مقاله پژوهشی

نشریه فیزیولوژی محیطی گیاهی، سال شانزدهم، شماره ۶۲، تابستان ۱۴۰۰ / صفحات: ۶۴-۵۰
Doi: 10.30495/iper.2021.679551 Dor: 20.1001.1.76712423.1400.16.62.4.4

# بررسی تاثیر سینرژیستیک گیاه‌پالایی و ایزوله باکتریایی در حذف هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی (PAHs) از خاک آلوده

**مهدی خزائی[۱]، علیرضا اطمینان[۲]، سولماز دشتی[۳]*، سیداحمد حسینی[۱]**

[۱]گروه محیط زیست و منابع طبیعی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران.

[۲]گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران.

[۳] گروه محیط زیست، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران.

**تاریخ دریافت: ۹۹/۰٤/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰٦/۰۵**

**چکیده**

هیدروکربن‌های آروماتیک سرطان‌زا و سمی بوده و آسیب‌های جدی به محیط زیست و موجودات زنده وارد می‌کنند. این ترکیبات عموماً به خاک‌ها تخلیه می‌شوند. روش‌های بیولوژیکی با بکارگیری میکروارگانیسم‌های موثر جدا شده از خاک‌های آلوده نفتی و گیاهان مقاوم برای پاکسازی این خاک‌ها ترجیح داده می‌شوند. هدف مطالعه حاضر بررسی اثر گیاه کنوکارپوس (*Conocarpus erectus*) و باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*) بر میزان حذف Polycyclic Aromatic hydrocarbons (PAHs) از خاک‌های آلوده و شور حوضچه تبخیر واحد نمکزدایی در طول ۲۷۵ روز و در شرایط غیرآزمایشگاهی بود. آزمایش بصورت فاکتوریل با دو فاکتور، در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار طراحی شد. فاکتورهای آزمایش شامل٤ سطح (گیاه، باکتری، گیاه و باکتری و خاک بدون کاربرد گیاه و باکتری «به‌عنوان شاهد») و غلظت آلاینده در ۵ سطح نفت خام بنگستان با غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱، ۲/۵ و ۵ درصد وزنی بود. با افزایش غلظت هیدروکربن در هر ۵ سطح، درصد حذف و نیز وزن خشک ریشه، اندام هوایی گیاه و کلروفیل کاهش یافت. بالاترین درصد حذف در دو غلظت صفر و۱ درصد با درصدهای ۹۹/٤۳، ۵۹/۸۹ و ۵۷/۰۱ درصد به تیمارهای دارای باکتری و گیاه، تیمارهای جداگانه باکتری و گیاه تعلق داشت.. کارایی گیاه و باکتری در حذف هیدروکربن‌های نفتی تقریباً برابر بود. تیمارهای دارای باکتری در مقایسه با تیمارهای فاقد آن کلروفیل، وزن خشک ساقه و اندام هوایی بیشتری داشتند .نتایج نشان داد که حضور گیاه و باکتری به صورت جداگانه اثر مثبتی برتجزیه میزان PAHs داشت اما اثر سینرژیستیک باکتری و گیاه در تجزیه میزان PAHs مثبت‌تر بود (P<۰/۰۵).

***واژه‌های کلیدی:*** باکتری، سینرژیستیک، گیاه‌پالایی، هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی.

**مقدمه**

زیست پالایی استفاده از سیستم‌های زنده پویا برای کاهش، سم‌زدایی، تبدیل، انتقال یا تثبیت آلاینده‌های سمی محیط زیست با حداقل انرژی و مواد شیمیایی است. یکی از استراتژی‌های زیست پالایی، گیاه پالایی است که در آن از گیاهان برای حذف آلودگی از خاک استفاده می‌شود. سیستم پیچیده‌ی ریشه گیاه که بخش زیادی از خاک را درگیر می‌کند یکی از مزایایی مهم گیاه پالایی است. سیستم ریشه از جمعیت‌های زیادی از باکترهای ریزوسفری حمایت کرده و تولید ترشحاتی می‌کنند که می‌توانند مستقیم بر روی فعالیت جمعیت باکتری‌های موجود

*نویسنده مسئول: soolmazdashti@iauahvaz.ac.ir

در ریزوسفر و از بین بردن آلودگی تاثیر گذار باشد. گیاهان مورد استفاده برای این هدف باید انعطاف و با سازش پذیری بالایی برای زیست در شرایط استرس‌زا در حضور هیدروکربن‌ها را داشته باشد( Bisht et al., 2015).

هیدروکربن‌های نفتی، ترکیباتی با دو یا تعداد بیشتری حلقه‌های بنزنی هستند. این ترکیبات عموماً به وسیله‌ی تجزیه حرارتی مولکول‌ها آلی و ترکیبات مشابه تولید می‌شوند و منبع عمومی آنها در محیط زیست فعالیت‌های انسانی، آتش سوزی‌های طبیعی، تخلیه نفت و آتشفشان‌ها است. هیدروکربن‌های نفتی به عنوان آلودگی‌های سمی، جهش‌زا و سرطان‌زا دسته بندی شده ( Kosnar and Tlustos, 2018; Motamedimehr and Gitipour, 2019) که در شرایط طبیعی به آسانی از محیط زیست حذف نمی‌شوند و با افزایش وزن مولکولی، مقاومت این ترکیبات افزایش می‌یابد. به دلیل حضور گسترده‌ی این ترکیبات در هوا، خاک و رسوبات مطالعه‌ی این ترکیبات به سبب انتقال در زنجیره غذایی اهمیت فوق‌العاده‌ای دارد (Dudhagara et al., 2016). روش‌های متفاوتی همانند روش‌های بیولوژیکی، حرارتی، فیزیکی، شیمیایی و سخت سازی برای حذف این مواد از خاک کاربرد دارد ( Kalantary et al., 2014). در میان روش‌های مختلف حذف آلودگی، تکنیک‌های بیولوژیکی اغلب هم از نظر هزینه-کارآمدی و هم از نظر دوست دار محیط زیست بودن کاربرد گسترده‌تری دارند ( Ravanipour et al., 2015).

سیمبیوتیک بین گیاه، میکروارگانیسم و محیط زیستی یکی از روش‌های جدید پاکسازی آلودگی نفتی خاک است. اعتقاد بر این است که جداسازی باکتری‌های بومی با توانایی کاهش هیدروکربن‌های نفتی و افزودن آنها به ریزوسفر گیاهان کارایی حذف را افزایش داد که در این زمینه باکتری‌های گرم منفی اهمیت بالایی دارند (Swaathy et al., 2014). Doyle و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که بالاترین سطح حذف هیدروکربن‌های نفتی در ریشه گیاهان اتفاق می‌افتد. Eskandary و همکاران (۲۰۱۷) استفاده توام گیاه *Festuca arundinacea* و باکتری‌های *Bacillus licheniformis* و *Bacillus mojavensis* جدا شده از خاک آلوده و Ebadi و همکاران (۲۰۱۹) تاثیر توام استفاده از دو گیاه *Salicornia persica* و *Festuca arundinacea* و باکتری *Pseudomonas aeruginosa* در کاهش آلودگی هیدروکربنی خاک را موثر دانستند.

جمعیت‌های ویژه‌ای از باکتری‌های تجزیه کننده جاذب هیدروکربن‌های نفتی هستند که در بر هم‌کنش گیاه – باکتری در فرآیند تجزیه زیستی نقش دارند. از طرفی، گیاهان از طریق تاثیرات ریزوسفری، از تجزیه هیدروکربن‌ها توسط باکتری‌ها در ناحیه ریشه حمایت می‌کنند (Abena et al., 2019). از این‌رو به‌نظر می‌رسد که استفاده از ترکیب گیاه و برخی از باکتری‌ها می‌تواند در افزایش کارایی تجزیه‌ی زیستی آلودگی موثر باشد (Chukwuma et al., 2019; Ebadi et al., 2018). از این رو در این مطالعه تاثیر ترکیب گیاه کنوکارپوس (*Conocarpus erectus*) و باکتری سودوموناس آئروژینوزا ( *Pseudomonas aeruginosa*) در مقایسه با حالت منفرد گیاه و یا باکتری در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی سنگین حوضچه‌ی تبخیر واحد نمکزدایی یکی از واحدهای نفت و گاز اهواز (خوزستان، ایران) مورد بررسی قرار گرفته است.

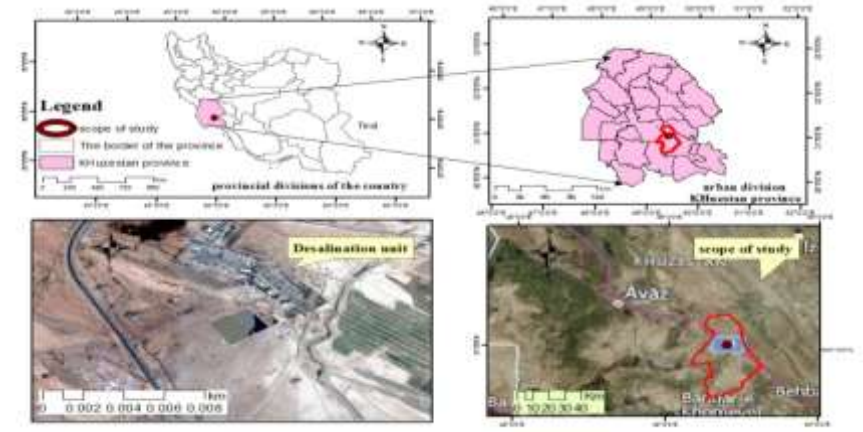
## مواد و روش‌ها

با توجه به کاربردی بودن زیست‌پالایی گیاهی و باکتریایی، مطالعه‌ی حاضر در سال ۱۳۹۷ در محدوده ۱۰۰ متری حوضچه تبخیر واحد نمک‌زدایی یکی از

واحدهای نفت و گاز اهواز (خوزستان، ایران) و مطابق شکل ۱، انجام شد. در این حوضچه‌ها به جز پالایش طبیعی، هیچ فعالیتی جهت رفع آلودگی صورت نگرفته است. ویژگی‌های خاک مورد استفاده در جدول ۱ ذکر شده است.

**جدول ۱:** ویژگی‌های خاک

| بافت | EC (Ms/cm) | pH | ماده آلی (درصد) | کلراید (Meq/L) |
|---|---|---|---|---|
| رسی – لای | ۲۳/۹ | ۷/۲ | ۷۰/۷ | ۷۹/۳ |




**شکل ۱:** موقعیت جغرافیایی محدوده مورد مطالعه

در این پژوهش در بخش زیست‌پالایی از ۶۰ اصله نهال گیاه کنوکارپوس (*Conocarpus erectus*) یک و نیم ساله به عنوان گیاهی با سازگاری زیاد به هوای گرم و خشک و با توانایی رشد در خاک‌های اسیدی و قلیایی شنی و رسی عاری از مواد آلی (خاک بخش زیادی از مناطق فعال استخراج نفت در ایران را شامل می‌شود) که دارای ریشه‌های رونده عمودی و افقی است، استفاده شد (Seyed Alikhani et al., 2011).

باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*) به عنوان باکتری زیست یار از خاک منطقه‌ی مورد مطالعه جداسازی شد. این باکتری مصرف کننده مواد آلی بوده و از محیط کشت تمام معدنی جدا شد (جدول ۲) (Mukred et al., 2008). برای خالص‌سازی میکروارگانیسم‌ها از خاک منطقه، از پاساژهای متناوب در محیط کشت نوترینت آگار (R2A-Agar با کد ۱۰۰۴۱۶) و دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. در انتها از میکروارگانیسم‌های خالص سازی شده، اسلنت تهیه و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Nnamchi et al., 2006).

**جدول ۲:** محیط کشت معدنی (MSM) استفاده شده در مطالعه (Nnamchi et al., 2006).

| ترکیب | $KH_2PO_4$ | $NH_4SO_3$ | $MgSO_47H_2O$ | $COCl_2$ | $CaCl_2$ | $Fe_2(SO_4)_3$ | $Na2HPO_4$ | $MnSo_4.7H_2O$ | $(NH_4)_6MO_7O_2$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| مقدار (g/l) | ۰/۰۰۰۵ | ۲/۵ | ۰/۵ | ۰/۰۰۵ | ۰/۰۰۱ | ۰/۰۱ | ۱ | ۰/۰۰۰۱ | ۰/۰۰۰۱ |

برای انتخاب باکتری‌هایی با قدرت تجزیه هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی میکروارگانیسم‌های موجود بر روی محیط کشت نوترینت براث به ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت معدنی حاوی، ۱ میلی لیتر نفت خام بنگستان اضافه شد. پس از پایان ۱۵ روز نفت خام باقی مانده در ارلن مایرها به کمک اضافه نمودن ۲۵ میلی‌لیتر تتراکلریدکربن و قرار دادن آن‌ها به مدت ۱۵ دقیقه بر روی شیکر با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه استخراج و جداسازی دو فاز تتراکلریدکربن حاوی نفت خام و محیط کشت معدنی به کمک قیف جداکننده (دکانتور) انجام شد. فاز حلال جدا شده با استفاده از اسپکتروفتومتری (Milton Roy, USA) برای تعیین میزان مواد آروماتیک موجود در آن مورد بررسی قرار گرفت (Nnamchi et al., 2006). شناسایی باکتری با استفاده از خصوصیات ظاهری باکتری‌ها توسط میکروسکوپ المپیوس (Olympus, CX31) و با استفاده از تست‌های معمول بیوشیمیایی و کتاب طبقه‌بندی سیستماتیک باکتری‌شناسی برجی انجام شد.

**طراحی آزمایش:** ۳۶۰کیلوگرم خاک غیر آلوده به نفت خام بنگستان با غلظت‌های۰، ۰/۵، ۱، ۲/۵ و ۵ درصد وزنی- وزنی، آلوده شد. برای این منظور ۸ لیتر نفت خام بنگستان (دانسیته معادل API ۳۲/۵، وزن ویژه ۰/۸۶ gr/cc، گرانروی CP ۰/۲۸و pH آب همراه ۸/۲) با نسبت ۱ به ۳ در استون (Merck, Germany) حل و به شکل اسپری به خاک اضافه شد. تیمارها شامل ۶۰ گلدان سفالی (۵۰×۵۰ سانتی‌متر) حاوی ۶ کیلوگرم خاک آلوده بودند. گلدان‌های سفالی درون زمین در فاصله یکصد متری حوضچه تبخیر واحد نمکزدایی درون خاک قرار گرفتند. در تیمارهای حاوی باکتری *Pseudomonas aeruginosa* مایه تلقیح باکتری قبل از کاشت نهال، درون حفره ۳ سانتی‌متری ریخته شده و نهال‌ها کاشته شدند. آبیاری به صورت ۲ تا ۳ بار در هفته و به میزان ۷۰ درصد ظرفیت نگهداری آب در خاک، انجام شد. سطوح این مطالعه شامل غلظت‌های مختلف نفت خام، کاشت یا عدم کاشت گیاه، تلقیح باکتری و عدم تلقیح باکتری به صورت مجزا و یا توام بود (جدول ۳).

**اندازه‌گیری غلظت هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی (PAHs)[1]:** طول دوره آزمایش ۲۷۵ روز بود و در پایان آزمایش پس از بیرون آوردن گلدان‌های سفالی از درون خاک و تخریب آنها گیاه از خاک جدا و خاک درون هر گلدان بر روی سینی پلاستیکی ریخته شد. گیاه پس از خروج از گلدان‌ها به خوبی تکان داده شدند تا خاک غیر ریزوسفری جدا گردد (He et al., 2009). ۱۰ گرم خاک ریزوسفری برای آزمایش، نمونه برداری شد. به منظور سنجش ترکیبات PAHs از روش استاندارد آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا (USEPA) استفاده شد (EPA, 2005). در این روش از ۱۰ گرم با استفاده از دستگاه سوکسله حاوی ۲۵۰ میلی‌لیتر هگزان و دی کلرومتان (۵۰:۵۰) عصاره‌گیری انجام شد. غلظت هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی Hewlett Packard (HP) مدل ۶۸۹۰ مجهز به آشکار ساز FID اندازه‌گیری شد.

**تعیین زیست‌توده و کلروفیل گیاه کنوکارپوس (*Conocarpus erectus*):** ریشه و اندام هوایی گیاه به طور جداگانه، در دمای ۸۰ درجه‌سانتی‌گراد در آون به مدت ۴۸ ساعت خشک و وزن آن‌ها به وسیله ترازوی دیجیتالی مشخص گردید( Mishra and Nautiyal, 2009). میزان کلروفیلa گیاهان با استفاده از اسپکتروفوتومتر (مدل UV-600A) و در طول موج‌های ۶۶۳/۲۰، ۶۴۶/۸ و ۴۷۰ نانومتر و به روش لیختن‌تالر و توسط حلال استون ۱۰۰ درصد اندازه‌گیری شد (Lichtenthaler, 1987).

1. Polycyclic Aromatic hydrocarbons

**جدول ۳:** طرح آزمایش

| جامعه آماری | باکتری | گیاه | میزان آلودگی |
|---|---|---|---|
| C1 P2 B2 | B۲ | P۲ | C۱ |
| C1 P2 B1 | B۱ | | |
| C1 P1 B2 | B۲ | P۱ | |
| C1 P1 B1* | B۱ | | |
| C2 P2 B2 | B۲ | P۲ | C۲ |
| C2 P2 B1 | B۱ | | |
| C2 P1 B2 | B۲ | P۱ | |
| C2 P1 B1* | B۱ | | |
| C3 P2 B2 | B۲ | P۲ | C۳ |
| C3 P2 B1 | B۱ | | |
| C3 P1 B2 | B۲ | P۱ | |
| C3 P1 B1* | B۱ | | |
| C4 P2 B2 | B۲ | P۲ | C٤ |
| C4 P2 B1 | B۱ | | |
| C4 P1 B2 | B۲ | P۱ | |
| C4 P1 B1* | B۱ | | |
| C5 P2 B2 | B۲ | P۲ | C۵ |
| C5 P2 B1 | B۱ | | |
| C5 P1 B2 | B۲ | P۱ | |
| C5 P1 B1* | B۱ | | |

غلظت نفت خام (C1:٪۰/۵، C2:٪۰/۵، C3:٪۱، C4:٪۲/۵ و C5:٪۵)، P (P1 تیمار بدون گیاه، P2 تیمار حاوی گیاه)، B (B1 نشانگر تیمار بدون باکتری، B2 نشانگر تیمارحاوی باکتری) *نمونه شاهد

این آزمایش بصورت فاکتوریل با دو فاکتور، در قالب طرح پایه کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. فاکتورهای آزمایش شامل ٤ سطح (گیاه، باکتری، گیاه و باکتری و خاک بدون کاربرد گیاه و باکتری (به‌عنوان شاهد)) وغلظت آلاینده در ۵ سطح نفت خام بنگستان با غلظت های صفر، ۰/۵، ۱، ۲/۵ و ۵ درصد وزنی بود. برای آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS نگارش ۲۳ و Excel 2010 استفاده شد. برای تست نرمال بودن داده‌ها از آزمون Kolmogorov-Smirnov، برای مقایسه و یافتن اختلاف معنی‌دار از آزمون ANOVA و تست تکمیلی دانکن و در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ درصد استفاده شد.

## نتایج

مطابق با جدول ٤، در مجموع ۱۱ باکتری متحرک، کاتالاز و اکسیداز مثبت با نام اصلی MA از خاک اطراف حوضچه تبخیر نمکزدایی جداسازی شدند. دو باکتری MA01 و MA08 متعلق به گونه *سودوموناس آئروژینوز* با ۸۷ و ۸۳ درصد بالاترین کارایی را در تجزیه‌ی ترکیبات هیدروکربنی نفت خام بنگستان داشتند.

**جدول ٤:** باکتری‌های ایزوله‌شده و مشخصات مرفولوژیکی و بیوشیمیایی باکتری‌ها

| شماره/کد | محل برداشت نمونه خاک آلوده به موادنفتی | شکل باکتری | نوع گرم | حرکت | رنگ کلنی | کاتالاز | اکسیداز | تولید $H_2S$ | درصد تجزیه نفت خام |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| MA01 | ضلع جنوبی حوضچه تبخیر | میله‌ای | – | متحرک | کرمی | + | + | – | ۸۷ |
| MA02 | ضلع جنوبی حوضچه تبخیر | میله‌ای | + | متحرک | صورتی | + | + | – | ٦۰ |
| MA03 | ضلع جنوبی حوضچه تبخیر | میله‌ای | – | متحرک | سبزآبی | + | + | – | ۷۵ |
| MA04 | ضلع شمالی حوضچه تبخیر | کروی | – | متحرک | قهوه ایی | + | + | – | ٦٦ |
| MA05 | ضلع شمالی حوضچه تبخیر | میله‌ای | – | متحرک | سبز | + | + | + | ٤۵ |
| MA06 | ضلع شمالی حوضچه تبخیر | میله‌ای | – | متحرک | نارنجی | + | + | – | ٦٦ |
| MA07 | ضلع غربی حوضچه تبخیر | کروی | – | متحرک | قهوه ایی | + | + | – | ۷۱ |
| MA08 | ضلع غربی حوضچه تبخیر | میله‌ای | – | متحرک | کرمی | + | + | – | ۸۲ |
| MA09 | ضلع شرقی حوضچه تبخیر | کروی | + | متحرک | قهوه ایی | + | + | – | ۵۳ |
| MA10 | ضلع شرقی حوضچه تبخیر | میله‌ای | – | متحرک | سفید | + | + | – | ۲۷ |
| MA11 | ضلع شرقی حوضچه تبخیر | کروی | + | متحرک | صورتی | + | + | – | ۵۱ |

مطابق با جدول ۵، در هر ۵ غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۲/۵ و ۵ درصد هیدروکربن، تیمار ترکیبی دارای باکتری و گیاه با کمترین غلظت هیدروکربنی، بالاترین درصد حذف را در مقایسه با تیمارهای منفرد گیاه، باکتری و تیمار بدون باکتری و گیاه داشتند($P<0/05$). تیمار بدون باکتری و گیاه با محدوده‌ی هیدروکربنی ۱٤/۹٦–۱۹/٤ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مقایسه با تیمار دارای همکاری باکتری و گیاه با محدوده‌ی ۷/٤۳– ۰/۰۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم پایین‌ترین درصد حذف هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی را داشت. همچنین داده‌های بدست آمده نشان دادند که درصد حذف هیدروکربن‌های نفتی با غلظت این ترکیبات ارتباط دارد به این معنا که در غلظت‌های بسیار بالا توانایی گیاه و باکتری در حذف هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی کاهش معنی‌داری داشت ($P<0/05$).

**جدول ۵:** مقایسه میانگین تاثیر گیاه، باکتری و اثر متقابل گیاه و باکتری بر غلظت هیدروکربن‌های نفتی (میلی‌گرم بر کیلوگرم) خاک اطراف حوضچه تبخیر

| تیمار / سطح | غلظت نفت بنگستان (٪) | دارای باکتری و گیاه | گیاه | باکتری | بدون باکتری و گیاه |
|---|---|---|---|---|---|
| *C۱ | ۰ | ۰/۲۲ ± ۰/۰۲$^{Aa}$ | ٦/٤۳ ۰±/۸۸ $^{Aa}$ | ٦ ۰± /٦٦$^{Aa}$ | ۱٤/۹٦ ۰±/۲۳ $^{Aa}$ |
| C۲ | ۰/۵ | ۰/۰۹ ۰± /۰۱$^{Aa}$ | ۱۲/۵٦ ± ۲/٦٤$^{Ba}$ | ۱۲/۲±۲۳/۵٦$^{Ba}$ | ۱۵/۵٦ ۰±/۲۹$^{ABa}$ |
| C۳ | ۱ | ۰/۱ ۰±/۰۲$^{Aa}$ | ۱٤/٦٦ ۰± /۲٦$^{BCa}$ | ۱۵/۸۳ ± ۰/٤٦$^{Ca}$ | ۱۷/۷ ± ۱/٦$^{Aba}$ |
| C٤ | ۲/۵ | ٤/۲۸ ۰± /۲۹$^{Ba}$ | ۱۵/٦ ± ۱/۳۷$^{CDa}$ | ۱۵/۷۳ ± ۰/۲۷$^{Ca}$ | ۱۷/۷٦ ۲±۲/۰۵$^{ABCa}$ |
| C۵ | ۵ | ۷/۳±٤۳/۰٤$^{Ca}$ | ۱۸/±۰۳ ۲/۳۱$^{Da}$ | ۱٦/٤±۱۳/۰۵$^{Ca}$ | ۱۹/۰±٤/۳ $^{Ca}$ |

حروف غیر مشابه کوچک به معنی اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر ستون است (P<۰/۰۵)

حروف غیر مشابه بزرگ به معنی اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر ردیف است (P<۰/۰۵)

*C : غلظت آلاینده در سطح C۱ : صفر، C۲: ۰/۵، C۳: ۱، C٤: ۲/۵ و C۵: ۵ درصد وزنی

جهت بررسی تاثیر و کارایی گیاه، باکتری و نیز باکتری و گیاه، درصد حذف هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی محاسبه گردید. براساس درصد حذف‌های محاسبه شده در جدول ٦، تیمارهای دارای باکتری و گیاه بالاترین درصد حذف را داشتند. همچنین نتایج نشان داد که با افزایش غلظت هیدروکربن‌های نفتی، درصد حذف کاهش یافت. در خصوص کارایی گیاه و باکتری در حذف هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی، در سه غلظت C۱، C۲ و C٤ درصد حذف هیدروکربن‌ها در تیمارهای گیاه و باکتری اختلاف معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵) اما در غلظت‌های C۳ و C۵ درصد حذف هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی توسط باکتری بیشتر از درصد حذف توسط گیاه بود (P<۰/۰۵).

**جدول ٦:** درصد حذف هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی توسط گیاه، باکتری و اثر متقابل گیاه و باکتری

| تیمار / سطح | دارای باکتری و گیاه | گیاه | باکتری |
|---|---|---|---|
| *C۱ | ۹۸/۵۲ ± ۰/۵٦ $^{a}$ | ۵۷/۰۱ ±۰/٦۲ $^{b}$ | ۵۹/۸۹ ±۰/۳۳$^{b}$ |
| C۲ | ۹۹/٤۲ ± ۰/٤۳ $^{a}$ | ۱۹/۲۸ ±۰/٦٤$^{b}$ | ۲۱/٤۰ ±۰/۸۷$^{b}$ |
| C۳ | ۹۹/٤۳ ± ۰/۱٦$^{a}$ | ۱۷/۱۷ ۰± /۷۱$^{c}$ | ۱۰/۵٦ ±۰/۰۱$^{b}$ |
| C٤ | ۷۵/۹ ± ۰/۲۰$^{a}$ | ۱۲/۰±۱٦/۱۲$^{b}$ | ۱۱/٤۳±۰/٤۳$^{b}$ |
| C۵ | ٦۱/۷۰ ±۰/۸٦ $^{a}$ | ۷/۰٦ ±۰/۹۸$^{c}$ | ۱٦/۸۵ ۰±/۰۱$^{b}$ |

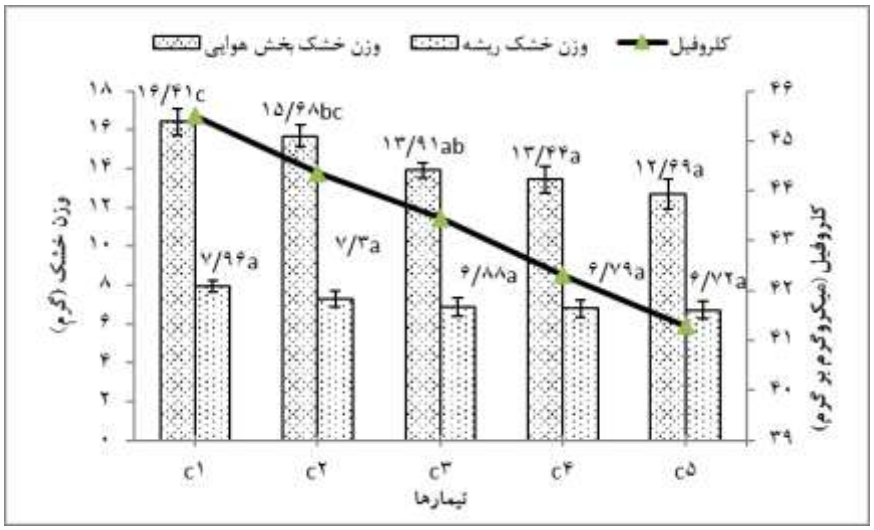
حروف غیر مشابه به معنی اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر ردیف است (P<۰/۰۵)

*C : غلظت آلاینده در سطح C۱ : صفر، C۲: ۰/۵، C۳: ۱، C٤: ۲/۵ و C۵: ۵ درصد وزنی

با توجه به اینکه یکی از مکانیسم‌های موثر گیاه پالایی در حذف آلاینده استخراج گیاهی است، جرم زیست توده گیاه می‌تواند در کارایی گیاهی پالایی موثر واقع گردد. در این مطالعه افزایش در میزان آلاینده‌های نفتی خاک سبب کاهش غلظت کلروفیل در گیاه کنوکارپوس (*C. erectus*) شد که این روند کاهشی نیز در خصوص وزن خشک بخش هوایی و ریشه گیاه کنوکارپوس نیز قابل مشاهده بود (P<۰/۰۵) (شکل ۲). اثرات متقابل باکتری و غلظت فقط در مورد وزن خشک گیاه، وزن خشک ساقه و کلروفیل بی‌تاثیر بود (جدول ۷).

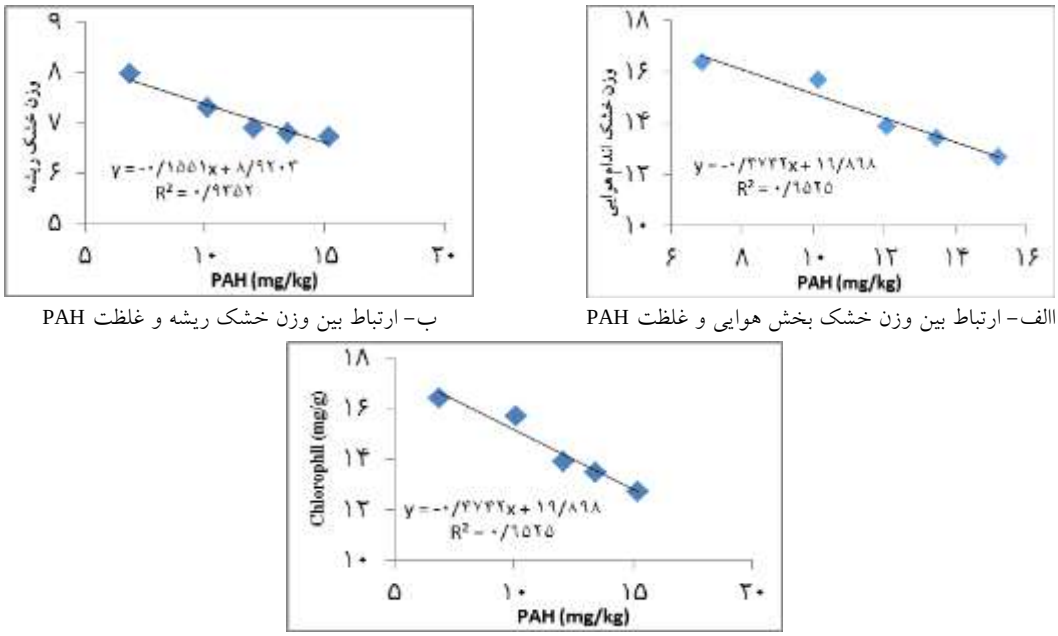
**جدول ۷:** بررسی اثرات متقابل باکتری، غلظت هیدروکربن‌های نفتی و اثر متقابل آنها بر پارامترهای گیاه

| منبع تغییرات | | وزن خشک ریشه | وزن خشک اندام هوایی | کلروفیل |
|---|---|---|---|---|
| باکتری (B) | F value | ۲۵۸/۰۵ | ۱۹/۶۳ | ۱/۶۰ |
| | Df | ۱ | ۱ | ۱ |
| | میانگین مربعات | ۲٤/۱۷ | ۲۹/۰۲ | ۱۵/۱۲ |
| | Pr>F | <۰/۰۰۰۱ | <۰/۰۰۰۱ | <۰/۰۰۰۱ |
| غلظت(C) | F value | ۱۷/۰۷ | ۹/۹۰ | ۱/۷۳ |
| | Df | ٤ | ٤ | ٤ |
| | میانگین مربعات | ۱/۶۰ | ۱٤/٦٤ | ۱٦/۳۹ |
| | Pr>F | <۰/۰۰۰۱ | <۰/۰۰۰۱ | <۰/۰۰۰۱ |
| باکتری (B)* غلظت (C) | F value | ۱/۸۰ | ۰/٤۰۷ | ۰/۰۲۱ |
| | Df | ٤ | ٤ | ٤ |
| | میانگین مربعات | ۰/۱۷۰ | ۰/٦۰ | ۰/۲۰۰ |
| | Pr>F | ۰/۱٦ | ۰/۸۰ | ۰/۹۹۹ |




**شکل ۲:** مقایسه میانگین تاثیر غلظت‌های مختلف هیدروکربن‌های نفتی بر وزن خشک و میزان کلروفیل گیاه کنوکارپوس (*C. erectus*)

ارتباط بین تغییرات غلظت هیدروکربن‌ها در خاک با تغییرات وزن خشک ریشه و وزن خشک اندام هوایی گیاه کنوکارپوس به صورت نمودارهای رگرسیونی در شکل ۳ نمایش داده شده است. با توجه به عرض از مبدا منفی در هر سه نمودار، روند کاهشی وزن خشک ریشه، وزن خشک بخش هوایی و کلروفیل با افزایش غلظت هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی در هر سه بخش گیاهی معنی‌دار بود (P<۰/۰۵).



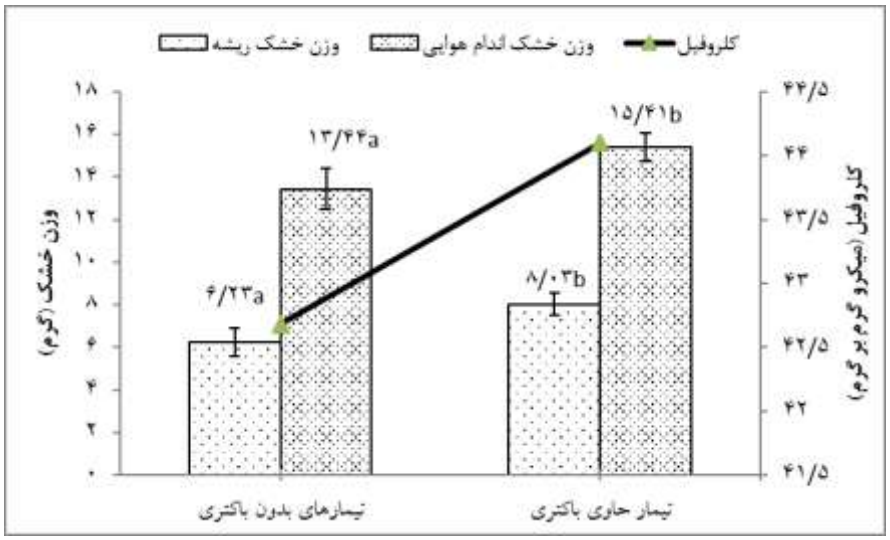

الف- ارتباط بین وزن خشک بخش هوایی و غلظت PAH

ب- ارتباط بین وزن خشک ریشه و غلظت PAH

ج- ارتباط بین کلروفیل و غلظت PAH

**شکل ۳:** بررسی تاثیر هیدروکربن‌های نفتی سنگین بر روی بخش‌های مختلف گیاه کنوکارپوس (*C. erectus*)

با توجه به نتایج بدست آمده حضور و یا عدم حضور باکتری نیز، بر روی میزان وزن خشک بخش‌های مختلف گیاه و نیز کلروفیل برگ موثر بود ($P<۰/۰۵$). به این ترتیب وزن خشک اندام هوایی و ریشه در تیمارهای حاوی باکتری در مقایسه با تیمارهای بدون باکتری بالاتر بود. بیشترین میزان کلروفیل با اختلاف معنی‌دار در تیمارهای حاوی باکتری (مقدار ٤٤/١ میکرو گرم بر گرم) در مقایسه با تیمارهای بدون باکتری (٤٢/١ میگروم بر گرم) اندازه‌گیری شد ($P<۰/۰۵$) (شکل ٤).




**شکل ٤:** مقایسه میانگین تاثیر حضور و یا عدم حضور باکتری بر وزن خشک و میزان کلروفیل گیاه کنوکارپوس (*C. erectus*)

**بحث**

نتایج مطالعه حاضر نشان داد در حضور تیمارهای باکتری تجزیه کننده، غلظت هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی (TPHs) نسبت به تیمار بدون تلقیح باکتری به طور معنی‌داری کمتر بود (P< ۰/۰۵). اضافه شدن باکتری‌های تجزیه‌گر به خاک، باعث افزایش حلالیت بخش غیر قابل دسترس آلاینده‌ها به واسطه ترشح بیوسورفکتانت‌ها شده و بالطبع تجزیه هیدروکربن‌های نفتی افزایش می‌یابد (Polyak et al., 2018). باکتری‌های نظیر باکتری *P. aeruginosa* (مطالعه حاضر) از هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده کرده و با تولید بیوسورفکتانت‌هایی باعث تخریب و تجزیه ساختمان شیمیایی این ترکیب شده و با تولید متابولیت‌های مختلف این مواد آلی را تجزیه و تولید $CO_2$ و $H_2O$ و سایر مواد بی‌ضرر می‌کنند (Guarino et al., 2019). همچنین توانایی باکتری‌های جنس سودوموناس به دلیل وجود تنوع و نیز تولید تعداد زیادی آنزیم‌های مورد نیاز کاتابولیکی و از آن مهم‌تر به دلیل توانایی ذاتی بسیار خوب آنها در سازگاری با شرایط مختلف محیطی است (Okoh et al., 2003). درصد حذف PAH در تیمارهای منفرد *P. aeruginosa* محدوده‌ای ۵۹/۸۳-۱۷/۶۲ را نشان داد. Mittal و Singh (۲۰۰۹) توانایی باکتری سودوموناس در حذف نفت از خاک‌های آلوده را ۹۶ درصد و Javaheri و همکاران (۲۰۱۹) توانای باکتری‌های *Paenibacillus* و *Bacillus* در حذف ترکیبات مختلف PAH را ۹۶/۳ -۹۴/۶ درصد گزارش کردند. با توجه به داده‌های بدست آمده در این مطالعه، توانایی حذف هیدروکربن‌ها توسط باکتری، به غلظت این مواد در محیط باکتری بستگی دارد (P< ۰/۰۵) و توجیه کننده درصدهای حذف متفاوت در مطالعات مختلف است.

در تیمارهای دارای گیاه کنوکارپوس، درصد حذف بین ۵۷/۰۱-۷/۰۶ درصد بود و در غلظت‌های بالا توانایی گیاه در حذف هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی کاهش یافت (P-value=۰/۰۳۵). ریشه گیاهان با ترشح ترکیبات آلی مانند گلوگز، آنزیم و کربوهیدارت‌های پیچیده، منبعی مناسب از کربن و انرژی را برای میکروارگانیسم‌های ناحیه ریشه فراهم می‌سازند و روند تجزیه ترکیبات نفتی را بهبود می‌بخشد (Shim et al., 2000). مطالعات نشان داده است که گیاهانی با ریشه‌های انبوه و رونده نظیر گیاه کنوکارپوس، جذب و پاکسازی خاک را افزایش می‌دهند (Guarino et al., 2019). D'Orazio و همکاران (۲۰۱۳) در مطالعه‌ای بر روی گیاه‌پالایی خاک آلوده به پیرن با استفاده از گونه‌های گیاهی *Brassica napus, Medicago sativa, Lolium perenne*، متوسط میزان حذف پیرین در خاک کشت شده با گیاه را ۳۰ درصد و در خاک بدون گیاه را ۱۸ درصد گزارش کرد. همچنین Guarino و همکاران (۲۰۱۹)، وجود همبستگی مثبت بین غلظت هیدرورکربن‌های نفتی و مقدار آن در بافت ریشه و ساقه را نشانه‌ی جذب و پاکسازی محیط از هیدروکربن‌های نفتی گزارش کردند. Chiou و همکاران (۲۰۱۱)، بخش لیپیدی ریشه را محل ذخیره آلودگی (حتی در اندازه‌ی بسیار کوچک) غیر محلول در آب نظیر هیدروکربن‌های نفتی معرفی کردنددر تحقیقی دیگر Lin و همکاران (۲۰۰۷)، نشان دادند که ذخیره هیدروکربن‌های نفتی در ریشه‌ی ذرت (*Zea maize*) مستقیماً به سطح لیپید بافت ریشه بستگی دارد که این چربی مستقیماً وارد سلول شده و به اندام هوایی منتقل می شود و ارتباط مستقیم بین غلظت هیدروکربن‌های نفتی و وزن خشک ریشه و اندام‌هوایی را تایید می‌کند.

رشد سریع و پوشش بالای ریشه در گیاهانی نظیر کنوکارپوس، جوامع میکروبی خاک را تحریک کرده و میزان جذب هیدروکربن‌ها را افزایش می‌دهد (Oberai et al., 2018; Dasgupta et al., 2018). با توجه به درصد حذف ۹۹/۴۳-۶۱/۷۰ درصدی در تیمار باکتری و گیاه، نتایج این مطالعه تاثیر سینرژیستی دو روش زیست پالایی گیاهی و باکتریی در مقایسه با استفاده‌ی منفرد از آنها در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی را تکنیکی بسیار موثر معرفی می‌کند. از جمله دلایل بالاتر بودن درصد حذف در تیمارهای دارای ترکیب گیاه و باکتری، می‌توان به بهبود انتقال اکسیژن و در نتیجه تحریک رشد میکروبی در قسمت ریزوسفر اشاره کرد (DOrazio et al., 2013). در واقع استفاده از استراتژی‌های ترکیبی گیاه و باکتری، با صرفه‌ترین گزینه برای تصفیه خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی است که دلیل این امر را می‌توان به بیشتر بودن جرم زیست توده و جمعیت میکروبی به عنوان عامل بهبود دهنده گیاه پالایی ربط داد (Ebadi et al., 2018). حضور پوشش گیاهی و ترشحات ریشه می‌تواند تحریک رشد و فعالیت باکتری‌های تجزیه کننده هیدروکربن‌های نفتی و میکروارگانیسم‌های ریزوسفر در خاک شود. همچنین بهبود خواص فیزیکی خاک، سبب تخریب این آلاینده‌های آلی در خاک شده و دسترسی آسانتر باکتری به این آلاینده‌ها را افزایش دهد (Abena et al., 2019). حضور مواد نفتی بر روی میزان کلروفیل تاثیر معنی‌داری داشت و به این ترتیب بیشترین میزان کلروفیل (۴۵/۵ mg/g) در تیمار $C_1$ (با ۰ درصد نفت) و کمترین میزان آن در تیمار $C_5$ (با ۵ درصد نفت) اندازه‌گیری شد. تنش نفتی از طریق تولید گونه‌های فعال اکسیژن نظیر رادیکال‌های سوپراکسید و پراکسید هیدروژن، می‌توانند سبب تولید پراکسیداسیون لیپیدها و در نتیجه آسیب غشای سلول و دستگاه فتوسنتز شده و منجر به تخریب کلروفیل شوند (Fatima et al., 2017). مطالعات انجام شده توسط El-Sheekh و همکاران (۲۰۱۳) نشان داد با افزایش غلظت نفت خام میزان کلروفیل موجود در گیاه پس از ۱۵ روز کاهش یافت. Baruah و همکاران (۲۰۱٤) گزارش کردند که نفت خام سنتز کلروفیل در گیاه *Cyperus brevifolius* را به شدت کاهش داد و تخریب کلروفیل با افزایش غلظت نفت بیشتر بود. نفت خام مخلوطی از آلفاتیک، آروماتیک و ترکیبات آلی به وزن مولکولی بالاست که مانع از فعالیت آنزیم‌های مورد نیاز برای سنتز کلروفیل می‌شوند (Al-Hawas et al., 2012). کلروفیل در تیمارهای دارای باکتری در مقایسه با تیمارهای بدون باکتری به شکل معنی‌داری بالاتر بود که نشان می‌دهد باکتری‌های محرک رشد گیاه به حفظ کلروفیل برگ کمک کرده و باعث فراهم آمدن زیست توده انبوده جهت زیست پالایی می‌شوند (Han et al., 2016).

کاهش وزن خشک ریشه و اندام هوایی همانند کاهش وزن کلروفیل متناسب با افزایش غلظت نفت خام موجود در خاک بود که با یافته‌های Baruah و همکاران (۲۰۱٤) در خصوص در معرض قرار دادن گیاه *Cyperus brevifolius* با نفت خام و کاهش بیومس ریشه و اندام هوایی هم‌خوانی دارد. همچنین تهویه ناکافی به دنبال آلودگی نفتی علت پوسیدگی ساقه، کاهش رشد و بیومس گزارش شده است (Smith et al., 1998).

همچنین در مطالعه آنها بیومس اندم هوایی در مقایسه با ریشه بالاتر بود و علت آن را ناشی از استرس بالاتر ریشه در شرایط در معرض قرارگیری با نفت خام و ایجاد نوعی نیروی مکانیکی مقاوم در خاک دانستند که طویل شدن ریشه‌های گیاهان را کند می‌سازد.

اثر منفی ترکیبات نفت خام می‌تواند ناشی از عدم نفوذپذیری هیدروکربن‌های نفتی، عدم حرکت مواد غذایی به ویژه نیتروژن یا اثر ممانعت کننده برخی ترکیبات حلقوی آروماتیک‌ها باشد. ترکیبات آلیفاتیک کوچک، آروماتیک، نفتالیک و شبه فنولی موجود در نفت خام سبب کاهش تنفس، تبخیر، فتوسنتز و پاسخ هورمونی به تنش می‌شوند. نفت خام یک لایه آب گریز روی ریشه را تشکیل می‌دهد که جذب آب و مواد غذایی را محدود می‌کند (Quinones-Aquilar et al., 2003; Bandowe et al., 2019). اما در حضور باکتری، تیمارهای دارای گیاه کنوکارپوس علاوه بر تجزیه بالاتر هیدروکربن‌ها در نواحی پیرامونی ریشه، وزن خشک ریشه و اندام هوایی افزایش یافت که آن را می‌توان با کاهش اثر سمیت و تنش ناشی از آلودگی نفتی بر گیاه مرتبط دانست. Huang و همکاران (۲۰۰٤)، عنوان کردند که باکتری‌های محرک ریشه گیاه در ناحیه ریشه با سنتز ACC – دآمیناز و کاهش سطح اتیلن در گیاه از کاهش رشد ریشه جلوگیری کرده و بقای گیاه تحت تنش را بالا می‌برند. Mishra و Nautiyal (۲۰۰۹) وزن خشک نخود در خاک آلوده به نفت کاهش یافت ولی افزودن مایه تلقیح باکتری به خاک آلوده باعث بهبود وضعیت رشد گیاه گردید. این یافته‌ها با نتایج همبستگی مثبت بین غلظت هیدروکربن‌های نفتی با وزن خشک ریشه و اندام‌های هوایی گیاه کنوکارپوس هم‌خوانی داشت و نشان می‌دهد حضور باکتری در کنار گیاه، ضمن افزایش توان گیاه‌پالایی گیاه، امکان بقای گیاه کنوکارپوس را در شرایط نامناسب خاک اطراف حوضچه‌ی تبخیر نمکزدایی افزایش داد. در شرایط طبیعی، تخریب هیدروکربن‌های نفتی مختلف توسط میکروارگانیسم‌های خاک در محدوده ۱۰-۵ درصد به صورت طویل المدت امکان پذیر می‌باشد (Quinones-Aquilar et al.,2005) که در مقایسه با درصدهای حذف درج شده در جدول ٦، کارایی بالایی سینرژیستی باکتری و گیاه را نشان می‌دهد. در غلظت‌های بالا توانایی گیاه، باکتری و نیز ترکیب باکتری و گیاه در حذف هیدروکربن‌های نفتی به شدت کاهش یافت و در غلظت ۵ درصد به پایین‌ترین میزان خود رسید که نشان دهنده محدودیت گیاه پالایی در حضور مقادیر بالای هیدروکربن است.

## نتیجه‌گیری نهایی

خاک‌های درگیر با آلودگی نفتی به مدت طولانی مانند حوضچه‌های تبخیر مطالعه‌ی حاضر، به جهت طبیعت ناهمگن و حجم بالای موادی که باید پاکسازی شوند محیطی پیچیده برای پاکسازی هستند. نتایج این مطالعه نشان داد که گیاه کنوکارپوس کارایی بالایی در کاهش هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی داشت. اما به سبب شرایط سخت محیط آزمایش، تیمار دارای باکتری با پتانسیل تجزیه کننده هیدروکربن‌های نفتی (نظیر *P. aeruginosa*) و در تلفیق با گیاه کنوکارپوس (*C. erectus*) با قدرت زیست بالا، توانست توانایی حذف (۹۹/٤۳-٦۱/۷ درصد در مطالعه‌ی حاضر) هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی را به شکلی سازگار با محیط زیست بالا ببرد.

## References

**Abena, M., T., Li, Shah, M. and Zhong, W. (2019).** Biodegradation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in highly contaminated soils by natural attenuation and bioaugmentation. Chemosphere. 234: 864-874.

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

**Bandowe, B. A. M., S. Leimer, Meusel, H. and Velescu, A. (2019).** Plant diversity enhances the natural attenuation of polycyclic aromatic compounds (PAHs and oxygenated PAHs) in grassland soils. Soil Biology and Biochemistry. 129: 60-70.

**Baruah, P., Saikia, R.R., Baruah, P.P. and Deka, S. (2014).** Effect of crude oil contamination on the chlorophyll content and morpho-anatomy of Cyperus brevifolius (Rottb.). Environmental Science and Pollution Research. 21:12530–12538.

**Bisht, S., Pandey, P., Bhargava, B.S., Sharma, Kumar, V. and Sharma, K.D. (2015).** Bioremediation of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) using rhizosphere technology. Brazilian Journal of Microbiology. 46: 7-21

**Chiou, C., Sheng, G. and Manes, M. (2001).** A partition-limited model for the plant uptake of organic contaminants from soil and water. Environmental Science and Technology. 35(7): 1437–44.

**Chukwuma, C., Ikewuchi, J. and Monanu, M. (2019).** Removal of hydrocarbons from crude oil contaminated agricultural soil by phytoremediation using Mariscus alternifolius and Fimbristylis ferruginea. European Journal of Biological Research. 9(1): 34-44.

**D'Orazio, V., Ghanem, A. and Senesi, N. (2013).** Phytoremediation of pyrene contaminated soils by different plant species. CLEAN–Soil. Air., Water. 41(4):377-82

**Dasgupta, D., Jublee, J. and Suparna, M. (2018).** Characterization, phylogenetic distribution and evolutionary trajectories of diverse hydrocarbon degrading microorganisms isolated from refinery sludge. Biotechnology. 8: 273-282.

**Doyle, E., L. Muckian, Hickey, A.M. and Clipson, N. (2008).** Microbial PAH degradation. Advances in Applied Microbiology. 65: 27–66

**Dudhagara D.R., R.K. Rajpara, J.K., Bhatt, H.B., Gosai, Sachaniya, B.K. and Dave, B.P. (2016).** Distribution, sources and ecological risk assessment of PAHs in historically contaminated surface sediments at Bhavnagar coast, Gujarat, India. Environmental Pollution. 213:338–46.

**Ebadi, A., N.S.K. Sima, M. Olamaee, Hashemi, M. and Nasrabadi, R.G. 2018.** Remediation of saline soils contaminated with crude oil using the halophyte *Salicornia persica* in conjunction with hydrocarbon-degrading bacteria. Journal of Environmental Management. 219:260-268.

**El-Sheekh, M.M., Hamouda, R.A. and Niza, AA. (2013).** Biodegradation of crude oil by Scenedesmus obliquus and Chlorella vulgaris growing under heterotrophic conditions. International Biodeterioration and Biodegradation. 82:67-72

**EPA. (2005).** Method 3535A. Solid–phase extraction (SPE), Revision1. Available t:http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/online/3_series.htm

**Eskandary, S., Tahmourespour, A., Hoodaji, M. and Abdillahi, A. (2017).** The synergistic use of plant and isolated bacteria to clean up polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil. Journal of Environmental Health Science and Engineering. 15: 12-20.

**Fatima, K., Imran, A., Naveed, M. and Afzal, M. (2017).** Plant-bacteria synergism: An innovative approach for the remediation of crude oil-contaminated soils. Soil and Environment. 36(2): 93-113.

**Guarino, C., D. Zuzolo, M. Marziano, B., Conte, G., Baiamonte, L., Morra, D., Benotti, D. Gresia, E. Robortella Stacul, Cicchella, D. and Sciarrillo, R. 2019.** Investigation and Assessment for an effective approach to the reclamation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAHs) contaminated site: SIN Bagnoli, Italy. Science Repository. 9: 11522-11534.

**Han, G., B.X. Cui, Zhang, X.X. and Li, K.R. (2016).** The effects of petroleum-contaminated soil on photosynthesis of Amorpha fruticosa seedlings. International Journal of Environmental Science Technology. 13:2383–2392

**He, L.Y., Z.J. Chen, Ren, G.D. and Sheng, X.F. (2009).** Increased cadmium and lead uptake of a cadmium hyperaccumulator tomato by cadmium-resistant bacteria. Ecotoxicology and Environmental Safety. 72: 1343-1348.

**Huang, X.D., Y. El-Alawi, D.M. Penrose, Glick, B.R. and Greenberg, B.M. (2004).** Responses of three grass species to creosote during phytoremediation. Environmental Pollution. 130: 453-463.

**Javaheri, M., Mokhtati, M. and Samaei, M.R. (2019).** Evaluation the Capability of Isolated Bacteria from Stabilized Compost for Bioremediation of Pyrene and Phenanthrene from Contaminated Soil with Municipal Solid Waste Leachate. Journal of Environmental Health and Sustainable Development. 4(3): 819-33.

**Kalantary, R.R., A. Mohseni-Bandpi, A. Esrafili, S. Nasseri, F.R. Ashmagh, Jorfi, S. and Ja'fari, M. (2014).** Effectiveness of biostimulation through nutrient content on the bioremediation of phenanthrene contaminated soil. Journal of Environmental Health Science and Engineering. 12(1):1-15.

**Kosnar, Z. and Tlustos, P. (2018).** Removal of soil polycyclic aromatic hydrocarbons derived from biomass fly ash by plants and organic amendments. Plant, Soil and Environment. 64 (2): 88-94.

**Lichtenthaler, H.K. (1987).** Chlorophylls and carotenoids, the pigments of photosynthetic biomembranes. Met. Enzymol. 148: 350-382

**Lin, H., S. Tao, Zuo, Q. and Coveney, R. M. (2007).** Uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons by maize plants. Environmental Pollution. 148: 614–619.

**Macci, C., S. Doni, E. Peruzzi, S. Bardella, G. Filippis, Ceccanti, B. and Masciandaro, G. (2012).** A real-scale soil phytoremediation. Biodegradation. PubMed Retrieve. 24(4): 521-538.

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

**Mittal, A. and Singh, P. (2009).** Isolation of hydrocarbon degrading bacteria from soils contaminated with crude oil spills. Indian Journal of Experimental Biology. 47: 760 -765

**Motamedimehr, S.H. and Gitipour, S. (2019).** Extraction and Recovery of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Petroleum Contaminated Soils Using Supercritical Water by Response Surface Methodology. Pollution. 5(4): 913-922.

**Mukred,A.M., A.A. Hamid, Hamzah, A. and Yusoff, W. 2008.** Development of Three Bacteria Consortium for the Bioremediation of Crude Petroleum-oil in Contaminated Water. On Line Journal of Biological Sciences. 8 (4): 73-79.

**Nnamchi, C.I., Obeta, J.A.N., and Ezeogu, L.I. 2006.** Isolation and characterization of some poly aromatic hydrocarbon degrading bacteria from Nsukka soils in Nigeria. International Journal of Environmental Science and Technology. 3(2): 181-190

**Oberai, M. and Khanna, V. (2018).** Rhizoremediation – Plant Microbe Interactions in the Removal of Pollutants. International Journal of Current Microbiology and Applied Science. 7(1): 2280–2287.

**Okoh, A.I. 2003.** Biodegradation of Bonny light crude oil in soil microcosm by some bacterial strains isolated from crude oil flow stations saver pits in Nigeria. African Journal of Biotechnology. 2(5): 104-108

**Polyak, Y.M., L.G. Bakina, M.V. Chugunova, Mayachkina, N.V. and Gerasimov Bure, A.O. (2018).** Effect of remediation strategies on biological activity of oil-contaminated soil - A field study. International Biodeterioration and Biodegradation. 126: 57–68

**Quinones-Aquilar, E. E., R. Ferra-Cerrato, R.F. Gavi, L. Fernandez, Rodriguez, V.R. and Alarcom, A. (2003).** Emergence and growth of maize in a crude oil polluted soil. Agrociencia. 37: 585-594

**Ravanipour, M., R.R. Kalantary, A. Mohseni-Bandpi, A. Esrafili,**

**Farzadkia, S. and Hashemi-Najafabadi. M. (2015).** Experimental design approach to the optimization of PAHs bioremediation from artificially contaminated soil: application of variables screening development. Journal of Environmental Health Science and Engineering. 13(1):1-10.

**Seyed Alikhani, S., Shorafa, M., Tavasoli, A. and Ebrahimi Seyedeh, S. (2011).** Effect of plants growth in different densities on the hydrocarbons of soil oil, soil and water. agricultural science and industries. 25:61-72.

**Shim, H., S. Chauhan, D. Ryoo, K. Bowers, Thomas, S.M. and Burken, J.G. (2000).** Rhizosphere competitiveness of trichloroethylene-degrading, poplar-colonizing recombinant bacteria. Appli Environmental Microbiology. 66(11): 4673-78

**Smith, B., Stachowisk, M. and Volkenbugh, E. (1989).** Cellular processes limiting leaf growth in plants under hypoxic root stress. Journal of Experimental Botany. 40(1):89-94

**Swaathy, S, V., Kavitha., A.S., Pravin, Mandal A.B. and Gnanamani, A. (2014).** Microbial surfactant mediated degradation of anthracene in aqueous phase by marine Bacillus licheniformis MTCC 5514. Biotechnology Reports. 4: 161–70

*Journal of Plant Environmental Physiology, Serial 62, 16th year, Number 2, Summer 2021*

# The effect of synergistic phytoremediation and bacterial isolates on removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from contaminated soil

**Khazaei, M.[1], Etminan, A.[2], Dashti, S. [3]*, Hosseini, S.A.[1]**

[1]Department of Environment and Natural Resources, Islamic Azad University, Kermanshah Branch, Kermanshah, Iran

[2]Department of Plant Breeding and Biotechnology, Islamic Azad University, Kermanshah Branch, Kermanshah, Iran

[3]Department of Environment, Islamic Azad University, Ahvaz Branch, Ahvaz, Iran

**Received date: 2020/07/05 Accepted date: 2020/08/26**

## Abstract

Having carcinogenic and toxic effects, aromatic hydrocarbons cause serious damage to the environment and living organisms. These compounds are mainly discharged into the soil. For the remediation of contaminated soils, biological methods utilizing the efficient microorganisms isolated from the oil-contaminated soils as well as resistant plants are preferred. The aim of this study was to assess the effect of *Conocarpus erectus* and *Pseudomonas aeruginosa* on the removal efficiency of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from contaminated and saline soils of the salt separation pond of a desalination unit during 275 days under non-laboratory condition. The study was conducted in a factorial experiment with two factors based on completely randomized design with three replications. The factors used in this experiment included four treatment types (plant, bacteria, plant-bacteria cultivated in the soil, and soil with no plant and bacteria (control)) and the concentration of contaminant (Bangestan crude oil) with 5 levels (0, 0.5, 1, 2.5, and 5 wt%). As hydrocarbon concentrations increased at all five levels, the percentage of PAHs removal, the dry weight of roots and shoots, and chlorophyll contents decreased. At 0 and ۱% concentrations, the highest percentages of removal were obtained as 99.43, 59.89, and 57.01 for bacteria-plant treatment and separate bacterial and plant treatments, respectively ($p\leq0.05$). The plant and the bacteria showed almost equal efficiency in the removal of oil hydrocarbons ($p\leq0.05$). Bacterial treatments led to increased chlorophyll content as well as higher dry weight of roots and shoots compared with the treatments without bacteria ($p\leq0.05$). Results indicated that individual treatments of plant and bacteria had a positive effect on the decomposition rate of PAHs. However, the rate was more positively influenced by the synergistic activity of the bacteria and plants ($p\leq0.05$).

***Keywords*:** Bacteria, Phytoremediation, Polycyclic aromatic hydrocarbons, Synergistic .

*Corresponding author; Solmazdashti@gmail.com