

بسم الله الرحمن الرحيم



دانشکده کشاورزی

گروه آب و خاک

بررسی تغییرات تجزیه آلودگی نفتی خاک توسط سیستم‌های زیست پالایی

مریم خسروی نوده

اساتید راهنما :

دکتر علی عباسپور

دکتر سیده سهیلا ابراهیمی

استاد مشاور:

دکتر حمیدرضا اصغری

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

بهمن ۱۳۹۱

شماره: ۰۰۴۴۴

تاریخ: ۱۳۹۱/۱۲/۹

ویرایش:

بسمه تعالی



دانشگاه صنعتی شاهرود

دپارتمان تحصیلات تکمیلی

فرم شماره (۶)

فرم صورتجلسه دفاع از پایان نامه تحصیلی دوره کارشناسی ارشد

با تأییدات خداوند متعال و با استعانت از حضرت ولی عصر (عج) ارزیابی جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم مریم خسروی نوده رشته کشاورزی گرایش علوم خاک تحت عنوان: "بررسی تغییرات تجزیه آلودگی نفتی خاک توسط سیستم های زیست پالایی" که در تاریخ ۱۳۹۱/۱۱/۹ با حضور هیأت محترم داوران در دانشگاه صنعتی شاهرود برگزار گردید به شرح ذیل اعلام می گردد:

☐ قبول (با درجه: عالی - امتیاز ۲۰)	☐ دفاع مجدد	☐ مردود
---	------------------------------------	--------------------------------

۱- عالی (۲۰ - ۱۹)

۲- بسیار خوب (۱۸ - ۱۸/۹۹)

۳- خوب (۱۷ - ۱۷/۹۹)

۴- قابل قبول (۱۵ - ۱۴/۹۹)

۵- نمره کمتر از ۱۴ غیر قابل قبول

عضو هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنما	علی عباسپور سپهילה ابراهیمی	استادیار استادیار	
۲- استاد مشاور	حمیدرضا اصغری	استادیار	
۳- نماینده شورای تحصیلات تکمیلی	خلیل اژدری	استادیار	
۴- استاد ممتحن	هادی قربانی	استادیار	
۵- استاد ممتحن	بهناز دهرآزما	استادیار	

رئیس دانشکده:

تقدیم به خانواده عزیزم

مادر مهربان، صبور، فداکار و پدر بزرگوارم که:

نه می توانم موهایشان را که در راه عزت من سفید شد، سیاه کنم و نه برای دست های پینه بسته شان که ثمره می تلاش برای افتخار من است، مرهمی دارم.

برادران گرامی ام، همسر برادرم و برادرزاده عزیزم مایا:

به پاس محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند.

سعید عزیز که:

در تمامی بحظات زندگی اش رفیق را هم بود.

و خانم دکتر سیده سیلا ابراهیمی:

به پاس عاطفه سرشار و گرمای امیدبخش وجودشان.

شکر و قدردانی

پاس خدای را که سخوران، دستودن او باند و شمارندگان، شمردن نعمت های او ندانند و کوشندگان، حق او را گزاردن نتوانند. و سلام و دورد بر محمد و خاندان پاک او، طاهران معصوم، هم آنان که وجودمان و امدار وجودشان است؛ و نفرین پیوسته بر دشمنان ایشان تا روز رستاخیز...

نمی توانم معنایی بالاتر از تقدیر و شکر بر زبانم جاری سازم و پاس خود را در وصف استادان خویش آشکارانم، که هر چه گویم و سراپم، کم گفته ام. در ابتدا از اساتید که تقدیر و دلسوز جناب آقای دکتر علی عباسپور و سرکار خانم دکتر سیده سیلا ابراهیمی که در کمال سعه صدر، با حسن خلق و فروتنی، از پیچگی در این عرصه بر من دریغ نمودند و زحمت راهنمایی این پایان نامه را بر عهده گرفتند؛ و استاد گرامی جناب آقای دکتر حمید رضا صغری که زحمت مشاوره این پایان نامه را متقبل شدند کمال شکر و قدردانی را دارم. باشد که این خردترین، بخشی از زحمات آنان را پاس گوید.

همچنین از گروه خاک شناسی، دانشکده مهندسی آب و خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی کرگان و شرکت ملی پخش و پالایش فراورده های نفتی شاهرود بابت همکاری در اجرای این پروژه پاسگزارم.

و در آخر از دوستان عزیزم خانم مهندس نعیمه سیطرفان، مهندس نرگس طالع زاده، مهندس فاطمه معانی، مهندس محبوبه خسرو جردی و تمام کسانی که بهواره دلسوزانه در کنارم بودند و بی دریغ یاریم دادند شکر می کنم و برایشان بهترین آرزوها را دارم.

مریم خسروی نوده بهمن ۱۳۹۱

چکیده

آلودگی منابع آبی و خاک توسط نفت خام و مشتقات آن در حین استخراج نفت خام، ترابری، پالایش و سوختن آن مشکلی پیچیده و رایج در سراسر دنیا به شمار می‌آید. این نوع آلودگی اثرات منفی و زیان‌آوری بر سلامت انسان و سایر موجودات دارد و تهدیدی جدی برای محیط زیست به‌شمار می‌رود. از این‌رو، پاک‌سازی زیستی آلودگی نفتی در صورت امکان‌سنجی کاربرد، جایگزینی مناسب و کاربردی برای روش‌های فیزیکی و شیمیایی است. در این راستا، هدف از انجام این پژوهش، بررسی نرخ کاهش آلودگی هیدروکربنی خاک‌های آلوده به مواد هیدروکربنی (نفت کوره) توسط کشت دو گیاه یونجه و چمن با و بدون همراهی باکتری سودوموناس پوتیدا به روش گیاه‌پالایی بود. بدین منظور بذور دو گیاه یونجه و چمن در دو سطح تراکم و به همراه دو تیمار با و بدون باکتری سودوموناس پوتیدا در تعدادی گلدان حاوی خاک آلوده به نفت کوره با درصد آلودگی مشخص، کشت و در شرایط گلخانه‌ای نگهداری شدند. نمونه برداری خاک در مراحل جوانه‌زنی، رویشی و زایشی گیاهان انجام شد. سپس نمونه‌های خاک به آزمایشگاه منتقل و آزمایش‌های لازم بر روی نمونه‌های خاک مورد نظر انجام شد. بررسی نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که هر دو گیاه یونجه و چمن در هر سه مرحله‌ی رشد میزان آلودگی خاک به نفت کوره را کاهش دادند. همچنین افزایش تراکم کشت و اعمال تیمار باکتری نیز در کاهش میزان آلودگی هیدروکربنی خاک اثر مثبتی داشته اما این کاهش نسبت به تیمار بدون باکتری و تراکم کمتر گیاه معنی‌دار نبود. همچنین آلودگی خاک به هیدروکربن‌های نفتی باعث کاهش میزان رشد و جوانه زنی هر دو گیاه شد.

کلمات کلیدی: آلودگی خاک، سودوموناس پوتیدا، گیاه‌پالایی، نفت کوره

مقالات مستخرج از پایان نامه

مقالات علمی-پژوهشی

خسروی نوده م.، عباسپور ع.، ابراهیمی س. و اصغری ح. ر.، (۱۳۹۱) " پاکسازی خاک آلوده به نفت کوره بوسیله یونجه و چمن به همراه باکتری سودوموناس پوتیدا" مجله پژوهش‌های حفاظت آب و خاک، گرگان.

مقالات کنفرانسی

خسروی نوده م.، عباسپور ع. و ابراهیمی س.، (۱۳۹۰) " اصلاح خاک آلوده به ترکیبات نفتی بوسیله گیاه یونجه و باکتری سودوموناس" اولین همایش ملی گیاه‌پالایی، کرمان.

خسروی نوده م.، عباسپور ع.، ابراهیمی س. و اصغری ح. ر.، (۱۳۹۱) " اثر خاک آلوده به نفت کوره بر روی جوانه‌زنی گیاه یونجه" دوازدهمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات، کرج.

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه

صفحه

مقدمه..... ۲

هدف و ضرورت تحقیق..... ۹

فصل دوم: مروری بر پژوهش‌های پیشین

کلیات..... ۱۲

۱-۲ تعریف خاک ۱۲

۲-۲ تعریف آلودگی ۱۲

۳-۲ تعریف آلودگی خاک ۱۳

۱-۳-۲ منابع آلاینده‌ی خاک ۱۳

۲-۳-۲ آلودگی نفتی خاک ۱۴

۳-۳-۲ مشخصات نفت ۱۵

۴-۲ پاک‌سازی آلودگی نفتی ۱۵

۱-۴-۲ روش‌های زیستی پاک‌سازی آلودگی نفتی ۱۵

۱-۱-۴-۲ میکروارگانیسم‌ها ۱۶

۲-۱-۴-۲ گیاهان ۲۰

۲-۴-۲ روش‌های دیگر پاک‌سازی آلودگی نفتی ۲۷

۱-۲-۴-۲ جانوران خاکزی ۲۷

- ۲۸..... ۲-۲-۴-۲ کمپوست کردن
- ۳۰..... ۳-۲-۴-۲ ازونه کردن
- ۳۱..... ۴-۲-۴-۲ افزایش کود و مواد اصلاح کننده
- ۳۲..... ۵-۲-۴-۲ سیستم فاز دوغابی
- ۳۳..... ۶-۲-۴-۲ احیاء
- ۳۴..... ۷-۲-۴-۲ مواد شوینده
- ۳۴..... ۸-۲-۴-۲ زمین پالایی
- ۳۵..... ۹-۲-۴-۲ روش های تلفیقی
- ۳۸..... ۵-۲ یونجه
- ۳۸..... ۱-۵-۲ شناسه های گیاهی یونجه
- ۳۹..... ۲-۵-۲ گونه ها و رقم های گوناگون یونجه
- ۴۰..... ۳-۵-۲ سازگاری محیطی یونجه
- ۴۰..... ۶-۲ چمن
- ۴۱..... ۱-۶-۲ انواع چمن

فصل سوم: مواد و روش ها

- ۴۴..... ۱-۳ تهیه ی خاک برای انجام پژوهش
- ۴۴..... ۱-۱-۳ خصوصیات خاک
- ۴۶..... ۲-۳ انتخاب گیاهان برای انجام زیست پالایی گیاهی

۳-۳ انتخاب باکتری ۴۷

۴-۳ آزمایش گلخانه‌ای ۴۸

۵-۳ استخراج نفت از خاک ۵۱

فصل چهارم: نتایج و بحث

۴-۱ رشد و درصد جوانه زنی گیاه در خاک آلوده به هیدروکربن نفتی ۵۴

۴-۱-۱ سنجش میزان جوانه زنی گیاه یونجه در خاک آلوده به نفت کوره ۵۴

۴-۱-۲ سنجش میزان جوانه زنی گیاه چمن در خاک آلوده به نفت کوره ۵۶

۴-۲ تغییرات هیدروکربن‌های نفتی خاک ۶۰

۴-۲-۱ تغییرات هیدروکربن‌های نفتی خاک توسط گیاه یونجه ۶۰

۴-۲-۲ تغییرات هیدروکربن‌های نفتی خاک توسط گیاه چمن ۶۸

۴-۳ گزارش برخی مشاهدات جنبی در این پژوهش ۷۵

۴-۴ نتیجه‌گیری ۷۷

۴-۵ پیشنهادها ۷۷

پیوست‌ها ۷۹

فهرست منابع مورد استفاده ۸۵

فهرست جدول‌ها

جدول ۱-۲ ترکیبات موجود در نفت ۱۴

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۴ الف. درصد جوانه‌زنی یونجه در خاک آلوده به نفت کوره در تراکم ۱۰ با و بدون باکتری..... ۵۵

شکل ۱-۴ ب. درصد جوانه‌زنی یونجه در خاک آلوده به نفت کوره در تراکم ۲۰ با و بدون باکتری..... ۵۵

شکل ۱-۴ ج. درصد جوانه‌زنی یونجه در خاک غیر آلوده در تراکم ۱۰ و ۲۰ ۵۶

شکل ۲-۴ الف. درصد جوانه‌زنی چمن در خاک آلوده به نفت کوره در تراکم ۵ با و بدون باکتری..... ۵۷

شکل ۲-۴ ب. درصد جوانه‌زنی چمن در خاک آلوده به نفت کوره در تراکم ۱۰ با و بدون باکتری..... ۵۷

شکل ۲-۴ ج. درصد جوانه‌زنی چمن در خاک غیر آلوده در تراکم ۵ و ۱۰ ۵۸

شکل ۳-۴ الف. تغییرات هیدروکربن نفتی خاک توسط گیاه یونجه در مرحله‌ی جوانه‌زنی ۶۱

شکل ۳-۴ ب. تغییرات هیدروکربن نفتی خاک توسط گیاه یونجه در مرحله‌ی رویشی

۶۱.....

شکل ۳-۴ ج. تغییرات هیدروکربن نفتی خاک توسط گیاه یونجه در مرحله‌ی زایشی

۶۲.....

شکل ۴-۴ الف. تغییرات درصد آلودگی نفتی خاک در طول دوره‌ی رشدی گیاه یونجه در

تراکم ۱۰ و با دو تیمار با و بدون باکتری ۶۳.....

شکل ۴-۴ ب. تغییرات درصد آلودگی نفتی خاک در طول دوره‌ی رشدی گیاه یونجه در

تراکم ۲۰ و با دو تیمار با و بدون باکتری ۶۳.....

شکل ۴-۵ الف. تغییرات هیدروکربن نفتی خاک توسط گیاه چمن در مرحله‌ی

جوانه‌زنی..... ۶۹.....

شکل ۴-۵ ب. تغییرات هیدروکربن نفتی خاک توسط گیاه چمن در مرحله‌ی

رویشی..... ۶۹.....

شکل ۴-۵ ج. تغییرات هیدروکربن نفتی خاک توسط گیاه چمن در مرحله‌ی

زایشی..... ۷۰.....

شکل ۴-۶ الف. تغییرات درصد آلودگی نفتی خاک در طول دوره‌ی رشدی گیاه چمن در

تراکم ۵ و با دو تیمار با و بدون باکتری ۷۱.....

شکل ۴-۶ ب. تغییرات درصد آلودگی نفتی خاک در طول دوره‌ی رشدی گیاه چمن در تراکم

۱۰ و با دو تیمار با و بدون باکتری ۷۱.....

پیوست‌ها

پیوست ۱

جدول پیوست ۱- برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک آلوده به نفت کوره ۸۰

جدول پیوست ۲- برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک آلوده به نفت کوره مخلوط با

خاک غیر آلوده ۸۱

جدول پیوست ۳- تجزیه واریانس اثرات تراکم گیاه و باکتری بر میزان درصد جوانه زنی

یونجه در خاک آلوده به نفت کوره ۸۲

جدول پیوست ۴- تجزیه واریانس اثرات تراکم گیاه و باکتری بر میزان درصد جوانه زنی چمن

در خاک آلوده به نفت کوره ۸۲

جدول پیوست ۵- تجزیه واریانس اثرات مراحل رویشی و تراکم گیاه و باکتری بر میزان

گیاه‌پالایی یونجه ۸۳

جدول پیوست ۶- تجزیه واریانس اثرات مراحل رویشی و تراکم گیاه و باکتری بر میزان

گیاه‌پالایی چمن ۸۳

پیوست ۲

آرایش گلدان‌ها ۸۴

فصل اول

مقدمه

نفت خام، منبعی با ارزش برای تولید انرژی و فرآورده‌های صنعتی است، بنابراین در کشورهای تولید کننده نفت از جمله کشور ایران، یکی از آلوده کننده‌های مهم زیست‌بوم به شمار می‌رود. منابع اصلی این آلودگی شامل تاسیسات صحرایی نفت در طی استخراج، انتقال تولیدات نفت خام و توزیع سوخت مایع، حفاری‌های غیر قانونی در خطوط لوله‌ی حمل مواد نفتی و در طی پالایش و مصرف (سوختن) مواد نفتی هستند. آلودگی نه تنها ممکن است حاصلخیزی کشاورزی خاک را به خطر بیندازد همچنین می‌تواند توانایی‌های اقتصادی و اکولوژیکی اکوسیستم را نیز با خطر مواجه کند (جوو و همکاران، ۲۰۰۷). آلودگی محیط زیرزمینی بسیار آرام و تدریجی به صورت طبیعی یا تشدید ری می‌دهد و متأسفانه در هنگام ظهور و بروز، نیازمند صرف هزینه و وقت بسیار است.

نفت خام ترکیبی پیچیده مشتمل بر صدها نوع ماده مختلف مانند هیدروکربن‌ها، نیتروژن، گوگرد و وانادیوم است و قسمت هیدروکربنی آن شامل ترکیبات آروماتیک، آلیفاتیک و آسفالتن است. ترکیبات مونوآروماتیک شامل بنزن، تولوئن، اتیل بنزن و مخلوط زایلن که به عنوان شاخص آلودگی مواد نفتی مطرح می‌باشند، سمی و سرطان‌زا نیز هستند. هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای^۱ آلاینده‌های آلی ماندگاری هستند که به طور گسترده در خاک توزیع می‌شوند (ویرا و همکاران، ۲۰۰۷).

نفت سبک بیشتر از هیدروکربن‌های اشباع و آروماتیک تشکیل شده و دارای درصد کمی از رزین و آسفالتن است، لیکن، نفت سنگین که ناشی از تجزیه نفت خام در شرایط

^۱ PAHs (Poly Aromatic Hydrocarbons)

بدون اکسیژن در مخازن طبیعی است، هیدروکربن‌های اشباع و آروماتیک کمتری دارد و بیشتر از ترکیبات قطبی، رزین و آسفالتن تشکیل شده است (ابراهیمی و همکاران، ۲۰۰۹).

با ظهور و بروز آثار زیانبار و عوارض فعالیت‌های صنعتی و فعالیت‌های اکتشاف، استخراج و نقل و انتقال و ترابری فرآورده‌های نفتی در کشور نفت خیز ایران، امروزه برای ایجاد تعادل و سازگاری بین صنعت و محیط زیست، تمهیدات مختلفی ابداع و مورد استفاده قرار گرفته است. هدف از به کارگرفتن این استراتژی‌ها و کارآمد نمودن آن‌ها، تعدیل آثار منفی فعالیت‌های بشر و به حداقل رساندن تبعات منفی آن‌ها با به کارگیری این مجموعه از اقدامات حفاظتی و اصلاحی امکان‌پذیر است (جعفری و لطفی جلال آبادی، ۱۳۸۳).

به کار بردن روش‌های پاک‌سازی فیزیکی و شیمیایی مانند استخراج با حلال، اکسید کننده‌های شیمیایی و شستشوی خاک‌ها برای پالایش خاک‌های آلوده استفاده می‌شد. جذب و یا استفاده از غشاءها از روش‌های متداول تصفیه فیزیکی هستند. متداول‌ترین روش‌های تصفیه شیمیایی، اکسیداسیون بوسیله ازن، اکسید تیتانیوم و اشعه ماورای بنفش است. لیکن، روش‌های پاک‌سازی حرارتی، فیزیکی و شیمیایی آلاینده‌های نفتی به دلیل خواصی مانند پایین بودن حلالیت، غیر قطبی بودن و هیدروفوب بودن همواره با مشکلاتی مواجه بوده اند، علاوه بر آنکه این روش‌ها همواره گران هستند و توجیه اقتصادی مناسب می‌طلبند (ابراهیمی و همکاران، ۱۳۸۸).

پالایش TPH پایدار از خاک‌ها به‌طور کلی فرآیندی گران و کند است. اما امروزه روش‌های زیستی بدلیل ساده بودن تکنولوژی، دوست‌دار بودن طبیعت، امکان استفاده هم‌زمان با سایر روش‌های فیزیکی و شیمیایی، پایین بودن هزینه‌های جاری اولیه، امکان

تخریب و تخفیف آلاینده‌ها بدون عوارض جانبی و عدم نیاز به تجهیزات تخصصی، بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. زیست‌پالایی تکنیک توسعه یافته برای حذف آلودگی‌ها از خاک، آب و هوا با استفاده از میکروارگانیسم‌هاست (اورتگا و همکاران، ۲۰۰۳). میکروارگانیسم‌ها هیدروکربن‌ها را تخریب می‌کنند و کربن را به عنوان منبع انرژی برای رشد خود استفاده می‌کنند (لیسته و پراتز، ۲۰۰۶). این تکنیک می‌تواند در درمان خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفت خام مؤثر واقع شود (الزاله و شبیر، ۲۰۰۴).

عموماً احیاء بیولوژیکی به دو روش در محل^۱ و خارج از محل^۲ انجام می‌شود، به صورت خلاصه عبارتند از:

۱- کشت زمین: در این روش هوادهی و اختلاط آلاینده‌ها در خاک به همراه زراعت انجام می‌شوند. در این محل کنترل رطوبت و مواد غذایی ضروری است.

۲- کمپوست کردن: اساس این فرایند تصفیه ترموفیلیک هوازی است که در آن مواد آلوده با مواد کمکی (کمپوست) مخلوط می‌شوند.

۳- بیو راکتور: تجزیه بیولوژیکی درون یک محفظه یا راکتور صورت می‌گیرد و ممکن است برای تصفیه مایعات و یا خاک به صورت دوغابی به کار رود.

۴- تهویه بیولوژیکی: روش‌هایی از تصفیه خاک آلوده که با دمیدن اکسیژن از میان خاک به منظور تحریک فعالیت‌های میکروبی صورت می‌گیرد.

۵- افزودن میکروب: اضافه کردن ستون باکتریایی به یک محیط آلوده که به منظور

^۱In situ

^۲Ex situ

تحریک و افزایش فعالیت میکروبی صورت می‌گیرد.

۶- تحریک بیولوژیکی: در این روش فعالیت جمعیت میکروبی موجود در خاک و یا آب‌های زیرزمینی منطقه با تامین مواد مغذی مورد نیاز تحریک می‌شود.

۷- احیاء بیولوژیکی ذاتی: در این روش احیای بیولوژیکی بدون هیچگونه تقویت و کمک انجام می‌شود و فقط در آن به طور مرتب پایش صورت می‌گیرد.

۸- پمپاژ و تیمار: انتقال آب‌های زیرزمینی به سطح زمین، جهت تصفیه و تزریق مجدد که با استفاده از پمپاژ صورت می‌گیرد (رضایی کلانتری، ۱۳۸۲).

ازجمله روش‌های بیولوژیکی می‌توان به زیست‌پالایی اشاره نمود که یکی از تکنیک‌های بسیار کارآمد تصفیه خاک‌های آلوده به ترکیبات آلی و هیدروکربنی به شمار می‌رود. به طور کلی هدف زیست‌پالایی هیدروکربنی، تجزیه بوسیله موجودات زنده تا رسیدن به محصولات نهایی آب و دی‌اکسیدکربن است. روش‌های زیستی نهایتاً سبب تبدیل مواد سمی پرخطر به محصولات نهایی غیرسمی و بی‌خطرتر شده که این فرایند به صورت درجا و دیرپا با هزینه پایین و کمترین اثرات جانبی بر سلامت انسان و محیط زیست صورت می‌گیرد (ابراهیمی و همکاران، ۱۳۹۰). در حقیقت می‌توان گفت که این روش کاربرد جدیدی است برای یک فن‌آوری بسیار کهنه که زمانی عمدتاً در تصفیه فاضلاب به کار می‌رفته است. از این روش امروزه برای پاک‌سازی خاک، لجن، آب زیرزمینی، و آب‌های سطحی که با ماده‌های شیمیایی مانند مواد نفتی، حلال‌های صنعتی و امثال آن آلوده شده‌اند بهره‌گیری می‌شود (ابراهیمی و همکاران، ۲۰۰۸).

در مورد محاسن و مزایای روش‌های بیولوژیک به اختصار می‌توان گفت که این

روش‌ها در مقایسه با فرایندهای فیزیکی و شیمیایی به هزینه کمتری نیاز دارد. بعلاوه اینکه در مقایسه با بسیاری از تکنولوژی‌ها ساده است. از سویی، این تصفیه می‌تواند به صورت در محل یا با حداقل فاصله از منطقه آلوده صورت گیرد، در نتیجه ترکیبات فرار کمتری در محیط پخش می‌شوند. تخریب منطقه در این روش حداقل بوده و پایداری آلاینده‌ها و احتمال حضور طولانی مدت آن‌ها را کاهش و پذیرش عمومی بیشتری دارد. در نهایت فرایند احیاء بیولوژیکی می‌تواند با سایر روش‌های تصفیه فیزیکی و شیمیایی همراه شود (ابراهیمی و همکاران، ۱۳۹۰).

گیاه‌پالایی، استفاده از گیاهان برای استخراج، جداسازی و یا رفع مسمومیت‌های ناشی از آلودگی می‌باشد. گیاهان دارای خصوصیات بسیار زیاد وراثتی، بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی هستند که آن‌ها را عاملی مناسب برای اصلاح خاک و آب می‌کند. واژه گیاه‌پالایی Phytoremediation شامل پیشوند یونانی Phyto به معنی گیاه و ریشه‌ی لاتین remedium به معنی اصلاح یا حذف یک عامل مزاحم و خارجی می‌باشد (تقی‌زاده و کافی، ۱۳۸۷). برای گیاه‌پالایی گونه‌های گیاهی زیادی به آلودگی‌های از نوع TPH حساس هستند، بنابراین گیاهان روی خاک‌های آلوده یا رشد نمی‌کنند یا رشدشان کند است (بوپائی، ۲۰۰۴). همچنین برخی گیاهان نسبت به بقیه مقاومت بیشتری به آلودگی نفتی دارند (اویانگ و همکاران، ۲۰۰۵). اما موفقیت گیاه‌پالایی تا حد زیادی با گونه‌های گیاهی و سن گیاه و قابلیت دسترسی آلاینده‌ها و مواد غذایی وابسته است (لی و همکاران، ۲۰۰۸). از طرف دیگر سطوح نفت خام کمتر از حدود ۱ درصد ممکن است رشد و باروری گیاه را افزایش دهد (اویانگ و همکاران، ۲۰۰۵). در سال‌های اخیر پیشرفت قابل توجهی در گسترش گیاهان بومی و اصلاح شده برای درمان آلودگی‌های محیطی شده است. چون عناصر تغییر ناپذیر هستند،

گیاه‌پالایی^۱، خط مشی است برای رفع آلودگی‌های هیدروکربوری، عناصر رادیواکتیو و سنگین که در قسمت سطحی زمین تجمع یافته‌اند. همچنین، آلودگی‌های آلی نیز می‌توانند توسط گیاهان کاملاً معدنی شوند (لیسته و فلگنترو، ۲۰۰۶).

گیاه‌پالایی را براساس نوع موادی که اصلاح می‌کنند، به ۶ نوع اصلی تقسیم می‌کنند.

برای آلودگی‌های فلزی:

۱-Phytoextraction: استفاده از گیاهان برای استخراج آلودگی‌های محیط،

۲- Rhizofiltration: جذب آلودگی توسط ریشه‌های گیاهان که در آب غوطه ور

هستند،

۳- Phytostabilization: استفاده از گیاهان برای کاهش دسترسی بیولوژیکی و

مهاجرت آلودگی.

برای آلودگی‌های آلی:

۱- Phytotransformation: استفاده از برخی از گیاهان که توانایی تغییر و تحول

ترکیبات آلی و کاهش آلودگی‌های حاصل از آن‌ها را دارند.

۲- Rhizosphere Bioremediation: اصلاح خاک و از بین بردن آلودگی‌های آلی در

خاک توسط میکروارگانیسم‌هایی که در محیط ریزوسفر فعالیت بالایی دارند.

۳- Phytovolatilization: استفاده از گیاهان برای تصفیه برخی آلودگی‌های خاک و به

¹ Phytoremediation

روش فرایند تصعید.

استفاده از گیاه‌پالایی مزایای متنوعی دارد. این روش دوست‌دار طبیعت است. فرآیندی نسبتاً ساده و اقتصادی است و انتقال فرسایشی خاک آلوده را خنثی می‌کند (اویانگ و همکاران، ۲۰۰۵). عناصر جذب شده توسط گیاهان ممکن است از بیوماس گیاه بیرون کشیده شود و سپس دوباره بازگردانده شوند. گیاه‌پالایی می‌تواند برای انواع زیادی از آلودگی‌ها بکار رود و با جلوگیری از نشت آن‌ها به سیستم‌های آب‌های زیرزمینی، ورود آلودگی‌ها را به محیط کاهش دهد (ویلک، ۲۰۰۷) و از نظر استتیک (زیبایی شناختی) نیز یک فن‌آوری زیباست (اویانگ و همکاران، ۲۰۰۵).

از سوی دیگر، بسیاری از خاک‌های آلوده هیدروکربنی، خود منبعی مناسب برای تامین غذای ریزاندام‌هایی خاص موسوم به "باکتری‌های نفت‌خوار"^۱ بوده، که از این منبع آلودگی بعنوان منبع غذایی خود استفاده کرده و نتیجه آن کاهش یافتن آلودگی هیدروکربنی خاک است. به طور مثال باکتری‌های گره‌ای مانند رایزوباکتریوم، برادی رایزوباکتریوم و رایزوباکتری‌های بهبود دهنده‌ی رشد گیاه (PGPR) مثل سودوموناس‌ها، فلاوی باکتریوم، سراتیا و... داشتن پتانسیل تخریب هیدروکربن را ثابت کردند (پاپ و متیو، ۱۹۹۳). همچنین باکتری‌های نفت‌خوار می‌توانند قبل از شروع فرایند گیاه‌پالایی سمیت TPH را برای گیاهان کمتر کنند، بنابراین تحمل گیاه به TPH و دیگر استرس‌ها را افزایش می‌دهند (گانگی و کم، ۲۰۰۷؛ شفر و همکاران، ۲۰۰۵). در زمینه استفاده از باکتری‌های نفت‌خوار و استفاده از این تکنیک در پاک‌سازی خاک‌های آلوده، سه فرم کلی برای زیست‌پالایی وجود

¹Oil eating bacteria

دارد:

Intrinsic Bioremediation: دنبال کردن فرایند طبیعی تجزیه زیستی است و از طریق آن میکروارگانیسم‌های طبیعی موجود در محیط در همان شرایط طبیعی حذف آلودگی‌ها را تا سطح قابل قبولی انجام می‌دهند. به‌طور کلی این اولین انتخاب برای حذف آلودگی به روش زیستی است به این دلیل که هیچ مداخله‌ای در آن صورت نمی‌گیرد و فقط روند طبیعی کار دنبال می‌شود.

Biostimulation: در واقع بهبود شرایط محیطی نظیر اضافه کردن مواد غذایی یا هوادهی است. این روش هنگامی صورت می‌گیرد که سرعت تجزیه زیستی به طور طبیعی کم باشد و به همین دلیل میکروارگانیسم‌های موجود در محیط تحریک شده تا مواد شیمیایی هدف را تجزیه کنند. در این موارد معمولاً جمعیت تجزیه کننده به اندازه کافی حضور دارد ولی شرایط محیطی برای فعالیت آن‌ها مساعد نیست. این شرایط نامساعد می‌تواند نبودن اکسیژن، pH نامناسب، کمبود مواد مغذی به شکل معدنی، کمبود رطوبت و دمای نامناسب باشد یا اینکه میزان در دسترس بودن ماده شیمیایی مورد نظر مطلوب نباشد. با مساعد کردن شرایط محیطی می‌توان سرعت تجزیه زیستی را توسط میکروارگانیسم‌های خود محیط افزایش داد.

Bioaugmentation: این فرایند شامل وارد کردن میکروارگانیسم‌های غیروومی به محیط طبیعی با هدف افزایش سرعت و یا گسترش تجزیه زیستی است. این روش معمولاً زمانی استفاده می‌شود که میکروارگانیسم‌های خود محیط قادر به تجزیه نباشند یا اینکه ماده آلوده کننده محیط ساختاری پیچیده داشته و از طیف وسیعی از ترکیبات تشکیل شده باشد. در

واقع وقتی دو روش اول، نتایج قابل قبولی به دست نیاورند از این روش استفاده می‌شود، که به دلیل کم بودن جمعیت میکروارگانیزم‌ها یا دیر تجزیه شوندگی یا سرسختی ماده آلی می‌باشد. به همین منظور باکتری‌هایی که توانایی انجام فعالیت مورد نظر را به طور طبیعی یا با استفاده از تکنیک‌های مهندسی ژنتیک داشته باشد مستقیماً وارد منطقه آلوده می‌کنند. در صورت نیاز، مواد غذایی هم وارد می‌کنند.

هدف و ضرورت تحقیق

در دهه اخیر مطالعات زیادی در خصوص استفاده از انواع روش‌های مختلف تصفیه خاک‌های آلوده به مواد نفتی انجام شده است. در این راستا، هدف از انجام این تحقیق، بررسی اثر منفرد و تلفیقی چندین سیستم زیستی پاک‌سازی آلودگی هیدروکربوری خاک‌های آلوده، یافتن گیاهان اصلاح کننده بومی منطقه (مانند یونجه، شبدر و انواع چمن‌ها) با خاصیت زیست‌پالایی و انتخاب نوع مناسب آن با توجه به زیست‌بوم، به عنوان راهی عملی و پایدار جهت استفاده در خاک‌های آلوده در حذف و پالایش هیدروکربورهای نفتی از خاک می‌باشد. علاوه بر آن بررسی خواهد شد که اثر باکتری‌های نفت‌خوار در پالایش منطقه به چه صورت است. افزون بر آن، سعی می‌شود اثر مشترک هر دو سیستم پاک‌سازی مورد ارزیابی قرار گیرد و حذف یا کاهش آلودگی خاک‌های منطقه مورد مطالعه واقع در شرق شاهرود از آلاینده‌های نفتی با استفاده از گیاه و ارزیابی مقدار و چگونگی امکان پالایش خاک‌های آلوده به آلاینده‌های نفتی اطراف شرکت پخش و پالایش فراورده‌های نفتی با استفاده از روش‌های زیستی و دستیابی به دانش فنی پالایش این خاک‌ها مورد نظر قرار می‌گیرد.

فصل دوم

مروری بر پژوهش‌های پیشین

کلیات

۱-۲ تعریف خاک

خاک جسمی پویا، زنده و طبیعی است که برای ایفای نقش اکوسیستم‌های خاکی ضروری است. خاک از دو بخش زنده و غیر زنده تشکیل شده است. بخش غیر زنده خاک، شامل سنگ‌های هوازده و مواد معدنی حاصل از پوسیدگی گیاهان و جانوران می‌باشد (که مواد آلی یا هوموس نامیده می‌شود) و هوا و آب نیز در این بخش قرار می‌گیرند. اما خاک زنده، خاکی است که دارای جانوران کوچک همچون حشرات و کرم‌ها است و در آن گیاهان، قارچ‌ها، باکتری‌ها و سایر میکروب‌ها قرار دارند. نمونه‌ی بارز خاک ۵۰ درصد مواد معدنی و آلی و ۵۰ درصد هوا و آب دارد که فضای خالی موجود در خاک را پر می‌کند و ارگانسیم‌های زنده‌ی خاک را نگه می‌دارد. خاک یکی از منابع مهم و ارزشمند طبیعت است، بدون داشتن خاک سالم حیات و زندگی روی زمین امکان‌پذیر نخواهد بود. ۹۵ درصد از غذای انسان از زمین حاصل می‌شود، بنابراین برنامه ریزی برای داشتن خاکی سالم و تولید کننده لازمه‌ی بقای انسان است.

۲-۲ تعریف آلودگی

آلودگی عبارت است از پخش یا آمیختن مواد خارجی در آب، هوا و خاک به میزانی که کیفیت و خواص فیزیکی، شیمیایی یا بیولوژیکی آن‌ها را به گونه‌ای تغییر دهد که برای انسان، گیاه و یا سایر موجودات زنده زیان آور باشد، تغییر در ویژگی‌هایی که منجر به تغییر در کاربرد آن شده و اجزای تشکیل دهنده محیط زیست، منافع و حیات موجودات زنده را به طور مستقیم یا غیر مستقیم به مخاطره اندازد.

۲-۳ تعریف آلودگی خاک

خاک توده‌ای بی‌جان نیست بلکه در آن علاوه بر مواد معدنی، آلی، هوا، آب و موجودات زنده همانند باکتری‌ها، قارچ‌ها، جلبک‌ها و کرم‌های خاکی وجود دارند؛ گفتنی است این موجودات در خواص شیمیایی خاک، تغذیه گیاه و خواص فیزیکی خاک بسیار مؤثرند. باید میان موجودات زنده‌ی خاک و محیط زیست آن‌ها تعادل اکولوژیک برقرار باشد، چنانچه این تعادل محیطی با مشکل مواجه شود فعالیت موجودات زنده را دچار اختلال کرده که ادامه‌ی آن می‌تواند منجر به نابودی این موجودات و در نهایت کاهش سطح حاصلخیزی خاک شود. در سال‌های اخیر، اقدامات گوناگون برای افزایش تولید در صنعت، و افزایش استفاده از کودهای شیمیایی، سموم دفع آفات نباتی، علف‌کش‌ها، فاضلاب‌های صنعتی و شهری جهت آبیاری موجب آلودگی خاک‌ها و در نتیجه از بین رفتن موجودات زنده و کاهش توان تولید آن‌ها شده است (دبیری، ۱۳۸۹).

متأسفانه آلودگی خاک به شکل مستقیم یا غیر مستقیم سلامتی انسان، حیوان و سایر موجودات زنده را تهدید می‌کند.

۲-۳-۱ منابع آلاینده‌ی خاک

از منابع آلوده کننده خاک می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱- فلزات سنگین (آرسنیک، کادمیم، نیکل، سرب، کروم، روی، مولیبدوم، سلنیم و ...)

۲- سموم شیمیایی و علف‌کش‌ها (حشره‌کش‌ها، قارچ‌کش‌ها)

۳- کودهای شیمیایی

۴- مواد زائد و فاضلاب‌ها

۵- مواد نفتی

۲-۳-۲ آلودگی نفتی خاک

نفت خام به انگلیسی Crude Oil و به روسی Naphra نامیده می‌شود که در حالت طبیعی به صورت مایع بوده و رنگ آن قهوه‌ای زرد مایل به سیاه است و در برابر نور انعکاسی، رنگ سبز بخصوصی از خود نشان می‌دهد.

مواد نفتی و مشتقات آن‌ها در اثر حمل و نقل یا ذخیره سازی ممکن است موجب آلودگی خاک شود. هر قدر مواد نفتی به عمق بیشتری از خاک نفوذ کند رفع آلودگی آن مشکل‌تر خواهد بود. آلودگی خاک‌ها به هیدروکربن‌های نفتی (TPHs) یکی از مهم‌ترین مشکلات زیست محیطی در برخی از نقاط کشور به ویژه در اطراف پالایشگاه‌های نفت می‌باشد. آلاینده‌های نفتی در خاک، سبب بروز سمیت برای انسان و سایر موجودات زنده شده و موجبات آلودگی آب‌های زیر زمینی و سطحی را فراهم می‌آورد (افیونی و خوشگفتارمنش، ۱۳۸۵).

جدول ۲-۱) ترکیبات موجود در نفت

عنصر	حداقل درصد وزنی	حداکثر درصد وزنی
کربن	۸۲/۲	۸۷/۱
هیدروژن	۱۱/۸	۱۴/۷
گوگرد	۰/۱	۵/۵

۴/۵	۰/۱	اکسیژن
۱/۵	۰/۱	نیتروژن

۳-۳-۲ مشخصات نفت

نفت خام به جهت وجود ترکیبات گوگرد بوی نامطلوبی دارد. بخش اعظم نفت خام از هیدرات‌های کربن و مقدار کمی عناصر دیگر نیز در آن مخلوط می‌گردد، که در جدول ۱-۲ با میزان درصدشان آورده شده‌اند (لارسون، ۱۹۶۷).

۴-۲ پاک‌سازی آلودگی نفتی

۱-۴-۲ روش‌های زیستی پاک‌سازی آلودگی نفتی

بررسی پایگاه داده بین المللی نشت نفتی^۱، نشان داد که حدود ۱/۱۴ میلیون متر مکعب از نفت به داخل آب‌های دریایی ایالت متحده آمریکا نشت کرده که این مساله ناشی از ۸۲۶ حادثه در برگیرنده تانکرها، بشکه‌ها و وسایل انتقال بوده است. از سویی حدود ۰/۷۶ میلیون متر مکعب نفت در اثر نشت از لوله‌های انتقال نفت، آلودگی خاک‌ها را موجب گردید (اسکاکلفورد^۲ و همکاران، ۱۹۸۹). در جنگ خلیج فارس در سال ۱۹۹۱ نیز شش تا هشت میلیون بشکه نفت در خلیج فارس ریخته شد (والورث و رینولدز، ۱۹۹۵) و به سبب نزدیکی و هم‌مرزی خوزستان با این خلیج مقادیر عظیمی از این آلودگی‌ها به این استان منتقل گردید. در سال ۱۹۸۷، گزارشی از بخش کیفیت زیست محیطی مک‌کین^۳ مبنی بر

¹ International Oil Spill Database

³ MacKin

² Schackelford, et al

⁴ Methyl Trshyu Butyl Ether(MTBE)

نشت سه مخزن ذخیره سوخت بنزین از ۴ مخزن، ارائه شد که منجر به استفاده از فیلترهای تصفیه آب توسط مردم منطقه گردید (انجمن پژوهش‌های ملی، ۱۹۹۴). در سال‌های بعد، دو سیستم تامین کننده نیاز آب شرب شهری به دلیل آلودگی به متیل ترسیو-بوتیل اتر^۴ غیرقابل استفاده گردیدند. در سانتامونیکای آمریکا حداقل ۵۰ درصد از کل آب شهری که از منابع زیرزمینی تامین می‌شد برای شرب غیر قابل استفاده گردید، به طوریکه ۵/۳ میلیون دلار برای جایگزینی و تامین آب شرب منطقه هزینه شد (آلر و همکاران، ۱۹۸۷).

۲-۴-۱-۱ میکروارگانیسیم‌ها

بشر از دیر باز از سیستم‌های بیولوژیکی استفاده می‌کرد. استفاده از مخمر به ۶۰۰۰ سال پیش بر می‌گردد، از اولین فرایندهای بیولوژیکی مهندسی استفاده از مخمر برای ور آمدن نان و تولید آجود بوده است. مطالعات ابتدایی راجع به فعالیت میکروارگانیسیم‌ها در سال ۱۹۵۸ توسط باکاماسکاز^۱ بر مواد سوختی انجام شد. پس از او، پرینس در سال‌های ۱۹۶۰-۱۹۶۱ وجود باکتری‌ها را در لجن موجود در مخازن سوخت هواپیمای جت، ثابت کرد. اطلس و همکارانش (۱۹۷۴) نیز استفاده از باکتری‌ها را در تجزیه نفت و مشتقات آن مورد بررسی قرار دادند و باکتری باکتریوم اریتروژنز^۲ را به عنوان عامل موثر در تجزیه نفت معرفی نمودند. میکروارگانیسیم‌هایی که می‌توانند الکان‌ها را در مراحل مختلف به اسیدهای کربوکسیلیک تبدیل و برخی از هیدروکربن‌ها را به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده کنند در همه جا حاضر هستند (گیبسون، ۱۹۸۴).

¹ Bakamauskas

² *Bacterium erythrogenes*

اندرسون (۱۹۸۹) اندازه‌گیری تنفس میکروبی را شاخص مناسبی جهت بررسی فعالیت میکروبی در خاک و نیز میزان و شدت معدنی شدن ترکیبات آلی در خاک دانست.

وولیکا و همکاران (۲۰۰۹) در یک مطالعه‌ی آزمایشگاهی میکروارگانیسم‌های هوازی قادر به تخریب بنزن، تولوئن، اتیل بنزن و زایلن (BTEX) را از یک ناحیه‌ی آلوده شده توسط تولیدات نفت خام جداسازی کردند و تحت دو شرایط آزمایشگاهی و مزرعه آزمایش کردند. آن‌ها مشاهده کردند که بنزن، تولوئن، اتیل بنزن و زایلن اضافه شده به محیط کشت در آزمایشگاه به عنوان منبع کربن تنها در غلظت 500 mg/l در محیط کشت تحت شرایط آزمایشگاهی، باعث کاهش ۸۴ درصد بنزن، ۸۶ درصد تولوئن، ۸۲ درصد زایلن شده است. در محیط کشت با اتیل بنزن به عنوان منبع کربن تنها، این کاهش حدود ۸۰ درصد بود. در شرایط مزرعه مقادیر اندکی کمتر مشاهده شد.

اوبوکوی و همکاران (۲۰۰۱) نمونه‌های خاک حاوی نفت خام، فناترن و هگزادکان را به مدت یک سال ماهانه از میدان نفتی جنوب بورگان در کویت برای تخریب زیستی جمع آوری کردند. در دمای بالا (55°C) بویژه در ماه‌های گرم‌تر و خشک‌تر باکتری‌ها نسبت به قارچ‌ها مخرب‌های بهتری بودند. به دلیل وابستگی به دوره‌ی نمونه‌گیری، باکتری‌ها هیدروکربن‌ها را ۴۶-۸۶ درصد (نفت خام)، ۴۲-۱۰۰ درصد (هگزادکان) و ۵-۵۸ درصد (فئاترن) تخریب کردند. قارچ‌ها فقط قادر به تخریب ۲۰-۲۸ درصد (نفت خام)، ۳۰-۹۵ درصد (هگزادکان) و کمتر از ۵۵ درصد فئاترن بودند.

ایجاح و اندانا (۲۰۰۴) پتانسیل پوسته‌ی صدف را در افزایش تجزیه‌ی میکروبی نفت خام نشت کرده در خاک را مطالعه کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که تعداد باکتری‌های مخرب نفت خام در خاک آلوده به نفت غنی شده با پوسته‌ی صدف بیشتر از تعداد باکتری‌ها در

خاک غنی نشده با پوسته‌ی صدف بود. سرعت و مقدار کل تخریب زیستی نفت خام در خاک توسط اصلاح کننده تحریک شده بود. حدود ۴۳/۴ درصد نفت خام در خاک غنی نشده بعد از ۱۶ روز در مقابل ۷۰/۱ درصد تخریب زیستی نفت در همان دوره‌ای که خاک با پوسته‌ی صدف غنی شده بود در طول مدت مشابه رخ داده است. این مقادیر بطور معنی‌داری از یکدیگر متفاوت بودند ($P < 0.05$). اصلاح خاک با پوسته‌ی صدف pH خاک را از اسیدی به قلیایی بالا برد. میکروارگانیسم‌های مخرب نفت خام شناسایی شده در خاک اصلاح شده با پوسته‌ی صدف از جنس *Acinetobacter*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Rhizopus* و *Mucor* بودند. به همین نحو *Micrococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Aspergillus*, *Penicillium* و *Mucor* به عنوان میکروارگانیسم‌های مخرب نفت خام در خاک اصلاح نشده شناسایی شدند. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که پوسته‌ی صدف می‌تواند در اصلاح خاک‌های آلوده به نفت مورد استفاده قرار گیرند.

پیازا و همکاران (۲۰۰۸) پاک‌سازی و کاهش سمیت فاضلاب نفت خام توسط ۵ استرین باکتریایی را بررسی و مطالعه کردند. *Alcaligenes*, *Ralstonia picketti* SRS(BP-20), *Bacillus sp.*, *Bacillus sp.* (T-1), *Bacillus subtilis* (I'-1a), *piechauldii* SRS(C'ZOR L-1B) به ترتیب از خاک‌های آلوده به نفت خام جداسازی شدند. هیدروکربن‌های نفت خام بطور معنی‌داری توسط مخلوط باکتری‌های کشت شده در مدت ۳۰ روز تخریب شدند (۹۱ درصد) (۲۹ درصد در ۷۲ ساعت اولیه). بطور مشابه سمیت فاضلاب نفت خام زیست‌پالایی شده بعد از ۳۰ روز ۳ برابر کمتر شد. این کار اثر باکتری‌ها را بر روی تخریب هیدروکربن‌ها و سمیت همراه و وابستگی آن به حضور میکروارگانیسم‌های ویژه را نشان می‌دهد.

ویرا و همکاران (۲۰۰۷) در مطالعه‌ای به مقایسه‌ی تجزیه‌ی بیولوژیک گازوئیل توسط دو دسته از میکروارگانیسم‌های جدا شده از خاک دریاچه‌ای که حاوی مقادیر زیادی از گازوئیل بود پرداختند. آن‌ها موفق به حذف ۹۰ درصد گازوئیل موجود در آب در مدت زمان ۴۰ روز شدند و در ادامه کار بهینه سازی شرایط رشد این میکروارگانیسم‌ها را نیز انجام دادند.

طلایی و همکاران در سال ۱۳۸۸ نیز در مطالعه‌ی خود موفق به جداسازی میکروارگانیسم‌هایی از خاک آلوده به بنزین و گازوئیل در یک پمپ بنزین شدند که قادر به تجزیه‌ی گازوئیل بود. همچنین آن‌ها در مطالعه‌ی دیگری در همان سال نیز موفق به جداسازی میکروارگانیسم‌های دیگر شده بودند که قادر به تجزیه‌ی نفت خام شناور بر روی آب بود.

لی و همکاران (۲۰۰۵) در مطالعه‌ای بر روی تجزیه‌ی بیولوژیک فاضلاب‌های تولیدی در مناطق نفت خیز توانستند تعدادی میکروارگانیسم را شناسایی نمایند که قادر به مصرف نفت خام به صورت محلول در آب و یا به صورت قطرات ریز بودند. لی با کمک این میکروارگانیسم‌ها توانست ۸۵ درصد نفت خام موجود در این گونه پس‌آب‌ها را در مدت زمان ۷ روز تجزیه نماید.

موراتووا و همکاران (۲۰۰۳) پتانسیل اکسیداسیون نفت توسط باکتری‌های رایزوسفر همراه جنس آزوسپریلیوم را تحت شرایط آزمایشگاهی مطالعه کردند. بعد از غربال، استرین *A. Brasilense* (SR80) برای تحقیق بیشتر انتخاب شد. این استرین قادر به تخریب ۵۶/۵ درصد نفت خام (اضافه شده در غلظت ۱ درصد) به عنوان منبع کربن و انرژی اضافی را در مدت ۱۴ روز در یک محیط کشت حاوی مالتات داشت.

ینگ تنگ و همکاران (۲۰۱۰) مطالعه کوچکی برای آزمون توان پاک‌سازی زیستی گونه های *paracoccus* sp. Strain HPD-2 بر روی خاک‌های آلوده به PAH انجام دادند و کاهش ۲۳/۲ درصد در غلظت کل PAH خاک بیش از ۲۸ روز را مشاهده کردند.

اکبری و همکاران (۱۳۸۹) عملکرد دو قارچ *Acromonium* sp. *Aspergillus* sp. در حذف آلودگی نفتی در شرایط آزمایشگاهی را بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که این قارچ‌ها قادر به کاهش نفت در محیط کشت می‌باشند و بیشترین میزان کاهش و حذف نفت برای قارچ *Aspergillus* sp. در محیط کشت ۱۰ درصد نفت و برای قارچ *Acromonium* sp. در محیط کشت ۲ درصد نفت مشاهده گردید. نتایج حاصله دلالت دارد که قارچ‌های *Acromonium* sp. *Aspergillus* sp. نقش مهمی در زیست پالایش آلودگی نفتی دارد و قادر به تجزیه‌ی نفت خام می‌باشد.

سعیدی و همکاران (۱۳۹۰) تجزیه‌ی زیستی نرمال هگزادکان بوسیله‌ی باکتری‌های سودوموناس آرژینوزا (P.A)، پوتیدا (P.P) و باکتری‌های بومی مناطق در حضور منبع غذایی در شرایط آزمایشگاهی را بررسی کردند. تیمارها شامل ۲ سطح نرمال هگزادکان (ppm ۱۰۰۰۰ و ۲۵۰۰)، ۶ سطح باکتری (سودوموناس آرژینوزا (P.A) و پوتیدا (P.P)، ۳ جدایه از منطقه آلوده اهواز (IA)، سرخس (IS) و تهران (IT) و بدون باکتری) و ۲ سطح کود شیمیایی (۰ و ۲ تن در هکتار) بودند. نتایج نشان داد که میزان تجزیه‌ی نرمال هگزادکان با گذشت زمان افزایش و همچنین در حضور کود شیمیایی از نظر آماری معنی‌دار بود.

اوبوکوی و همکاران (۲۰۰۱) نمونه‌های خاک حاوی نفت خام، فنانترن و هگزادکان را به مدت یک سال ماهانه از میدان نفتی جنوب بورگان در کویت برای تخریب زیستی جمع آوری کردند. در دمای بالا (۵۵°C) بویژه در ماه‌های گرم‌تر و خشک‌تر باکتری‌ها نسبت به

قارچ‌ها مخرب‌های بهتری بودند. به دلیل وابستگی به دوره‌ی نمونه‌گیری، باکتری‌ها هیدروکربن‌ها را ۴۶-۸۶ درصد (نفت خام)، ۴۲-۱۰۰ درصد (هگزادکان) و ۵-۵۸ درصد (فنانترن) تخریب کردند. قارچ‌ها فقط قادر به تخریب ۲۰-۲۸ درصد (نفت خام)، ۳۰-۹۵ درصد (هگزادکان) و کمتر از ۵۵ درصد فنانترن بودند.

۲-۴-۱-۲ گیاهان

در سال ۱۹۹۹ یک آزمایش تحقیقاتی برای تعیین پتانسیل پالایش گیاهی برای اصلاح خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های پلی آروماتیک (PAHs)، توسط پرادهان و همکارانش در انستیتوی تکنولوژی گاز (IGT) صورت گرفت. خاک‌های مورد مطالعه از خاک‌هایی بود که سابقاً در آن‌ها گیاه تولید کننده گاز (MPG) وجود داشت در منطقه نیوارک (Newark, NJ) ۳ گونه متفاوت از گیاهان برای مدت ۶ ماه در آزمایشگاه مورد مطالعه قرار گرفت که شامل یونجه (*Medicago sativa*)، ارزن (*Panicum virgatum*) و علف ساقه آبی کوچک (*Schizachyrium scoparium*) بود. استفاده از یونجه و ارزن برای تیمار اولیه از خاک آلوده به PAH، ۵۷ درصد کاهش کل غلظت را، بعد از گذشت ۶ ماه نشان داد. تحقیقات پیشرفت قابل ملاحظه‌ای را از نظر کارایی و هم از نظر اقتصادی در استفاده از روش گیاه پالایی برای پاک‌سازی خاک‌های آلوده نشان داد (پرادهان و همکاران، ۱۹۹۹).

کیجون سونگ و همکارانش در سال ۲۰۰۳ استفاده از گیاهان برای اصلاح خاک آلوده به هیدروکربن‌ها در شرایط زیر زمین آزمایش نمودند. بویژه سنجش تاثیر ریشه‌های عمیق علف‌ها، علف جانسون (*Johnsongrass*) و چاودار وحشی کانادایی در پراکندگی تری‌نیترو تولوئن در خاک‌های تازه آلوده به غلظت‌های اولیه $10/71 \pm 1/35$ برای تری‌نیترو

تولوئن (TNT) و $9/87 \pm 1/23 \text{ mg/kg}$ برای پلی‌برمو بی‌فنیل (PBB) پرداختند. آزمایش انجام شده در ۷۲ ستون لایسیمتر با ۴ تیمار بود که شامل علف جانسون، چاودار وحشی، یکی درمیان از علف جانسون و چاودار وحشی و در شرایط بدون گیاه و آیش زمین صورت گرفت. به طور کلی خصوصیات ریشه را از نظر طول ریشه و چگالی ریشه و مساحت سطح ریشه به عمق ۱/۵ متری محدود کردند. بیشترین و سریع‌ترین کاهش در غلظت شیمیایی TNT بعد از گذشت ۹۳ روز از جوانه‌زنی خاک بود که به میزان 250 mg/kg کاهش پیدا کرد و میزان PBB بعد از گذشت ۱۸۵ روز از جوانه‌زنی نزدیک به حدود 500 mg/kg رسید.

لیسته و همکاران در سال ۲۰۰۶ در یک آزمایش گلدانی گلخانه‌ای توانایی یک نوع علف (چمن چاودار)، یک لگوم (ماشک تابستانه) و یک گیاه چلیپایی (خردل سفید) برای رشد در خاکی از بقایای محل تولید زغال‌سنگ همراه با اثر جوامع باکتریایی خاک و توسعه‌ی تخریب زیستی هیدروکربن‌های نفت خام را بررسی کردند. غلظت خاک حاوی هیدروکربن‌های نفت خام PAHs، 517 mg/kg بود. بعد از ۹۵ روز $68/7$ درصد مقدار TPH اولیه و 59 درصد TPAHs در خاک کشت شده ناپدید شده بود.

آپرل و سیمز (۱۹۹۰) در پژوهش خود، اثر حضور پوشش گیاهی علفی چندساله با ریشه‌های فیبری را بر پالایش خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی آروماتیک چند حلقه‌ای بررسی کردند. آن‌ها مشاهده کردند که ریشه گیاهان علفی چندساله به سبب طبیعت فیبری خود موجب تحریک فعالیت میکروبی و افزایش تجزیه و تخریب این دسته از آلاینده‌ها در محیط رایزوسفر می‌شوند، چرا که ریشه‌های فیبری نسبت به سایر ریشه‌ها، محیط مناسب‌تر و با سطح ویژه‌ی بالاتری را برای فعالیت و توسعه جمعیت میکروبی بزرگ‌تری در محیط رایزوسفری آن‌ها به وجود می‌آید. آن‌ها در مطالعات خود مشاهده

کردند که تجزیه و تخریب ترکیبات PAHs پس از یک دوره‌ی ۲۱۹ روزه در خاک رایزوسفری بیش از خاک غیر رایزوسفری است.

شهریاری و همکاران در سال ۱۳۸۶ تاثیر مخلوط گیاه یونجه (لگوم) و فسکیو (گراس) را بر خاک آلوده به غلظت‌های مختلف نفت خام (۱، ۳، ۵، ۷ و ۱۰ درصد) را برای مدت ۱۲۰ روز مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد در غلظت بالای نفت تا ۵ درصد، تعداد کل باکتری‌ها نسبت به شاهد و غلظت‌های پایین نفت افزایش یافت ولی بین غلظت‌های ۵، ۷ و ۱۰ درصد از این نظر اختلاف معنی‌داری دیده نشد. شمارش تعداد باکتری‌های نفت‌خوار خاک نیز نشان داد که بیشترین تعداد باکتری‌های نفت‌خوار در خاک با آلودگی ۱۰ درصد دیده شد. مقایسه کاهش نفت خام در نمونه‌های خاک دارای گیاه و غلظت متناظر آن‌ها در نمونه‌های فاقد گیاه نشان داد که در نمونه‌های دارای گیاه، کاهش نفت خام بیشتر بود. بررسی مقدار کاهش نفت خام در خاک دارای گیاه نشان داد که بیشترین مقدار کاهش در نمونه‌ی ۱ درصد نفت خام بود که کاهش در حدود ۳۶/۷ درصد بود، در حالیکه کمترین مقدار کاهش نفت، در نمونه‌ی ۱۰ درصد به میزان ۵/۶ درصد بود. ژيو و همکاران (۲۰۰۶) ۳ گونه‌ی گیاهی (ذرت، چمن، شبدر سفید) را برای حذف پایرن و فنانترو مطالعه کردند و نتیجه گرفتند که حضور پوشش گیاهی بطور معنی‌داری اتلاف فنانترو و پایرن را در محیط خاک بالا برد. تقریباً ۹۲ درصد فنانترو و ۸۸ درصد پایرن در خاک کشت شده توسط ذرت حذف شده بود. ترکیب کشت گیاه (کشت مخلوط) (ذرت، چمن و با شبدر سفید) بطور معنی‌داری سرعت تخریب را در خاک بالا برد (۹۸ درصد فنانترو و ۹۵ درصد پایرن).

ریاحی و همکاران (۱۳۹۰) رشد و نمو گیاه سورگوم و توانایی گیاه پالایی آن را در خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی بررسی کردند. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر هیدروکربن‌های نفت روی فاکتورهای رشد در گیاه سورگوم و همچنین ارزیابی میزان پتانسیل گیاه پالایی این گیاه در بهبود خاک‌های آلوده به ضایعات نفتی بود. نتایج حاکی از کاهش TPHs در طول نمونه برداری‌ها بود. که بیشترین میزان حذف مربوط به نیمه نخست آزمایش بود. همچنین در بررسی تاثیر اعمال مکمل در میزان توان گیاه پالایی مشخص شد مکمل Peat روی رشد گیاه تاثیر مثبت دارد. در پایان آزمایش نتایج حاکی از این امر بود که گیاه سورگوم می‌تواند رفتار مؤثر و امیدوار کننده‌ای را در حذف آلاینده‌های نفتی داشته باشد.

شواب و بانکز (۱۹۹۴) نیز به کاهش بیشتر غلظت کل هیدروکربن‌های نفتی در حضور پوشش گیاهی در مقایسه با تیمار شاهد بدون پوشش گیاهی اشاره کردند.

فرو و همکاران (۱۹۹۹) نیز در مطالعات گلخانه‌ای خود کاهش معنی‌دار غلظت پیرن، کریزن و فلورانتن در حضور گیاه رای‌گرس دائمی را گزارش کردند.

در مطالعه‌ی دیگری کارتیکیان و همکاران (۱۹۹۹) به کاهش بیش از ۵۷ تا ۹۰ درصدی غلظت آلاینده‌های نفتی در خاک‌ها آلوده به نفت در حضور گیاه یونجه اشاره کردند.

وایتس و همکاران (۱۹۹۸) نیز دریافتند که گونه‌های مختلف یونجه اثری مثبت بر کاهش غلظت آلاینده‌های ناشی از نفت خام در خاک دارند. به شکلی که در حضور این گیاهان، کاهش حدود ۳۳ تا ۵۶ درصدی غلظت آلاینده‌های نفتی در مقایسه با تیمار شاهد

بدون گیاه مشاهده شد. کامیسر و پارک (۱۹۹۷) نیز به کاهش ۸۰ درصدی غلظت هیدروکربن‌های نفتی سبک پس از ۸ هفته مطالعات گیاه‌پالایی اشاره کردند.

وایت و همکاران (۲۰۰۵) بررسی اثر استقرار گیاهان به اضافه‌ی افزودن کود بر تخریب زیستی هیدروکربن‌های آروماتیک پلی‌سایکلیک آلکیل شده در یک خاک آلوده به نفت خام را مطالعه کردند. تیمارها شامل شاهد بدون گیاه و بدون کوددهی، مخلوط فسکیو و چمن به اضافه‌ی کود یا مخلوط فسکیو و چمن برمودا به اضافه‌ی کود در ۴ تکرار بودند. پوشش گیاهی در محلی که غلظت TPH برابر $9/175 \text{ mg/kg}$ بود با موفقیت استقرار یافت. در حالیکه نفتالن‌های ۲ حلقه‌ای آلکیل شده در همه‌ی تیمارها بطور مساوی تخریب شده بودند تخریب TPH در پلات‌های کشت شده و کوددهی شده نسبت به پلات‌های کشت نشده و بدون کوددهی بیشتر بود.

دریابییگی زند و همکاران (۱۳۸۶) در تحقیقی به بررسی پارامترهای رفتاری ۵ گونه گیاهی یونجه، کرچک، آفتابگردان، کتان و ذرت بلالی در خاک بسیار آلوده (بدون کود و کوددار) و توانایی آن‌ها در حذف ترکیبات نفتی از خاک پرداخته‌اند. پایش رشد گیاه در روزهای ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ انجام گرفت. آنالیز غلظت آلودگی در خاک به روش گازکروماتوگرافی (GC) با آشکارگر FID انجام گرفت (هشت نمونه خاک با سه تکرار). آلودگی نفتی دارای تأثیر قابل ملاحظه بر رشد گیاهان بود. گونه‌های آفتابگردان و ذرت بلالی نسبت به سایر گونه‌ها از رشد بهتری در خاک‌های آلوده برخوردار بودند. در میان گیاهان رشد کرده در خاک آلوده، بیشترین ارتفاع اندام هوایی در گونه‌ی گیاهی آفتابگردان (تیمار I-۲۵/۵ سانتی‌متر)، حداکثر طول ریشه در گیاه کرچک (تیمار H-۲۶ سانتی‌متر)، حداکثر بیوماس خشک ریشه در آفتابگردان (تیمار I-۴/۲ گرم) و بیشترین بیوماس خشک

اندام هوایی برای درت بلالی (تیمار E-۲/۶ گرم) به دست آمد. همچنین در میان کودهای استفاده شده، کود پیت بهترین کارایی را بر رشد گیاهان در خاک آلوده به ترکیبات نفتی نشان داد. حداکثر میزان حذف TPHs در کتان (۸۷/۶۳ درصد) مشاهده شد به طوری که این گونه‌ی گیاهی توانست در مدت سه ماه بیش از ۳۵۰۰۰ mg/kg از ترکیبات نفتی خاک را حذف کند. نتایج این تحقیق نشان داد تکنولوژی زیست‌پالایی گیاهی روشی مؤثر و نوید بخش در حذف آلودگی نفتی از خاک‌های بسیار آلوده می‌باشد.

پان و همکاران (۲۰۰۸) مکانیسم‌ها و راندمان حذف و پاک‌سازی هیدروکربن‌های آروماتیک پلی‌سایکلیک (PAHs) در خاک‌ها را توسط الگوهای کشت متفاوت با گیاه خردل (*Brassica campestris*) و گیاه یونجه (*Medicago sativa*) به وسیله‌ی آزمایش‌های گلدانی در یک گلخانه مطالعه کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که راندمان پاک‌سازی تحت کشت مخلوط یونجه و خردل بطور معنی‌داری از تحت تک کشتی وقتی که غلظت‌های اولیه‌ی فنانترن و پایرن به ترتیب ۳۲۲/۰۶-۲۰/۰۵ mg/kg و ۳۲۱/۴۲-۲۰/۲۴ mg/kg بود تجاوز کرد. بعد از ۷۰ روز پس از کشت، مقادیر PAHs قابل استخراج در خاک تحت کشت مخلوط خیلی کمتر از تحت تک کشتی بود. به ترتیب حدود ۸۳/۵۲-۶۵/۱۷ درصد از فنانترن و ۶۰/۰۹-۷۵/۳۴ درصد از پایرن از خاک تحت کشت مخلوط حذف شده بود که بطور متوسط ۴۳/۲۶ و ۴۰/۳۸ درصد برای فنانترن و ۱۱/۰۳ و ۱۶/۲۹ درصد برای پایرن از تحت تک کشتی بیشتر بود. ظاهراً یونجه و خردل PAHs را از خاک‌ها جذب و انباشته کرده بودند. غلظت‌های PAHs بطور یکنواخت در گیاهان با افزایش غلظت PAHs اولیه در خاک افزایش یافت؛ تجمع PAHs در گیاهان بصورت توالی ذیل: ریشه‌ها < بخش‌های بالایی، فنانترن < پایرن و تک کشتی < کشت مخلوط در همان سطح آلودگی را نشان داد. با وجود حضور پوشش گیاهی پاک‌سازی

PAHs در خاک‌ها بطور معنی‌داری افزایش یافت و شرکت ضایعات بی‌جان، جذب گیاهی، تجمع و تخریب میکروبی خیلی کمتر از فعل و انفعالات میکروبی-گیاهی در فرایند گیاه‌پالایی بود. بنابراین برهم‌کنش میکروبی-گیاه برای افزایش پاک‌سازی آلودگی PAHs خاک تحت مدل‌های کشت مخلوط مکانیسم‌های اصلی هستند. نتایج امکان‌پذیری تشکیل گیاه‌پالایی چند گونه‌ای را برای بهبود راندمان پاک‌سازی PAHs پیشنهاد می‌کند، که ممکن است تجمع PAHs در محصولات را کاهش دهد و بنابراین خطر آن‌ها را نیز کاهش می‌دهد.

۲-۴-۲ روش‌های دیگر پاک‌سازی آلودگی نفتی

علاوه بر روش‌های زیستی رایج ذکر شده، روش‌های زیستی و فیزیکی و شیمیایی دیگری نیز برای پاک‌سازی خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی وجود دارند که در ادامه آورده شده است.

۲-۴-۱ جانوران خاکزی

شفر و همکاران (۲۰۰۵) پویایی جمعیت و فعالیت میکروبی در خاک‌های آلوده به نفت را که با یا بدون کرم‌های خاکی خوابانیده شده بودند مطالعه کردند. ۳ گونه‌ی کرم خاکی (*Eiesenia fetida*, *Allolobophora chlorotica*, *Lumbricus terrestris*) در خاک آلوده به نفت خام خوابانیده شده بودند (۱۰۰۰۰ mg/kg) هیدروکربن‌های نفت خام کل (TPH) و یک خاک مرجع به مدت ۲۸ روز به عنوان تیمار شاهد با مخلوط کود دامی و یا مکمل کود گاوی نیز خوابانیده شده بود. در خاک‌های آلوده به نفت خام، تنفس و غلظت بیوماس میکروبی با اصلاح توسط کرم خاکی بطور معنی‌داری افزایش یافت و غلظت‌های TPH بطور معنی‌داری کاهش یافت. شاید در نتیجه‌ی تفاوت در رفتار، این اثرات در تیمارهای با *A.chlorotica* کمتر

مشهود بود، چون افراد این گونه‌ی Endogeic در یک حالت رکود (عدم فعالیت) یافت شده بودند (تابستان گذرانی). پویایی جمعیت میکروبی به‌وسیله‌ی آنالیزهای اسید چرب فسفولیپیدی (PLFA) توصیف شده بود. بعد از ۲۸ روز تغییرات مشابه در ترکیب PLFA خاک‌های آلوده به نفت خام صرف نظر از گونه‌های کرم مشاهده شده بود. نسبت قارچی: باکتریایی در حضور کرم‌ها افزایش یافته بود، اما افزایش کود دامی به عنوان منبع غذایی، تعیین کننده‌ی یک اثر نامشخص روی سوبستراهای قابل متابولیز بود. نتایج نشان دادند که کرم‌های خاکی می‌توانند بطور مثبت در پاک‌سازی زیستی خاک‌های آلوده به نفت شرکت کنند اما ممکن است اثرات آن‌ها وابسته به گونه باشد.

۲-۴-۲ کمپوست کردن

لایو و همکاران (۲۰۰۳) با استفاده از کمپوست قارچ کوبیده به عنوان محصول جانبی باطله‌ی صنعت قارچ پاک‌سازی زیستی خاک آلوده به PAH ۵ درصد افزایش دادند. تخریب کامل نفتالن، فناترن، بنزوپایرن و بنزوپیریلین در مدت ۴۸ ساعت و دردمای ۸۰ درجه‌ی سانتیگراد مشاهده شد. هادرلین و همکاران (۲۰۰۵) اثرات کمپوست کردن یا افزودن ساده‌ی کمپوست به خاک در طی معدنی شدن پایرن و بنزوپایرن توسط افزودن برگ درخت افرا و یونجه را مطالعه کردند. آن‌ها گزارش کردند که نه کمپوست کردن و نه افزودن کمپوست اثری بر معدنی شدن بنزوپایرن نداشته است. در مقابل سرعت معدنی شدن پایرن بطور چشمگیری با مدت زمانی که خاک کمپوست می‌شده است افزایش یافت (بیش از ۶۰ درصد معدنی شدن پس از ۲۰ روز). آنتیزارلادیسلاو و همکاران (۲۰۰۵b, ۲۰۰۶) تکنولوژی کمپوست کردن در مخزن را برای پاک‌سازی خاک آلوده به زغال استفاده کردند و گزارش کردند که دمای کمپوست کردن خاک در ۳۸ درجه‌ی سانتیگراد برای تخریب مؤثرتر بهینه شد.

لی و همکاران (۲۰۰۸) برای آزمون اثرات اصلاح کننده‌ها بر روی تخریب عناصر سنگین نفت، یک آزمایش در مقیاس پایلوت در صحرا به مدت ۱۰۵ روز اجرا کردند. در طی آزمایش نمونه‌های خاک بطور دوره‌ای برای تعیین میزان هیدروکربن‌های باقی‌مانده جمع‌آوری و آنالیز شدند و اثرات اصلاح کننده‌ها بر روی فعالیت میکروبی ارزیابی شد. بعد از ۱۰۵ روز سطح اولیه آلاینده ((میلی گرم هیدروکربن بر کیلوگرم خاک) mg hc/kg soil 7490 ± 480) در خاک اصلاح شده ۴۰-۱۸ درصد کاهش یافته بود، در حالی که در خاک اصلاح نشده فقط ۹ درصد کاهش یافته بود. تخریب عناصر سنگین نفت در خاک اصلاح شده با کمپوست سریع‌تر و کامل‌تر از خاک‌های اصلاح شده با مواد غذایی معدنی، خاک اره و علف خشک بود. در میان پارامترهای میکروبی مطالعه شده، فعالیت‌های دهیدروژناز، لیپاز و اوره آز خاک قوی‌تر بودند و همبستگی منفی با تخریب زیستی عناصر سنگین نفت در خاک اصلاح شده با کمپوست داشت ($P < 0.01$).

آبیوی و همکاران (۲۰۱۰) سه زباله‌ی آلی (پوست موز BS، دانه‌ی استفاده شده در کارخانه‌ی آجیو سازی BSG، و کمپوست قارچ استفاده شده SMC) آلوده شده با روغن موتور مصرف شده را استفاده کردند تا پتانسیل این زباله‌های آلی را در تسهیل تخریب زیستی روغن موتور مصرف شده در خاک را تعیین کنند. سرعت تخریب زیستی روغن موتور در یک دوره‌ی ۸۴ روزه تحت شرایط آزمایشگاهی مطالعه شده بود. تعداد باکتری‌های مصرف کننده‌ی هیدروکربن در خاک اصلاح شده با زباله‌ها در مقایسه با خاک اصلاح نشده (شاهد) در طول ۸۴ روز مطالعه بالا و بین $10^6 \times 80/5$ cfu/g و $10^6 \times 10/2$ بود. خاک آلوده به نفت (روغن موتور) اصلاح شده با BSG بیشترین کاهش را در هیدروکربن کل نفت خام با تلفات خالص ۲۶/۷۶ درصد در ۸۴ روز در مقایسه با سه تیمار دیگر نشان داد. مدل سینیتیکی

مرتبه اول آشکار کرد که BSG در بین سه زباله آلی استفاده شده با ثابت سرعت تخریب زیستی ۰/۳۱۶۳ بر روز و نیمه عمر ۲/۱۹ روز بهترین بود. نتایج بدست آمده نشان داد که پتانسیل زباله‌های آلی برای پاک‌سازی زیستی نفت (روغن موتور) به ترتیب دانه‌ی مصرف شده در کارخانه‌ی آجیو سازی < پوست موز < کمپوست قارچ مصرف شده بود.

رز و همکاران (۲۰۱۰) یک آزمایش میدانی ۸ ماهه، با استفاده از لجن فاضلاب کمپوست شده (CS) و لجن فاضلاب تازه (FS) و خاک اصلاح نشده (US) بر روی یک خاک نیمه خشک آلوده به هیدروکربن قدیمی انجام دادند. تیمارهای FS (لجن فاضلاب تازه) درصد بیشتری از تخریب هیدروکربن (۴۶ درصد) و بالاترین جمعیت قارچی و باکتریایی را منجر شد. آنالیز Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) تفاوت در ساختار جوامع قارچی و باکتریایی درمان شده در مقایسه با خاک آلوده نشده (شاهد) را نشان داد. زمان نمونه گیری برای اغلب اختلافات بر اساس نوع تیمار محاسبه شد. راسته‌ی اصلی مشاهده شده در تیمار زیست‌پالایی *Acinetobacter* و *Ascomycota* بودند. نتایج بر افزایش اصلاح کننده‌های زیستی به ویژه لجن فاضلاب به عنوان یک استراتژی مفید تاثیر فرایند زیست‌پالایی کشت زمین در خاک‌های آلوده به هیدروکربن دلالت می‌کند.

۲-۴-۳-۲ از زونه کردن

توانایی پیش اکسیداسیون با استفاده از از زونه شدن و درمان شبیه به Fenton برای غلبه کردن بر سرسختی PAH برای تخریب زیستی و درمان بیولوژیکی در حذف PAH در خاک آلوده به روغن قیر (کروزوت) نسبت به کاربرد تنه‌های آن (پیش اکسیداسیون) مؤثرتر بود (کولیک و همکاران، ۲۰۰۶).

آن و همکاران (۲۰۰۵) پتانسیل تخریب PAH میکروارگانسیم‌های بومی در خاک‌های ازونه شده را بررسی کردند. pH و غلظت میکروبی در خاک با افزایش زمان ازونه شدن کاهش یافته بود و کاهش بیشتر در خاکی که به مدت ۹۰۰ دقیقه ازونه شده بود مشاهده شد. هرچند بیشترین حذف بعد از زیست‌پالایی در خاک ۱۸۰ دقیقه ازونه شده مشاهده شده بود در حالیکه یک حذف قابل چشم‌پوشی در خاک با ۹۰۰ دقیقه ازونه شده نشان داده شد. آن‌ها زمان مناسب ازونه شدن ترکیب با فعالیت میکروارگانسیم‌های بومی زنده مانده که بعد از ازونه شدن توانستند پاک‌سازی را بالا ببرند محاسبه کردند. آماهونی و همکاران (۲۰۰۶) پتانسیل کاربرد درمان ازون را با زیست‌پالایی برای حذف فنانتین از انواع متفاوت خاک‌ها را مطالعه کردند. میزان رطوبت خاک و حضور رس تاثیر معنی‌داری را بر روی راندمان تخریب نشان داد. خاک‌های هوا خشک حذف بیشتری از فنانتین را نشان دادند و حضور رس راندمان درمان را کند نشان داد.

۲-۴-۲ افزایش کود و مواد اصلاح کننده

مینایی تهرانی و همکاران (۱۳۸۴) در یک تحقیق چگونگی تخریب زیستی نفت خام در خاک در مقیاس نیمه صنعتی (پایلوت) را مطالعه کردند. قطعه زمین‌هایی به ابعاد ۲×۱ متر و ارتفاع ۷۰ سانتی متر از سیمان تهیه شد و خاک آلوده به نفت خام سنگین (V/W) ۲ درصد (۲۰۰۰۰ppm) در حدود ۰/۸ متر مکعب به هر خاک اضافه شد و مواد افزودنی شامل کود شیمیایی فسفات و نیترا، کود حیوانی و تراشه‌ی چوب به خانه‌های مختلف اضافه شد و روند تخریب زیستی نفت در هر خانه در مدت ۱۲ ماه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیشترین کاهش به میزان ۶۵ درصد در زمینی که به آن کود شیمیایی و همزمان تراشه‌ی چوب داده شده بود دیده شد. در زمینی که به آن کود حیوانی اضافه شده بود

مقدار کاهش در حدود ۶۰ درصد و در زمینی که در آن فقط از کود شیمیایی استفاده شده بود، کاهش نفت در حدود ۵۵ درصد بود. در نهایت در زمینی که در آن هیچ‌گونه از فاکتورهای مواد افزودنی اعمال نشده بود میزان کاهش در حدود ۵۰ درصد بود. به این ترتیب مشاهدات آن‌ها نشان داد که استفاده‌ی هم‌زمان از تراشه‌ی چوب و کود شیمیایی و یا استفاده از کود حیوانی در خاک می‌تواند راندمان تخریب زیستی نفت را بالا ببرد.

شریفی حسینی و همکاران (۱۳۸۸) در تحقیقی نفت خام چاه شماره ۶۹ میدان نفتی مارون، با غلظت ۱ درصد وزنی بر سطح خاک اسپری و سپس کود شیمیایی NPK با غلظت ۰، ۱ و ۲ تن در هکتار را با ۳ تکرار به عنوان تیمار به خاک اعمال کردند. پس از مدت زمان ۵ و ۱۰ هفته ماندگاری تحت شرایط رطوبتی ۲۰ درصد وزنی و هوادهی مناسب از ظروف نمونه‌برداری به عمل آمد. تجزیه‌ی مواد نفتی در طی پروسه زیست‌پالایی در خاک اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که تیمارهای اعمال شده باعث تجزیه‌ی ۴۵-۶۰ درصد آلودگی نفتی در خاک شدند و نتایج کروماتوگرافی گازی نیز کاهش در کلیه‌ی مقادیر نرمال آلکان‌ها و ایزوپرونوئیدها مانند فیتان و پرستان را نشان داد. بنابراین اعمال تیمار کود شیمیایی با غلظت ۲ تن در هکتار به خاک‌های آلوده به نفت به مدت زمان ۵ هفته یک تیمار بهینه برای خاک‌های آلوده به نفت منطقه می‌باشد.

احمدی مقدم و کمانی (۱۳۸۳) گزارش کردند که کاربرد آنزیم‌های آزاد و غیرمتحرک شده‌ی اکسیدو-ردوکتازها و هیدرولازها در خاک می‌تواند آلاینده‌های آروماتیک مانند ۲-۴ دی‌کلروفل و دی‌متوکسی‌فل را کاهش دهد. پایداری و کارایی چنین آنزیم‌هایی در خاک به ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و زیست‌شناختی خاک و همچنین اندازه و نوع مواد افزوده شده به خاک بستگی دارد.

۲-۴-۵ سیستم فاز دوغابی

بوپاتی (۲۰۰۳ و ۲۰۰۴) محیط‌های بی‌هوازی را در سیستم‌های فاز دوغابی خاک تحت شرایط پذیرنده‌ی الکترون مخلوط با درجه‌ی خوب موفقیت برای زیست‌پالایی رسوبات سوخت دیزل را استفاده کرد.

بیسوایس و همکاران (۲۰۰۵) نقش جاذب‌هایی همچون پیت_جذب و کاغذ_جذب در جذب دیزل خاک آلوده به نفت به وسیله‌ی یکی شدن با زیست‌پالایی فاز دوغاب خاک را نشان دادند.

اوکیه من و اوکیه من (۲۰۰۲) اثر لجن پردازش شده‌ی رزین طبیعی را بر تخریب هیدروکربن‌های نفت خام در خاک مطالعه کردند. نمونه‌های خاک آلوده به نفت خام (۵ قسمت نفت خام هوادیده در ۱۰۰ قسمت خاک؛ برابر با ۵۰۰۰۰ mg نفت در ۱ kg خاک) در آب دیونیزه دوغاب شد (۳۰۰ درصد ظرفیت نگهداری آب خاک) و با مقایسه مختلف لجن پردازش شده‌ی رزین طبیعی (میزان نیتروژن ۶۲/۱۵ mg/kg و میزان فسفر ۸/۷۵ mg/kg) با هم زدن خوب و مستمراً هواده‌ی شده در ۲۹ درجه سانتیگراد در مخزن عمل آوری شد. تغییرات در میزان هیدروکربن کل نمونه‌ی خاک با استفاده از تکنیک اسپکتوفتومتری در یک تابع زمانی تعیین شد. مقدار تخریب نفت خام در خاک عمل آوری شده با لجن به طور برجسته بالاتر از نمونه‌ی خاک عمل آوری نشده بود. راندمان تخریب زیستی هیدروکربن‌های نفت خام با استفاده از تکنیک فاز دوغاب با تکنیک فاز جامد قابل مقایسه بود.

۲-۴-۶ احیاء

چانگ و همکاران (۲۰۰۲) تخریب هوازی PAHs را در انواع مختلف خاک‌های تحت شرایط غنی از مواد معدنی را بررسی کردند و تحقیقات آن‌ها نشان داد که تخریب سریع PAH در یک مخلوطی از جاذب‌های PAH در مقایسه با حضور سوبسترای تنها مشاهده شد. تخریب بی‌هوازی PAH های ۲، ۳ و ۴ حلقه‌ای در شرایط خوابانیدن بهینه‌ی $pH=8$ و ۳۰ درجه‌ی سانتیگراد مشاهده شد. در میان ۳ وضعیت مطالعه شده، وضعیت احیاء سولفاتی (SRC) بیشترین راندمان را در مقایسه با وضعیت متانوزنیک و وضعیت احیاء نیتراتی (NRC) را نشان داد.

کووانو و شیمیزو (۲۰۰۶) زیست‌پالایی خاک آلوده به هیدروکربن مشتق شده از زغال‌سنگ تحت SRC (وضعیت احیاء سولفاتی) در بیوراکتورهای (راکتورهای زیستی) ستون خاک را گزارش کردند. داده‌های آزمایشی تاثیر SRC را در تبدیل PAHs با وزن مولکولی بالاتر به PAHs با وزن مولکولی پایین‌تر را آشکار کرد و آن‌ها پیشنهاد کردند که ائتلاف فرآیندهای هوازی بعد از عملیات بی‌هوازی می‌تواند در پاک‌سازی بیشتر PAHs با وزن مولکولی پایین‌تر نتیجه دهد.

۲-۴-۷ مواد شوینده

سیدرضوی و همکاران (۱۳۹۰) تاثیر شوینده‌ی زیستی Saponin بر حذف نفت خام از خاک با غلظت‌های آلودگی ۳۰۰۰۰ ppm و ۱۰۰۰۰ ppm در ستونی از خاک به ارتفاع ۱۵ سانتیمتر و قطر ۹ سانتیمتر پس از ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار دادند. مشخصه‌های آزمایشگاهی و مقادیر مختلف موادی که در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفتند عبارتند از: غلظت محلول شوینده (۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ درصد وزنی)؛ pH (۴، ۷، ۹ و ۱۱)؛ نمک NaOH و

پلیمر XanthanGum نیز در مقادیر به ترتیب (۰/۶ و ۰/۱ درصد وزنی) و (۰/۷ و ۰/۲ درصد وزنی) به عنوان مواد افزودنی برای حالات بهینه، برای بررسی امکان افزایش بازده حذف، مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج نشان داد حالات بهینه‌ی حذف برای هر ۲ غلظت آلاینده در $pH=11$ روی داده و غلظت محلول شوینده‌ی بهینه برای غلظت آلودگی 10000 ppm ، ۰/۱ درصد وزنی و برای 30000 ppm ، ۰/۲ درصد وزنی و بازده حذف نفت خام از خاک نیز به ترتیب ۶۹ و ۷۲ درصد است. نمک و پلیمر نیز در مقادیر ۰/۷ و ۰/۲ درصد وزنی (به ترتیب برای NaOH و XanthanGum) موجب افزایش نسبی بازده حذف تا ۷۱ و ۷۵ درصد شدند.

۲-۴-۸ زمین پالایی

گانگی و همکاران (۲۰۰۷) در یک مطالعه‌ی موردی از زمین پالایی خاک‌های آلوده به نفت خام در محل ریزش نفت دریافتند که اعمال هواده‌ی و کاربرد مواد آلی دارای نیتروژن و فسفر و تلقیح میکروبی باعث تجزیه‌ی ۷۵ درصد از آلاینده‌ها می‌شود.

هارمسن (۱۹۹۱) فرایند زمین پالایی را روشی مؤثر و در عین حال ساده، کم هزینه و اقتصادی جهت پالایش آلاینده‌های آلی به ویژه آلاینده‌های نفتی گزارش نمود. پاپ و متیو (۱۹۹۳) برخی از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک آلوده نظیر بافت خاک، وزن مخصوص ظاهری، هدایت هیدرولیکی، ظرفیت تبادل کاتیونی، میزان عناصر غذایی، نوع و تعداد ریزجانداران خاک را بر سرعت و میزان پالایش فیزیکی خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی مؤثر ذکر کردند.

پژوهش‌های بسیاری به نقش مؤثر ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی بر امکان و سرعت زمین پالایی این خاک‌ها اشاره دارند (گوی و همکاران

۲۰۰۶). اویانگ و همکاران (۲۰۰۵) نیز pH خاک را به سبب تاثیر فعاليت ریزجانداران خاک بر تجزیه و تخریب هیدروکربن‌های نفتی، عاملی مؤثر بر میزان و سرعت پالایش این دسته از آلاینده‌های آلی گزارش کردند.

هاروی پاتریسیا و همکاران (۲۰۰۲) در مطالعه‌ی خود دریافتند که قابلیت دسترسی زیستی یکی از مهم‌ترین فاکتورهای محدودکننده‌ی پالایش زیستی آلاینده‌های آلی است. قابلیت دسترسی زیستی، به ساختار خاک (از لحاظ مقدار مواد هومیک، pH، میزان رطوبت و تخلخل) و همچنین به خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آلاینده بستگی دارد.

۲-۴-۹ روش‌های تلفیقی

تکنیک‌های تلفیقی که نتایج بهتری از نظر رفع آلودگی دارند قادر به اصلاح بهتر هیدروکربن‌های پایا از خاک‌ها هستند. که دونگ هوآنگ و همکارانش در سال ۲۰۰۵ از سیستم چند مرحله‌ای گیاه‌پالایی^۱ که ترکیبی از کشت زمین باکتری کاهش دهنده آلودگی، ریزوباکتر افزایش دهنده رشد گیاه، و رشد گیاه مقاوم به آلودگی بود استفاده کردند. در این مطالعه، از روش MPPS برای خاک آلوده ناشی از نفت عالی در یک منطقه کشاورزی در سارینا، آنتاریو در کانادا استفاده شده است. این خاک آلوده به لجن پالایشگاه نفت، به میزان تقریباً ۵ (w/w) درصد کل هیدروکربن‌های نفت خام (TPH) بود. در دوره اولیه ۴ ماهه، میانگین بازده، رفع کل هیدروکربن‌های پایدار توسط MPPS دو برابر بیشتر از روش کشت زمین به تنهایی، و ۵۰ درصد بیشتر از اصلاح زیستی به صورت تنها و ۴۵ درصد بیشتر از گیاه‌پالایی به صورت تنها موثر بوده است. بعد از دوره دوم ۴ ماهه، به روش MPPS، ۹۰ درصد از TPH ها را از خاک حذف نمود.

^۱ Multi-process phytoremediation system (MPPS)

هانگ و همکاران (۲۰۰۴) یک تکنیک چند فرآیندی شامل ترکیبی از سیستم‌های گیاه‌پالایی، فیزیکی، فتوشیمیایی و پاک‌سازی میکروبی را برای پاک‌سازی خاک آلوده به قیر را به کار بردند. تکنیک‌های به کار رفته کشت زمین (هوادهی و پرتودهی سبک)، شناسایی باکتری‌های مخرب آلاینده و باکتری‌های بهبود دهنده رشد گیاه و رشد گیاه مقاوم به آلودگی تالفسکیو^۱ بود. بعد از یک دوره ۴ ماهه، میانگین راندمان حذف ۱۶ PAHs اولیه توسط این سیستم پاک‌سازی چند فرآیندی ۲ برابر بیشتر از لندفارمینگ، ۵۰ درصد بیشتر از زیست‌پالایی به تنهایی و ۴۵ درصد بیشتر از خود گیاه‌پالایی بود.

بسالت پور و همکاران (۱۳۸۶) در پژوهشی با استفاده از خاک کامل آلوده به هیدروکربن‌های نفتی (تیمار C_x) و خاک بدون آلودگی (تیمار C_0)، سطوح متفاوت آلودگی را با نسبت‌های وزنی ۱:۱ (تیمار C_1) و ۱:۳ (تیمار C_2) ایجاد کردند. سپس قابلیت پالایش خاک‌های مذکور توسط چهار گیاه آفتابگردان، گلرنگ، اگروپایرون و تالفسکیو، در ۴ تکرار مورد بررسی قرار گرفت. در روش پالایش مکانیکی نیز از ادوات دستی جهت زیرورو کردن خاک و سپس آبیاری در حد ظرفیت زراعی استفاده شد. در ابتدا و انتهای دوره ۴ ماهه‌ی آزمایش، غلظت کل هیدروکربن‌های نفتی (TPHs) و نیز برخی از هیدروکربن‌های چندحلقه‌ای (PAHs) در هر یک از تیمارهای گیاهی و مکانیکی با عصاره‌گیری به روش سوکسله و سپس قرائت با دستگاه GC تعیین شد. نتایج پژوهش آن‌ها نشان داد که بیشتری کاهش در میزان غلظت TPHs در حضور گیاهان اگروپایرون و تالفسکیو به ویژه در سطح پایین‌تر آلودگی بود. اعمال تیمار مکانیکی در همه‌ی سطوح آلودگی موجب کاهش معنی‌دار

¹ *Festuca arundinacea*

در غلظت TPHs شد. در کل استفاده از روش مکانیکی پیش از اعمال گیاه‌پالایی خاک‌های آلوده را پیشنهاد کردند.

دریابییگی زند و همکاران (۲۰۱۰) گیاه‌پالایی هیدروکربن‌های نفت خام کل (PAHs) را با استفاده از گونه‌های گیاهی در ایران را مطالعه کردند. هدف اصلی مطالعه‌ی آن‌ها بررسی اثر هیدروکربن‌های نفت خام با غلظت اولیه‌ی بالا (حدود ۳/۵ درصد) بر روی خصوصیات رشدی ذرت (*Zea mays* L.) و تال فسکیو (*Festuca arundinacea*) و همچنین ارزیابی پتانسیل گیاه‌پالایی ۲ گونه‌ی گیاهی مذکور در خاک با آلودگی بالا بود. برای بهبود شرایط تغذیه‌ای خاک و همچنین مطالعه‌ی اثر اصلاح‌کننده‌های خاک بر روی رشد گیاه، اصلاح‌کننده‌ی پیت نیز مطرح شد. نمونه‌های خاک برای تفکیک TPH توسط GC-FID آنالیز شدند. گونه‌های گیاهی بکار رفته رفتار رشدی امید بخشی را در غلظت بالای آلاینده‌ی خاک نشان دادند. کاهش TPHs در انتهای مسیر آزمایش در همه‌ی تیمارها یافت شد. حداکثر حذف در تال فسکیو بدست آمد، که تال فسکیو ۹۶/۳ درصد TPHs اولیه‌ی خاک را حذف کرد. اصلاح‌کننده‌ی پیت اثر مثبتی را بر روی رشد گیاه در خاک آلوده نشان داد. نتایج نشان دادند که ۲ گونه‌ی گیاهی مطالعه شده در حذف TPHs از خاک آلوده شده امید بخش و مؤثر بودند.

۲-۵ یونجه

بیشتر یونجه‌های یکساله در نواحی مدیترانه‌ای در طول زمستان رشد می‌کنند، علاوه بر اینکه یونجه‌های یکساله در برابر سرما مقاومت مناسبی از خود نشان می‌دهند، واجد صفاتی چون مقاومت در برابر آفات، بنیه به نسبت خوب گیاهچه، تولید علوفه با کیفیت بالا، تولید بذر زیاد و تنوع صفات مورفولوژیکی نیز می‌باشند. یونجه‌های یکساله از خانواده‌ی باقلا

هستند که توانایی زیادی در تثبیت ازت دارند. یونجه‌های یکساله واکنش‌های متفاوتی به شرایط نامساعد خاک از خود نشان می‌دهند به طوری که بعضی از گونه‌ها حتی در خاک‌های سبک اسیدی قادر به رویش هستند و به طور کلی در برابر شرایط نامساعد خاک مقاوم هستند (دی‌هان و برنز، ۱۹۸۱).

۲-۵-۱ شناسه‌های گیاهی یونجه

یونجه از بقولات علوفه‌ای چندساله و از خانواده‌ی بقولات است. برگ‌های آن سه برگچه‌ای مرکب هستند و به گونه‌ای پی‌درپی (متناوب) روی دمبرگ باریکی جا دارند. نوک برگچه‌ها کنگره‌ای هستند و برگچه‌ی میانی دارای دمبرگی کوتاه هستند؛ از آن‌سو، برگچه‌های کناری بدون دمبرگ هستند و یک‌راست به دمبرگ اصلی چسبیده‌اند. گیاه بالغ ۵ تا ۲۵ ساقه دارد که هر کدام به گونه‌ی معمولی به ۶۰ تا ۹۰ سانتی‌متر می‌رسند (مک‌لید و همکاران، ۱۹۸۸).

طوقه‌ی^۱ گیاه در آغاز از جایگاه گره لپه در نزدیکی سطح خاک از راه رشد فشرده‌ی محور زیرلپه^۲ پدید می‌آید. رشد و نمو جوانه و ساقه‌های دیگر در این گره و گره‌های قاعده‌ای نیز انجام می‌شود. بالندگی گسترده‌ی جوانه، همراه با رشد فشرده بعدی ساقه، جایگاه دائمی برای فعالیت مریستم پدید می‌آورد (بارنز و همکاران، ۱۹۸۵).

سامانه‌ی ریشه‌ای آن بیشتر راست است که تا عمق ۷-۹ متری یا بیشتر نفوذ می‌کند. توده‌ی ریشه با عمق ریشه کاهش می‌یابد، آن‌چنانکه ۶۰-۷۰ درصد همه‌ی حجم آن

^۱ Crown

^۴ Wing

^۲ Hypocotyledon

^۵ Kill

^۳ Standard

^۶ Medicago

در ۱۵ سانتی متری سطح خاک جا می گیرد. ریشه های افشان تا عمق ۲۰ سانتی متری پخش می شوند و بیشتر گره های ازت ساز روی آن ساخته می شوند.

گل آذین یونجه خوشه ای مانند و نیمه متراکم است. گل ها به رنگ ارغوانی، بنفش، زرد، آبی یا سفید و به گونه ای نامنظم با ۵ گلبرگ همانند یک درفش^۳، دو بال^۴ و دو ناو^۵ هستند. میوه ی یونجه غلاف نام دارد و بیشتر پیچ خورده و دارای چند بذر لوبیایی مانند است که به رنگ های قهوه ای یا زرد هستند (بحرانی، ۱۳۸۴).

۲-۵-۲ گونه ها و رقم های گوناگون یونجه

جنس مدیکاگو^۶ دست کم ۱۰۰ گونه یونجه دارد که بیشتر در سرزمین های مدیترانه ای پراکنده هستند و گسترش آن ها تا اروپای مرکزی و شمال آفریقا نیز انجام شده است. در این جنس، دو گونه یونجه ی پایا (چندساله) به نام های یونجه ی معمولی^۱ و یونجه ی گل زرد^۲ هست و دیگر یونجه ها، همه یکساله هستند (بارنز و همکاران، ۱۹۸۵).

۲-۵-۳ سازگاری محیطی یونجه

یونجه دارای توانایی سازش پذیری بی مانندی با شرایط آب و هوایی و خاک است. در دماهای زیر صفر (رقم های پایدار در برابر سرما) تا دماهای ۵۵ درجه ی سلسیوس و در بلندی های ۳۰۰۰ متری کشت آن، انجام شدنی است.

یونجه در خاک های عمیق لومی به خوبی رشد می کند، این خاک ها دارای خاک زیرین نفوذپذیر یا زهکشی شده هستند. یونجه در برابر دیگر بقولات علوفه ای به

^۱M.sativa L.

^۲M.falcata L.

اسیدیته‌ی خاک حساس است، در بیشتر زمین‌ها اسیدیته‌های ۶/۵ تا ۷/۵ برای رشد و نمو و عملکرد بهینه، خوب هستند (بارنز و همکاران، ۱۹۸۵).

گیاهچه‌ها و گیاهان جوان یونجه، تا اندازه‌ای به شوری خاک حساس هستند؛ ازینرو، کاشتن آن‌ها در شرایط خاک‌های شور دشوار است. ولی گیاهان صد در صد رشد یافته، در برابر شوری پایداری بیشتری دارند و تا ۰/۳ درصد نمک را تاب می‌آورند (بوئر و همکاران، ۱۹۶۹).

۲-۶ چمن

چمن‌ها جزء تیره‌ی گندمیان (*Poaceae*) محسوب شده و گیاهان علفی می‌باشند که در طول دوره‌ی رشد رویشی یا فاقد رشد طولی ساقه بوده و یا به میزان اندکی رشد طولی ساقه خواهند داشت. در واقع می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که بیشتر بخش رویشی آن‌ها شامل برگ است.

ریشه: ریشه چمن افشان و متراکم و نسبتاً کم عمق می‌باشد. عمق ریشه اغلب کمتر از یک متر و به ندرت بیش از دو متر است. در چمن‌های فصل سرد بهترین زمان رشد ریشه در اوایل بهار و پاییز است. ریشه در زمستان هم دارای رشد می‌باشد، مگر اینکه زمین یخ زده باشد.

۲-۶-۱ انواع چمن

الف) چمن فصل سرد یا چمن‌های سردسیری: این چمن‌ها مخصوص مناطق سردسیر و معتدل هستند. بهترین رشد خود را در دمای ۲۴-۱۵ درجه‌ی سانتیگراد دارند و دمای

بهینه برای رشد آن‌ها حدود ۲۰ درجه است. یخبندان را به خوبی تحمل می‌کنند اما در تابستان که گاهی دما ۳۰ تا ۴۰ درجه‌ی سانتیگراد است دچار رکود (چمن سبز است اما رشد نمی‌کند) می‌شوند. مهم‌ترین چمن‌های سردسیری جنس‌های *Poa*، *Lolium*، *Festuca*، *Agrostis* هستند.

ب) چمن فصل گرم یا چمن‌های گرمسیری: این چمن‌ها مخصوص مناطق گرمسیر که زمستان معتدل دارند هستند. بهترین رشد خود را در دمای ۳۲-۲۶ درجه‌ی سانتیگراد دارند و بیشترین رشد آن‌ها در فصل زمستان است. مهم‌ترین چمن‌های گرمسیری جنس‌های *Zoicia* و *Cynodon* هستند (دان و دیسبورگ، ۲۰۰۴).

بدین‌سان، پاک‌سازی زیستی به جایگزین جذاب برای روش‌های بازسازی فیزیکوشیمیایی تبدیل شد و رفع آلودگی میکروبیولوژیکی هیدروکربن‌های نفت در محیط‌های آلوده به جایگزین کارآمد، اقتصادی و مکمل درمان‌های فیزیکی و شیمیایی تبدیل شده است.

فصل سوم

مواد و روش ها

مواد و روش‌ها

۳-۱ تهیه‌ی خاک برای انجام پژوهش

در این پروژه، خاک مورد مطالعه از شرکت ملی پخش و پالایش فرآورده‌های نفتی ایران واقع در شرق شاهرود تهیه شد. آلودگی هیدروکربنی خاک از محلی که بطور طبیعی به ترکیبات نفتی آلوده شده بود، انتخاب شد. آلاینده‌ی هیدروکربنی خاک مورد نظر، از نوع نفت کوره بود. نفت کوره برشی از نفت خام تقطیر شده است که نقطه‌ی اشتعال آن ۴۰ درجه‌ی سانتیگراد است و عمدتاً به مایعی گفته می‌شود که برای سوختن در کوره و بویلر و موتورهای تولید انرژی مصرف می‌شود. نفت کوره از هیدروکربن‌های با زنجیره‌ی طویل به‌ویژه آلکان‌ها، سیکلوآلکان‌ها و آروماتیک‌ها تشکیل شده است. نفت کوره متشکل از سنگین‌ترین بخش‌های نفت خام و معمولاً فرآورده‌ی پایین ستون تقطیر در خلاء است و چون سیاه رنگ است به نفت سیاه نیز موسوم است.

۳-۱-۱ خصوصیات خاک

در ابتدا خاک توسط غربال درشت الک شد تا ذرات درشت خاک و قلوه سنگ‌های آن که قابل خرد شدن نبودند از خاک جدا شود و پس از گذشت زمان تعادلی (۴ ماه) خاک از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شد تا مخلوط یکنواختی حاصل گردد و به آزمایشگاه منتقل شد. مطالعات خاک‌شناسی نمونه‌های خاک حاوی هیدروکربن‌های نفتی (نفت کوره) شامل pH در سوسپانسیون ۱:۱ آب-خاک توسط دستگاه pH متر (توماس ۱۹۹۶)، قابلیت هدایت الکتریکی خاک (EC) با عصاره ۲:۱ آب-خاک با کمک دستگاه هدایت سنج (رودس، ۱۹۹۶)، مقدار آهک به روش تیتراسیون، نیتروژن با دستگاه کج‌دال (برمر، ۱۹۹۶)، کربن آلی با

روش سوزاندن تر (نلسون و سامر، ۱۹۸۲)، فسفر به روش اولسن (اولسن، ۱۹۵۴)، سدیم و پتاسیم با دستگاه فلیم فتومتر، کلسیم و منیزیم به روش تیتراسیون و بافت خاک به روش هیدرومتری (بویوکاس، ۱۹۶۲)، در آزمایشگاه انجام شد (جدول ۱ پیوست ۱).

افزایش هدایت الکتریکی خاک، رشد گیاه را تحت تاثیر قرار می‌دهد، لیکن اغلب گیاهان تا زمانی که هدایت الکتریکی بیشتر از ۴ دسی زیمنس بر متر نشود زیاد متاثر نمی‌شوند (دریابیگی‌زند و همکاران، ۱۳۸۹). خاک مورد استفاده در این تحقیق دارای EC برابر با ۱/۳۴ دسی زیمنس بر متر است (جدول ۱ پیوست ۱). همچنین آلودگی خاک به هیدروکربن‌های نفتی موجب کاهش جذب نیتروژن توسط گیاه و افزایش نسبت C/N می‌گردد. در خاک مورد مطالعه در این پروژه نیز نسبت C/N نسبتاً بالا بوده (حدود ۳۶/۵) و این امر می‌تواند موجب افت کارایی زیست‌پالایی گیاهی به دلیل کمبود نیتروژن برای متابولیسم هیدروکربن‌های نفتی گردد (آجیت‌کومار و همکاران، ۱۹۹۸). غلظت کل هیدروکربن‌های نفتی خاک در ابتدای آزمایش و بر اساس دستورالعمل EPA (آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا، ۲۰۰۱) به صورت انتقال آلودگی از ماتریکس خاک به سیال حلال به نام دی کلرومتان، تبخیر حلال و سنجش آلاینده‌ی هیدروکربنی بود اندازه‌گیری شد. بدین‌سان آلودگی اولیه‌ی خاک حدود ۱۶/۵ درصد برآورد شد، که این مقدار آلودگی برای گیاه بسیار بالاتر از ماکزیمم بازدهی گیاه‌پالایی بود که حداکثر معادل ۱۰ درصد برآورد شده است (شهریاری و همکاران، ۱۳۸۵)، بنابراین میزان آلودگی خاک آلوده به هیدروکربن‌های نفتی (نفت کوره) باید کاهش می‌یافت تا برای کشت گیاهان آماده می‌شد. بدین‌منظور، براساس نسبت وزنی و با توجه به وزن خاک موجود در هر گلدان (۳ کیلوگرم خاک در هر گلدان) نسبت خاک آلوده به هیدروکربن‌های نفتی (نفت کوره) و خاک

غیرآلوده (خاک رسی) تعیین شد. بنابراین برای هر گلدان ۳ کیلوگرمی، ۱/۳ کیلوگرم خاک آلوده به هیدروکربن‌های نفتی (نفت کوره) و ۱/۷ کیلوگرم خاک رسی توزین شد و این دو خاک کاملاً با هم مخلوط شد، که میزان آلودگی خاک آلوده به هیدروکربن‌های نفتی (نفت کوره) به ۶/۵ درصد رسید. این کار برای کل خاک آلوده به هیدروکربن‌های نفتی و برای تمام گلدان‌ها انجام شد و بنابراین تعداد ۷۲ عدد گلدان حاوی خاک آلوده به هیدروکربن‌های نفتی (نفت کوره) برای شروع کار آماده شد. همچنین مطالعات خاک‌شناسی نمونه‌های خاک آماده شده برای کشت (خاک حاوی هیدروکربن‌های نفتی (نفت کوره) مخلوط با خاک غیر آلوده) در آزمایشگاه اندازه‌گیری شد (جدول ۲ پیوست ۱).

۲-۳ انتخاب گیاهان برای انجام زیست‌پالایی گیاهی

شناسایی و انتخاب گونه‌های گیاهی مقاوم و مستعد احتمالی در حذف آلودگی هیدروکربن‌های نفتی به شرح زیر انجام گرفت:

الف) مطالعات کتابخانه‌ای به منظور شناسایی گونه‌های گیاهی مقاوم و مستعد در حذف آلودگی‌های نفتی از خاک با توجه به پژوهش‌های انجام شده در این زمینه.

ب) مطالعه‌ی مقالات به دست آمده از اینترنت که تحقیقاتی در زمینه‌ی زیست‌پالایی خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی توسط گونه‌های مقاوم و مستعد گیاهی انجام داده بودند.

ج) استفاده از راهنمایی اساتید محترم در زمینه استفاده از گونه‌های گیاهی مقاوم و مستعد و بومی منطقه نظیر یونجه برای پالایش خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی.

بعد از مطالعات لازم، در نهایت ۲ گیاه یونجه یکساله (*Medicago scutellata*) از خانواده‌ی باقلا (*Fabaceae*) و چمن پیازدار (*Poa bulbosa*) از خانواده‌ی گندمیان (*Poaceae*) انتخاب شدند (مرکل و همکاران، ۲۰۰۴).

در نهایت پس از انجام مطالعات لازم، بذر ۲ گیاه یونجه یکساله (*Medicago scutellata*) و چمن پیازدار (*Poa bulbosa*) از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد.

۳-۳ انتخاب باکتری

بر روی تحقیقاتی که بر روی گونه‌های مختلف باکتریایی در مقالات متعدد و مختلفی انجام شده بود مطالعات لازم انجام گرفت. گونه‌های باکتریایی که بیشتر به عنوان تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های نفتی عمل می‌کنند، عموماً شامل *Alkaligenes*، *Acinetobacter*، *Bacillus*، *Chromobacterium*، *Corynebacterium*، *Arthrobacter*، *Aeromonas*، *Brevibacterium*، *Azospirillum*، *Nocardia*، *Mycobacterium*، *Micrococcus*، *Klebsiella*، *Streptomyces*، *Rhodococcus*، *Vibrio*، *Pseudomonas*، *Flavobacterium* و راتلگ، ۱۹۸۴). بنابراین پس از مطالعه و تحقیق بر روی گونه‌های مختلف باکتریایی، در این پژوهش باکتری سودوموناس انتخاب شد، که در میان سویه‌های مختلف این گونه‌ی باکتریایی شامل *Pseudomonas pseudoalkaligenes*، *Pseudomonas alkaligenes*، *Pseudomonas putida* (به‌بود دهنده‌ی رشد گیاه PGPR) انتخاب شد. دلیل اصلی انتخاب این باکتری رایزوسفری (تثبیت‌کننده نیتروژن) توانایی آن در افزایش آزاد کردن ترکیبات آلی ساده توسط ریشه‌های گیاهی و

¹ *Pseudomonas putida*

پتانسیل مصرف هیدروکربن‌های نفتی در این گونه است (رادوان، ۲۰۰۹). پس از انجام مطالعات لازم، باکتری سودوموناس پوتیدا از شرکت زیست فن آور سبز تهران تهیه شد.

۳-۴ آزمایش گلخانه‌ای

برای آماده سازی خاک مورد نیاز، نمونه‌های خاک آلوده (با آلودگی اولیه ۱۶/۵ درصد) از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شده بودند و سپس با نسبت معینی از خاک رسی مخلوط شدند تا پس از گذشت زمان تعادلی کل آلودگی هیدروکربنی آن معادل ۶/۵ درصد رسید. مقدار ۳ کیلوگرم از خاک آلوده‌ی مورد نظر به هر گلدان انتقال داده شد. سپس بذور ۲ گیاه یونجه یکساله (*Medicago scutellata*) و چمن پیازدار (*Poa bulbosa*) در ۲ سطح تراکم (تراکم ۱۰ و ۲۰ عدد در گلدان برای گیاه یونجه یکساله و تراکم ۵ و ۱۰ عدد در گلدان برای گیاه چمن پیازدار) بر اساس میزان حداقل و حداکثر کاشت در هکتار (خطیبی و همکاران، ۱۳۸۸) و با ۲ تیمار با و بدون باکتری سودوموناس پوتیدا در ۳ مرحله‌ی رشدی گیاه (جوانه‌زنی، رویشی و زایشی) و ۳ تکرار در گلدان‌ها کشت شدند.

قبل از شروع کشت تست جوانه‌زنی بر روی بذور یونجه یکساله و چمن پیازدار انجام شد. به دلیل این‌که قوه‌ی نامیه‌ی بذور یونجه بسیار پایین بود قبل از شروع کشت، ابتدا تعدادی از بذور گیاه یونجه را در اسید سولفوریک ۹۸ درصد به مدت ۵ دقیقه خوابانیده (اسید شویی) و سپس بذور را با آب شستو داده و دوباره تست جوانه‌زنی بر روی بذور گیاه یونجه انجام شد اما باز هم درصد جوانه‌زنی قابل قبول نبود بنابراین اسید شویی بذور در مدت زمان ۱۰ دقیقه انجام شد این بار درصد جوانه‌زنی گیاه یونجه قابل قبول بود (۹۰ درصد جوانه‌زنی) سپس تمام بذور را به مدت ۱۰ دقیقه در اسید سولفوریک ۹۸ درصد خوابانده و بعد از آن بذور یونجه در گلدان‌ها قرار داده شد.

در تاریخ ۱۳۹۰/۷/۱۰ بذور یونجه و چمن درون گلدان‌های حاوی خاک آلوده به هیدروکربن‌های نفتی (نفت کوره) با آلودگی مشخص (۶/۵ درصد) کشت و گلدان‌ها به گلخانه منتقل و تحت شرایط نور و دمای کنترل شده قرار داده شدند، همچنین ۸ عدد گلدان حاوی خاک غیر آلوده نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد که به همراه سایر گلدان‌ها در شرایط گلخانه نگهداری شدند. این مطالعه بصورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۲ سطح تراکم، ۲ سطح باکتری (با و بدون باکتری)، ۳ مرحله‌ی ریشی و ۳ تکرار انجام شده است. تجزیه آماری داده‌ها نیز با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد. همچنین نمودارها با کمک نرم افزار Excel رسم شدند.

گلدان‌ها هر ۲ روز یک بار (هر بار حدود ۲۰۰ میلی‌لیتر) آبیاری می‌شدند و شرایط آن‌ها در گلخانه کنترل می‌شد تا زمان اولین جوانه‌زنی گیاهان ثبت شود. پس از گذشت ۹ روز اولین گیاهان جوانه زدند که در مقایسه با شاهد تاخیری در زمان جوانه زنی آن‌ها مشاهده نشد. جوانه‌زنی گیاهان به طور دقیق و مرتب کنترل می‌شد تا حداکثر درصد جوانه‌زنی گیاهان در خاک آلوده به هیدروکربن‌های نفتی حاصل گردد. پس از گذشت حدود یک ماه از کشت گیاهان در تاریخ ۱۳۹۰/۸/۹، وقتی که گیاهان در مرحله جوانه زنی بودند اولین نمونه برداری از خاک در مرحله‌ی جوانه‌زنی یونجه و چمن انجام شد. نمونه برداری از خاک از ۲۴ عدد گلدانی که برای مرحله‌ی جوانه‌زنی برای هر ۲ گیاه در نظر گرفته شده بودند به روش حفر دستی در ناحیه‌ی ریشه‌ی گیاهان (رایزوسفر) انجام گرفت. سپس نمونه‌های خاک به آزمایشگاه منتقل و پس از خشک شدن بصورت هوا خشک در دمای آزمایشگاه، برای آنالیز آماده شدند.

پس از برداشت نمونه‌ی خاک در مرحله‌ی جوانه‌زنی، سایر گلدان‌های باقی‌مانده حاوی یونجه و چمن برای مراحل رشد رویشی و رشد زایشی در گلخانه تحت شرایط کنترل شده نگهداری شدند. به دلیل پایین بودن درصد نیتروژن در خاک آلوده به هیدروکربن‌های نفتی (نفت کوره) در این مرحله به گلدان‌ها کود نیترات آمونیوم به صورت محلول در آب داده شد. همچنین به دلیل سرد شدن هوا و نیاز آبی کمتر گیاهان در این مرحله از رشد گلدان‌ها بصورت هفته‌ای یکبار آبیاری می‌شدند و وضعیت و شرایط محیطی آن‌ها به دقت بررسی می‌شد.

به دلیل سرمای زودرس هوا و کم شدن دمای گلخانه رشد گیاهان اندکی کند شد که پس از ایجاد شرایط دمایی مناسب وضعیت رشدی گیاهان مطلوب مشاهده شد. در این مرحله از رشد گیاهان، تعداد اندکی از گیاهان گلدان‌ها خشک شده بودند که قابل اغماض بودند (۳ گلدان هر کدام ۱ یا ۲ بوته در هر ۲ سطح تراکم). بنابراین در تاریخ ۱۳۹۰/۱۰/۲۰ حدود ۱۰۰ روز پس از کشت گیاهان، نمونه برداری خاک در مرحله‌ی رشد رویشی گیاهان از ۲۴ گلدان حاوی یونجه یکساله و چمن پیازدار انجام شد. در این مرحله نیز نمونه‌برداری به روش حفر دستی و از ناحیه‌ی ریشه گیاه (رایزوسفر) انجام شد. نمونه‌های خاک آلوده به هیدروکربن‌های نفتی (نفت کوره) برداشت شده در مرحله‌ی رشد رویشی به آزمایشگاه منتقل شد تا در دمای آزمایشگاه و بصورت هواخشک، رطوبت خود را از دست داده و خشک شوند و برای مرحله‌ی بعد یعنی آنالیز خاک آماده شوند.

۲۴ عدد گلدان باقی‌مانده دیگر که برای مرحله‌ی رشد زایشی گیاهان در نظر گرفته شده بودند هنوز در گلخانه و تحت شرایط گلخانه‌ای نگهداری می‌شدند. وضعیت این گلدان‌ها نیز به دقت بررسی و کنترل می‌شد. در این مرحله از رشد نیز گیاهان تعدادی از

گلدان‌ها خشک شده بودند که قابل اغماض بودند (۶ گلدان هر کدام ۱ یا ۲ بوته در هر ۲ سطح تراکم). بوته میری در مرحله رشد زایشی بیشتر بود. در این مرحله یعنی رشد زایشی گیاهان یونجه یکساله به همراه تیمار باکتری سودوموناس پوتیدا در هر ۲ سطح تراکم زودتر از گیاهان یونجه یکساله بدون تیمار باکتری سودوموناس پوتیدا به گل رسیدند و تشکیل غلاف دادند (کمتر از ۲ هفته). بنابراین گلدان‌های حاوی گیاه یونجه به همراه تیمار باکتری سودوموناس پوتیدا اواخر بهمن ماه یعنی در تاریخ ۱۳۹۰/۱۱/۲۶ و سایر گلدان‌ها در تاریخ ۱۳۹۰/۱۲/۱۱ نمونه برداری خاک آن‌ها انجام شد. در این مرحله یعنی مرحله‌ی رشد زایشی گیاهان نیز نمونه برداری به روش حفر دستی و از ناحیه‌ی ریشه گیاه (رایزوسفر) انجام شد. نمونه‌های خاک آلوده به هیدروکربن‌های نفتی (نفت کوره) برداشت شده در مرحله‌ی رشد زایشی به آزمایشگاه منتقل شد تا در دمای آزمایشگاه و بصورت هواخشک، رطوبت خود را از دست داده و خشک و برای آنالیز خاک آلوده به هیدروکربن‌های نفتی (نفت کوره) آماده شوند.

۳-۵ استخراج نفت از خاک

استخراج نفت از خاک طبق روش اصلاح شده‌ی Rocha-Marquez انجام شد. مقدار ۲ گرم خاک آلوده وزن شد و به آن حدود ۱۰ میلی لیتر حلال دی کلرومتان اضافه شد. مخلوط به شدت و به مدت ۱۰ دقیقه تکان داده شد. سپس مخلوط در دور ۳۰۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد تا خاک آن رسوب نماید. محلول روایی از خاک جدا شد و در ظرف شیشه‌ای که از قبل وزن شده بود ریخته شد. مرحله فوق دوباره تکرار شد. سپس اجازه داده شد که حلال دی کلرومتان برای مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه تبخیر شده و باقی مانده دوباره

وزن شد. این وزن مقدار نفت موجود در خاک را مشخص می‌کند (روکا-مارکوئز و همکاران، ۲۰۰۰).

آزمایش استخراج نفت از خاک برای تمام نمونه‌های خاک تهیه شده از ۳ مرحله رشد (جوانه‌زنی، رشد رویشی، رشد زایشی) گیاهان یونجه یکساله و چمن پیازدار انجام شد و وزن هیدروکربن‌های نفتی (نفت کوره) موجود در خاک و درصد وزنی آلودگی هیدروکربنی (نفت کوره) خاک محاسبه شد و نقش گیاهان در میزان این کاهش بررسی شد.

فصل چہارم

نتیجہ و بحث

نتایج و بحث

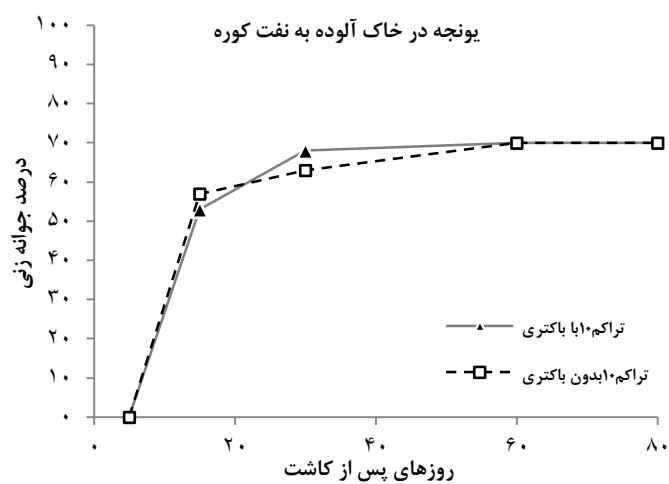
دراین پژوهش خاک آلوده به نفت (نفت کوره) تهیه شده از شرکت ملی پخش و پالایش فراورده‌های نفتی ایران واحد شاهرود مورد بررسی قرار گرفت. پس از تعیین میزان آلودگی خاک و کشت گیاهان مطابق مطالب گفته شده در فصل مواد و روش‌ها، تغییرات آلودگی نفتی در خاک مورد نظر مورد بررسی قرار گرفت. بنابراین در این فصل نتایج بدست آمده از این پژوهش به تفکیک ارائه خواهد گردید.

۴-۱ رشد و درصد جوانه زنی گیاه در خاک آلوده به هیدروکربن نفتی

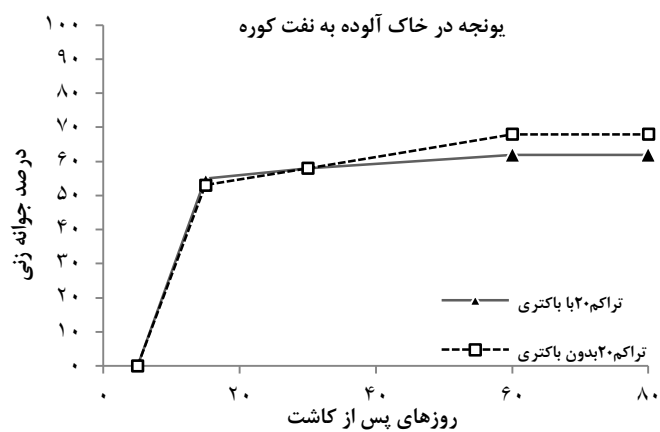
۴-۱-۱ سنجش میزان جوانه زنی گیاه یونجه در خاک آلوده به نفت کوره

با توجه به نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳ پیوست ۱) هیچکدام از اثرات تراکم گیاه و وجود باکتری و اثرات متقابل تراکم و باکتری بر درصد جوانه‌زنی گیاه یونجه مؤثر نبوده و اثراتشان معنی‌دار نمی‌باشد. بنابراین اثر تراکم گیاه و اعمال تیمار باکتری تاثیر شاخصی بر روی درصد جوانه‌زنی یونجه نداشت و در نتیجه آلودگی خاک به هیدروکربن‌های نفت خام باعث کاهش اندکی در درصد جوانه‌زنی گیاه یونجه شده‌است (شکل ۴-۱ الف، ب، ج). نتایج بدست آمده از اندازه‌گیری‌های حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که گیاه یونجه کشت شده در خاک آلوده به نفت کوره به هیدروکربن‌های نفتی موجود در خاک مقاوم بوده و در آن جوانه زده و رشد نمودند، اما درصد جوانه‌زنی یونجه در این خاک حدود ۱۲/۵ درصد در هر دو سطح تراکم و تیمار با و بدون باکتری کاهش یافته است. همچنین بیشترین میزان

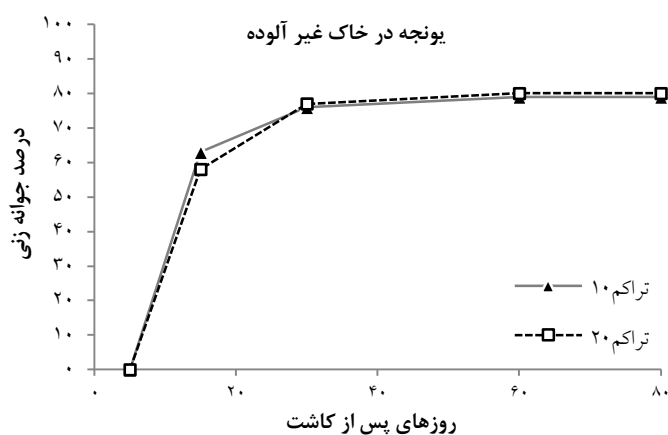
درصد جوانه‌زنی گیاه در خاک آلوده در پایان ماه اول برای تراکم ۱۰ و پایان ماه دوم برای تراکم ۲۰ مشاهده شد.



الف



ب



ج

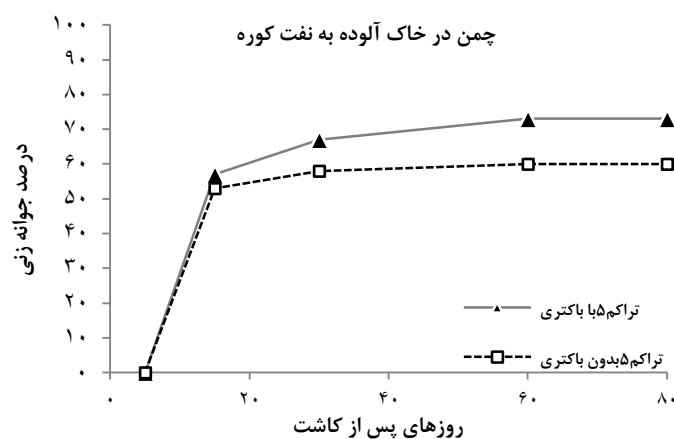
شکل ۴-۱) تغییرات درصد جوانه‌زنی در گیاه یونجه. الف) درصد جوانه‌زنی گیاه یونجه در تراکم ۱۰ و تیمار با و بدون باکتری در خاک آلوده به هیدروکربن‌های نفتی (نفت کوره). ب) درصد جوانه‌زنی گیاه یونجه در تراکم ۲۰ و تیمار با و بدون باکتری در خاک آلوده به هیدروکربن‌های نفتی (نفت کوره). ج) درصد جوانه‌زنی گیاه یونجه در ۲ سطح تراکم در خاک غیر آلوده.

۴-۱-۲ سنجش میزان جوانه زنی گیاه چمن در خاک آلوده به نفت کوره

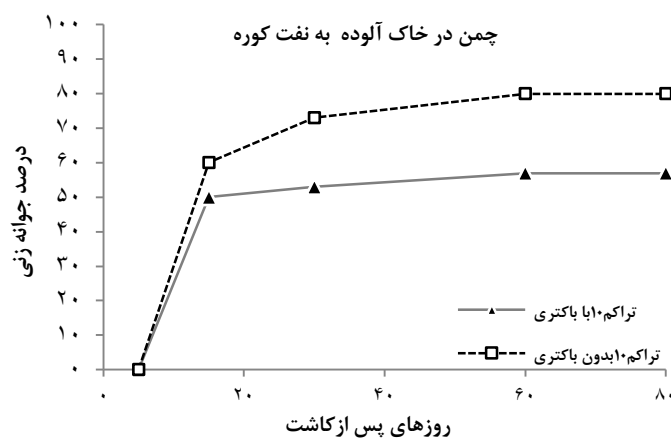
با توجه به نتایج تجزیه واریانس (جدول ۴ پیوست ۱) اثرات تراکم گیاه و باکتری بر روی جوانه‌زنی چمن معنی‌دار نمی‌باشد ولی اثر متقابل تراکم گیاه و باکتری بر روی جوانه‌زنی چمن مؤثر یا به عبارتی در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار می‌باشد. بنابراین اثر تراکم گیاه و اعمال تیمار باکتری تاثیر شاخصی بر روی درصد جوانه‌زنی چمن نداشت (شکل ۴-۲ الف، ب، ج). نتایج بدست آمده از اندازه‌گیری‌های حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که گیاه چمن کشت شده در خاک آلوده به نفت کوره به هیدروکربن‌های نفتی موجود در خاک مقاوم بوده و در آن جوانه زده و رشد نمودند، اما درصد جوانه‌زنی چمن در این خاک در تیمار با باکتری حدود ۲۵ درصد و در تیمار بدون باکتری حدود ۲۲ درصد در هر دو سطح تراکم کاهش یافته است، لیکن آلودگی خاک به هیدروکربن‌های نفتی سبب

کاهش در درصد جوانه‌زنی گیاه چمن گردید. همچنین بیشترین میزان درصد جوانه‌زنی گیاه در خاک آلوده در هر دو تراکم در پایان ماه دوم مشاهده شد. لذا، گیاه چمن کشت شده در خاک آلوده به هیدروکربن‌های نفتی (نفت کوره) به آلودگی موجود در خاک مقاوم بوده و در زمره گیاهان متحمل به‌شمار می‌رود و از درصد جوانه‌زنی مطلوب برخوردار بود.

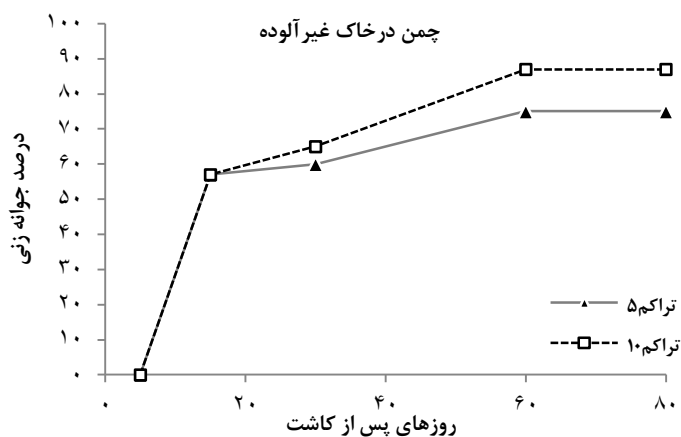
نتایج بدست آمده در این پژوهش مبنی بر کاهش میزان جوانه‌زنی گیاهان (یونجه و چمن) در خاک آلوده به هیدروکربن‌های نفتی با گزارش‌های دیگر محققان که در ادامه آورده شده است هم‌خوانی دارد.



الف



ب



ج

شکل ۴-۲) تغییرات درصد جوانه زنی در گیاه چمن. الف) درصد جوانه زنی گیاه چمن در تراکم ۵ و تیمار با و بدون باکتری در خاک آلوده به هیدروکربن‌های نفتی (نفت کوره). ب) راست درصد جوانه زنی گیاه چمن در تراکم ۱۰ و تیمار با و بدون باکتری در خاک آلوده به هیدروکربن‌های نفتی (نفت کوره). ج) درصد جوانه زنی گیاه چمن در ۲ سطح تراکم در خاک غیر آلوده.

مشاهده‌ی تغییراتی که مخلوط یونجه و تال فسکیو در خاک آلوده متحمل شدند نشان دهنده‌ی آن است که ترکیبات سمی موجود در نفت خام سبک توانسته است بر روی رشد هر دو گیاه تاثیر منفی بگذارد (شهریاری و همکاران، ۱۳۸۵).

ترکیبات نفت می‌توانند به درون بذر وارد شوند و واکنش‌های متابولیکی را بر هم زنند یا حتی گیاهک (جنین) را از بین ببرند (آدام و دانکن، ۲۰۰۲). برخی از مطالعات به پیوند بین جوانه زنی ضعیف و رشد ثانویه‌ی ضعیف در خاک آلوده به هیدروکربن اشاره کرده‌اند (چینیو و همکاران، ۱۹۹۷).

همچنین با نتایج سالانتیرو و همکاران (۱۹۹۷) که کاهش ظهور جوانه‌ی ذرت، گندم و جو دوسر (یولاف) در خاک آلوده شده با نفت خام سنگین را گزارش کردند هم‌خوانی دارد.

جوانه زدن دو گیاه یونجه و تال فسکیو در غلظت‌های بالای نفت (۷ و ۱۰ درصد) نشان داد که این گیاهان توانسته‌اند غلظت‌های بالای نفت در خاک را تحمل کنند (شهریاری و همکاران، ۱۳۸۵). کاهش جوانه‌زنی ۳۰ تا ۹۰ درصدی برای برخی گونه‌های محلی Mexico در خاک آلوده به نفت خام هم توسط گالگو-مارتینز و همکاران (۲۰۰۰) مشاهده شده بود که با نتایج مشاهده شده در این پژوهش هم‌خوانی دارد. پژوهشگران جوانه‌زنی گیاهان را تا غلظت ۵/۵ درصد گزارش کرده‌اند (ژیو و جانسون، ۱۹۹۵).

تأخیر در جوانه‌زنی گیاهان مطالعه شده می‌تواند به خاصیت آب‌گریز بودن هیدروکربن‌ها نسبت داده شود. هیدروکربن‌ها می‌توانند به عنوان یک حصار فیزیکی ممانعت‌کننده‌ی بذور از دست‌یابی به آب و اکسیژن یا تأخیر در دست‌یابی به آن‌ها عمل کنند. به نظر می‌رسد که آلاینده‌های نفتی در خاک به صورت یک لایه‌ی روغنی اطراف بذر را فرا گرفته، مانع از رسیدن آب و اکسیژن به آن می‌شود و سبب تأخیر در جوانه‌زنی بذر گیاه و کاهش درصد جوانه‌زنی آن می‌شود (آدام و دانکن، ۲۰۰۲).

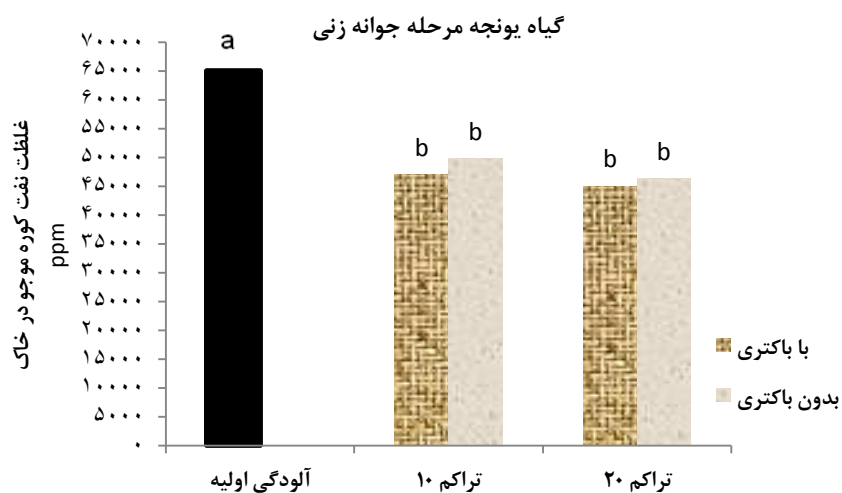
چینیو و همکاران (۱۹۹۷) نیز در مطالعات خود به کاهش جوانه‌زنی بذر در هر ۷ گیاه مورد مطالعه‌ی خود شامل گندم، جو، آفتابگردان، ذرت، لوبیا، شبدر و کاهو با وجود آلاینده‌های نفتی در خاک اشاره و گزارش کردند که بذرهای آفتابگردان < لوبیا < گندم < شبدر < ذرت < جو < کاهو در برابر این آلاینده‌های موجود در خاک، مقاومت کردند. همچنین ایشان بیان داشتند که ترکیب‌های سبک‌تر نفتی به سبب آنکه قادر به عبور از دیواره و غشای سلولی بذر و اثر بر جنین بذر و واکنش‌های متابولیسمی درون بذر هستند، اثر بیشتری نسبت به ترکیبات سنگین نفتی در خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی دارند.

۲-۴ تغییرات هیدروکربن‌های نفتی خاک

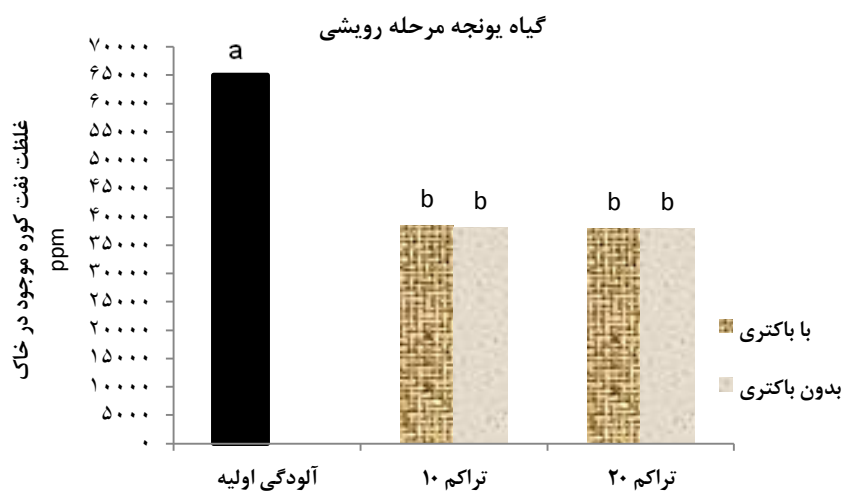
۱-۲-۴ تغییرات هیدروکربن‌های نفتی خاک توسط گیاه یونجه

با توجه به نتایج تجزیه واریانس (جدول ۵ پیوست ۱) اثر مرحله‌ی رشد بر روی عملکرد گیاه یونجه در کاهش میزان آلودگی نفتی موجود در خاک در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد اما فاکتورهای سطح تراکم گیاه و تیمار باکتری همچنین اثرات متقابل مرحله‌ی رشد و تراکم، مرحله‌ی رشد و باکتری، تراکم و باکتری، مرحله‌ی رشد و تراکم و باکتری بر روی عملکرد گیاه یونجه در کاهش میزان آلودگی نفتی موجود در خاک معنی‌دار نمی‌باشد. به این صورت که در مرحله‌ی جوانه‌زنی گیاه یونجه، مقدار کاهش آلودگی نفتی خاک در تیمار با باکتری و در تراکم ۲۰ (تراکم بیشتر) نسبت به سایر تیمارها اندکی بیشتر بود (اثر تراکم و باکتری در کاهش میزان آلودگی نفتی خاک معنی‌دار نبود) (شکل ۳-۴ الف) که مقدار این کاهش برابر با ۳۰/۸ درصد بود. در مرحله‌ی رویشی گیاه یونجه، تراکم ۲۰ نسبت به تراکم ۱۰ اندکی بیشتر در میزان آلودگی نفتی خاک کاهش نشان داد (اثر تراکم در کاهش میزان آلودگی نفتی خاک معنی‌دار نبود) همچنین اعمال تیمار باکتری تاثیری بر میزان کاهش آلودگی نفتی خاک نداشت (اثر باکتری در کاهش میزان آلودگی نفتی خاک معنی‌دار نبود) و مقدار کاهش آلودگی نفتی در خاک در تیمار بدون باکتری با تیمار با باکتری برابر بود که مقدار آن ۴۱/۵ درصد بود (شکل ۳-۴ ب). در مرحله‌ی زایشی گیاه یونجه نیز تیمار با باکتری نسبت به تیمار بدون باکتری در هر دو سطح تراکم گیاه یونجه تاثیر کمی در کاهش میزان آلودگی نفتی خاک داشت و مقدار کاهش آلودگی نفتی خاک در تراکم ۲۰ و تیمار با باکتری نسبت به تراکم ۱۰ و تیمار با باکتری اندکی کاهش بیشتری نشان داد (اثر

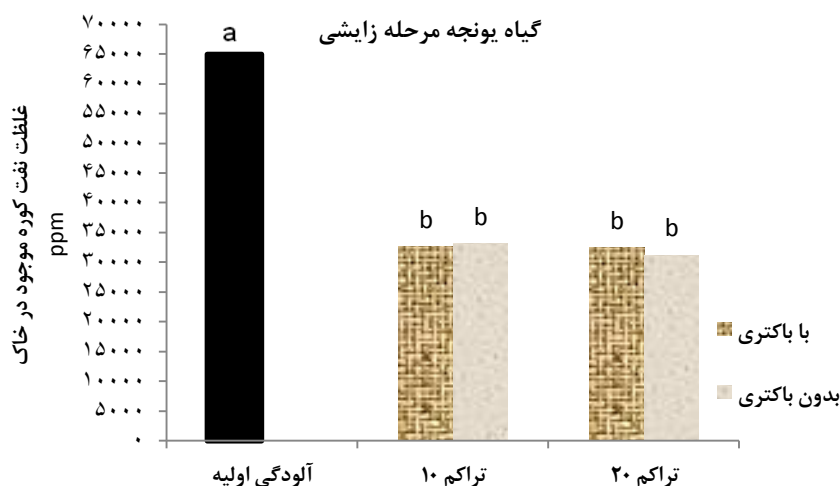
تراکم و باکتری در کاهش میزان آلودگی نفتی خاک معنی دار نبود) (جدول ۴ پیوست) که مقدار آن معادل ۵۰ درصد نسبت به آلودگی نفتی اولیه موجود در خاک بود (شکل ۳-۴ ج).



الف



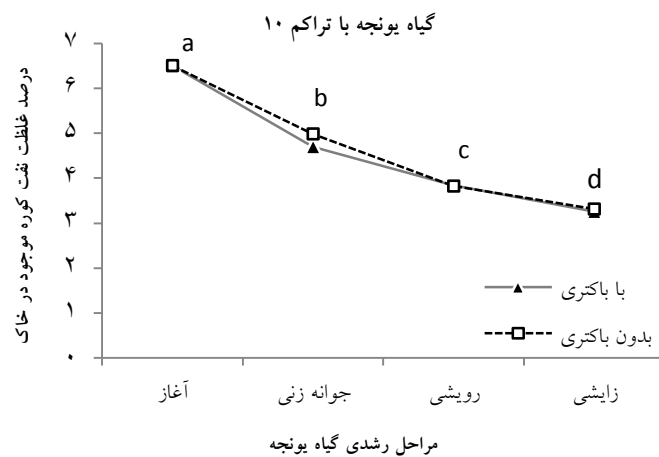
ب



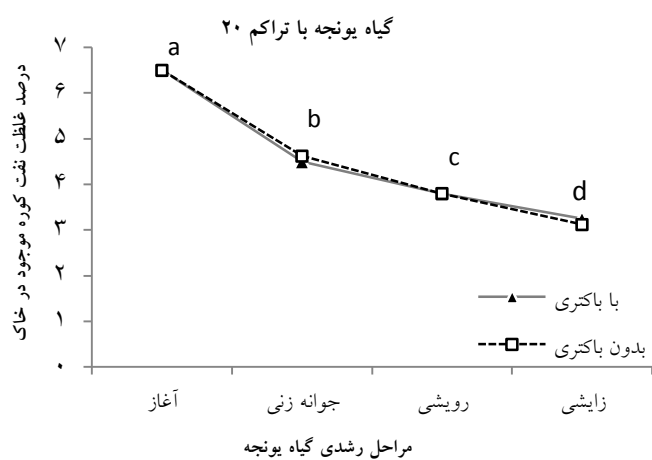
ج

شکل ۴-۳) تغییرات غلظت نفت کوره موجود در خاک پس از کاشت گیاه یونجه در سه مرحله‌ی رشد در دو سطح تراکم و تیمار با و بدون باکتری. الف) مرحله‌ی جوانه‌زنی. ب) مرحله‌ی رویشی. ج) مرحله‌ی زایشی. (حروف مشابه نشان دهنده‌ی این است که اثر تیمار سطح تراکم گیاه و تیمار باکتری در میزان کاهش غلظت آلودگی نفتی (نفت کوره) موجود در خاک معنی‌دار نبوده است).

نتایج به دست آمده در این پژوهش نشان داد، گیاه یونجه کشت شده در خاک آلوده به نفت کوره به آلودگی موجود در خاک مقاوم بوده و در آن جوانه زده و رشد کرد و مقدار آلودگی نفتی (نفت کوره) کل خاک را در هر مرحله از رشد کاهش داد. بنابراین بیشترین نرخ کاهش آلودگی نفتی (نفت کوره) موجود در خاک در تمام مراحل رشد گیاه یونجه در مرحله‌ی جوانه‌زنی گیاه یونجه در هر دو سطح تراکم گیاه و تیمارهای با و بدون باکتری بود (اثر مرحله‌ی رشد در کاهش میزان آلودگی نفتی خاک معنی‌دار بود) که میزان آلودگی نفتی موجود در خاک را ۳۰ درصد کاهش داد، اما به طور کلی گیاه یونجه در پایان سه مرحله‌ی رشد در سطح احتمال ۱ درصد آلودگی نفتی خاک را ۵۰ درصد کاهش داد (شکل ۴-۴ الف و ب) یعنی میزان آلودگی خاک را به نصف رسانید.



الف



ب

شکل ۴-۴) تغییرات درصد آلودگی نفتی خاک (نفت کوره) در طول دوره‌ی رشدی گیاه یونجه در دو سطح تراکم و با دو تیمار با و بدون باکتری. الف) گیاه یونجه با تراکم ۱۰. ب) گیاه یونجه با تراکم ۲۰ (حروف غیر مشابه نشان دهنده‌ی معنی دار بودن اثر مراحل رشد گیاه است).

نتایج بدست آمده در این پژوهش مبنی بر کاهش میزان آلودگی هیدروکربنی خاک توسط گیاه (یونجه) با گزارش‌های دیگر محققان که در ادامه آورده شده است هم‌خوانی دارد.

پژوهش‌ها نشان داده که پوشش گیاهی می‌تواند موجب کاهش آلودگی خاک به ترکیبات نفتی گردد (کانینگهام، ۱۹۹۶) و گیاهانی از تیره‌ی بقولات نظیر *Calopogoniam mucunoides*، *Centrosema brasilianum*، *Stylosanthes capitata* و از تیره‌ی گندمیان نظیر *Cyperus aggregates*، *Brachiaria brizantha*، *Eleusine indica* توانایی کاهش چشمگیر آلودگی نفتی را نشان داده‌اند (مرکل و همکاران، ۲۰۰۴b).

ترشحات ریشه‌ای در گیاه‌پالایی آلاینده‌های آلی نقش مهمی را بازی می‌کنند. کایمی و همکاران (۲۰۰۷) فرض کردند که بقایای ترشحات گیاهان برای پاک‌سازی آلاینده‌های خاک شرکت می‌کنند. وایلیست و همکاران (۱۹۹۸) نیز دریافتند که گونه‌های مختلف یونجه اثری مثبت بر کاهش غلظت آلاینده‌های ناشی از نفت خام در خاک دارد. به شکلی که در حضور این گیاهان، کاهش حدود ۳۳ تا ۵۶ درصدی غلظت آلاینده‌های نفتی در مقایسه با تیمار شاهد بدون گیاه مشاهده شد.

ژیو و همکاران (۲۰۰۶) در مطالعات خود به نقش مؤثر حضور پوشش گیاهی ذرت و رای‌گرس در کاهش ۹۸ درصدی غلظت فنانترو و ۹۵ درصدی در غلظت پایرن طی یک دوره‌ی ۶۰ روزه اشاره کردند. کامیسر و پارک (۱۹۹۷) نیز به کاهش ۸۰ درصدی غلظت هیدروکربن‌های سبک نفتی پس از ۸ هفته مطالعات گیاه‌پالایی اشاره نمودند. حذف نامحسوس TPH در یک مطالعه‌ی گیاهی توسط اسکالانتا-اسپینوزا و همکاران (۲۰۰۵) از ۱۲۰ تا ۱۸۰ روز پرورش در خاک‌های کشت شده و کشت نشده مشاهده شده بود. هاجیسون و همکاران (۲۰۰۱) و

اسکالانتا-اسپینوزا و همکاران (۲۰۰۵) دریافتند که حداکثر سرعت گیاه‌پالایی در مرحله‌ی اول کشت (تا روز ۶۰) به دست آمد.

ریلی و همکاران (۱۹۹۶) نیز در مطالعه‌ای که بر روی یونجه و ۳ گونه از گرامینه‌ها شامل فستوکای بلند، علف سودانی و علف سوئیچ انجام دادند مشاهده نمودند که این گیاهان به طور معنی‌داری غلظت PAHs را نسبت به خاک‌های بدون گیاه به میزان ۳۰ تا ۴۰ درصد کاهش دادند.

مرحله‌ی توسعه‌ی گیاه برای گیاه‌پالایی مهم است. رشد و متابولیسم باکتریایی و بنابراین تجزیه‌ی زیستی مواد آلی در رایزوسفر به تدریج افزایش می‌یابد و اغلب اندکی پس از رشد گیاه به اوج می‌رسد (کازیاکوف، ۲۰۰۲). مقایسه‌ی نمونه‌های دارای گیاه نشان داد که روند کاهش نفت در خاک در ۳۰ روز اول بیش از روزهای ۶۰ و ۱۲۰ روز بوده است (شهریاری و همکاران، ۱۳۸۵).

خطیبی و همکاران (۱۳۸۸) نیز در تحقیق خود بر روی ۳ گیاه یونجه، چمن و شبدر سفید نشان دادند که بیشترین میزان کاهش در کل غلظت‌های هیدروکربن نفتی (TPH) به گیاه یونجه و چمن به ویژه در بیشترین سطح تراکم آن‌ها مربوط بود که در بیشترین سطح تراکم خود به ترتیب ۶۴/۴ و ۶۰/۳۶ درصد غلظت TPH را نسبت به غلظت اولیه‌ی کل هیدروکربن‌های نفتی در خاک کاهش دادند. در این پژوهش شبدر سفید در بیشترین سطح تراکم خود موجب کاهش ۵۵/۴۱ درصدی در میزان TPH در خاک گردید. در طی آزمایشات صحرایی در کالیفورنیا با تال فسکیو و مخلوط چمن‌های محلی و لگوم‌ها، بنکز و همکاران

(۲۰۰۳) دریافتند که مخلوط حاوی لگوم‌ها فقط ۱۸-۱۲ درصد کاهش را در غلظت TPH ارائه دادند، درحالی‌که تال فسکیو ۶۵ درصد کاهش در غلظت TPH را آسان کردند.

شواب و بانکز (۱۹۹۴) تجزیه و تخریب ترکیبات PAHs در رایزوسفر برخی از گیاهان پرورش یافته در خاک‌های آلوده به نفت شامل یونجه، فسکیو و سودان گراس را بررسی کردند. ایشان میزان تجزیه‌ی این ترکیبات نفتی در خاک‌های آلوده را به نوع ترکیب PAHs و نیز نوع گونه‌ی گیاهی وابسته دانستند، بنابراین انجام یک انتخاب بهینه نقش بسیار مهمی در کسب موفقیت در فرایند گیاه‌پالایی دارد. نیکولز و همکاران (۱۹۹۷) همچنین تجزیه‌ی چندین ماده‌ی شیمیایی آلی شامل فنانترن را در رایزوسفر یونجه (*Medicago sativa L.*) و چمن آبی آلپاین (*Poa alpine L.*) گزارش کردند، و تحریک پتانسیل زیست‌پالایی در اطراف ریشه‌های گیاه را پیشنهاد کردند که این تحقیقات با نتایج آزمایش موجود هم‌خوانی دارد.

گره‌های ریشه‌ی ماشک در خاک آلوده به هیدروکربن نفتی تثبیت همزیستی نیتروژن را نشان می‌دهند. تثبیت نیتروژن بوسیله‌ی لگوم‌ها، پاک‌سازی خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفت خام را توسط غلبه کردن بر کمبود نیتروژن که در این خاک‌ها رایج است، افزایش می‌دهند (شیمپ و همکاران، ۱۹۹۳).

براساس نتایج مطالعات قبلی (مرکل و همکاران، ۲۰۰۴a) چندین گونه از نخودیان در خاک آلوده به ۵ درصد نفت خام یافت شده‌اند. به نظر می‌رسد که نفت خام هنگام تماس با بافت‌های برهنه‌ی گیاه اثر کشنده یا مخرب دارد. اثر غیر مستقیم نفت خام فقط کاهش در رشد و بیوماس گیاهی است (مرکل و همکاران، ۲۰۰۴ b) و برخی از گزارش‌های قبلی نشان داده که گونه‌های گیاهی نظیر *Festuca rubra* و *Puccinellia maritima* (بیکر، ۱۹۷۱) و سایر

گندمیان و نخودیان (مرکل و همکاران، ۲۰۰۵) قادر به رشد در حضور نفت خام هستند. زیست‌پالایش خاک‌های آلوده به نفت عمدتاً متکی به تجزیه‌ی زیستی در ناحیه‌ی رایزوسفر می‌باشد (فریک و همکاران، ۱۹۹۹).

فعل و انفعالات بین گیاهان و میکروب‌ها در رایزوسفر پیچیده و در برخی حالات برای هر دو موجود زنده متقابلاً مفید هستند (هگ و فلچر، ۱۹۹۶). رشد و فعالیت میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده توسط ترشحات گیاهی تحریک می‌شوند که با سن گیاه و وضع تغذیه‌ای نوسان می‌کند. تغییر کمی و کیفی ترشحات گیاهی با سن گیاه می‌تواند روی جمعیت و فعالیت میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده‌ی هیدروکربن در رایزوسفر اثر بگذارد، که به موجب آن سرعت و کارایی گیاه‌پالایی با زمان تحت تاثیر قرار می‌گیرد (مرکل و همکاران، ۲۰۰۵).

توانایی گیاهان برای بالا بردن تجزیه‌ی میکروبی آلاینده‌ها در خاک رایزوسفر، مکانیسم اصلی گیاه‌پالایی خاک‌های آلوده به PAHs است. راگ و همکاران (۲۰۰۵) پیشنهاد کردند که کمک اصلی سیستم‌های کشت شده با گیاه برای زیست‌پالایی فنانترن می‌تواند از طریق دامنه‌ی متابولیک گسترش یافته‌ی جوامع باکتریایی رایزوسفر باشد. در خاک اصلاح شده با مخلوط ۸ PAHs از ۳ تا ۵ حلقه‌ای، تجزیه‌ی تمام PAHs ها در خاک رایزوسفر رای‌گرس از خاک غیر رایزوسفری بیشتر بود (بینت و همکاران، ۲۰۰۰). توما و همکاران (b و ۲۰۰۳ a) نشان دادند که رشد ریشه‌های گیاه و جوامع میکروبی همراه آن‌ها تجزیه‌ی زیستی آلاینده‌های نفت خام را افزایش می‌دهند.

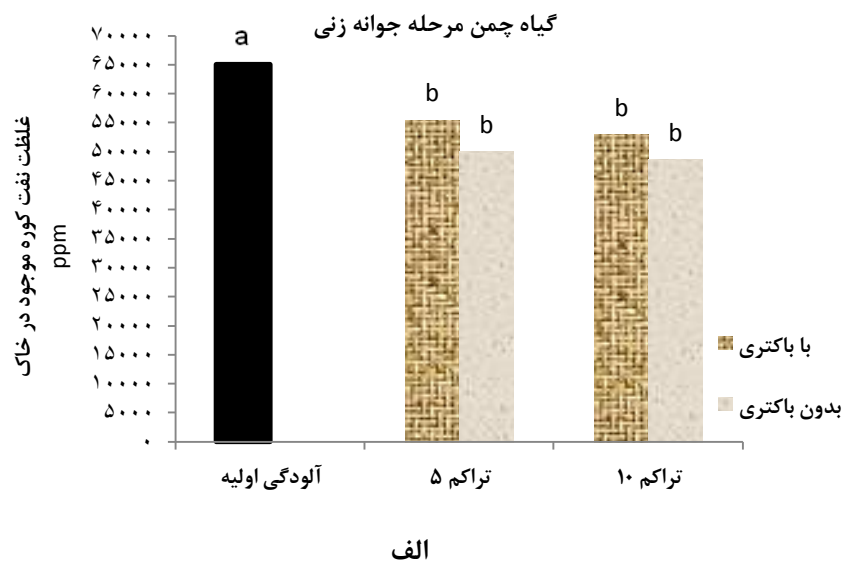
شواب و بانکز (۱۹۹۴) افزایش سرعت تجزیه‌ی پایرن را در خاک کشت شده (تال فسکیو، سودان گراس، سویچ گراس و یونجه) در مقایسه با خاک کشت نشده گزارش کردند. آن‌ها ذکر کردند که میکروارگانیسم‌های سازگار شده برای افزایش سرعت تجزیه، که آن‌ها در خاک‌های کشت شده مشاهده کردند ضروری نیستند. موراتووا و همکاران (۲۰۰۳) در مطالعات قبلی پاک‌سازی خاک‌های آلوده به هیدروکربن هم گزارش کردند که اثرات گیاهان روی میزان تجزیه‌کننده‌های PAH مبهم بود. تجزیه‌کننده‌های PAH در رایزوسفر یونجه هفت برابر از خاک آلوده‌ی بدون گیاه بیشتر بود، اما در رایزوسفر نی چهار برابر کمتر بود.

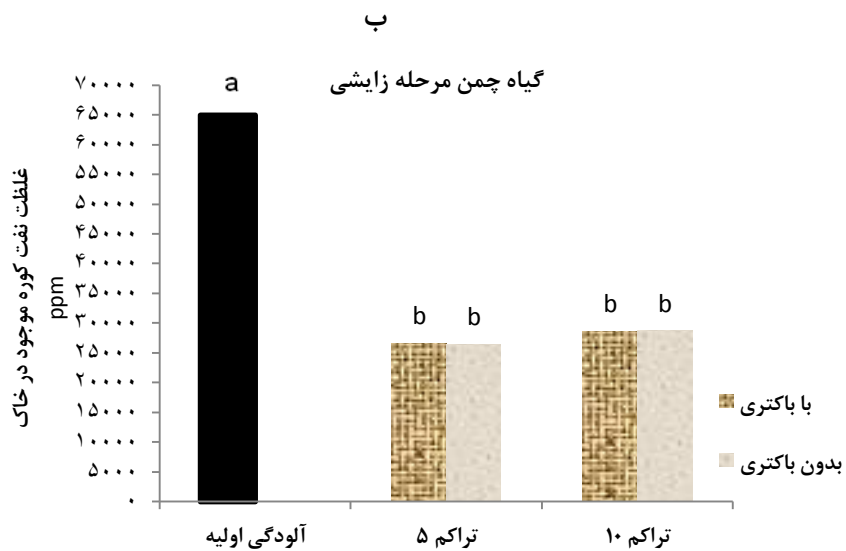
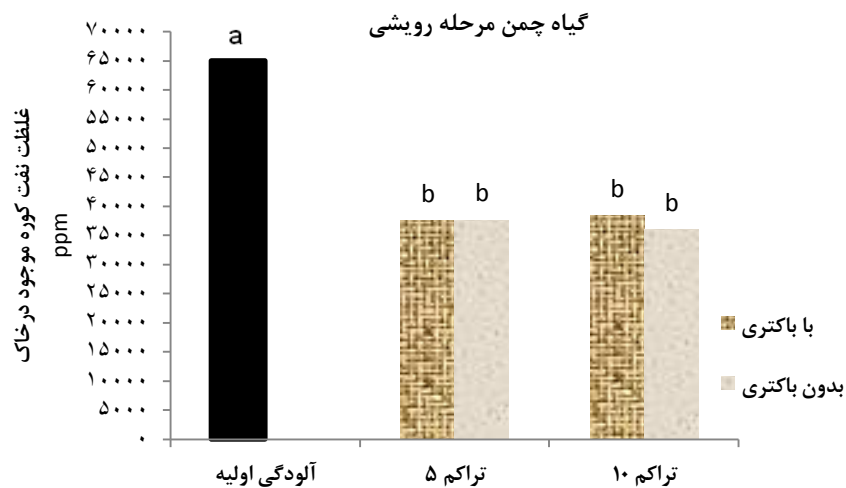
۴-۲-۲ تغییرات هیدروکربن‌های نفتی خاک توسط گیاه چمن

با توجه به نتایج تجزیه واریانس (جدول ۶ پیوست ۱) اثر مرحله‌ی رشد بر روی عملکرد گیاه چمن در کاهش میزان آلودگی نفتی موجود در خاک در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد اما فاکتورهای سطح تراکم گیاه و تیمار باکتری همچنین اثرات متقابل مرحله‌ی رشد و تراکم، مرحله‌ی رشد و باکتری، تراکم و باکتری، مرحله‌ی رشد و تراکم و باکتری بر روی عملکرد گیاه چمن در کاهش میزان آلودگی نفتی موجود در خاک بی‌تاثیر می‌باشد و اصطلاحاً معنی‌دار نمی‌باشد. به این صورت که در مرحله‌ی جوانه‌زنی گیاه چمن میزان کاهش آلودگی نفتی خاک در تراکم ۱۰ (تراکم بیشتر) و در تیمار بدون باکتری بیشتر بود که مقدار آن برابر با ۲/۲۵ درصد بود (اثر تراکم و باکتری در کاهش میزان آلودگی نفتی خاک معنی‌دار نبود) (شکل ۴-۵ الف). در مرحله‌ی رویشی گیاه چمن میزان کاهش آلودگی نفتی موجود در خاک در تراکم ۱۰ گیاه چمن و تیمار بدون باکتری نسبت به سایر تیمارها کمی بیشتر بود (اثر تراکم و باکتری در کاهش میزان آلودگی نفتی خاک معنی‌دار نبود) که

مقدار آن برابر با ۴۰ درصد بود (شکل ۴-۵ ب). اما در مرحله‌ی زایشی گیاه چمن میزان کاهش آلودگی نفتی (نفت کوره) موجود در خاک در تراکم ۵ گیاه چمن (تراکم کم) و در تیمار بدون باکتری نسبت به سایر تیمارها اندکی بیشتر بود (اثر تراکم و باکتری در کاهش میزان آلودگی نفتی خاک معنی‌دار نبود) مقدار آن برابر با ۵۹/۲ درصد بود (شکل ۴-۶ ج). با توجه به نتایج مشاهدات در گیاه چمن، اعمال تیمار باکتری تأثیری در کاهش میزان آلودگی نفتی (نفت کوره) موجود در خاک نداشت.

نتایج بدست آمده در مورد گیاه چمن، نشان داد که گیاه چمن کشت شده در خاک آلوده به نفت کوره نیز به آلودگی نفتی موجود در خاک مقاوم بوده و در آن جوانه زده و رشد کرده و مقدار آلودگی نفتی (نفت کوره) موجود در خاک را در هر مرحله از رشد گیاه چمن کاهش داد.





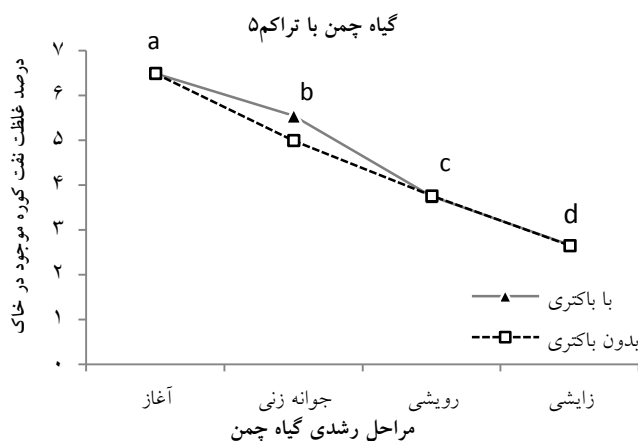
ج

شکل ۴-۵) تغییرات غلظت نفت کوره موجود در خاک پس از کاشت گیاه چمن در سه مرحله‌ی رشد در دو سطح تراکم و دو تیمار با و بدون باکتری. (الف) مرحله‌ی جوانه‌زنی. (ب) مرحله‌ی رویشی. (ج) مرحله‌ی زایشی. (حروف مشابه نشان دهنده‌ی این است که اثر تیمار سطح تراکم گیاه و تیمار باکتری در میزان کاهش غلظت آلودگی نفتی (نفت کوره) موجود در خاک معنی‌دار نبوده است).

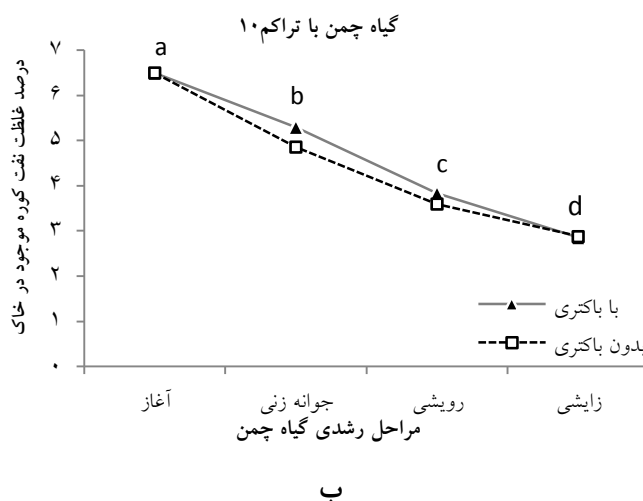
با توجه به نتایج مشاهدات در گیاه چمن، بیشترین نرخ کاهش آلودگی نفتی خاک در هر سه مرحله‌ی رشد مربوط به مرحله‌ی زایشی در گیاه چمن در هر ۲ سطح تراکم گیاه و تیمارهای با و بدون باکتری بود (اثر مرحله‌ی رشد در کاهش میزان آلودگی نفتی خاک در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود) (جدول ۵ پیوست) که میزان آلودگی نفتی (نفت کوره) موجود در خاک را به بیشتر از نصف کاهش داد یعنی نزدیک به ۶۰ درصد (۵۹/۲ درصد) از آلودگی اولیه خاک پاک‌سازی شد. (شکل ۴-۶ الف و ب).

نتایج بدست آمده در این پژوهش مبنی بر کاهش میزان آلودگی هیدروکربنی خاک توسط گیاه (چمن) با گزارش‌های دیگر محققان که در ادامه آورده شده است هم‌خوانی دارد.

حضور رای‌گرس (*Lolium multiflorum*) تجزیه‌ی رایزوسفری آلاینده‌ها در خاک آلوده به فنانترین و بنزوپایرن را افزایش داد (دینگ و همکاران، ۲۰۰۴).



الف



شکل ۴-۶) تغییرات درصد آلودگی نفتی خاک (نفت کوره) در طول دوره‌ی رشدی گیاه چمن در دو سطح تراکم و با دو تیمار با و بدون باکتری. الف) گیاه چمن با تراکم ۵. ب) گیاه چمن با تراکم ۱۰ (حروف غیر مشابه نشان دهنده‌ی معنی‌دار بودن اثر مراحل رشد گیاه است).

ریشه‌های فیبری نسبت به سایر ریشه‌ها، محیط مناسب‌تر و با سطح ویژه بالاتری را برای فعالیت و توسعه‌ی جمعیت میکروبی فراهم می‌کنند و جمعیت میکروبی بزرگ‌تری در محیط رایزوسفری آن‌ها به وجود می‌آید (آپرل و سیمز، ۱۹۹۰). کایمی و همکاران (۲۰۰۶) رای‌گرس را گیاهی مقاوم به نفت گزارش کردند که در خاک‌های شور و قلیایی به خوبی رشد می‌کند. ریشه‌های رای‌گرس در افزایش تجزیه‌ی زیستی خاک آلوده به نفت دیزل مؤثر نشان داده شده است.

به نظر می‌رسد کشت همزمان دو گیاه علفی اگروپایرون و فسکیو به سبب دارا بودن ریشه‌های با طبیعت فیبری که نسبت به سایر ریشه‌ها محیط مناسب‌تر و با سطح ویژه بالاتری را برای فعالیت و توسعه‌ی جمعیت میکروبی در محیط رایزوسفر خود فراهم

می‌آورند و نقش مؤثرتری بر تجزیه و تخریب آلاینده‌های نفتی در خاک دارند، نسبت به سایر انتخاب‌ها مطلوب‌تر بوده است (آپرل و سیمز، ۱۹۹۰).

چن و همکاران (۲۰۰۳) پتانسیل معدنی شدن پایرن را در رایزوسفر گیاه با استفاده از روش پایرن کربن ۱۴ پایدار شده مطالعه کردند. آن‌ها دریافتند که پس از گذشت ۱۹۰ روز از خواباندن، ۳۷/۷ و ۳۰/۴ درصد پایرن کربن ۱۴ به ترتیب در خاک کشت شده با تال فسکیو (*Festuca arundinacea*) و چمن مرغزار (*Panicum virgatum*) معدنی شده بود. درحالی‌که فقط ۴/۳ درصد از معدنی شدن برای شاهد کشت نشده مشاهده شده بود.

ندونوری و همکاران (۲۰۰۰) اثر حضور گیاهان مختلف بر کاهش غلظت TPHs در خاک طی فرایند گیاه‌پالایی را مورد بررسی قرار دادند و دو گیاه رای‌گرس و آگوستین‌گرس را جهت پالایش خاک‌های آلوده به نفت منطقه‌ی مورد مطالعه‌ی خود پیشنهاد نمودند. مرکل و همکاران (۲۰۰۵) نیز گیاه علفی *Brachiaria brizantha* را به عنوان پاسخ بهینه برای کاهش غلظت ترکیبات نفتی از خاک نسبت به دیگر گیاهان مورد مطالعه‌ی خود معرفی کردند.

رای‌گرس در مقایسه با خاک بدون گیاه مقدار بیشتری از هیدروکربن‌های مخلوط (n-آلکان‌ها، هگزادکان، فنانترن، آنتراسن، فلورانتن، پایرن و peristane) را در خاک کاهش می‌دهند. بطوریکه پس از یک دوره‌ی ۲۲ هفته‌ای، غلظت هیدروکربن قابل استخراج از ۴۳۳۰ mg/kg به کمتر از ۱۲۰ mg/kg در خاک‌های گیاه‌دار کاهش یافت (۹۷ درصد) درحالی‌که در خاک‌های بدون گیاه فقط ۷۹۰ mg/kg (۸۲ درصد) کاهش صورت گرفت (گانتز و همکاران، ۱۹۹۶).

خاک کشت شده با *Brachiaria brizantha* و *Cyperus aggregatess* نسبت به خاک کشت نشده تجزیه‌ی بالاتر نفت خام را داشت، اما چنین افزایشی در *Eleusine indica* یافت نشد (مرکل و همکاران، ۲۰۰۵).

تجزیه‌ی زیستی فنانترن در خاک رایزوسفر گیاه جو دوسر باریک (*Avena barbata*) در مقایسه با خاک کشت نشده‌ی شاهد سریع‌تر بود و با افزایش تعداد تجزیه‌کننده‌ها در خاک رایزوسفر همبستگی داشت (مایا و فایر استون، ۲۰۰۰).

در تمام موارد کاهش آلودگی در همان مراحل اولیه‌ی تیمارها چشمگیرتر از مراحل بعد مشاهده گردید که با نتایج کار شوواب و بانکز (۱۹۹۵)، همچنین شهریاری (۱۳۸۵) تاثیر فسکیو و یونجه را بر آلودگی‌های نفتی بررسی کرده بود مطابقت داشت.

کیم و هائو (۱۹۹۹) طی پژوهش‌های خود تاثیر مثبت حضور *Pseudomonas* را در تغییر آلاینده‌های آلی دریافتند. علیخانی و همکاران (۱۳۸۸) تاثیر مثبت *Pseudomonas* در پالایش نفت را که از نتایج تحقیق باسرت و بارثا (۱۹۸۴) است مشاهده کردند. آن‌ها باکتری‌های *Pseudomonas*، *Arthrobacter*، *Alkaligenes*، *Corynebacterium*، *Flavobacterium*، *Achromobacter*، *Micrococcus* و *Mycobacterium* را به عنوان فعال‌ترین گونه‌های باکتریایی در تجزیه‌ی هیدروکربن‌ها در خاک گزارش کردند.

مسیر غالب برای حذف PAHs، زیست‌پالایی است که بر توانایی تجزیه‌ی جوامع میکروبی تکیه می‌کند، و کارایی زیست‌پالایی می‌تواند توسط تلقیح میکروارگانیسم‌های فعال و سازگار تجزیه‌کننده‌ی PAH افزایش یابد (ونگر-دابلر، ۲۰۰۳).

ترشحات ریشه‌ای حاوی قند، ویتامین‌ها، آمینواسیدها، اسیدهای آلی و نوکلئوتیدها هستند (رووینا و مک‌دوگال، ۱۹۶۷) که به جریان همرفتی (هدایتی) محلول‌های غذایی در رایزوسفر می‌پیوندد و می‌تواند منجر به افزایش تعداد و فعالیت میکروبی شود (رینولدز و همکاران، ۱۹۹۹). جنیفر و همکاران (۲۰۰۵) تنوع و فراوانی زیاد میکروبی را در خاک آلوده به نفت خام کشت شده با رای‌گرس چند ساله و یونجه نسبت به خاک کشت نشده مشاهده کردند.

رنتز و همکاران (۲۰۰۵) در برخی از تحقیقات گزارش کردند که یک پوشش گیاهی ناپدید شدن PAHs با جرم مولکولی بالا (HMW) را در ناحیه‌ی ریشه تسریع می‌کند. پتانسیل اصلاح خاک‌های آلوده در میان گونه‌های گیاهی و واریته‌ها متفاوت است، اما بین جرم ریشه و توانایی گیاه برای تحریک تجزیه‌ی زیستی آلاینده همبستگی وجود ندارد (لیسته و الکساندر، ۱۹۹۹).

نقش اصلی در حذف ترکیبات نفتی بر عهده‌ی میکروارگانیسم‌های موجود در رایزوسفر گیاهان است و گیاه نقش حمایتی از فعالیت‌های میکروارگانیسم‌ها را دارد (فردریک و همکاران، ۲۰۰۷). اندرسون و همکاران (۱۹۹۳) و گانتز و همکاران (۱۹۹۶) در مطالعات گذشته نیز بر تاثیر ریشه‌ی گیاه در افزایش توده‌ی میکروبی تایید کرده‌اند. تانر و السیوال (۲۰۰۳) و ژبو و ژیا (۲۰۰۷) گیاه القایی را در جوامع میکروبی خاک همچون تحریک رشد و فعالیت میکروبی، افزایش تعداد تجزیه‌کننده‌ها و تغییر ساختار جوامع میکروبی را به عنوان مسیر غالب برای توسعه‌ی دامنه‌ی متابولیک جوامع باکتریایی رایزوسفر و افزایش سرعت تجزیه‌ی متابولیک جوامع باکتریایی رایزوسفر و افزایش سرعت تجزیه‌ی PAH مطرح کردند.

ترشحات گیاهی زیادی برای جذب و تحریک جوامع میکروبی مانند سودوموناس‌ها شناخته شده‌اند (اسپینوزا-اورگل، ۲۰۰۴). گیاهان می‌توانند ترکیبات فنولیک آزاد کنند که می‌تواند مانند PAH عمل کنند و اثر رایزوسفر را توسط افزایش تجزیه کننده‌های PAH در پلات‌های کشت شده و کوددهی شده را بالا ببرند (لیسته و الکساندر، ۱۹۹۹). تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌ها در ناحیه‌ی ریشه برای تجزیه‌ی زیستی آلاینده‌های آلی خاک همراه با گیاه تعیین کننده هستند (اندرسون و همکاران، ۱۹۹۳).

خردل و ماشک تعداد زیادی از تجزیه کننده‌های هیدروکربن را در ناحیه‌ی ریشه‌ی آلوده به PAH حمایت می‌کنند که شامل: *Flavobacterium* *Alcaligenes piechauadii* *stenotrophomonas* *Ps. Syringae* *Ps. Stutzeri* *Ps. Putida* *Ps. Fluresens johnsoniae* *Vibrio furnissi* *maltophilia* هستند (ویلسون و جونز، ۱۹۹۳؛ UM-BBD، ۲۰۰۳).

شبدر سفید تولید ریشه و بیوماس سطحی خیلی کمی دارد، با این حال شبدر سفید بالاترین سرعت تجزیه‌ی هیدروکربن را در مزرعه داشت (بانکز و همکاران، ۲۰۰۰).

۳-۴ گزارش برخی مشاهدات جنبی در این پژوهش

غیر از مطالعات و مشاهدات انجام شده روی گیاهان مورد نظر در رابطه با کاهش میزان آلودگی نفتی خاک، یکسری مشاهدات جنبی نیز روی دو گیاه یونجه و چمن انجام شد که در اینجا به صورت موردی آورده شده است:

اثر آلودگی نفتی خاک بر سرعت رشد گیاه:

۱-طبق مشاهدات؛ آلودگی نفتی خاک باعث کاهش سرعت رشد دو گیاه یونجه و چمن شد که در مقایسه با شاهد رشد بسیار کندتری داشتند.

۲- همچنین در مورد گیاه چمن، این گیاه در خاک آلوده به نفت کوره به مرحله ی پنجه زنی نرفت.

۳- ارتفاع و قطر اندام های هوایی (بیوماس) هر دو گیاه در خاک آلوده به نفت کوره در مقایسه با شاهد کمتر مشاهده شد. که تمام این اثرات به سمیت هیدروکربن های نفتی نسبت داده می شود.

این مشاهدات با گزارش های دیگر محققان که در ادامه آورده شده است هم خوانی دارد.

چینیو و همکاران (۱۹۹۷) کاهشی بیشتر از ۸۰ درصد در سرعت رشد لوبیا و گندم را گزارش کردند.

گالگو-مارتینز و همکاران (۲۰۰۰) کاهش در بیوماس را برای ۲ گونه ی گیاهی مشاهده کردند. جلوگیری از رشد گیاه می تواند به دلیل اثر سمیت هیدروکربن های نفت خام باشد.

ارتفاع گیاه و بیوماس ساقه شاخص های خوبی برای سلامت گیاه هستند؛ هرچند اندازه ی بیشتر بیوماس لزوماً شاخص کارایی پاک سازی نیستند (بانکز و همکاران، ۲۰۰۳). به نظر می رسد مسمومیت ایجاد شده به سبب وجود این آلاینده های آلی در خاک و همچنین ایجاد محدودیت در رشد و توسعه ی ریشه و کاهش قابلیت جذب آب و عناصر غذایی، عوامل اصلی کاهش رشد و عملکرد ماده خشک این گیاهان بوده است (چینیو و همکاران، ۱۹۹۷).

پاک‌سازی میکروبی و گیاه‌پالایی توسط فاکتورهای بسیار متفاوتی همچون دما، pH و کاربرد کودهای شیمیایی در خاک می‌تواند تحت تاثیر قرار بگیرد (وانگ و همکاران، ۲۰۰۸b).

به نظر می‌رسد که زیست‌توده‌ی تولیدی پایین، نوع و میزان ترشحات ریشه در حضور این گیاه در تشدید فعالیت میکروبی و بنابراین تجزیه و تخریب آلاینده‌های نفتی موجود در خاک، نقش مؤثری نداشته است (پیسینیو و لاول، ۲۰۰۰).

۴-۴ نتیجه‌گیری

به طور کلی نتایج به دست آمده در این پژوهش نشان داد که دو گیاه یونجه و چمن کشت شده در خاک آلوده به هیدروکربن‌های نفتی (نفت کوره)، به آلودگی نفتی موجود در خاک مقاوم بوده و در آن جوانه زده و رشد کردند (تاخیری در زمان جوانه‌زنی گیاه نسبت به شاهد مشاهده نشد) و مقدار آلودگی نفتی (نفت کوره) موجود در خاک را در هر مرحله از رشد (هر دو گیاه یونجه و چمن) کاهش دادند. گیاه یونجه در مرحله‌ی جوانه‌زنی و گیاه چمن در مرحله‌ی زایشی بیشترین تاثیر را در تجزیه‌ی آلاینده‌های آلی داشتند، البته به نظر می‌رسد عملکرد گیاه چمن در کاهش آلودگی نفتی (نفت کوره) خاک بهتر بوده است. اعمال تیمار باکتری سودوموناس پوتیدا نیز اثر معنی‌داری بر روی میزان کاهش آلودگی نفتی موجود در خاک نسبت به تیمار بدون باکتری نداشته است.

۴-۵ پیشنهادها

بنابراین گیاه یونجه (از خانواده لگومینه) برای کشت در خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی به دلیل مقاومت به آلودگی هیدروکربنی و گیاه چمن به دلیل رشد

مناسب در خاک آلوده به هیدروکربن‌های نفتی و ایجاد سیستم ریشه‌ای فیبری مناسب برای استفاده در پاک‌سازی خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی به روش گیاه‌پالایی پیشنهاد می‌شود.

استفاده از پوشش گیاهی به عنوان یک روش پاک‌سازی میسر و ممکن برای خاک‌های آلوده با هیدروکربن‌های نفت خام در ایران و نیز در دیگر کشورهای در حال توسعه به دلیل ارزان بودن و نیازمند بودن به حداقل نگهداری و مراقبت و مدیریت خاک می‌تواند جذاب باشد.

چوستا

پیوست ۱- جداول

جدول ۱- برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک آلوده به نفت کوره

پارامتر	مقدار
رس (%)	۳/۹
شن (%)	۷۸/۵
سیلت (%)	۱۷/۶
بافت	شن لومی
سدیم (ppm)	۱۷/۸
پتاسیم (ppm)	۱۹
کلسیم (ppm)	۲۱/۶
منیزیم (ppm)	۱۳/۲
نیتروژن (%)	۰/۱۰۴
فسفر (ppm)	۲۹
کربن آلی (%)	۳/۸
آهک (%)	۲۳
هدایت الکتریکی (dS/m)	۱/۳۴
اسیدیته	۷/۹۹

جدول ۲- برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک آلوده به نفت کوره مخلوط با خاک غیر آلوده

پارامتر	مقدار
رس (%)	۲۰
شن (%)	۵۶/۶۷
سیلت (%)	۲۳/۳۳
بافت	لوم شنی
سدیم (ppm)	۱۲/۳
پتاسیم (ppm)	۱۶/۳۶
کلسیم (ppm)	۱۳/۸
منیزیم (ppm)	۸/۴
نیتروژن (%)	۰/۰۸۱
فسفر (ppm)	۲۱
کربن آلی (%)	۳/۰۱
آهک (%)	۱۵/۲
هدایت الکتریکی (dS/m)	۰/۸۴
اسیدیته	۸/۰۲

جدول ۳- تجزیه واریانس اثرات تراکم گیاه و باکتری بر میزان درصد جوانه‌زنی یونجه در خاک آلوده به نفت کوره

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد جوانه‌زنی
تکرار	۲	* ۰/۰۲۲۷
تراکم	۱	^{ns} ۰/۸۱۵
باکتری	۱	^{ns} ۰/۶۶۴
تراکم×باکتری	۱	^{ns} ۰/۹۲۰
خطا	۳۲	–
ضریب تغییرات (%)	–	۲۲/۷

* و ^{ns} به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و معنی‌دار نبودن

جدول ۴- تجزیه واریانس اثرات تراکم گیاه و باکتری بر میزان درصد جوانه‌زنی چمن در خاک آلوده به نفت کوره

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد جوانه‌زنی
تکرار	۲	** ۰/۰۰۰۸
تراکم	۱	^{ns} ۰/۸۷۲
باکتری	۱	^{ns} ۰/۶۳۰
تراکم×باکتری	۱	* ۰/۰۴۳
خطا	۳۲	–
ضریب تغییرات (%)	–	۲۷/۱۲

** و * و ^{ns} به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد و ۵ درصد و معنی‌دار نبودن

جدول ۵- تجزیه واریانس اثرات مراحل رویشی و تراکم گیاه و باکتری بر میزان گیاه پالایی یونجه

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد نفت
تکرار	۲	^{ns} ۰/۰۹۸
مرحله رشد	۲	^{**} ۶/۵۲۷
تراکم	۱	^{ns} ۰/۱۷۴
باکتری	۱	^{ns} ۰/۰۲۴
مرحله رشد×تراکم	۲	^{ns} ۰/۰۴۸
مرحله رشد×باکتری	۲	^{ns} ۰/۰۵۴
تراکم×باکتری	۱	^{ns} ۰/۰۲۵
مرحله رشد×تراکم×باکتری	۲	^{ns} ۰/۰۰۹
خطا	۲۴	^{ns} ۰/۱۷۱
ضریب تغییرات (%)	–	۱۰/۷۶

^{**} و ^{ns} به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد و معنی دار نبودن

جدول ۶- تجزیه واریانس اثرات مراحل رویشی و تراکم گیاه و باکتری بر میزان گیاه پالایی چمن

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد نفت
تکرار	۲	^{ns} ۰/۰۹۸
مرحله رشد	۲	^{**} ۶/۵۲۷
تراکم	۱	^{ns} ۰/۱۷۴
باکتری	۱	^{ns} ۰/۰۲۴
مرحله رشد×تراکم	۲	^{ns} ۰/۰۴۸
مرحله رشد×باکتری	۲	^{ns} ۰/۰۵۴
تراکم×باکتری	۱	^{ns} ۰/۰۲۵
مرحله رشد×تراکم×باکتری	۲	^{ns} ۰/۰۰۹
خطا	۲۴	^{ns} ۰/۱۷۱
ضریب تغییرات (%)	–	۱۰/۷۶

^{**} و ^{ns} به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد و معنی دار نبودن

پیوست ۲- آرایش گلدان‌ها

گیاه یونجه:

$$۲۱ = (A_1, A_2, A_3 \text{ مرحله رشد}) \times ۷ = (۱ + ۶ \text{ شاهد}) = (۳ \text{ تکرار}) \times (B_1 \text{ و } B_2 \text{ تراکم})$$

$$۴۲ = (۲ \text{ سطح باکتری (بدون باکتری } C_2 \text{ و (با باکتری } C_1)) \times$$

گیاه چمن:

$$\times ۲۱ = (a_1, a_2, a_3 \text{ مرحله رشد}) \times ۷ = (۱ + ۶ \text{ شاهد}) = (۳ \text{ تکرار}) \times (b_1 \text{ و } b_2 \text{ تراکم})$$

$$۴۲ = (۲ \text{ سطح باکتری (بدون باکتری } C_2 \text{ و (با باکتری } C_1))$$

S: شاهد

$A_1B_1C_1$	$A_1B_1C_2$	$A_1B_2C_1$	$A_1B_2C_2$	$a_1b_1c_1$	$a_1b_1c_2$	$a_1b_2c_1$	$a_1b_2c_2$
$A_1B_1C_1$	$A_1B_1C_2$	$A_1B_2C_1$	$A_1B_2C_2$	$a_1b_1c_1$	$a_1b_1c_2$	$a_1b_2c_1$	$a_1b_2c_2$
$A_1B_1C_1$	$A_1B_1C_2$	$A_1B_2C_1$	$A_1B_2C_2$	$a_1b_1c_1$	$a_1b_1c_2$	$a_1b_2c_1$	$a_1b_2c_2$
$A_2B_1C_1$	$A_2B_1C_2$	$A_2B_2C_1$	$A_2B_2C_2$	$a_2b_1c_1$	$a_2b_1c_2$	$a_2b_2c_1$	$a_2b_2c_2$
$A_2B_1C_1$	$A_2B_1C_2$	$A_2B_2C_1$	$A_2B_2C_2$	$a_2b_1c_1$	$a_2b_1c_2$	$a_2b_2c_1$	$a_2b_2c_2$
$A_2B_1C_1$	$A_2B_1C_2$	$A_2B_2C_1$	$A_2B_2C_2$	$a_2b_1c_1$	$a_2b_1c_2$	$a_2b_2c_1$	$a_2b_2c_2$
$A_3B_1C_1$	$A_3B_1C_2$	$A_3B_2C_1$	$A_3B_2C_2$	$a_3b_1c_1$	$a_3b_1c_2$	$a_3b_2c_1$	$a_3b_2c_2$
$A_3B_1C_1$	$A_3B_1C_2$	$A_3B_2C_1$	$A_3B_2C_2$	$a_3b_1c_1$	$a_3b_1c_2$	$a_3b_2c_1$	$a_3b_2c_2$
$A_3B_1C_1$	$A_3B_1C_2$	$A_3B_2C_1$	$A_3B_2C_2$	$a_3b_1c_1$	$a_3b_1c_2$	$a_3b_2c_1$	$a_3b_2c_2$
S_1	S_2	S_3	S_4	S_5	S_6	S_7	S_8

فهرست منابع (فارسی و لاتین) :

ابراهیمی س.، شایگان ج.، ملکوتی م. ج.، بای بوردی م. و قدوسی ج.، (۱۳۸۸) " بررسی مکانی- زمانی رفتار برخی آلاینده‌های هیدروکربوری و حلال‌های شیمیایی در محیط متخلخل خاک" رساله دکتری دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده مهندسی کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، ۱۵۰ صفحه.

ابراهیمی س.، لادن ش. و ملکوتی م. ج.، (۱۳۸۸) "امکان سنجی پایش انواع آلاینده‌های نفتی در خاک و ارائه الگوریتم بر اساس نوع آلاینده" یازدهمین کنگره علوم خاک ایران، گرگان، ص ۲۱-۲۳.

ابراهیمی س.، شایگان ج.، ملکوتی م. ج.، بای بوردی م.، قدوسی ج.، اکبری ع. و آتش‌جامه الف.، (۱۳۸۸) "بررسی نشر آلودگی هیدروکربنی در خاک محدوده پالایشگاه سرخون" مجله علمی پژوهشی پژوهش‌های حفاظت خاک و آب، جلد ۱۶، شماره چهارم، ص ۱۰۱-۱۱۸.

ابراهیمی س.، شایگان ج. و ملکوتی م. ج.، (۱۳۹۰) "بررسی وجود و میزان احتمالی آلودگی هیدروکربنی در خاک و آب‌زیرزمینی مطالعه موردی: محدوده کارخانه آنتی‌بیوتیک سازی شهر ساری" مجله علمی پژوهشی مدیریت خاک و تولید پایدار، جلد اول، شماره ۱، ص ۶۳-۸۰.

ابراهیمی س.، شایگان ج.، ملکوتی م. ج. و اکبری ع.، (۱۳۹۰) "ارزیابی زیست محیطی و سنجش برخی فاکتورهای مهم آلودگی نفتی در اراضی محدوده پالایشگاه گاز سرخون بندرعباس" مجله علمی پژوهشی محیط شناسی، دانشکده محیط زیست دانشگاه تهران، تهران. شماره ۵۷، ص ۹-۱۸.

احمدی مقدم م. و کمانی ح.، (۱۳۸۳) "حذف ترکیبات آروماتیک چند حلقوی از خاک به کمک آنزیم" نهمین کنگره ملی مهندسی شیمی ایران، تهران، ص ۲۷۲۴-۲۷۳۱.

افیونی م. و خوشگفتارمنش ح.، (۱۳۸۵) "گزارش عملکرد قطب آلودگی خاک و آب دانشگاه صنعتی اصفهان" دانشگاه صنعتی اصفهان، ص ۲-۱۱.

اکبری م.، چهرگانی ع.ک. و محسن زاده ف.، (۱۳۸۹) "ارزیابی توانایی قارچ‌های *Aspergillus* sp. و *Acromonium* در زیست‌پالایی آلودگی‌های نفتی در شرایط آزمایشگاهی" پنجمین همایش ملی ایده‌های نو در کشاورزی، خوراسگان.

بحرانی م.ج.، (۱۳۸۴) "فراوری گیاهان علوفه‌ای" جلد اول، چاپ دوم، انتشارات دانشگاه شیراز، شیراز، صفحه ۵.

بسالت پور ا.، حاج عباسی م.ع.، خوشگفتارمنش الف.ح. و افیونی م.، (۱۳۸۶) "پالایش خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی به روش‌های گیاه‌پالایی و مکانیکی" مجموعه مقالات دهمین کنگره علوم خاک ایران، کرج، ص ۱۳۴۰-۱۳۴۱.

تقی زاده م. و کافی م.، (۱۳۸۷) "معرفی تکنولوژی گیاه‌پالایی و گیاه‌پالاینده‌های فضای سبز" مجموعه مقالات سومین همایش ملی فضای سبز و منظر شهری، ویژه نامه ضمیمه ماهنامه، شماره ۲۷.

جعفری ح. ر. و لطفی جلال آبادی ع.، (۱۳۸۳) "ارزیابی آثار محیط زیستی فعالیت های نفتی فلات قاره خلیج فارس" مجله محیط شناسی، شماره ۳۴، ص ۶۳-۵۵.

خطیبی ش.، میر سید حسینی ح.، نظامی م. ط. و ابراهیمی س.، (۱۳۸۸)، "تغییر آلاینده های نفتی در خاک اطراف پالایشگاه تهران توسط یونجه، چمن و شبدر سفید" یازدهمین کنگره علوم خاک ایران، گرگان.

دبیری م.، (۱۳۷۵) "آلودگی محیط زیست" انتشارات اتحاد، چاپ هفتم.

دریابیگی زند ع.، نبی بیدهندی غ. ر.، مهرداد دی ن. و شیردم ر.، (۱۳۸۹) "توانایی گونه های گیاهی مختلف در حذف ترکیبات نفتی از خاک و تاثیر آلودگی نفتی بر رشد این گونه های گیاهی" مجله علوم و تکنولوژی محیط زیست، دوره ی دوازدهم، شماره ۴، ص.

رضایی کلانتری ر.، (۱۳۸۲)، "تعیین تاثیر افزایش مواد هوموس بر فرایند اصلاح زیستی خاک های آلوده به هیدروکربن های نفتی" پایان نامه دوره دکتری، مهندسی عمران - محیط زیست، دانشگاه تربیت مدرس.

ریاحی ن.، صفاری م. و پسندی پور ا.، (۱۳۹۰)، "بررسی رشد و نمو گیاه سورگوم (Sorghum biocolor) در خاک های آلوده به هیدروکربن های نفتی و توانایی گیاه پالایی آن" مجموعه مقالات اولین همایش ملی گیاه پالایی ایران، کرمان، ص ۵۷-۵۸.

سعیدی س.، فتوت ا. و لکزیان ا. (۱۳۹۰)، "بررسی تجزیه زیستی نرمال - هگزادکان بوسیله باکتری های سودوموناس" دوازدهمین کنگره علوم خاک ایران، تبریز.

سیدرضوی س.ن.، خدادادی ا. و گنجی دوست ح.، (۱۳۹۰)، "حذف نفت خام از خاک به کمک شوینده‌ی زیستی" مجله محیط شناسی، سال ۳۷، شماره ۶۰، ص ۱۱۶-۱۰۷.

شریفی حسینی س.، شهبازی ع.، یزدی پور ع.ر. و کامرانفر ا.، (۱۳۸۸)، "پالایش زیستی خاک‌های آلوده به نفت خام با کودهای شیمیایی" نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)، جلد ۲۳، شماره ۳، ص ۱۵۵-۱۴۵.

شهریاری م. ح.، ثوابی فیروز آبادی غ. ر.، مینایی تهرانی د. و پدیداران م.، (۱۳۸۵)، "تاثیر مخلوط دو گیاه یونجه و فسکیو در گیاه پالایی خاک آلوده به نفت خام سبک" مجله علوم محیطی، شماره ۱۳، ص ۴۰-۳۳.

سید علیخانی س.، شرفا م. و اصغرزاده ا.، (۱۳۸۸)، "کارایی تیمارهای باکتریایی تولید داخل در درمان بیولوژیک آلودگی هیدروکربنی خاک" هفتمین همایش ملی انرژی ایران، تهران.

مینایی تهرانی د.، حرفت منش ع. و آذری دهکردی ف.، (۱۳۸۴)، "مطالعه تجزیه زیستی نفت خام سنگین در خاک با مقیاس پایلوت" مجله علوم محیطی، شماره ۱۰، ص ۸۲-۷۱.

یوسفی نیا د.، (۱۳۸۲)، "تصفیه بیولوژیکی خاک‌های آلوده به مواد نفتی با استفاده از لجن فاضلاب شهری" پایان‌نامه کارشناسی ارشد، مهندسی عمران-محیط زیست، دانشگاه تربیت مدرس.

Abioye P.O., Abdul Aziz, A. and Agamuthu P. (2010) "Enhanced biodegradation of used engine oil in soil" **J. Water. Air. Soil. Pollut.** **209**: 173-179.

Adam G. and Duncan H. (2002) "Influence of diesel fuel on seed germination" **Environ. Pollut.** **120**: 363-370.

Ahn Y., Jung H., Tatavarty R., Choi H., Yang J. and Kim I.S. (2005) "Monitoring of petroleum hydrocarbon degradative potential of indigenous microorganism in ozonated soil" **Biodegrad.** **16**: 45-56.

Ajitkumar P.V., Gangadhara K.P., Manilal P. and Kunhi A.A.M. (1998) **Soil Boil. Chem.** **30**: 1053.

Aller L., Bennet T., Lehrs J., Petty R.J., and Hackett G. (1987) "Drastic: A standardized system for evaluating ground water pollution potential using hydrogeologic U.S.EPA" **600:2-87-035**.

AL-Zalzaleh H. and Shabbir G. (2004) "Effect of bioremediated soil on growth of different plant species" **Kuwait J. Sci. Eng.** **31**: 107-118.

Anderson T.A., Guthrie E.A. and Walton B.T. (1993) "Bioremediation in the rhizosphere" **Environ. Sci. Technol.** **27**: 2630-2636.

Antizar-Ladislao B., Lopez-Real J. and Beek A.J. (2006) "Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in an aged coal tar contaminated soil under in-vessel composting conditions" **Environ. Pollut.** **141**: 459-468.

Anderson W.G. (1989) Wettability literature survey: Part 3. "The effects of Wettability on the electrical properties of porous media" **petro Technol.** **1371-1378**, Dec.

April W. and Sims R.C. (1990) "Evaluation of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil" **J. Chem.** **20**: 253-265.

Baker J.M. (1971) "The effect of oils on plants" **Environ. Pollut.** **1**: 27-44.

Banks M.K., Govindaraju R.S., Schwab A.P. and Kulakow P. (2000) Field demonstration. Pp.3-85. In: Fiorenza S., Oubre C.L. and Ward C.H. (Eds.),

"Phytoremediation of Hydrocarbon Contaminated Soil" Lewis Publishers. Boca Raton. FL.

Banks M.K., Schwab A.P., Liu B., Kulakow P., Smith J.S. and Kim R. (2003) "The effect of plants on the degradation and toxicity of petroleum contaminants in soil" A field assessment. **Adv. Biochem. Eng. Biotech.** 78: 75-96.

Banks M.K., Mallede H. and Rathbone K. (2003b) "Rhizosphere microbial characterization in petroleum contaminated soil" **Soil sed. Contam.** 12: 371-385.

Barnes D.K., Goplen D.P., Baylor J.E. and Sheffer C.C. (1985) Alfalfa. Pp. 89-98. **"Forage Crop Production"** 2. Bahrani, M.J. Shiraz University Press 315. Shiraz.

Binet P., Portal J.M., Leyval C. (2000) "Dissipation of 3-6 ring polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of ryegrass" **Soil. Biol. Biochem.** 32: 2011-2017.

Biswas S.S.K., Chaudhari S. and Mukhreji S. (2005) "Microbial uptake of diesel oil sorbed on soil and spill clean-up sorbents". **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 80: 587-593.

Bower C.A., Ogata G. and Tucher J.M. (1969) "Rootzone soil profiles and alfalfa growth as influenced by irrigation water salinity and leaching fraction" **Agron. J.** 61: 783-85.

Boopathy R. (2003) "Anaerobic degradation of No. 2 diesel fuel in the wetland sediments of bacteria-Terrebone estuary under various electron acceptor conditions" **Biores. Technol.** 86: 171-175.

Boopathy R. (2004) "Anaerobic degradation of No. 2 diesel fuel in soil: a soil column study" **Biores. Technol.** 94: 143-151.

Boulton C.A. and Ratledg C. (1984) "The physiology of hydrocarbon-utilization microorganisms" In: Wiseman, A (Ed), **Topics information and enzyme technology.** Vol 9. Ellis Horwood. Chichester. Pp. 11-17.

Bremner J.M. (1996) Nitrogen-total. P. 1585-1122. In: Sparks D.L., Page A.L., Helmke P.A. and Loeppert R.H. "method of soil analysis" Published by: soil science society of American, Inc. American society of agronomy. Inc. Madison, Washington, USA.

Chaîneau C.H., Morel J.L. and Oudot J. (1997) "Phytotoxicity and plant uptake of fuel oil hydrocarbons" **J. Environ. Qual.** **26:** 1478-1483.

Chen Y.C., banks M.K. and Schwab A.P. (2003) "Pyrene degradation in the rhizosphere of tall fescue (*Festuca arundinacea*) and switchgrass (*Panicum virgatum* L.)" **Environ. Sci. Technol.** **37:** 5778-5782.

Cunningham S.D., Anderson T.A., Schwab P.A. and Hsu, F.C. (1996) "Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants" **Adv. Agro.** **56:** 44-114.

Daryabeigi Zand A., Nabi Bidhendi GH.R. and Mehrdadi N. (2010) "Phytoremediation of total petroleum hydrocarbons (TPHs) using plant species in Iran" **Turk. J. Agric.** **34:** 429-438.

De-Haan R.L. and Barnes D.K. (1998) "Inheritance of pod type, stem color, and dwarf growth habit in *Medicago polymorpha*" **Crop Science.** **38:** 1558-1561.

Ding K.Q., Luo Y.M., Liu S.L., Wu L.H., Xin W.Q., Li Z.G. and Tao S. (2004) "Dynamics in benzo[a]pyrene concentrations in soil as influenced by ryegrass plants" **Act. Pedologi. Sin.** **41:** 348-353.

Dunn J.H. and Diesburg K. (2004) "Turf Management in The Transition Zone" Vol. 1. Wiley, USA. Pp. 288.

Ebrahimi s, Shayegan j., Malakouti M .J. Akbari A. and Atashjameh A. (2009) "Investigation of Hydrocarbon Pollution Spreading in soil around sarkhoun Refinery" 8 th World Congress of Chemical engineering, Montreal, Quebec, Canada, August.

Ebrahimi s., Ghorbanian M., Alikhani S., Khatibi S. and Malakouti. M. J. (2008) "Feasibility in Application of Different Remediation Methods of Petroleum Pollutants in soil and its Algorithm in Industrial Case" University of Natural Resources and Applied Life Sciences (BOKU), EUROSIL 2008, Pp: 86, Vienna, Austria.

Escalante-Espinoza E., Gallegos-Martinez M.E., Favela-Torres E. and Gutierrez-Rojas M. (2005) "Improvement of hydrocarbon phytoremediation rate by *Cyperus laxus* lam" Inoculated with a microbial consortium in a model system. **Chem. 59: 405-413.**

Espinoza-Urgel M. (2004) "Plant-associated *Pseudomonas* populations: molecular biology, DNA dynamics, and gene transfer" **Plasmid. 52: 139-150.**

Ferro A.M., Rock S.A., Kennedy J., Herrick J.J. and Kulakow P.A. (1999) "Biodegradation of soils contaminated with wood preservatives: greenhouse and field evaluations" **Int. J. Phytoremed. 3: 289-306.**

Frick C.M., Farrell L.E. and Germida J.J. (1999) "Assessment of phytoremediation as an In-Situ technique for cleaning oil-contaminated sites" Petroleum Technology Alliance Canada. Calgary.

Friedrich J., Zalar P., Mohorcic M., Klun U. and Krzan A. (2007) "Ability of fungi to degrade synthetic polymer nylon-6" **Chem. 67: 2089-2095.**

Gaffney T., Friedrich L., Vernooij B., Negrotto D., Nye G., Uknes S., Ward E., Kessmann H. and Ryals J. (1993) "Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance" **Science. 261: 754-756.**

Gagni S. and Cam D. (2007) "Stigmastane and hopan as conserved biomarkers for estimatin oil biodegradation in a former refinery plant-contaminated soil" **Chem. 67: 1975-1981.**

Gallegos-Martinez M.G., Gomez-Trujillo A.G., Gonzales L.G., Montes O.G. and Gutier-rezRojas M. (2000) "Diagnostic and resulting approached to restore petroleum-contaminated soil in a Mexican tropical swapm" **Water. Sci. Technol. 42: 377-384.**

Gunther T., Dornberger U. and Fritsche W. (1996) "Effects of ryegrass on biodegradation of hydrocarbons in soil" **Chem. 33: 203-215.**

Haderlein A., Legros R. and Ramsay B.A. (2005) "Pyrene mineralization capacity increase with compost maturity" Biodegradation (in press).

Harvey Particia, J., Campenella B.F. and Castro P.N.L. (2002) "Phytoremediation of polyaromatic hydrocarbons, Anilines and Phenols, Environmental Science and Pollution" Res **9**: 29-47.

Hedge R.S. and Fletcher J.S. (1996) "Influence of plant growth stage and season on the release of root phenolics by mulberry as related to development of phytoremediation technology" **Chem. 32**: 2471-2479.

Huang X., Alawi Y.E., Penrose D.M., Glick B.R. and Greenborg B.M. (2004) "A multi-process phytoremediation system for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils" **Environ. Pollut. 130**: 465-476.

Huang X.D., El-Alawi Y., Gruska J., Glick B. and Greenbaerg B. M. (2005) "A multi-process phytoremediation system for decontamination of persistent total petroleum hydrocarbons (TPHs) from soil" **Microchemical journal.81**:139-147.

Hutchinson S.L., Banks M.K. and Schwab A.P. (2001) "Phytoremediation of aged petroleum sludge: Effect of inorganic fertilizer" **J. Environ. Qual. 30**: 395-403.

Ijah U.J.J. and Ndana M. (2003) "Stimulated biodegradation of crude oil in soil amended with periwinkle shells" **J. Environ. 23**: 249-254.

Jenifer L.K., John N.K., Hung L. and Jack T.T. (2005) "The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil" **Environ. Pollut. 133**: 455-465.

Joo H.S., Shoda M. and Phae C.G. (2007) "Degradation of diesel oil in soil using a food waste composting process" **J. Biodegrad. 18**: 597-605.

Kaimi E., Mukaidani T., Miyoshia S. and Tamaki M. (2006) "Ryegrass enhancement of biodegragation in diesel-contaminated soil" **Environ. Exp. Bot. 55(1-2)**: 110-119.

Kaimi E., Mukaidani T. and Tamaki M. (2007) "Screening of twelve plant species for phytoremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil" **Plant prod. Sci. 10(2)**: 211-218.

Kao S. (1996). Phosphorus. P. 869-920. In: Sparks D.L., Page A.L., Helmke P.A. and Loeppert R.H. "method of soil analysis" Published by: soil science society of American, Inc. American society of agronomy. Inc. Madison, Washington, USA.

Karthikeyan R., Davis L.C., Mankin K.R., Errckson L.E. and Kulakow P.A. (1999) "Biodegradation of jet fuel (JP-8) in the presence of vegetation" In: Proceeding of the 1999 conference on hazardous waste research, St. Louis, Missouri, Pp: 243-256.

Kijune s., Munster C.L., Rhykerd R., Drew M.C. and Yavuz Corapciogl M. (2003) "The use of vegetation to remediate soil freshly contaminated by recalcitrant contaminants" **Water res. 37:2408-2418.**

Kim M.H. and Hao O.J. (1999) "Cometabolic degradation of chlorophenols by *Acinetobacter* species" **Water. Res. 33: 562-574.**

Komisar S.J. and Park J. (1997). "Phytoremediation of diesel contaminated soil using alfalfa" In: Furth International in Situ and on Site Bioremediation Symposium. New Orleans. LA. Vol. Pp. 3: 331-36.

Kulik N., Goi A., Trapido M. and Tuhkanen T. (2006) "Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by combined chemical pre-oxidation and bioremediation in creosote contaminated soil" **J. Environ. Manag. 78: 382-391.**

Kuwano Y. and Shimizu Y. (2006) "Bioremediation of coal contaminated soil under sulfatereducing condition" **Environ. Technol. 27: 95-102.**

Kuzyakov Y. (2002) "Review: factors affecting rhizosphere priming effects" **J. Plant. Nutr. Soil Sci. 165: 382-396.**

Larson A.I. (1967) "Oil geology book. Friman" W.H

Lau K.L., Tsang Y.Y. and Chiu S.W. (2003) "Use of spent mushroom compost to bio remediate PAH-contaminated samples" **Chem. 52: 1532-1546.**

Lee S.H., Oh B.I. and Kim J.G. (2008) "Effect of various amendments on heavy mineral oil bioremediation and soil microbial activity" **Biores. Technol. 99: 2578-2587.**

Li Q., Kang C. and Zhang C. (2005) "Waste water produced from an oilfield and continuous treatment with and oil-degrading bacterium" **Process Biochem.** **40:** 873-77.

Liste H.H. and Alexander M. (1999) "Rapid screening of plants promoting phenanthrene degradation" **J. Environ. Qual.** **28:** 1376-1377.

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

Liste H.H. and Prutz I. (2006) "Plant performance, dioxigenase-expressing rhizosphere bacteria, and biodegradation of weathered hydrocarbons in contaminated soil" **Chem.** **62:** 1411-1420.

Marquez-Rocha F.J., Hernandez-Rodriguez V.Z. and Teresa Lamela M.A. (2000) "Biodegradation of diesel oil in soil by microbial consortium" **Water. Air. Soil. Pollut.** **128:** 313-320.

McLead B., Moutray J.B. and Bouton J.H. (1988) Geographic adaptation and cultivar selection. Pp. 596-618. "**Forage Crop Production**". 2. Bahrani, M.J. Shiraz University Press 315. Shiraz.

Merkel N., Schultez-Kraft R. and Infante C. (2004a) "Phytoremediation of petroleum-contaminated soil in the tropics-preselection of plant species from eastern Venezuela" **J. App. Bot. Food. Qual.** **78:** 185-192.

Merkel N., Schultez-Kraft R. and Infante C. (2004b) "Phytoremediation in the tropics – The effect of crude oil on the growth of tropical plants" **J. Bioremed.** **8:** 177-184.

Merkel N., Schultz-Kraft R. and Infante C. (2005a) "Assessment of tropical grasses and legumes for phytoremediation of petroleum contaminated soils" **Water. Air. Soil. Pollut.** **165:** 195-209.

Merkel N., Schultz-Kraft R. and Infante C. (2005b) "Phytoremediation in the tropics – influence of heavy crude oil on root morphological characteristics of graminoids" **Environ. Pollut.** **138:** 86-91.

Muratova A.Y., Turkovskaya O.V., Antonyuk L.P., Makarov O.E., Pozdnyakova L.I. and Ignatov V.V. (2005) "Oil-oxidizing potential of associative rhizobacteria of the genus *Azospirillum*" **Microbiol. J. Vol. 74: 248-254.**

Muratova A.Y., Turkovskaya O.V. and Hubner T., Kusck P. (2003) "Studies of the efficacy of alfalfa and reed in the phytoremediation of hydrocarbon polluted soil" **Appl. Biochem. Microbiol. 39: 599-605.**

Myia R.K. and Firestone M.K. (2000) "Phenanthrene-degrader community dynamics in rhizosphere soil from a common annual grass" **J. Environ. Qual. 29: 584-592.**

National Research Council. (1994) "**Alternatives for Ground Water Cleanup**" Washington: National Academy Press.

Nedunuri K.V., Govindaraju R.S., Banhs M.K., Schwab A.P. and Chen Z. (2000) "Evaluation of phytoremediation for field scale degradation of total petroleum hydrocarbons" **Environ. Engin. 126: 483-490.**

Nelson D.W. and Sommers L.E. (1982) Total carbon, organic carbon and organic matter. P. 539-580. In: A.L. page(ed). "**Methods os soil analysis part 2**" 2nd ed. Chemical and microbiological properties. Agronomy monograph no.9.SSSA and ASA, Madison, WI.

Nichols T.D., Wolf D.C., Rogers H.B., Beyrouty C.A. and Reynolds C.M. (1997) "Rhizosphere microbial populations in contaminated soil" **Water. Air. Soil. Pollut. 95: 165-178.**

Obuekwe C.O., Hourani G. and Radwan S.S. (2001) "High-Temperature hydrocarbon biodegradation activities in Kuwaiti desert soil samples" **Folia. Microbial. 46(6): 535-539.**

Okieimen C.O. and Okieimen F.E. (2002) "Effect of natural rubber processing sludge on the degradation of crude oil hydrocarbons in soil" **J. Biores. Technol. 82: 95-97.**

O'Mahony M.M., Dobson A.D.W., Barnes J.D. and Singleton I. (2006) "The use of ozone in the remediation of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated soil" **Chemosphere. 63: 307-314.**

Ouyang W., Liu H., Murygina V. and Yongyong Y. (2005) "Comparison of bioaugmentation and composting for remediation of oily sludge": A field-scale study in china, process **Biochem. 40: 3763-3768.**

Pal D. and Overcash M.R. (1987) "Plant-soil assimilative capacity for oils" In: Proceedings of the 85th National meeting of the American Institute of Chemical Engineers, Philadelphia.

Piazza G.A., Jangid K., Lukasik K., Nalecz-Jaweski G., Berry C.J. and Brigmon R.L. (2008) **Bull. Environ. Contam. Toxicol. 89: 329-333.**

Piceno Y.M. and Lovell C.R. (2000) "Stability in natural bacterial communities: nutrient addition effects on rhizosphere diazotrophs assemblage" **J. Ecol. 39: 32-40.**

Pope D.F. and Matthews J.E. (1993) "Bioremediation using the land treatment concept" USEPA/600/R-93/194. Robert S. Kerr, Environmental Research Laboratory. US Environmental Protection Agency.

Pradhan S.P., Conrad J.R., Paterek J.R. and Srivastava V.J. (1999) "Potential of phytoremediation for treatment of PAHs in soil at MGP sites" **Journal of soil contamination. Volume.7:467-480.**

Radwan S.S., Dashti N., EL-Nemr I.M. and Khanafer M. (2007b) "Hydrocarbon utilization by nodule bacteria and plant growth-promoting rhizobacteria" **Int J. Phytoremed. 9: 1-11.**

Reilley K.A., Banks M.K. and Schwab A.P. (1996) "Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere" **J. Environ. Qual. 25: 212-219.**

Rentz J.A., Alvarez P.J.J. and Schnoor J.L. (2005) "Benzo[a]pyrene co-metabolism in the presence of plant root extracts and exudate: implications for phytoremediation" **Environ. Pollut. 136: 477-484.**

Reynolds C.M., Wolf D.C., Gentry T.J., Perry L.B., Pidgeon C.S., Koene, B.A., Rogers H.B. and Beyrouty C.A. (1999) "Plant enhancement of indigenous soil microorganisms: A low-cost treatment of contaminated soils" **Polar. Rec.** **35**: 33-40.

Rhoades J. (1996) "Electrical conductivity and total dissolved solids" P. 417-436. In: Sparks D.L., Page A.L., Helmke P.A. and Loeppert R.H. "method of soil analysis" Published by: soil science society of American, Inc. American society of agronomy. Inc. Madison, Washington, USA.

Ros M., Rodriguez I. and Hernandez T. (2010) "Microbial communities involved in the bioremediation of an aged recalcitrant hydrocarbon polluted soil by using organic amendments" **J. Biores. Technol.** **101**: 6916-6923.

Rovina A.D. and McDugall B.M. (1967) Microbiological and biochemical aspects of the rhizosphere. In: A.D. McClaren and G.H. Peterson (eds.), "Soil Biochemistry", Marcel Dekker, Inc. New York. Pp. 417-463.

Salantiro J.P., Dorn P.B., Huesemann M.H., Moore K.O., Rhodes L.A., Jackson L.M.R., Vipond T.E., Western M.M. and Wisniewski H.L. (1997) "Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment" **Environ. Sci. Technol.** **31**: 1769-1776.

Schackelford C. D., Daniel D.E. and Liljestrand H.M. (1989) "Diffusion of inorganic chemical species in compacted clay soil" Contaminated hydrology. Vol. 3, no. 4, pp.241-273.

Schaefer M., Petersen S.O. and Filser J. (2005) "Effects of *Lumbricus terrestris*, *Allolobophora chlorotic* and *Eiesenia fetida* on microbial community dynamics in oil-contaminated soil" **Soil. Biology. Biochem.** **37**: 2065-2076.

Schwab A.P. and Banks M.K. (1994) "Biologically mediated dissipation of polyaromatic hydrocarbons in the root zone" Bioremediation through Rhizosphere Technology, Andersson, T. and J. Coats (eds.), American chemical Society Symposium, series 563, American Chemistry Society Washington, DC. Pp: 132-141.

Schwab A.P., Banks M.K. and Arunachalam M. (1995) "Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in rhizosphere soil" Bioremediation of Recalcitrant organics. Hinchee, R.E., Anderson, D.B., Hoeppe, R.E. Battelle press: Columbus. 23-29.

Sims G.K. (1990) "Biological degradation of soil" Pp. 289-330. In: Lal, R., Stewart, B.A. (Eds.), Soil degradation. Advances in soil science, vol. 11. Springer-Verlag. New York.

Talaie A.R., Jafaarzadeh N., Talaie M.R. and Beheshti M. (2008) "Optimization of floating crude Biodegradation by experimental design method" **Koomesh Journal of semnan University Medical Sciences. 11(1): 41-54.**

Teng Y., Luo Y., Sun M., Liu Z., Li Zh. and Christie P. (2010) "Effect of bioaugmentation by *Paracoccus* sp. Strain HPD-2 on the soil microbial community and removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from an aged contaminated soil" **Biores. Technol. 101: 3437-3443.**

Thoma G.J., Lam T.B. and Wolf D.C. (2003a) "Mathematical modeling of phytoremediation of oil-contaminated soil" Model development. **Int: J. Phytorem. 5: 41-55.**

Thoma G.J., Lam T.B. and Wolf D.C. (2003b) "Mathematical modeling of phytoremediation of oil-contaminated soil" Sensitivity analysis. **Int: J. Phytorem. 5: 125-136.**

Thomas, G.W. (1996) Soil pH and soil acidity. P. 475-490. In: Sparks D.L., Page A.L., Helmke P.A. and Loeppert R.H. "method of soil analysis" Published by: soil science society of American, Inc. American society of agronomy. Inc. Madison, Washington, USA.

Toner E.J. and Laceyval C. (2003) "Rhizosphere gradients of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) dissipation in two industrial soil and the impact of arbuscular mycorrhiza" **Environ. Sci. Technol. 37: 2371-2375.**

UM-BBD (The university of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database), (2003) "Microbial biocatalytic reactions and biodegradation pathway primarily for xenobiotic", chemical compounds. At: <http://umbbd.ahc.umn.edu/>. Retrieval 2003-12-05.

USEPA. (2001) Treatment technologies for site cleanup. Annual Status Report, Office of Solid Waste and Emergency Response (5102G), 10th ed. United State Enviromental Protection Agency.

Vieira P.A., Vieira R.B., Franc F.P. and Cardoso V.L. (2007) "Biodegradation of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline" **Journal of Hazardous Materials**. **140**: 52- 59.

Walworth J.L., and Reynolds C.M. (1995) "Bioremediation of a petroleum-contaminated cryic soil: effects of phosphorous, nitrogen, and temperature" **Journal of Soil Contam**. **4**: 299-310.

Wang Z., Gao D., Li F., Zhao J., Xin Y., Simkins S. and Xing B. (2008b) "Petroleum hydrocarbon degradation potential of soil bacteria native to the Yellow River Delta" **Ped**. **18**: 707-716.

Wanger-Dobler I. (2003) "Microbial inoculants—snake oil or panavea? **Bioremediation**" A critical review. Horizontal scientific press. Pp. 260-280.

White P.M., Wolf D.C., Thoma G.J. and Reynolds C.M. (2006) "Phytoremediation of alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons in a crude oil-contaminated soil" **Water. Air. Soil. Pollut. J**. **169**: 207-220.

Wilck W. (2007) "Global patterns of polycyclic hydrocarbons (PAHs) hn soil" **Geoderma** **141**, 157-166.

Wilson S.C. and Jones K.C. (1993) "Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) " a review. **Environ. Pollut**. **81**: 229-249.

Wilste C.C., Rooney W.L., Chen Z., Schawb A.P. and Banks M.K. (1998) "Greenhouse evaluation of agronomic and crude oil-phytoremediation potential among alfalfa genotypes" **J. Environ. Qual**. **27**: 169-173.

Wolicka D., Suzek A., Borkowski A. and Bielecka A. (2009) "Application of aerobic microorganisms in bioremediation in site of soil contaminated by petroleum products" **J. Biores. Technol.** **100**: 3221-3227.

Xu C. and Xia B.C. (2007) "Research progress in rhizeremediation on polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soil" **Ecol. Environ.** **16**: 216- 222.

Xu S.Y., Chen Y.X., Wu W.X., Wang K.X., Lin Q. and Liang X.Q. (2006) "Enhanced dissipation phenanthrene and pyrene in spiked soils by combined plants cultivation" **Sci Total Environ.** **363**: 206-215.

Abstract

Pollution caused by crude oil and its derivatives is the most prevalent problem throughout the world, during its crude oil extraction, transport, refining and burning. Oil spills can have serious effects on humans and other creatures. Therefore cleaning up environmental oil pollution is an alternative technique for physicochemical methods. The purpose of this study was to evaluate the biodegradation rate of fuel-oil contaminated soil by alfalfa (*Medicago scutellata*) and grass (*Poa bulbosa*) along with *Pseudomonas putida* bacterium. Thus, alfalfa and grass seeds were planted in two density levels with and without *Pseudomonas putida* in pots containing fuel oil-contaminated soil under greenhouse condition. Soil samplings were done in germination, vegetative and reproductive's stages of plant's growth. Results obtained in this study showed that both alfalfa and grass plants decreased fuel oil in the contaminated soil. The treatment of bacteria and the plants with high density had a positive effect in reducing the amount of soil's hydrocarbon contamination. However, this reduction was not significant than treatments without bacteria and plants with less density. Also, petroleum hydrocarbon contaminated soil to reduce growth and germination of both species.

Keywords: Soil pollution, *Pseudomonas putida* bacteria, Phytoremediation, Fuel oil



Shahrood University Of Technology

Faculty Of Agriculture

Department Of Water And Soil

Thesis M.Sc

**Investigation of changes in oil pollution of soil by Bio-
cleanup systems**

Maryam Khosravi Nodeh

Supervisors

Dr. Ali Abbaspour

Dr. S. Soheila Ebrahimi

Advisor

Dr. Hamidreza Asghari

January 2013