نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۳، شماره ۴، مهر – آبان ۱۳۹۸، ص. ۵۹۰-۵۷۹

Journal of Water and Soil
Vol. 33, No. 4, Sep-Oct. 2019, p. 579-590

بررسی اثرات کاربرد توام گیاه پالایی و زیست پالایی در یک خاک آلوده به نفت خام

اکبر نعمتی[1*]- احمد گلچین[2]- اکبر قویدل[3]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۰۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۱۷

چکیده

استخراج نفت و تولید مشتقات نفتی متنوع باعث گسترش آلودگی در خاک‌های اطراف مکان‌های استخراج و پالایش نفت شده است. بزرگ‌ترین نگرانی در این مورد، خطرات زیست محیطی این آلاینده‌ها می‌باشد. به منظور مطالعه تأثیر گیاه پالایی و زیست پالایی در خاک آلوده به نفت خام یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی و در سه تکرار طراحی و اجرا گردید. فاکتورهای مورد مطالعه شامل سطوح آلودگی خاک با نفت خام شامل صفر (C_0)، ۲ درصد نفت خام (C_1) و ۴ درصد نفت خام (C_2) و تیمارهای پالایشی شامل کاشت گیاه چمن (B_1)، کاشت گیاه یونجه (B_2)، کاشت چمن + تلقیح بذر با باکتری *سودوموناس پیوتیدا* + تلقیح خاک با قارچ *فانروکت کریزوسپوریوم* (B_3)، کاشت یونجه + تلقیح بذر با باکتری *سودوموناس پیوتیدا* + تلقیح خاک با قارچ *فانروکت کریزوسپوریوم* (B_4) و بدون کشت (شاهد) (B_0) بودند. میزان عملکرد ماده خشک گیاهی، میزان حذف نفت خام و تنفس میکروبی برای نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد غلظت ترکیبات نفتی باقیمانده در سطح C_1 آلودگی نفت خام در اثر تیمارهای پالایشی B_3 و B_4 به‌ترتیب ۵۹ و ۵۶/۵ درصد کاهش یافت و در سطح C_2 آلودگی نفت خام نیز این تیمارهای پالایشی بترتیب ۴۱ و ۳۹ درصد غلظت ترکیبات نفتی خاک را کاهش دادند. تیمار پالایشی B_3 دارای بیشترین عملکرد ماده خشک اندام هوایی بود. با افزایش سطح آلودگی نفت خام، عملکرد ماده خشک اندام هوایی و ریشه کاهش یافت. سطوح آلاینده‌های نفتی (C_1 و C_2) به‌ترتیب ۴۶ و ۶۱ درصد عملکرد ماده خشک ریشه، ۵۳ و ۶۳ درصد عملکرد ماده خشک اندام هوایی را کاهش دادند. بیشترین میزان تنفس میکروبی در تیمارهای پالایشی B_3 و B_4 مشاهده گردید. در هر سه سطح آلودگی اختلاف میزان تنفس میکروبی در تیمارهای پالایشی B_1 و B_2 با تیمار شاهد، معنی‌دار نبود.

واژه‌های کلیدی: آلودگی نفتی، زیست پالایی، ترکیبات نفتی باقیمانده، تنفس میکروبی

مقدمه

نفت خام یکی از مهمترین منابع انرژی است که تولید، انتقال، مصرف و دفع آن در مقیاس گسترده، آن را به یکی از مهم‌ترین و رایج‌ترین انواع آلودگی محیط زیست در سراسر جهان تبدیل کرده است. از آنجاکه نفت و مشتقات آن برای استفاده در مناطق مختلف، از محل استخراج و تصفیه به نقاط دیگر حمل و نقل می‌شوند، امکان آلودگی خاک به این ترکیبات وجود دارد (۳۲).

ورود نفت خام به خاک سبب چسبندگی و اتصال ذرات خاک شده و علاوه بر سخت و غیرقابل نفوذ کردن خاک، زهکشی آب و انتشار اکسیژن را با مشکل مواجه می‌سازد. همچنین نفت خام می‌تواند در بافت‌های گیاه نفوذ کرده و وارد فضاهای بین سلولی شود. غشای سلولی نیز به دلیل نفوذ هیدروکربن‌ها آسیب می‌بینند که منجر به نشت محتویات درون سلول می‌شود (۱۰). وجود هیدروکربن‌های نفتی در محیط زیست به‌دلیل سرطان زایی و ایجاد جهش ژنی، خطرناک است. این آلاینده‌ها ممکن است بعد از ورود به خاک وارد زنجیره غذایی شده و سلامت گیاه، حیوان و انسان را با خطر مواجه کنند (۷).

هیدروکربن‌های نفتی، مخلوطی از ترکیبات شیمیایی هستند که همگی از کربن و هیدروژن تشکیل شده‌اند. این ترکیبات یکنواخت از لحاظ شیمیایی، حلالیت کمی در آب داشته و یا غیر قابل حل در آب هستند و نسبت به آب از جرم مخصوص کمتری برخوردارند. علاوه بر کربن و هیدروژن که لازمه تشکیل این ترکیبات هستند، نیتروژن و گوگرد نیز ممکن است در ساختار این ترکیبات وجود داشته باشند (۳). آلودگی خاک با هیدروکربن‌های نفتی سبب از بین رفتن پوشش و تنوع گیاهی و جانوری خاک می‌شود. از طرف دیگر گسترش آلودگی و انتقال آن از طریق شستشو با آب باران موجب آلوده شدن مناطق

۱ و ۲- به‌ترتیب دانشجوی دکتری و استاد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان
(*- نویسنده مسئول: Email: akbar.nemati@znu.ac.ir)
۳- دانشیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی
DOI: 10.22067/jsw.v0i0.76812

کشاورزی و آب‌های زیرزمینی می‌گردد (۱۵).

گیاه‌پالایی روشی نوین و پایدار در رفع آلودگی خاک به شمار می‌رود و به دلیل استفاده از پتانسیل طبیعت برای پاک‌سازی آلودگی ها، به فناوری سبز مشهور است. در این روش به کارگیری گیاهان سبب می‌شود که آلودگی موجود در خاک از بین برود یا به موادی با سمیت کمتر تبدیل شود که ممکن است مستقیما در اثر واکنش آنزیم‌های گیاه یا به دلیل تاثیر غیر مستقیم گیاه بر این مواد باشد (۱۰).

زیست پالایی با بکارگیری میکروارگانیسم‌ها و گیاهان به‌خاطر توانایی مختلف آن‌ها برای سم زدایی یا حذف آلاینده‌ها، یک روش مناسب برای حذف یا تخریب تعداد زیادی از آلاینده‌های زیست محیطی شامل محصولات صنعت نفت می باشد (۲۸). میکروارگانیسم‌ها نقش کلیدی در تبدیل زیستی ترکیبات پیچیده آلاینده‌ها در طول فرآیندهای زیست پالایی خاک ایفا می‌کنند (۸).

مباشر و همکاران (۲۰) گزارش کردند پس از پنج ماه گیاه پالایی، میزان هیدروکربن‌های نفتی بطور معنی‌داری کاهش یافت همچنین متوسط میزان تخریب هیدروکربن‌های نفتی ۳۱/۲ درصد بود. وانگ و همکاران (۳۳) طی مطالعه‌ای پنج ماهه روی گیاه پالایی ترکیبات نفتی توسط گیاه فسیکو پا بلند[1] در خاک‌های آلوده با غلظت ۵۰۰۰ میلی‌گرم نفت خام در هر کیلوگرم خاک، دریافتند که میزان کاهش هیدروکربن‌های نفتی توسط گیاه ۴۰-۳۰ درصد بود.

در آزمایشی توسط سید علیخانی و همکاران (۲۶)، تأثیر پنج تیمار مختلف متشکل از گونه‌های مختلف دو جنس باکتری *باسیلوس* و *سودوموناس* با و بدون کشت گیاه جو بر پالایش هیدروکربن‌های نفتی در خاک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تیمار حاوی *باسیلوس* به همراه کشت جو، هیدروکربن‌های نفتی خاک را ۷۲/۵٪ و در تیمار بدون گیاه ۵۹/۸٪ کاهش داد. نتایج مطالعات آلارکون و همکاران (۴) نیز نشان داد که تیمار حاوی باکتری و قارچ میکوریز با تخریب آلاینده‌های هیدروکربنی به میزان ۵۹ درصد بیشترین بازدهی را داشت.

با توجه به اینکه ایران کشور نفت خیزی به شمار می‌رود و آلودگی خاک‌های مناطق اطراف پالایشگاه‌های نفتی قابل توجه می باشد بنابراین برای پالایش این آلودگی‌ها، از روش‌های زیست پالایی و گیاه پالایی که مشکلات سایر روش‌های پالایشی اعم از تخریب ساختار شیمیایی و فیزیکی خاک و هزینه‌های بالا را ندارند، استفاده می‌گردد. تحقیقات پیشین در این زمینه اغلب بر روی مطالعه تاثیرات جداگانه هر یک از این روش‌ها بوده است و کمتر به تاثیرات ترکیب این روش‌ها توجه شده است. بنابراین هدف از انجام این تحقیق مطالعه تاثیر کاربرد توام روش‌های گیاه پالایی و زیست پالایی بر تجزیه یا کاهش نفت خام بوده است.

مواد و روش‌ها

برای کشت گیاه، یک نمونه خاک غیر آلوده به ترکیبات نفتی از عمق صفر تا ۳۰ سانتی متری یک زمین زراعی تهیه و پس از عبور دادن از الک ۲ میلی متری به لوله‌های P.V.C با طول ۵۰ سانتی متر و قطر ۲۰ سانتی متری منتقل گردید به طوری که وزن خاک هر لوله تقریبا ۲۲ کیلوگرم بود. نتایج اندازه‌گیری برخی خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک مورد مطالعه از جمله pH، هدایت الکتریکی (EC)، درصد ذرات و بافت خاک، میزان مواد آلی و آهک خاک در جدول ۱ آورده شده است (۱۶). فاکتورهای مورد مطالعه شامل تیمارهای پالایشی (B_1): کاشت گیاه چمن *Lolium perenne*، (B_2): کاشت گیاه یونجه *Medicago sativa*، (B_3): کاشت چمن *Lolium perenne*+ تلقیح بذر با باکتری *سودوموناس پیوتیدا*[2] + تلقیح خاک با قارچ *فانروکت کریزوسپوریوم*[3]، (B_4): کاشت یونجه *Medicago sativa* + تلقیح بذر با باکتری *سودوموناس پیوتیدا* + تلقیح خاک با قارچ *فانروکت کریزوسپوریوم* و (B_0): بدون کشت (شاهد) و سطوح غلظت نفت خام شامل: صفر (C_0)، ۲ درصد نفت خام (C_1) و ۴ درصد نفت خام (C_2) بودند. برای آماده‌سازی خاک آلوده، نمونه‌های خاک به طور مصنوعی با نفت خام (از پالایشگاه نفت تبریز) آلوده شدند. بدین صورت که پس از محاسبه وزن ترکیبات نفتی مورد نیاز برای آلوده ساختن خاک که بر اساس سطح آلودگی و وزن خاک ستون‌ها صورت گرفت، با توجه به دانسیته نفت خام ($۰/۹ gr/cm^3$)، حجم مقدار نفت خام مورد نیاز محاسبه و به خاک اضافه گردید. مقدار نفت خام لازم برای آلوده‌سازی خاک هر ستون، ابتدا با ۱۰٪ از وزن خاک ستون مخلوط و سپس این مقدار با بقیه خاک ستون بطور کامل مخلوط گردید. خاک‌های آلوده به نفت خام برای رسیدن به تعادل به مدت یک ماه خوابانیده شدند.

باکتری *سودوموناس پیوتیدا* و قارچ *فانروکت کریزوسپوریوم* مورد استفاده در تحقیق به ترتیب با شماره PTCC ۱۶۹۴ و ۱۵۵۷، از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردیدند. در این مطالعه از محیط کشت PDA[4]، برای رشد قارچ‌ها استفاده گردید. برای تکثیر و دستیابی به حداکثر رشد قارچ فانروکت کریزوسپوریوم، از محیط کشت مایع حاوی افزودنی‌های زیر به ازای یک لیتر استفاده گردید: پنج گرم پپتون (عصاره مخمر به عنوان منبع

1- *Tall Fescue*

2- *Pseudomonas Putida*

3- *Phanerochaete Chrysosporium*

4- Potato Dextro Agar

نیتروژن)، ۱۰ گرم گلوکز (به عنوان منبع کربن)، و مواد معدنی جهت رشد قارچ شامل ۰/۵ گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۱ گرم NH_4Cl، ۰/۵ گرم KH_2PO_4، ۰/۰۵ گرم $FeSO_4.7H_2O$، ۰/۱ گرم $CaCl_2.2H_2O$ و ۲ گرم K_2HPO_4. این محیط کشت به میزان ۱۰۰ میلی لیتر در ارلن‌های ۵۰۰ میلی لیتری ریخته و دهانه ارلن‌ها توسط پنبه و فویل آلومینیومی پوشانده و استریل شدند (۲۷). جهت تلقیح بذر با باکتری در نمونه‌های دارای تلقیح، ۱۰ میلی‌لیتر از کشت خالص باکتری رشد کرده در محیط کشت نوترینت براث[1] که حاوی 10^8 سلول باکتری زنده و فعال بود، استفاده شد. همچنین در عمق سه سانتی‌متری از سطح هر ستون خاک، ۲۰ میلی‌لیتر مایع حاوی اسپورهای قارچ اضافه و سپس بذرها در ستون‌های خاک کاشته شدند.

به منظور کشت، بذر چمن (*Lolium perenne*) و یونجه (*Medicago sativa*) از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردیدند. قبل از تلقیح، بذور به مدت ۳۰ ثانیه با الکل ۹۶ درصد و سپس به مدت ۲ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد ضدعفونی سطحی شده و با آب مقطر استریل ۷ تا ۸ مرتبه شستشو داده شد. بعد از اعمال تیمارها، نمونه‌ها داخل ستون‌های خاک منتقل گردیده و کشت گیاه انجام شد. ستون‌های خاک در شرایط مشابه مزرعه[2] با دمای $^{\circ}C$(۲۸ ± ۱۵) با طول دوره روشنایی ۱۶ ساعت به مدت چهار ماه نگه داشته شدند. در طول دوره آزمایش آبیاری ستون‌های خاک هر دو روز یکبار و به مقدار حدودا ۵۰۰ میلی‌لیتر برای هر ستون و بر اساس تفاوت رطوبت ستون خاک با میزان رطوبت حد ظرفیت مزرعه نمونه‌ها، انجام شد.

پس از اتمام دوره رشد، جهت انجام آزمایش‌های مربوطه، نمونه برداری از خاک اطراف ریشه (خاک ریزوسفری) انجام شد. برای این منظور، گیاهان پس از خروج از ستون‌های خاک به خوبی تکان داده شدند تا خاک غیر ریزوسفری جدا گردد و در نهایت خاک ریزوسفری برای آزمایش نمونه‌برداری شد. سپس جهت تعیین عملکرد ماده خشک گیاهی، ریشه و اندام هوایی گیاهان برداشت شده و در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت در آون قرار داده شدند. میزان عملکرد ماده خشک گیاهی در اندام‌های هوایی و ریشه اندازه‌گیری گردید. برای آنالیز مقدار نفت خام باقیمانده، از هگزان نرمال به عنوان حلال برای استخراج آلاینده نفت خام استفاده گردید. پس از تبخیر هگزان نرمال، مقدار باقیمانده نفت خام بر اساس توزین اندازه‌گیری شد. بدین ترتیب که به ازاء هر ۱۰ گرم خاک برداشت شده از خاک اطراف ریشه، ۵۰ میلی لیتر هگزان نرمال به آن اضافه و به مدت ۲ ساعت با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه هم‌زده و سپس درون لوله‌های سانتریفیوژ ریخته شد. نمونه‌ها درون دستگاه سانتریفیوژ، به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه (rpm)، قرار داده شد. پس از گذشت مدت زمان مذکور، میزان آلاینده نفتی باقیمانده در نمونه‌ها، به روش EPA اندازه‌گیری شد (۳۰).

جهت تعیین میزان تنفس میکروبی در خاک، ۲۵ گرم خاک توزین و در ظروف مخصوص تنفس میکروبی ریخته شد. به هر یک از خاک‌ها تا ۰/۷ ظرفیت مزرعه آب مقطر افزوده شد. به منظور جمع آوری CO_2 تولید شده طی فرآیند تنفس میکروبی ریزجانداران 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 شدند. پس از دوره انکوباسیون به هر یک از نمونه‌ها ۱۰ میلی-لیتر کلرید باریوم ۱۰ درصد و چند قطره معرف فنل فتالئین افزوده و با اسید سولفوریک ۰/۲۵ نرمال تیتر شدند. در نهایت میزان میلی‌گرم کربن تولید شده به صورت CO_2 طی فرآیند تنفس میکروبی بر حسب میزان اسید مصرفی محاسبه شد (۵). تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.2 و برای ترسیم نمودار از نرم‌افزار Excel استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱ درصد صورت گرفت.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس ماده خشک ریشه و اندام هوایی، ترکیبات نفتی باقیمانده و تنفس میکروبی در تیمارهای مختلف نشان داد که اثر تیمارهای پالایشی و سطوح غلظت نفت خام بر روی تمام پارامترهای اندازه‌گیری شده و نیز اثرات متقابل آن‌ها به غیر از ترکیبات نفتی باقیمانده بر بقیه پارامترها معنی‌دار بود (جدول ۲).

وزن ماده خشک گیاهی

مقایسه میانگین وزن ماده خشک ریشه و اندام هوایی در سطوح مختلف غلظت نفت خام (C_0، C_1 و C_2)، بیانگر آن است که تیمارهای پالایشی B_3 و B_4 دارای وزن ماده خشک ریشه بالاتری بوده است. لذا به نظر می‌رسد که تیمارهای B_3 و B_4 از لحاظ استقرار و تولید عملکرد ماده خشک ریشه نسبت به تیمارهای B_1 و B_2 توانایی بالاتری داشتند. همچنین وزن ماده خشک اندام هوایی B_3 نسبت به B_4 و وزن ماده خشک اندام هوایی گیاه B_1 نسبت به B_2 در سطوح غلظت نفت خام بیشتر بود.

۱- محیط کشت نوترینت براث مایع برای کشت میکروارگانیسم‌هایی که به مواد خاصی برای رشد نیاز ندارند توصیه می‌شود. این محیط کشت مایع حاوی عصاره گوشت و پپتون است. مواد محلول در آب از جمله کربوهیدرات‌ها، ویتامین‌ها، ترکیبات نیتروژن آلی و نمک در عصاره گوشت وجود دارد. این محیط مبنای ساخت بیشتر محیط‌های کشت و به دلیل نداشتن آگار مایع می‌باشد.

2- semi field

جدول ۱- برخی خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک مورد استفاده در آزمایش

Table 1- Selected physicochemical properties of the soil used in the experiment

بافت خاک Soil texture	شن Sand	سیلت Silt	رس Clay	مواد آلی Organic matter	رطوبت ظرفیت مزرعه Field capacity	pH	EC	آهک $CaCO_3$
	٪						$dS.m^{-1}$	$g.kg^{-1}$
لوم شنی Sandy loam	65.3	13.1	21.6	0.78	16.5	7.6	2.5	112

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس اثرات ساده و متقابل روش‌های پالایشی و غلظت نفت خام

Table 2- The results of ANOVA showing the effects of experimental treatments

منابع تغییرات Source of variations	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات (mean of squares)			
		ترکیبات نفتی باقیمانده Residual petroleum	تنفس میکروبی Microbial basal respiration	وزن خشک اندام هوایی Dry weight of shoot	وزن خشک ریشه Dry weight of root
تیمارهای پالایشی Remediation treatments	3	14.44^{**}	25.21^{**}	48.13^{**}	8.99^{**}
غلظت نفت خام Crude oil concentration	2	32.28^{**}	67.79^{**}	94.55^{**}	5.84^{**}
تیمارهای پالایشی * نفت خام Remediation treatments*Crude oil	6	3.64^{ns}	8.13^{**}	6.85^{**}	0.92^{*}
خطا Error	24	0.57	0.38	0.72	0.66

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱درصد و ns عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

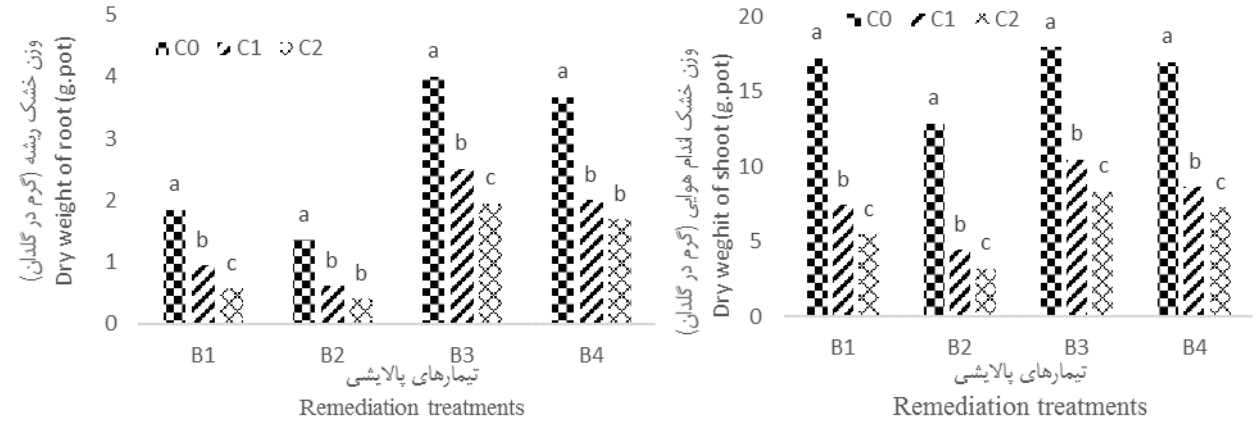
ns: not significant, * $p \leq 0.05$ and ** $p \leq 0.01$

افضل و همکاران (۲) در بررسی گیاه پالایی خاک آلوده به نفت گزارش کردند که گیاه چمن به‌همراه باکتری سودوموناس میزان زیست‌توده گیاهی و تخریب هیدروکربن‌ها را افزایش دادند. کو و همکاران (۱۷) نیز در بررسی گیاه پالایی خاک‌های آلوده به نفت بیان کردند علف وتیور[1] بیشترین میزان زیست‌توده را در سطح ۱۰٪ آلودگی هیدروکربن‌های نفتی، نشان داد.

کمترین میزان وزن ماده خشک ریشه و اندام هوایی برای سطوح مختلف مربوط به بالاترین سطح آلودگی (تیمار C_2) بود. به طوری‌که کاهش ۴۶ و ۶۱ درصدی در تولید ماده خشک ریشه به ترتیب در سطوح C_1 و C_2 غلظت نفت خام نسبت به سطح C_0 دیده شد. وزن ماده خشک اندام هوایی در سطوح غلظت نفت خام C_1 و C_2 به ترتیب ۵۳ و ۶۳ درصد کمتر از خاک غیرآلوده (سطح C_0) بود. همچنین کاهش در تولید زیست‌توده اندام هوایی برای هر دو گیاه چمن و یونجه در سطوح آلودگی C_1 و C_2 نسبت به سطح C_0 نمایان‌گر اثر سمیت نفت خام بر گیاهان مورد مطالعه و لذا کاهش رشد و تولید زیست‌توده گیاهی است. جاقتاپ و همکاران (۱۴) در بررسی گیاه پالایی خاک آلوده به دیزل گزارش کردند زیست‌توده اندام هوایی و ریشه برای اغلب گیاهان مورد مطالعه، کاهش یافت. ایرجی آسیابادی و همکاران (۱۲) گزارش کردند، نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌های وزن خشک اندام هوایی و ریشه سورگوم و جو در خاک آلوده گویای آن بود که وجود هیدروکربن‌های نفتی در خاک موجب کاهش رشد و عملکرد ماده خشک اندام هوایی و ریشه در مقایسه با تیمار شاهد شده است. کاهش حدود ۳۰ و ۲۲ درصدی در عملکرد ماده خشک ریشه و کاهش حدود ۴۲ و ۵۱ درصدی در عملکرد ماده خشک اندام هوایی به ترتیب برای جو و سورگوم در تیمار آلوده نسبت به تیمار شاهد مشاهده شد.

اثر متقابل تیمارهای پالایشی و سطوح آلودگی بر ماده خشک ریشه و اندام هوایی گیاهان مورد مطالعه در شکل ۱ آورده شده است. وجود آلاینده‌های نفتی در خاک در سطوح مختلف سبب کاهش رشد و عملکرد ماده خشک ریشه و اندام هوایی هر دو گیاه شده است که این کاهش در سطح آلودگی C_2 مشهودتر بود (شکل ۱). در سطح آلودگی C_1 تولید ماده خشک ریشه در تیمارهای B_3، B_4، B_2 و B_1 به ترتیب حدود ۳۷، ۴۶، ۵۴ و ۴۹ درصد نسبت به سطح آلودگی C_0، کمتر بود.

1- *Vetiveria zizanioides*



شکل ۱- اثرات تیمارهای پالایشی و غلظت نفت خام بر وزن خشک ریشه و اندام هوایی گیاهان مورد مطالعه

Figure 1- The effects of remediation treatments and crude oil concentration on dry weight of root and shoot of studied plants

فاکتورهای اولیه بازدارنده رشد گیاهان، سمیت ترکیبات هیدروکربنی با وزن مولکولی کم می‌باشند و علت دیگر ویژگی‌های آب گریزی این ترکیبات است که سبب محدود کردن گیاهان برای جذب آب و عناصر غذایی می‌گردد (۲۲ و ۳۵).

در سطح آلودگی C_2 نیز غلظت بالای نفت خام سبب کاهش ۵۱، ۵۴، ۷۰ و ۶۹ درصدی تولید ماده خشک ریشه نسبت به سطح آلودگی C_o به ترتیب برای تیمارهای پالایشی B_3، B_4، B_2 و B_1 شد. به نظر می‌رسد چسبندگی بیش از حد ذرات خاک در اثر علظت بالای نفت خام در سطح آلودگی C_2، سبب ایجاد لایه‌هایی با نفوذپذیری پایین در خاک شده که منجر به مختل شدن حرکت آب و انتشار اکسیژن گردیده و به همین دلیل رشد ریشه و تولید ماده خشک آن کاهش بیشتری نشان داده است. گرهارد و همکاران (۲۰۰۹) با بررسی پتانسیل گیاه پالایی خاک‌های آلوده به آلاینده‌های آلی بیان کردند حضور آلاینده‌های نفتی در خاک سبب چسبندگی و اتصال ذرات خاک شده و علاوه بر سخت و غیرقابل نفوذ کردن خاک، زهکشی آب و انتشار اکسیژن را با مشکل مواجه می‌سازد (۱۰).

رشد و تولید ماده خشک اندام هوایی گیاهان مورد مطالعه در هر دو سطح آلودگی نسبت به خاک بدون آلودگی کاهش معنی‌داری داشت، به طوری‌که ماده خشک اندام هوایی در تیمارهای پالایشی B_3، B_4، B_1، B_2 در سطح آلودگی C_1 نسبت به سطح آلودگی C_o به ترتیب ۴۲، ۴۹، ۵۷ و ۶۵ درصد کاهش یافت (شکل ۱). همچنین در سطح آلودگی C_2 نیز کاهش ۵۴، ۵۷، ۶۸ و ۷۵ درصدی به ترتیب در عملکرد ماده خشک اندام هوایی تیمارهای پالایشی B_3، B_4، B_1، B_2 نسبت به سطح آلودگی C_o دیده شد (شکل ۱).

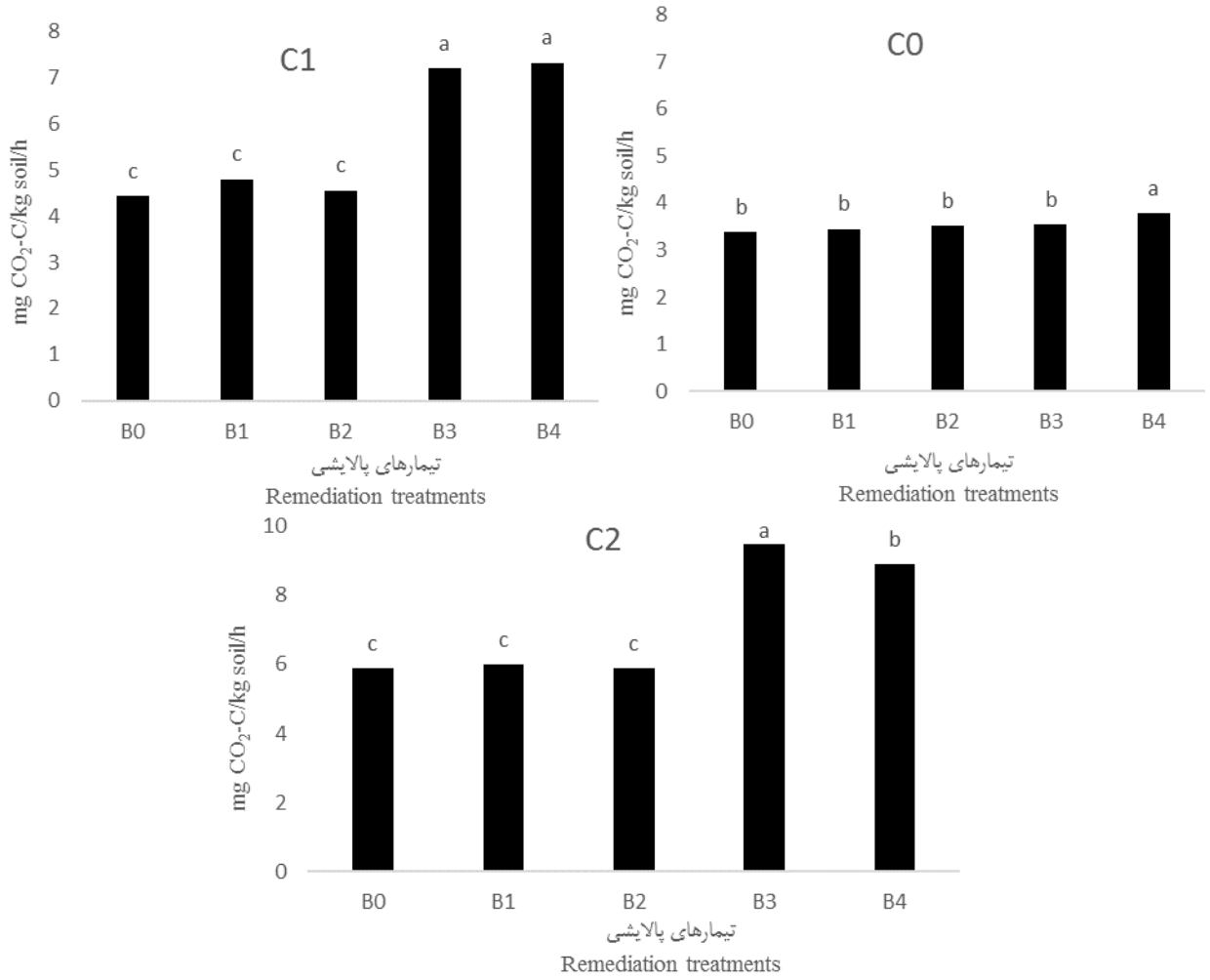
به نظر می‌رسد تأثیر آلاینده‌ها بر قابلیت جذب آب و عناصر غذایی، مانع از رشد مناسب ریشه گردیده و بنابراین منجر به تفاوت در وزن ماده خشک ریشه و اندام هوایی گیاهان مورد مطالعه شده است.

در همین راستا ایسوفی و همکاران (۱۳) به اثرات سمیتی آلاینده‌های نفتی بر ذرت و بروز نارسایی‌هایی نظیر کلروز برگی، چروکیدگی برگ، کاهش رشد و ایجاد نقاط سوختگی بر روی برگ‌ها در طول دوره آزمایش اشاره کردند. ژیائو و همکاران (۳۶) نیز گزارش کردند که کاهش جذب عناصر غذایی نیتروژن و فسفر توسط گیاه در حضور هیدروکربن‌های نفتی خاک سبب کاهش رشد گیاهان مورد مطالعه گردیده است.

تنفس میکروبی

نتایج تجزیه واریانس میزان CO_2 تولید شده طی فرآیند تنفس میکروبی در جدول ۱ آمده است. نتایج نشان می‌دهد که اثر نوع تیمار پالایشی و غلظت نفت خام در خاک در تیمارهای مختلف بر میزان فعالیت ریزجانداران خاک و در نتیجه میزان CO_2 تولید شده طی فرآیند تنفس میکروبی در سطح یک درصد آزمون دانکن معنی‌دار بوده است (جدول ۱).

میزان CO_2 تولید شده طی فرآیند تنفس میکروبی در اثر تیمارهای پالایشی به تفکیک سطوح غلظت نفت خام (C_o، C_1 و C_2) در شکل ۲ نشان داده شده است. در حضور تیمار پالایشی B_4 در سطح C_o غلظت نفت خام، میزان فعالیت و تنفس میکروبی افزایش معنی‌داری (در سطح ۵ درصد آزمون دانکن) یافته و بیشتر از نمونه شاهد بوده است. این در حالیست که سایر تیمارهای پالایشی تأثیر معنی‌داری بر تنفس میکروبی نداشتند. در سطح C_1، بیشترین میزان فعالیت میکروبی در تیمارهای پالایشی B_3 و B_4 دیده شد، به طوری‌که در ریزوسفر این تیمارهای پالایشی، تنفس میکروبی به طور معنی‌داری بیش‌تر از سایر تیمارهای پالایشی بود. همچنین در این سطح غلظت نفت خام میزان کربن تولید شده به صورت CO_2 در تیمار پالایشی B_1 بیشتر از نمونه شاهد بود. اما اختلاف معنی‌داری بین میزان فعالیت میکروبی در ریزوسفر B_1 و B_2 و شاهد مشاهده نشد (شکل ۲).



شکل ۲- اثرات تیمارهای پالایشی و غلظت نفت خام بر میزان دی اکسید کربن تولید شده طی فرآیند تنفس میکروبی

Figure 2- The effects of remediation treatments and crude oil concentration on produced CO_2 in microbial basal respiration

در سطح C_2 غلظت نفت خام، بیشترین میزان تنفس میکروبی در تیمار پالایشی B_3 حاصل شد. این در حالیست که در این سطح آلودگی اختلاف معنی‌داری از لحاظ میزان CO_2 طی فرآیند تنفس میکروبی در حضور تیمارهای B_1 و B_2 با تیمار شاهد وجود نداشت (شکل ۲). تیمار پالایشی B_4 همانند B_3 باعث افزایش فعالیت میکروبی شد ولیکن میزان CO_2 تولید شده ناشی از فعالیت میکروبی در ریزوسفر این گیاه ۵ درصد کمتر از ریزوسفر B_3 بود (شکل ۲). به نظر می‌رسد که تیمار پالایشی B_3 به سبب استقرار مناسب‌تر و تولید زیست‌توده ریشه و اندام هوایی بیشتر در این سطح (شکل ۱)، اثر بیشتری بر فعالیت میکروبی در خاک داشته است. از طرف دیگر در سطح غلظت نفت خام بالاتر (C_2) که غلظت آلاینده‌های نفتی در خاک و لذا سوبسترای لازم برای فعالیت ریزجانداران خاک بالاتر بوده است، میزان کربن تولیدی به صورت CO2 ناشی از فعالیت آنها نیز بیشتر شده است (شکل ۲). در تحقیقی ایرجی آسیابادی و همکاران (۱۲) بیان کردند میزان کربن تولیدی به صورت CO_2 ناشی از تنفس میکروبی در خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی نسبت به خاک شاهد (بدون آلودگی) بطور معنی‌داری افزایش یافت. پولیاک و همکاران (۲۳) در بررسی تاثیر روش‌های مختلف پالایشی بر فعالیت های بیولوژیکی خاک آلوده به نفت بیان کردند بیشترین میزان تنفس پایه، یک هفته پس از شروع آزمایش مشاهده شد. زمانی که غلظت هیدروکربن‌ها در بیشترین میزان قرار داشت. آنها بیان کردند که غلظت بالای هیدروکربن ها باعث تحریک فعالیت بالای میکروبی می‌گردد.

همچنین اثر متقابل پوشش گیاهی و فعالیت میکروبی در تخریب آلاینده‌های نفتی در بسیاری از پژوهش‌های دیگر گزارش شده است. در این مطالعات به همبستگی مثبت بین زیست‌توده ریشه و فعالیت میکروبی و تخریب هیدروکربن‌های نفتی اشاره کرده و همچنین بیان کردند اثرات سینرژیستی گیاهان و باکتری‌های تلقیح شده بر تخریب

هیدروکربن‌ها سبب تاثیرات موثرتری نسبت به کاربرد جداگانه پالایش میکروبی و گیاه پالایی می‌گردد (۲ و ۱۱). لایست و فلنگترو (۱۸) نیز بیان نمودند به این دلیل گیاهان جهت افزایش امکان تخریب و پالایش ترکیبات آلاینده آلی در خاک پیشنهاد می‌گردند که جمعیت و فعالیت میکروبی در ریزوسفر آنها بسیار بیشتر از خاک بدون گیاه است.

گیاه پالایی نفت خام

نتایج نشان داد کاربرد تیمارهای پالایشی نقش مؤثری بر تجزیه و تخریب آلاینده‌های نفتی در خاک دارا می باشد. در این راستا، تیمارهای پالایشی و غلظت‌های نفت خام دارای اثری معنی‌دار در سطح آماری یک درصد بر میزان کاهش غلظت TPHs[1] طی فرآیند گیاه پالایی و زیست پالایی، بودند (جدول ۱). به طوری‌که اختلافی معنی‌دار در اثر تخریب و کاهش غلظت TPHs بین تیمار شاهد (B_0) و سایر تیمارهای پالایشی دیده شد. اما در سطوح غلظت نفت خام، توانایی دو تیمار پالایشی B_3 و B_4 در پالایش آلاینده‌های نفتی موجود مشابه بود و اختلاف معنی‌داری بین اثر حضور این دو تیمار بر تجزیه و تخریب TPHs در سطوح مختلف آلودگی دیده نشد (شکل ۳).

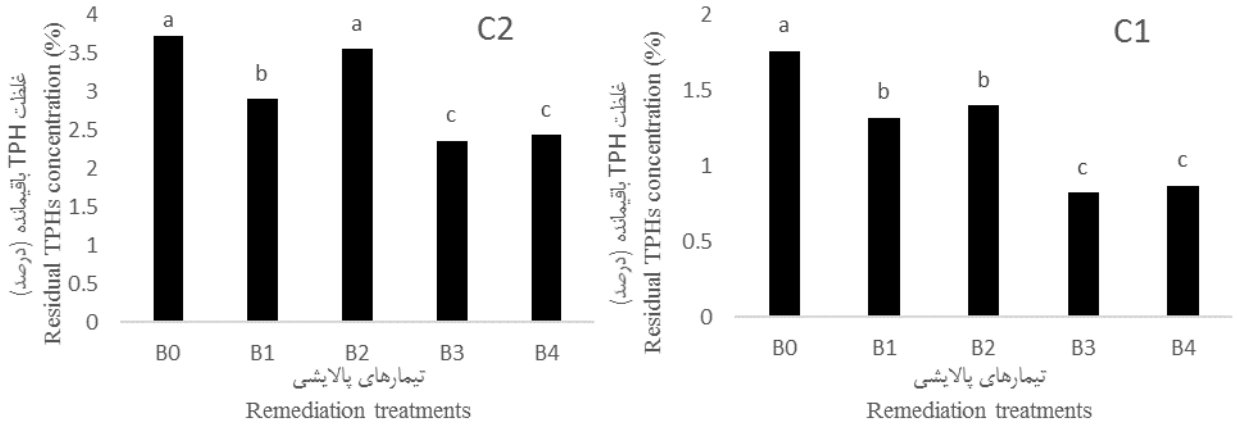
ژیائو و همکاران (۳۶) در بررسی گیاه پالایی ترکیبات PAHs توسط گونه‌های گیاهان زینتی گزارش کردند گیاهان نخل زینتی[2] و یونجه[3] توانستند در یک آزمایش ۱۵۰ روزه، بترتیب ۹۹/۴ ٪ و ۹۸/۱۱٪ ترکیبات PAHs را حذف کنند. عابدی کوپایی و همکاران (۱) در مطالعه‌ای از گیاه ری‌گراس[4] به‌منظور بررسی روند زوال درصد ترکیبات نفتی استفاده نمودند، نتایج آزمایش‌های گیاه پالایی نشان داد گیاه لولیم در طی ۱۷ هفته میزان ترکیبات نفتی را ۶۵ درصد کاهش داد. در واقع فرایندها و مکانیسم‌های مختلفی در ناحیه اطراف ریشه گیاهان اتفاق می‌افتد که باعث می‌شوند ریشه‌ها محیط ایده‌آلی برای تخریب هیدروکربن‌های نفتی فراهم کنند. همچنین رشد و توسعه ریشه‌ها به خاک‌های عمیق‌تر باعث افزایش تبادل آب و هوای خاک شده که منجر به بهبود ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و بیولوژیکی خاک می‌گردد (۱۷، ۳۴). ریشه‌ها بوسیله کاهش سطح و حجم میکروپورهای خاک سبب افزایش دسترسی زیستی هیدروکربن‌های نفتی می‌گردند. همچنین آزاد سازی ترکیبات آلی مانند آمینواسیدها، قندها، آنزیم‌ها، اسیدهای آلی و کربوهیدرات‌ها از ریشه‌ها سبب افزایش جمعیت و فعالیت میکروب‌ها می‌گردند (۳۱). بطور مثال گزارش شده است که فعالیت‌های گیاهان چمن و یونجه، جمعیت و توان باکتری‌های تخریب کننده هیدروکربن‌های نفتی مانند *میکروباکتر* و *سودوموناس* را بطور معنی‌داری افزایش دادند (۲۴ و ۲۹).

بررسی نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف پالایشی بر کاهش غلظت نفت خام در خاک در هر یک از سطوح غلظت نفت خام C_1 و C_2 به صورت جداگانه بیانگر پالایش بیشتر این آلاینده‌ها در سطح آلودگی پایین‌تر (C_1) است (شکل ۳). در سطح آلودگی پایینتر که استقرار و رشد و توسعه گیاه بیشتر بوده است (شکل ۱)، فرآیندهای پالایشی نیز نقش مؤثرتری در پالایش نفت خام داشته‌اند. به این علت که غلظت بالای آلاینده‌های نفتی در خاک می‌تواند سبب بروز سمیت برای گیاه و ریزجانداران شده و نهایتاً موجب مرگ و نابودی آنها شود. ژانگ و همکاران (۳۸) گزارش کردند در بسیاری از خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی جمعیت‌های میکروبی کاهش یافتند که در اثر سمیت هیدروکربن‌های نفتی بود. بنابراین در خاک‌هایی با غلظت بالای هیدروکربن‌های نفتی کارایی فرآیندهای پالایشی کاهش می‌یابد. همچنین غلظت بالای این آلاینده‌ها در خاک سبب کاهش سرعت رشد و استقرار پوشش گیاهی و فعالیت ریزجانداران خاک شده و نهایتاً تجزیه و تخریب این آلاینده‌ها در خاک کاهش می‌یابد.

شکل ۳ نمایان‌گر مقایسه میانگین تاثیر تیمارهای پالایشی مختلف با تیمار شاهد (بدون گیاه) و غلظت ترکیبات نفتی باقیمانده در سطوح C_1 و C_2 است. با توجه به این شکل مشخص است که تیمارهای پالایشی B_3 و B_4 نقش مؤثرتری بر کاهش غلظت آلاینده های نفتی در خاک داشتند اگرچه تفاوت معنی‌داری بین اثر حضور دو تیمار مشاهده نشد.

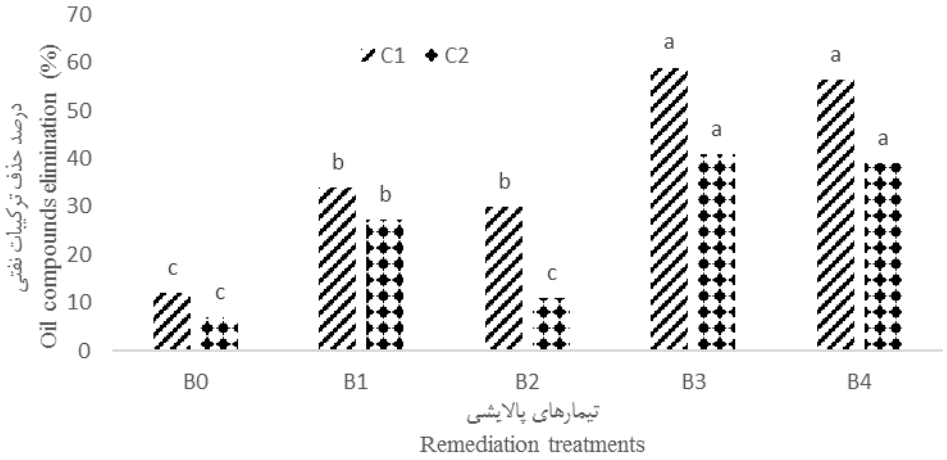
برای سطح C_2 نفت خام نیز نتایجی مشابه با سطح C_1 حاصل شد. اگرچه بین تیمارهای پالایشی B_3 و B_4 اختلاف معنی‌داری در کاهش غلظت نفت خام در خاک در تیمار C_2 مشاهده نشد ولیکن تیمار پالایشی B_3 نقش مؤثرتری در پالایش این دسته از آلاینده‌های زیست محیطی داشته است (شکل ۳). در مطالعات متعددی از چمن به عنوان گیاه پالاینده برای پالایش هیدروکربن های‌نفتی استفاده شده است که بدلیل توانایی‌های گیاه چمن از جمله: سیستم ریشه‌ای گسترده، توان تحمل بالای هیدروکربن‌ها، سطح ریشه بزرگ و قدرت بالای نفوذ ریشه‌ای در خاک می‌باشد (۲، ۹ و ۳۷). همچنین گیاه چمن بدون اضافه کردن عنصر تغذیه‌ای مکمل نیز توانایی حذف هیدروکربن‌ها را دارا می‌باشد (۹). بنابراین بر اساس نتایج بدست آمده به نظر می‌رسد که نوع گیاه و غلظت آلاینده‌های نفتی در خاک و حضور و فعالیت ریزجانداران و همچنین قابلیت رشد و نمو و تولید زیست‌توده ریشه گیاهان مورد مطالعه در تجزیه و تخریب آلاینده‌های نفتی در خاک نقش مهمی را ایفا می‌کنند.

1- Total Petroleum Hydrocarbons
2- *Phoenix*
3- *Medicago sativa* Linn
4- *Ryegrass*



شکل ۳- اثرات تیمارهای پالایشی و نفت خام بر میزان ترکیبات نفتی باقیمانده

Figure 3- The effects of remediation treatments and crude oil concentration on residual TPHs



شکل ٤- مقایسه میزان حذف ترکیبات نفتی در اثر تیمارهای پالایشی و غلظت نفت خام

Figure 4- Compare of oil compounds elimination under effects of remediation treatments and crude oil concentration

بررسی درصد حذف ترکیبات نفتی نمایان‌گر نقش مؤثرتر دو تیمارهای پالایشی B_3 و B_4 نسبت به بقیه تیمارها در پالایش آلاینده های نفتی موجود در خاک است (شکل ۴). به شکلی که در سطح C_1 غلظت نفت خام، حضور تیمارهای پالایشی B_3 و B_4 به ترتیب سبب کاهش ۵۹ و ۵۷ درصدی غلظت نفت خام نسبت به غلظت اولیه این ترکیبات در شروع دوره آزمایش شد. این درحالیست که در سطح C_1 غلظت نفت خام، کمترین درصد حذف غلظت ترکیبات نفتی بعد از تیمار شاهد B_0 در حضور تیمار پالایشی B_2 مشاهده شد که البته دارای تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد بود (شکل ۴).

در سطح C_2 غلظت نفت خام نیز، تیمارهای پالایشی B_3 و B_4 در پالایش این دسته از آلاینده‌های نفتی، نقش مؤثرتری داشتند و کاهش حدود ۴۱ و ۳۹ درصدی در غلظت نفت خام به ترتیب در حضور B_3 و B_4 دیده شد (شکل ۴). به نظر می‌رسد که این تیمارهای پالایشی به سبب حضور جمعیت میکروبی و فعالیت میکروبی باعث افزایش تجزیه و تخریب این دسته از آلاینده‌ها در محیط ریزوسفر خود شده‌اند. در آزمایشی، افزودن میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده ترکیبات نفتی میزان تجزیه را در مقایسه با تیمار کشت گیاه افزایش داد. بیشترین مقدار تجزیه به میزان ۸۵ درصد در تیمار حاوی قارچ میکوریزا و باکتری‌های تجزیه کننده در سطح آلودگی دو درصد مشاهده شد. (۲۵). کاوی و همکاران (۶) در بررسی گیاه پالایی چمن و فسیکو پایه بلند به همراه باکتری‌های محرک رشد گیاه از جمله سودوموناس پیوتیدا گزارش کردند حضور این باکتری‌ها تخریب هیدروکربن‌ها را بهبود بخشیده و ۸۰٪ ترکیبات هیدروکربنی نفتی را کاهش داد. از سوی دیگر در حضور این دو تیمار پالایشی (B_3 و B_4)، تنفس میکروبی نسبت به تیمار شاهد (بدون گیاه) افزایش معنی‌داری یافت که خود می‌تواند عاملی مهم در کاهش بیشتر غلظت آلاینده

های نفتی در حضور این دو تیمار باشد (شکل ۲). چراکه جمعیت میکروبی بالاتر در حضور پوشش گیاهی عامل اصلی تجزیه و تخریب بیشتر و سریع‌تر ترکیبات هیدروکربنه نسبت به نمونه شاهد بود.

حضور تیمار پالایشی B_2 در غلظت بالاتر نفت خام (C_2) نقش مؤثری بر پالایش آلودگی نفت خام، نداشت و اختلاف معنی‌داری بین اثر حضور این تیمار پالایشی و تیمار شاهد بر حذف ترکیبات نفتی در خاک دیده نشد (شکل ۴). به نظر می‌رسد که این تیمار پالایشی (B_2) به سبب عملکرد ماده خشک گیاهی پایین (شکل ۱) و نبودن فعالیت میکروبی، بر تجزیه و تخریب آلاینده‌های نفتی در خاک تاثیر زیادی نداشته است. بررسی نتایج تنفس میکروبی نیز گویای اهمیت پایین این گیاه در افزایش فعالیت میکروبی به ویژه در سطح C_2 غلظت نفت خام است (شکل ۲). در همین ارتباط مرکل و همکاران (۱۹) نیز بیان کردند که کاهش عملکرد ماده خشک گیاه به ویژه ریشه، مستقیماً بر روی خصوصیات ریزوسفر گیاه به ویژه تحریک ریزجانداران خاک اثر گذاشته و سبب کاهش فعالیت ریزجانداران تجزیه کننده نفت در خاک می‌شود.

نتیجه‌گیری

سطوح آلودگی خاک با نفت خام، موجب کاهش رشد و عملکرد ماده خشک اندام هوایی و ریشه همه سطوح مورد مطالعه در مقایسه با سطح شاهد (C_0) شد و این کاهش رشد و عملکرد در سطح آلودگی بالاتر (تیمار C_2) مشهودتر بود که بیانگر سمیت ترکیبات نفتی و حضور نفت خام در خاک برای گیاهان و میکروارگانیسم های بکار رفته، بود.

میزان حذف غلظت نفت خام و وزن خشک اندام هوایی و ریشه و همچنین تنفس میکروبی در تیمارهای پالایشی B_3 و B_4 که شامل ترکیب حضور گیاه و باکتری و قارچ بود، بیشتر از سایر تیمارهای پالایشی بود. این در حالیست که تیمارهای پالایشی B_1 و B_2 حاوی همان گیاهان تیمارهای B_3 و B_4 ولی بدون حضور باکتری و قارچ بودند. بنابراین می‌توان به اهمیت حضور میکروارگانیسم‌ها و فعالیت میکروبی در کنار گیاهان برای تخریب و حذف ترکیبات هیدروکربنی نفتی پی برد.

بطور کلی می‌توان گفت اثرات کاربرد توام گیاه پالایی و زیست پالایی بر تخریب و حذف ترکیبات نفت خام خاک بیشتر از کاربرد جداگانه هر یک از این روش‌ها می‌باشد. همچنین با توجه به نتایج به دست آمده، استفاده همزمان از تلقیح میکروبی به همراه گیاه پالایی بویژه گیاه چمن برای پالایش آلودگی‌های ناشی از ترکیبات نفتی توصیه می‌گردد.

منابع

1- Abedi Koupai J., Ghaheri E., Eslamian S.S., and Hosseini H. 2013. Investigation the kinetic models of biological removal of petroleum contaminated soil around oil pipeline using ryegrass. Journal of Water and Wastewater 25(89): 62-68. (In Persian)

2- Afzal M., Yousaf S., Reichenauer T.G., and Sessitsch A. 2012. The inoculation method affects colonization and performance of bacterial inoculant strains in the phytoremediation of soil contaminated with diesel oil. International Journal of Phytoremediation 14: 35– 47.

3- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 1990. Public Health Statement, *Creosote.* (Accessed, May, 1999)

4- Alarcon A., Davies F.T., Autenneth R.L., and Zuberer D.A. 2008. Arbuscular mycorrhiza and petroleum-degrading microorganisms enhance phytoremediation of petroleum-contaminated soil. International Journal of Phytoremediation 10: 251-263.

5- Alef K., and Nannipieri P. 2003. Methods in applied soil microbiology and biochemistry. Harcourt brace & company.

6- Cowie B.R., Greenberg B.M., and Slater G.F. 2010. Determination of microbial carbon sources and cycling during remediation of petroleum hydrocarbon impacted soil using natural abundance 14C analysis of PLFA. Environmental Science of Technology 44: 2322–2327.

7- Cupers C., Pancras T., Grotenhuis T., and Rulkens W. 2002. The estimation of PAH bioavailability in contaminated sediments using hydroxypropyl-B-cylodextrin and triton x-100 extraction techniques. Chemosphere 46: 1235-45.

8- Gadd G.M. 2010. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. Microbiology 156: 609–643.

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

10- Gerhardt K.E., Huanga X.D., Glicka B.R., and Greenberg B.M. 2009. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. Plant Science 176: 20-30.

11- Gurska J., Wang W., Gerhardt K.E., Khalid A.M., Isherwood D.M., Huang X.D., Glick B.R., and Greenberg B.M. 2009. Three-year field test of a plant growth promoting rhizobacteria enhanced phytoremediation system at a land farm for treatment of hydrocarbon waste. Environmental Science of Technology 43: 4472–4479.

12- Iraji Asibadi F., Mir Bagheri A., and Soliemani M. 2015. Phytoremediation of soil contaminated with oil hydrocarbons in around of Esfahan refinery. Water and Waste Water 3: 38-47. (In Persian)

13- Issoufi I., Rhykerd R.L., and Smiciklas K.D. 2006. Seedling growth of gronomic crops in crude oil contaminated soil. Agronomy and Crop Science 192: 310.
14- Jagtap S.S., Woo S.M., Kim T.S., Dhiman S.S., Kim D., and Lee J.K. 2014. Phytoremediation of diesel-contaminated soil and saccharification of the resulting biomass. Fuel 116: 292–298.
15- Joner E.J., Leyval C., and Colpaert J.V. 2006. Ectomycorrhizas impede phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) both within and beyond the rhizosphere. Environmental Pollution 142: 34-38.
16- Jones, J.B.J. 2001. Laboratory guide for conducting soil tests and plant analysis. Boca raton, London, New York and Washington, D.C. CRC press. P. 152-153.
17- Kuo H.C., Juang D.F., Yang L., Kuo W.C., and Wu Y.M. 2014. Phytoremediation of soil contaminated by heavy oil with plants colonized by mycorrhizal fungi. International Journal of Environmental Science Technology 11: 1661–1668.
18- Liste H.H., and Felgentreu D. 2005. Crop growth culturable bacteria and degradation of petrol hydrocarbons (PHCs) in a long term contaminated field soil. Applied Soil Technology, 31: 43-52.
19- Merkl N., Kraft R.S., and Infant C. 2004. Phytoremediation of petroleum- contaminated soils in the tropics – Preliminary assessment of the potential of species from eastern Venezuela. Journal of Applied Botany and Food Quality 78(3): 185–192.
20- Moubasher H.A., Hegazi A.K., Mohamed N.H., Mostafa Y.M., Kabiel H.F., and Hamed A.A. 2015. Phytoremediation of soil polluted with crude petroleum oil using Bassia scoparia and its rhizosphere microorganisms. International Biodeterioration and Biodegradation 98: 113–120.
21- Muratova A.Y., Golubev S.N., Dubrovskaya E.V., Pozdnyakova N.N., Panchenko L.V., Pleshakova E.V., Chernyshova M.P., and Turkovskaya O.V. 2012. Remediating abilities of different plant species grown in diesel-fuel-contaminated leached chernozem. Applied Soil Ecology 56: 51–57.
22- 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.
23- Polyak Y.M., Bakina L.G., Chugunova M.V., Mayachkina N.V., Gerasimov A.O., and Bure V M. 2018. Effect of remediation strategies on biological activity of oil-contaminated soil- A field study. International Biodeterioration and Biodegradation 126: 57–68.
24- Rezek J., Wiesche C., Mackova M., Zadrazil F., and Macek T. 2008. The effect of ryegrass (*Lolium perenne*) on decrease of PAH content in long term contaminated soil. Chemosphere 70: 1603–1608.
25- Sarvi Moghanlo V., Chorom M., Falah M., and Motamedy H. 2012. Evaluation the effect of myccorhiza and degrading 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)
26- Seyedalikhani S., Shorafa M., and Asgharzadeh A. 2010. Efficiency of *bacillus* bacteria in bioremediation of hydrocarbon contaminated soil. Journal of Water and Soil Science 3(21): 91-101. (In Persian with English abstract)
27- Sharari M., Roohani M., Jahan Latibari A., Guillet A., Aurousseauc M., and Sharari M. 2013. Treatment of Bagasse preparation effluent by *phanerochaete chrysosporium* immobilized on polyurethane foam: Enzyme production versus pollution. Industrial Crops and Products 46: 226–233
28- Singh A., Kuhad R., and Ward O. 2009. Advances in Applied Bioremediation. Springer Verlag, Berlin.
29- Sorkhoh N.A., Ali N., Salamah S., Eliyas M., Khanafer M., and Radwan S.S. 2010. Enrichment of rhizospheres of crop plants raised in oily sand with hydrocarbonutilizing bacteria capable of hydrocarbon consumption in nitrogen free media. International Biodeterioration and Biodegradation 64: 659–664.
30- U.S. EPA. 2001. Guideline for the bioremediation of marine shorelines and fresh water wetland. Office of research and development, US Environmental Protection Agency.
31- Van Hecke M.M., Treonis A.M., and Kaufman J.R. 2005. How does the fungal endophyte Neotyphodium coenophialum affect tall fescue (*Festuca arundinacea*) rhizodeposition and soil microorganisms? Plant Soil 275: 101–109.
32- Wang H., Xu R., Li F., Qiao J., and Zhang B. 2010. Efficient degradation of lube oil by a mixed bacterial consortium. Journal of Environmental Sciences 22: 381–388.
33- Wang J., Zhang Z., Su Y., He W., He F., and Song H. 2008. Phytoremediation of petroleum polluted soil. Petroleum Science 5(2): 167-71.
34- Wang Z., Xu Y., Zhao J., Li F., Gao D., and Xing B. 2011. Remediation of petroleum contaminated soils through composting and rhizosphere degradation. Journal of Hazardous Materials,190: 677–685.
35- Wyszkowski M., and Ziólkowska A. 2009. Role of compost, bentonite and calcium oxide in restricting the effect of soil contamination with petrol and diesel oil on plants. Chemosphere 74: 860–865.
36- Xiao N., Liu R., Jin C., and Dai Y. 2015. Efficiency of five ornamental plant species in the phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. Ecological Engineering 75: 384–391.
37- Yousaf S., Afzal M., Reichenauer T.G., Brady C.L., and Sessitsch A. 2011. Hydrocarbon degradation, plant colonization and gene expression of alkane degradation genes by endophytic Enterobacter ludwigii strains. Environmental Pollution 159: 2675–2683.

38- Zhang Z., Rengel Z., Chang H., Meney K., Pantelic L., and Tomanovic R. 2012. Phytoremediation potential of *Juncus subsecundus* in soils contaminated with cadmium and polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs). Geoderma 175–176: 1–8.

Journal of Water and Soil
Vol. 33, No. 4, Sep-Oct. 2019, p. 579-590

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۳، شماره ۴، مهر – آبان ۱۳۹۸، ص. ۵۹۰-۵۷۹

Evaluating the Effects of Co-using Phytoremediation and Bioremediation in a Crude Oil Contaminated Soil

A. Nemati[1]*- A. Golchin[2]- A. Ghavidel[3]

Received: 22-12-2018
Accepted: 05-09-2019

Introduction: Crude oil is one of the most important sources of energy and its large scale production, transmission, consumption and disposal, making it one of the most important and common types of environmental pollution worldwide. Oil extraction and various oil products have led to spread of pollution in the soils around oil extraction and refining sites. During the production and transportation of crude oil, unsuitable operation and leakage may result in contamination of soil with petroleum hydrocarbons. Great concern in this case is the environmental risks of these pollutants. During the past decades, bioremediation of petroleum contaminated soil has been a hot issue in environmental research, and many bioremediation strategies have been developed and improved to clean up petroleum polluted soil. The aim of this study was to compare the effects of co-using of different bioremediation strategies on remediation of crude oil contaminated soil.

Materials and Methods: In order to investigate the effects of co-using phytoremediation and bioremediation in a crude oil contaminated soil, a factorial experiment in completely randomized design with three replications was conducted. The factors were three levels of crude oil contamination (0 wt% (C_0), 2 wt% (C_1) and 4 wt% (C_2)) and four treatments of remediation (Grass (B_1), Alfalfa (B_2), Grass + *Pseudomonas Putida+ Phanerochaete Chrysosporium* (B_3), Alfalfa + *Pseudomonas Putida+ Phanerochaete Chrysosporium* (B_4), control (B_0)). For amendment of contaminated soil, soil samples were artificially contaminated with crude oil (from Tabriz Oil Refinery) and blended to soil (10% total quantity of soil spiked) then spiked soils were progressively mixed with unpolluted soil and homogenized. After preparation of the crude oil-spiked soil microbial inoculation were done and then the samples were packed into soil columns and then plants cultivation was done in soil columns (P.V.C pipes). At the end of growth period, some parameters were measured including residual Total Petroleum Hydrocarbons (TPHs) concentration, microbial basal respiration and dry weight of root and shoot.

Results and Discussion: The results showed that TPHs concentration in C_1 crude oil level by B_3 and B_4 remediation treatments decreased by 59% and 57%, respectively, and in C_2 level B_3 and B_4 remediation treatments decreased TPHs content by 41% and 39%, respectively. B_3 remediation treatment had the highest shoot and root dry weight and the lowest root and shoot dry weight observed from B_2 remediation treatment. Shoot and root dry weight decreased with increasing crude oil contamination levels. The highest basal respiration rate was observed in B_3 and B_4 remediation treatments. In all of crude oil levels, there was not significant difference between B_1 and B_2 remediation treatments and control (B_0) in basal respiration rate. In the highest crude oil contamination level (C_2) the amount of carbon produced as CO_2 increased because this level has higher concentration of oil pollutants and therefore has more required substrate for the activity of microorganisms, and consequently more microbial activities increased CO_2 production. Compared to the control, the levels of crude oil contamination (C_1 and C_2) decreased dry weight of root by 46% and 61%, respectively and dry weight of shoot by 53% and 63%, respectively. Considering that the high concentrations of oil contaminants in the soil can lead to toxicity for plants and microorganisms and also hydrophilic properties of these compounds can decrease the availability of moisture and nutrients for plants root, therefore the growth of root decreased in oil contaminated soil. In lower level of crude contamination (C_1), remediation treatments have more effective role in refining crude oil. This results from more plant growth and then more plant roots which increase the bioavailability of hydrocarbons by reducing the volume of soil micro pores. Also plants root release organic compounds which would increase the population and activity of soil microbes and these cause to increase of oil compounds degradation and elimination.

Conclusion: Experimental results showed that remediation treatments which contained bacteria and fungi with plants caused to more oil compounds elimination, microbial basal respiration and dry weight of root and shoot. Therefore, it can be found the importance of the presence of microorganisms and the microbial activity with plants in order to degrade and remove the soil oil compounds.

Keywords: Bioremediation, Oil pollution, Residual oil compounds, Microbial basal respiration

1 and 2- Ph.D. Student and Professor of Soil Science Department, University of Zanjan
(*- Corresponding Author Email: akbar.nemati@znu.ac.ir)
3- Associate Professor of Soil Science Department, University of Mohaghegh Ardabili