	75/4
Pyrene-B5T1	73/1	Phenanthrene-B4T2	87/9
Pyrene-B1T1	79/4	Phenanthrene-B6T2	99/5
Pyrene-B6T1	66/9	Phenanthrene-B1T2	96/4
Pyrene-B3T1	64/1	Phenanthrene-B5T2	84/0
Pyrene-B2T1	74/1	Phenanthrene-B6T1	60/0
Pyrene-B6T1	64/4	Phenanthrene-B3T3	77/0
Pyrene-B4T2	68/4	Phenanthrene-Blank	89/3
Pyrene-B1T2	70/5	Phenanthrene-B1T1	77/0
Pyrene-B4T1	79/4	Phenanthrene-B5T1	79/1
Pyrene-B2T2	77/3	Phenanthrene-B2T1	79/1

جدول 2- تجزیه واریانس اثر تیمارها بر میزان وزن خشک اندام هوایی و ریشه

منابع تغییرات (SOV)	درجه آزادی (df)	اندام هوایی		ریشه	
		میانگین مربعات (MS)	Pr>F	میانگین مربعات (MS)	Pr>F
باکتری	3	0/18220	0/5468 Ns	0/00570	0/8514 ns
آلودگی	3	12/00380	<0/0001***	0/44122	<0/0001***
آلودگی × باکتری	9	0/69800	0/0164**	0/01499	0/7110 ns

ns،**،*** به ترتیب غیر معنی‌دار، معنی‌دار در سطح یک درصد و معنی‌دار در سطح یک دهم درصد

جدول 3- مقایسه میانگین اثرآلودگی بر وزن خشک اندام هوایی و ریشه گیاه گندم

تیمار	وزن خشک اندام هوایی (گرم در گلدان)	وزن خشک ریشه (گرم در گلدان)
بدون آلودگی	3/ 6192 a	0/784a
سطح اول آلودگی	1/7992 b	0/623b
سطح دوم آلودگی	1/6592 b	0/568b
سطح سوم آلودگی	1/4575 b	0/321c

در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، تفاوت آنها در سطح پنج درصد (روش دانکن) معنی‌دار نیست

جدول 4- مقایسه میانگین اثرات متقابل باکتری و آلودگی بر وزن خشک اندام هوایی

تیمار	وزن خشک اندام هوایی (گرم در گلدان)
بدون باکتری+ بدون آلودگی	2/773dc
بدون باکتری+ سطح اول آلودگی	1/6466ef
بدون باکتری+ سطح دوم آلودگی	2/3733de
بدون باکتری+ سطح سوم آلودگی	1/2033f
باسیلوس+ بدون آلودگی	3/66ab
باسیلوس+ سطح اول آلودگی	1/4966ef
باسیلوس+ سطح دوم آلودگی	1/8666ef
باسیلوس+ سطح سوم آلودگی	1/3766f
سودوموناس+ بدون آلودگی	4/4966a
سودوموناس+ سطح اول آلودگی	1/820ef
سودوموناس+ سطح دوم آلودگی	1/3633f
سودوموناس+ سطح سوم آلودگی	1/5100ef
باسیلوس+سودوموناس+ بدون آلودگی	3/5100bc
باسیلوس+سودوموناس+ سطح اول آلودگی	1/6733ef
باسیلوس+سودوموناس+ سطح دوم آلودگی	1/5933ef
باسیلوس+سودوموناس+ سطح سوم آلودگی	1/7400ef

در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، تفاوت آنها در سطح پنج درصد (روش دانکن) معنی‌دار نیست.

جدول 5- تجزیه واریانس اثر تیمارها بر غلظت پایرن و فنانترن در خاک گلدان‌ها

منابع تغییر (SOV)	درجه آزادی (df)	پایرن		فنانترن	
		میانگین مربعات (ms)	Pr>F	میانگین مربعات (Ms)	Pr>F
گیاه	1	1660/7813	0/0001***	83/0094	0/0001***
آلودگی	2	5780/5546	0/0001***	106/9668	0/0001***
باکتری	3	508/9278	0/0001***	8/4130	0/0003**
گیاه×آلودگی	2	662/4146	0/0001***	30/1064	0/0001***
گیاه×باکتری	3	626/1487	0/0001***	2/1150	0/1432^{ns}
گیاه×آلودگی×باکتری	12	361/4004	0/0001***	4/6350	0/0002**

*** معنی‌دار در سطح یک دهم درصد

جدول 6- مقایسه میانگین اثر کشت گیاه بر غلظت پایرن و فنانترن در خاک گلدان‌ها

تیمار	پایرن (میلی‌گرم در کیلوگرم)	فنانترن (میلی‌گرم در کیلوگرم)
بدون گیاه	16/178 b	1/1150 b
با گیاه	25/783 a	3/2635 a

در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، تفاوت آنها در سطح پنج درصد(روش دانکن) معنی‌دار نیست.

تلقیح باکتری‌های تجزیه کننده مواد نفتی به خاک، نسبت به شاهد بدون تلقیح (تیمار b_0) غلظت پایرن و فنانترن را بطور معنی‌داری کاهش داد. باکتری b_3 نسبت به شاهد بدون باکتری 19/83 و باکتری b_6 37/39، در حالی که مخلوط آنها 41/87 درصد غلظت پایرن را نسبت به شاهد کاهش دادند (جدول 7). این ارقام در مورد فنانترن 31/61، 32/29 و 53/87 درصد بودند.

جدول 7- مقایسه میانگین اثر باکتری بر غلظت پایرن و فنانترن در خاک گلدان‌ها

تیمار	پایرن (میلی گرم در کیلوگرم)	فنانترن (میلی گرم در کیلوگرم)
b0	27/89 a	3/095 a
b3	22/36 b	2/126 b
b6	17/46 c	2/099 b
Bmix	16/21 c	1/434 b

در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، تفاوت آنها در سطح پنج درصد (روش دانکن) معنی‌دار نیست.

مقایسه میانگین اثرات متقابل سطوح آلودگی و کشت گیاه نشان داد که در گلدان‌هایی که 150 میلی‌گرم در کیلوگرم پایرن و فنانترن دریافت کرده و در آنها گیاه گندم کشت شده بود، بیشترین غلظت پایرن و فنانترن را به خود اختصاص دادند، در حالی که گلدان‌هایی که 50 میلی‌گرم در کیلوگرم پایرن دریافت کرده و در آنها گندم کشت شده بود، کمترین غلظت پایرن را دارا بودند (جدول 8).

مسلمی و همکاران (1384)، نشان دادند که باکتری-های بومی استخراج شده از خاک‌های آلوده نفتی، قادرند پس از 30 روز، بین 50 تا 83 درصد از آلاینده مورد نظر (گازوئیل) را تجزیه و حذف نمایند. مشابه نتایج بدست آمده در این تحقیق، در مورد تجزیه و حذف آلاینده‌های هیدروکربنی توسط گونه‌های باکتریایی، در تحقیقات سالانیترو در سال 2001، زو و اوبارد در سال 2003 نیز بدست آمده است.

مقایسه میانگین اثرات متقابل گیاه و باکتری نشان داد که در گلدان‌هایی که گیاه کشت نشده و هیچگونه باکتری نیز به خاک تلقیح نشده بود، غلظت پایرن بیشترین مقدار (31/052 میلی‌گرم در کیلوگرم) را دارا بود در حالی که در گلدان‌های بدون گیاه که مخلوط باکتری‌ها (b_{mix}) به خاک تلقیح شده بود، کمترین مقدار پایرن (6/412 میلی‌گرم در کیلوگرم) را به خود اختصاص دادند (جدول 9).

جدول 8- مقایسه میانگین اثر متقابل آلودگی و کشت گیاه بر غلظت پایرن و فنانترن در خاک گلدان‌ها

تیمار		پایرن (میلی‌گرم در کیلوگرم)	فنانترن (میلی‌گرم در کیلوگرم)
بدون گیاه	P100	13/543 cd	0/8029 c
بدون گیاه	P150	27/5041 b	2/227 b
بدون گیاه	P50	7/4866 d	0/3147 c
با گیاه	P100	20/6422 bc	2/5004 b
با گیاه	P150	48/644 a	6/8057 a
با گیاه	P50	8/062 d	0/4813 c

در این جدول حرف P نشانه پایرن و فنانترن می‌باشد.

در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، تفاوت آنها در سطح پنج درصد (روش دانکن) معنی‌دار نیست.

جدول 9- مقایسه میانگین اثر متقابل باکتری و کشت گیاه بر غلظت پایرن و فنانترن در خاک گلدان‌ها

تیمار		میانگین	
		پایرن (میلی‌گرم در کیلوگرم)	فنانترن (میلی‌گرم در کیلوگرم)
بدون گیاه	b_0	31/052 a	0/4404 b
بدون گیاه	b_3	18/4811 abc	2/4732 ab
بدون گیاه	b_6	8/7651 bc	0/7703 b
بدون گیاه	b_{mix}	6/4127 c	0/7761 b
با گیاه	b_0	24/7317 ab	2/4284 Ab
با گیاه	b_3	26/2390 ab	3/7167 a
با گیاه	b_6	26/1543 ab	3/4823 a
با گیاه	b_{mix}	26/0081 ab	3/4224 a

در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، تفاوت آنها در سطح پنج درصد (روش دانکن) معنی‌دار نیست

جدول 10 مقایسه میانگین اثرات متقابل باکتری، آلودگی و کشت گیاه بر غلظت پایرن و فنانترن در خاک گلدان‌ها را نشان می‌دهد. مقایسه تیمارهای بدون گیاه با بالاترین سطح آلودگی در دو حالت بدون باکتری و با باکتری (مقایسه تیمار b6 P150G0 با تیمار b0 P150G0) از لحاظ غلظت پایرن نشان می‌دهد که باکتری نقش بسزایی در تجزیه پایرن داشته و غلضت آنرا از 61/12 در تیمار b0 P150G0 به 2/89 در تیمار b6 P150G0 کاهش داده است. همچنین مقایسه دو تیمارb0 P150G1 با تیمار b0 P150G0 نشان می‌دهد که گیاه کمتر از باکتری در تجزیه پایرن مؤثر بوده بطوریکه غلظت آنرا از 61/12 در تیمار اولی به 47/86 کاهش داده است، این درحالی است که غلظت پایرن در بالاترین سطح آلودگی اعمال شده در تیمارهای شاهد (بدون گیاه و باکتری) 61/12، در تیمار فقط گیاه 47/86، در تیمار فقط باکتری 2/89 و در تیمار باکتری و گیاه 49/91 میلیگرم در کیلوگرم خاک می‌باشد. فلذا باکتری در گلدان‌های حاوی گیاه در تجزیه پایرن چندان مؤثر نبوده است (جدول10).

خاک‌های آلوده به جهت طبیعت ناهمگن و حجم بالای موادی که باید پاکسازی شوند محیطی پیچیده و پرهزینه برای پاکسازی هستند. محیط اطراف ریشه‌ی گیاهان که به عنوان فراریشه شناخته می‌شود، غنی از ترکیبات کربنی آزاد شده از ریشه‌ی گیاه به فرم‌های مختلف می‌باشد. گیاهان حدود 5 تا 20 درصد انرژی حاصل از فتوسنتز خود را صرف تولید ترشحات (پلی‌ساکاریدها، اسیدهای آلی، ویتامین‌ها، لیپیدها و آنزیم‌ها) می‌کنند (مورال 1999) که در پاسخ به کمبود عناصر غذایی (مارشنر 1998) و یا دیگر تنش‌های محیط از خود ترشح می‌کنند. ترشحات ممکن است شرایط را در فراریشه تغییر دهند و یا اینکه یک تأثیر آنتی‌بیوتیکی بر موجودات زنده خاک، در جهت بهبود شرایط خاک برای رشد گیاه داشته باشند (هورنبای 1990). لار و همکاران (1999) افزایش تجزیه زیستی فنانترین جذب شده در نتیجه ریزجانداران حاضر در منطقه فراریشه را مشاهده کردند.

گیاه پالایی موفقیت آمیز آلاینده‌های آلی در گستره‌ی وسیعی از ترکیبات مانند گازوئیل و دیگر هیدروکربن‌های مخلوط مانند هیدروکربن‌های آلیفاتیک، هیدروکربن‌های حلقوی، آفت‌کش‌ها و مواد آلی کلردار اثبات شده است

جدول 10- مقایسه میانگین اثرات متقابل باکتری، آلودگی و کشت گیاه بر غلظت پایرن و فنانترن در خاک گلدان‌ها

	تیمار		پایرن (میلی‌گرم در کیلوگرم)	فنانترن (میلی‌گرم در کیلوگرم)
بدون گیاه	P_{100}	b_0	24/30 c	0/3213 f
بدون گیاه	P_{100}	b_3	9/99 defgh	1/075 def
بدون گیاه	P_{100}	b_6	16/04 cdefgh	1/382 def
بدون گیاه	P_{100}	b_{mix}	3/836 gh	0/433 f
بدون گیاه	P_{150}	b_0	61/123 a	0/693 Ef
بدون گیاه	P_{150}	b_3	39/433 b	6/114 Ab
بدون گیاه	P_{150}	b_6	2/896 h	0/626 f
بدون گیاه	P_{150}	b_{mix}	6/563 fgh	1/476 Def
بدون گیاه	P_{50}	b_0	7/733 fgh	0/306 f
بدون گیاه	P_{50}	b_3	6/018 gh	0/231 f
بدون گیاه	P_{50}	b_6	7/355 fgh	0/303 f
بدون گیاه	P_{50}	b_{mix}	8/839 efgh	0/418 f
با گیاه	P_{100}	b_0	17/69 cdefg	2/310 def
با گیاه	P_{100}	b_3	22/764 cd	2/951 cd
با گیاه	P_{100}	b_6	21/882 cde	2/664 de
با گیاه	P_{100}	b_{mix}	20/223 cdef	2/076 def
با گیاه	P_{150}	b_0	47/862 b	4/4946 bc
با گیاه	P_{150}	b_3	46/321 b	7/575 a
با گیاه	P_{150}	b_6	49/911 ab	7/368 a
با گیاه	P_{150}	b_{mix}	50/484 ab	7/784 a
با گیاه	P_{50}	b_0	8/634 efgh	0/480 f
با گیاه	P_{50}	b_3	9/63 defgh	0/623 f
با گیاه	P_{50}	b_6	6/669 fgh	0/414 f
با گیاه	P_{50}	b_{mix}	7/316 fgh	0/406 f

در این جدول حرف P نشانه پایرن و فنانترن می‌باشد.

در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، تفاوت آنها در سطح پنج درصد (روش دانکن) معنی‌دار نیست.

جدول 11- برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در کشت گلدانی

بافت خاک	عمق نمونه Cm	فسفر قابل استفاده (میلیگرم در کیلوگرم)	پتاسیم قابل استفاده (میلیگرم در کیلوگرم)	رس %	سیلت %	شن %	رطوبت اشباع %	هدایت الکتریکی عصاره اشباع (dS/m)	اسیدیته گل اشباع	کربن آلی %	نیتروژن کل %
Sandy loam		3/4	282	10	24	66	23	0/94	7/9	0/4	0/043

(آپریل و سیمز 1990). تأثیر فراریشه ریشه‌ی یونجه بر روی تجزیه‌ی زیستی نفت سیاه در آزمایشگاه و با استفاده از کشت در خاک و کشت هیدروپونیک توسط و چاینایو همکاران (2000) بررسی شد. وجود یونجه، تجزیه زیستی هیدروکربن‌های نفتی را در زمان 20 تا 80 روز افزایش داد. در حضور گیاه حذف هیدرو کربن‌های نفتی 20 درصد سریع‌تر از خاک کشت نشده بود. بعد از 80 روز، تجزیه‌ی هیدروکربن‌ها در خاک کشت شده و خاک بدون گیاه یکسان بود اختلاف معنی‌داری بین خاک کشت شده و خاک بدون گیاه در تجزیه‌ی هیدروکربن‌های نفتی مشاهده نشد. تجزیه‌ی بیشتر هیدروکربن‌های نفتی در حضور ذرت نسبت به شاهد بدون گیاه برای هر دو محیط خاک و کشت هیدروپونیک مشاهده گردید (چاینایو و همکاران 1997). پلات‌های گیاه‌پالایی جهت بررسی روند

تغییرپذیری تجزیه‌ی نفت خام نشست کرده به درون زمین‌های کشاورزی تگزاس مورد استفاده قرار گرفت (ندونوری و همکاران 2000). در طی 21 ماه دوره‌ی آزمایش غلظت کل هیدروکربن‌های نفتی (TPH) برای چچم 42 درصد، برای *St.Augustine* 50 درصد کاهش نشان داد. گیاهان چچم و *St.Augustine* 25 درصد کاهش بیشتری را در میانگین غلظت کل هیدروکربن‌های نفتی (TPH) نسبت به سورگوم و شاهد بدون گیاه نشان دادند (ندونوری و همکاران 2000).

در آزمایشی کاج، بید، مخلوط گراس‌ها و مخلوط لگوم‌ها برای کاهش سوخت دیزل در خاک مورد بررسی قرار گرفت. تیمارها شامل کود شیمیایی NPK، عصاره‌ی کمپوست و محیط کشت میکروبی غنی بود. در صنوبر، هیدروکربن‌های نفتی پس از 14 روز 50 تا 80 درصد و بعد از 4 هفته 80 تا 90 درصد بسته به نوع تیمار کاهش یافتند. در گراس‌ها در 60 روز پس از شروع آزمایش 40 درصد از سوخت دیزل در تمام تیمارها بجز کشت غنی میکروبی (2 درصد کاهش) کاهش یافت، در طی 180 روز، خاک تیمار شده با محیط کشت غنی میکروبی 85 درصد کاهش در حالی که دیگر تیمارها 83 تا 84 درصد کاهش داشتند. در مورد تیمار لگوم‌ها بین 96 تا 99 درصد از سوخت دیزل کاهش یافت که در مورد خاک اصلاح شده (کود شیمیاییNPK، عصاره‌ی کمپوست و محیط کشت غنی میکروبی) کاهش معنی‌دار سوخت دیزل تنها در 30 روز اول بود. برای تیمار شاهد بدون گیاه و بدون اضافه کردن مواد اصلاحی در 150 روز پس از شروع آزمایش تنها 30 درصد سوخت دیزل کاهش یافت. کاهش سوخت دیزل در خاک با حضور گیاه و نه بدلیل اضافه کردن مواد اصلاح کننده تسریع گردید و مؤثرترین روش برای کاهش سوخت دیزل تیمار لگوم‌ها بود (کویی لین و همکاران 2008).

استفاده از گیاهان و میکروارگانیسم‌ها یکی از روش-های مقرون به صرفه و سازگار با محیط زیست، در پاکسازی خاک‌های آلوده به مواد نفتی و عناصر سنگین می‌باشد. لذا با یافتن میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده ترکیبات نفتی، تکثیر و تلقیح آنها به خاک و کشت گیاه در خاک آلوده و متعاقباً فراهم کردن شرایط محیطی برای فعالیت میکروارگانیسم‌ها و رشد گیاهان در خاک، می‌توان خاک‌های آلوده را بدون جابجایی و با صرف هزینه‌های توجیه پذیر اصلاح نمود. براساس نتایج اکثر مطالعات انجام شده، استقرار گیاه در خاک آلوده با تغییر تعداد و ترکیب میکروارگانیسم‌ها در ناحیه ریزوسفر، به تجزیه زیستی آلاینده‌های نفتی کمک می‌نماید. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که الزاما تأثیر گیاه + میکروارگانیسم بیشتر از اثرات جداگانه آنها نیست بلکه این امر به نوع گیاه، نوع آلاینده، خصوصیات میکروارگانیسم‌ها و شرایط آزمایش بستگی دارد.

فهرست منابع:

1. وثوقی، م. و پ، مصلح آبادی، ا. عالم زاده، م، برقابی، د، رشتچیان و ع. م. صنعتی. 1383. مطالعه میزان آلودگی هیدروکربوری سواحل خلیج فارس و امکان تجزیه بیولوژیکی آن. مجله آب و فاضلاب اصفهان.
2. مسلمی، م.، م. وثوقی و ع. پاک. 1384. بررسی تأثیر عوامل محیطی بر راندمان حذف بیولوژیکی آلاینده‌های نفتی از خاک و تعیین شرایط بهینه عملکردی. مجله آب و فاضلاب اصفهان.
3. Aprill, W, and Sims R, C,, 1990. Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. Chemosphere. 20(1-2): 253-256.
4. Blumer, M. (1976). Polycyclic aromatic compounds in nature. Scientific American, 234, 34-45
5. Chaineau C.H, J.L. Morel and J. Oudot, 1997.Phytotoxicity and plant uptake of fuel oil hydrocarbons. J.Envion. Qual. 26: 1478-1483.
6. Chaineau C.H, J.L. Morel and J. Oudot, 2000. Biodegradation of fuel oil hydrocarbons in the rhizosphere of maize, J.Environ, Qual. 29:569-578.
7. Dibble, J.T and R.Bartha, 1979. Rehabilation of oil-inundated agricultural land: acase history. Soil Sciences. 128(1):56-60.
8. Dua, M., Sethunathan, N., and Johri, A. K. 2002. Biotechnology and bioremediation:successes and limitations. Appl. Microbiol. Biotechnol.59:143-152.

9. Elmendorf, D. L., C.E. Haith, G.S. Douglas, R. C. Prince. 1994. Relative rates of biodegradation of substitiuted polycyclic Aromatic hydrocarbon. In: Hinchee, R. E., lesson, A., Semprini, L., Ooong, S. K. (Eds.), Bioremediation of chlorinated and polycyclic Aromatic Hydrocarbon Compounds. Lewis, Boca Raton, FL, pp. 188-202
10. Gibson, D.T., and Sayler, G. S. 1992. Scientific Foundations of bioremediation: Current status and future needs, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
11. Grosser, R. J., D. Warshawsky and J. R Vestal. 1995. Mineralization of polycyclic and N-hetrocyclic aromatic compounds in hydrocarbon contaminated soil. Environmental Ttoxicology Chemistry Vol. 14, pp 375-382.
12. Heitzer, A., and Sayler, G. S. 1993. Monitoring the efficacy of bioremediation.Tibtech 11:334-343.
13. Hornby D, 1990. Root diseases. P.233-258. In: The Rhizosphere. Ed: Lynch, J.M. Wiley & Sons, New York.
14. Ilyina, A., S.M.I. Castillo., S.J.A. Villarreal., E.G. Ramirez & R. Candelas, 2003.Isolation of soil bacteria for bioremediation of hydrocarbon contamination. (Corporation Mrxicana de Investigacion en Materiales S.A. de C.V. (COMIMSA).
15. Kuiper, I., Bloemberg, G. V., and Lugtenberg, B. J. J. 2001. Selection of a plant-bacterium pair as a novel tool for rhizostimulation of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. Mol. Plant-Microbe Interact. 14:1197-1205.
16. Marschener H, 1998. Role of root growth, arbuscular mycorrhiza, and root exudates for the efficiency in nutrient acquisition. Field Crops Research. 56: 203-207.
17. Mirsal Ibrahim, A. 2004. Soil pollution: origin, monitoring and remediation, 1st Ed., Springer, Germany.
18. Moral, J.L. 1999. The role of plants in the remediation of contaminate soils; phytoremediation of soils. In Bioavailability of organic Xenobiotics in the environment, eds Baveye, Ph.,Block , J.-C., and Goncharuk V.V., pp 429-450.
19. Nedunuri, K. V., R.S. Govindaraju., M.K. Banks., A.P. Schwab., and Z. Chen. 2000. Evaluation of phytoremediation for field-scale degradation of petroleum hydrocarbons. J. Environ. Eng. 126:483-490.
20. Qi Lin, Kai-Li Shen, Hong-Mei Zhao, Weng-Hong Li.2008. Growth response of Zea mays L. in pyrene–copper co-contaminated soil and the fate of pollutants. Journal of Hazardous Materials 150.515–521
21. Salanitro, J.P.2001,Bioremediation of petroleum hydrocarbon in soil.Advances in Agronomy.Volum 72,pages :53-105.
22. Saleha, h.(2008) Microbial Metabolism of High Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 80, 723–736.
23. Shimp, J.F., Tracy, J.C., Davis, L.C., Lee, E., Huang, W.,Erickson, L.E., Schnoor, J.L., 1993. Beneficial effects of plants in the remediation of soil and groundwater contaminated with organic pollutants. Critical Reviews in Environmental Science and Technology 23, 41-77.
24. Wang, M.J., Jones, K.C., 1994. Uptake of chlorobenzenes by carrots from spiked and sewage sludge amended soil. Environmental Science and Technology 28, 1260-1267.
25. Wick, L.Y., Remer, R., Wu¨ rz, B., Reichenbach, J., Braun, S., Scha¨fer, F., Harms, H., 2007. Effect of fungal hyphae on the access of bacteria to phenanthrene in soil. Environ. Sci. Technol. 41, 500–505.
26. Wilson S. C. and Jones K. C. (1993) Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocar-bons (PAHs): A review. Environ. Pollution 81, 229-249
27. Xu, Ran, Jeffrey P, Obbard. 2003. Effect of nutrient amendments on indigenous hydrocarbon biodegradation in oil-contaminated beach sediments. Journal of Environmental Quality. Volume 32, Issue 4, Pages 1234-1243. ISSN:0047-2425.