تجزیه زیستی نفت خام توسط قارچ های جدا شده از خاک های آلوده مارون و هفتکل

ویدا داودی[1]*عبدالله رئیسی سرآسیاب[2]

چکیده:

انتشار تصادفی فرآورده های نفتی نگرانی خاصی در محیط زیست ایجاد کرده است. ترکیبات هیدروکربنی به خانواده ای از آلاینده های آلی سرطان زا و نوروتوکسیک تعلق دارند. قارچ ها نقش مهمی را در اکوسیستم خاک به عنوان تجزیه کنندگان اصلی بازی می کنند. هدف از این پژوهش جداسازی و شناسایی قارچ های بومی تجزیه ی کننده ی نفت از خاک های آلوده ی مارون و هفتکل می باشد. خاک های آلوده به نشت نفت جمع آوری شدند. برای جداسازی قارچ های مصرف کننده نفت خام از محیط MSM تکمیل شده با استرپتومایسین و ۱٪ نفت خام استفاده شد، قارچ هایی که روی این محیط رشد کردند روی محیط PDA تا زمان به دست آمدن کشت های خالص کشت مجدد شدند. پتانسل قارچ ها برای تجزیه زیستی نفت خام، توسط محیط مایع باکتو باشنل- هاس تکمیل شده با ۱٪ (v/v) نفت خام، ۰/۱ ٪ (v/v) توئین ۸۰ و ۰/۰۰۸ گرم بر ۵۰ میلی لیتر از معرف اکسیداسیون و احیا، بررسی شد. قارچ های جداسازی شده شامل *Acremonium spp*، *Alternaria spp*، *Aspergillus nidulans*، *Aspergillus terreus*، *Fusarium spp*، *Paecilomyces spp* and *Penicillium spp* بودند. از این هفت پرگنه، توانایی قارچ های *Alternaria spp*، *Aspergillus nidulans*، *Aspergillus terreus*، *Paecilomyces spp* and *Penicillium spp* برای تجزیه زیستی نفت خام مورد تایید قرار گرفت. از این رو، این گونه ها ی قارچی را می توان برای زیست پالایی مکان های آلوده به نشت نفت مورد استفاده قرار داد. در حال حاضر طبیعت با راه حل های کنترل بیولوژیکی برای حذف آلاینده های پرخطر از محیط زیست مانوس تر است.

واژگان کلیدی: تجزیه زیستی، نفت خام، قارچ های خاک

۱- دانشجوی گروه علوم پایه،دانشگاه فرهنگیان،تهران،ایران

۲- استادیار گروه علوم پایه،دانشگاه فرهنگیان،تهران،ایران

مقدمه

محصولات مبتنی بر نفت منبع اصلی انرژی برای صنعت و زندگی روزمره می باشند(Kvenvolden and Cooper, ۲۰۰۳). همان طور که وابستگی به نفت در حال افزایش است، مشکلات مربوط به آن نیز بیشتر و بیشتر می شوند(Mittal and Singh, ۲۰۰۹). آلودگی خاک با هیدروکربن ها منجر به تجمع آلاینده ها در بافت حیوانات و گیاهان و آسیب گسترده در آن ها می شود که می تواند باعث مرگ یا جهش ژنی شود (Alvarez and Vogel, ۱۹۹۱). وجود این آلاینده ها در محیط زیست علاوه بر تأثیر گسترده بر اکوسیستم منطقه، با گذشت زمان و ورود به چرخه غذایی، به جوامع انسانی نیز راه می یابند و به این ترتیب سلامت انسان ها را تهدید می کنند (Erdogan and Karaca, ۲۰۱۱). در حال حاضر نیاز به جلوگیری از گسترش این آلودگی ها و همین طور پاکسازی مناطق آلوده به شدت احساس می شود. برای این منظور می توان از روش های مختلفی بهره گرفت؛ یکی از این روش ها زیست پالایی می باشد (*et al.*, ۲۰۱۱ Kristanti). توانایی میکروارگانیسم ها برای مصرف هیدروکربن ها در محیط زیست آلوده نفتی به قطعیت رسیده است (Adekunle and Adebambo, ۲۰۰۷; Atlas, ۱۹۸۱; Ashraf and Ali, ۲۰۰۶). گونه های بسیاری از قارچ شناخته شده اند که هیدروکربن ها را متابولیزه می کنند و در مکان های آلوده به نفت مقاوم و پایدار هستند آن ها عبارتند از: *Aspergillus*، *Alternaria*، *CandidaCephalosporium*،*Aureobasidium*، *Geotrichum*، *Fusarium*، *Cladosporiom* ،

.

Penicillium، *Hansenula*، *Gliocladium*، *Trichoderma*، *Rhizopus*، *Rhodotolura*، *Mucor*، *Paecilomyces*، *Saccharomyces* Llanos) *Trichosporon* and *Torulopsis* and Kjøller, ۱۹۷۶; Bartha and Atlas, Obire and Anyanwu, ۲۰۰۹۱۹۷۷; Obire *et al.*, ۲۰۰۸;). قارچ های مختلفی یافت شده اند که تجزیه بیولوژیکی هیدروکربن ها را بیشتر از باکتری ها نشان دادند (Cerniglia and Perry, ۱۹۷۳). علاوه بر این، قارچ ها با توجه به تولید انبوه، راندمان بالا، دستکاری ژنتیکی، مقرون به صرفه بودن و همچنین نقل و انتقال ساده تر به عنوان ارگانیسم های مناسبی در این رابطه، مورد توجه قرار گرفته اند (Obire *et al.*, ۲۰۰۸). مزایای مرتبط با زیست پالایی قارچی عمدتاً در تطبیق پذیری تکنولوژی و میزان هزینه های آن در مقایسه با سایر فن آوری های بازسازی است (از قبیل سوزاندن، دفع حرارتی، استخراج) (George-Okafor *et al.*, ۲۰۰۹).انتظار می رود استفاده از قارچ ها به دلیل این که می توانند روی ضایعات کشاورزی ارزان قیمت و یا ضایعات درختان مانند چوب ذرت و خاک اره رشد کنند، نسبتاً مقرون به صرفه باشد بیشتر از آن، استفاده از آن ها یک روش ملایم و غیر تهاجمی است (Bijofp, ۲۰۰۳). با این حال، مطالعات بسیار کمی بر روی توانایی قارچ های رشته ای برای مصرف هیدروکربن های نفتی در ایران انجام شده است. هدف از این مطالعه جداسازی قارچ های مصرف کننده نفت خام از خاک های آلوده در مارون و هفتکل، به منظور تعیین رشد نسبی این قارچ ها بر روی نفت خام است.

مواد و روش ها

نمونه های خاک از یک افق ۱۰-۰ سانتی متری از سطح خاک آلوده شده به مواد نفتی از مناطق مارون و هفتکل در فروردین و اردیبهشت سال ۱۳۹۱جمع آوری شدند. برای جداسازی قارچ های مصرف کننده نفت خام از محیط نمک های معدنی (mineral salts medium) (MSM) تکمیل شده با استرپتومایسین و ۱٪ نفت خام استفاده شد، قارچ هایی که روی این محیط رشد کردند به محیط سیب زمینی دکستروز آگار(potato dextrose agar) (PDA) منتقل و به عنوان مصرف کنندگان اولیه نفت خام نگهداری شدند. ترکیب محیط شامل: کلرید سدیم ($NaCl$)، ۱۰/۰۰ گرم؛ سولفات منیزیم ۷ آبه ($MgSO_4.7H_2O$)، ۰/۴۲ گرم؛ کلرید پتاسیم (KCl)، ۰/۲۹گرم؛ فسفات دی هیدروژن پتاسیم (KH_2PO_4)، ۰/۸۳گرم؛ فسفات هیدروژن دی سدیم (Na_2HPO_4)، ۱/۲۵گرم؛ نیترات سدیم ($NaNO_3$)، ۰/۴۲گرم؛ آگار ۲۰گرم؛ آب مقطر یک لیتر و pH=۷/۲ (Obire and Anyanwu, ۲۰۰۹; Kalaiselvi and Panneerselvam, ۲۰۱۱; Chaudhry *et al.*, ۲۰۱۲). جهت شناسایی قارچ ها، مطالعات مورفولوژیک بر اساس بررسی اندازه، شکل، رنگ، تشکیل اسپور و تعداد روزهایی که طول می کشد تا قارچ ها به حداکثر قطر (۸ سانتی متر) پتری دیش برسند، انجام شد. بعد از ۴-۲ روز از رشد قارچ، رنگ آمیزی توسط لاکتو فنل کاتن بلو(Lactophenol cotton blue) (LCB) از قارچ انجام و با میکروسکوپ نوری مشاهده شد. قارچ های شناسایی شده از طریق مقایسه مورفولوژی و ویژگی های کشتی شان با مراجع تشریحی و توصیفی تایید شدند (Raper and Thom, ۱۹۴۹; Thom and Raper, ۱۹۵۴; Cappuccino, ۱۹۹۸; Fisher and Cook, ۱۹۹۸). قابلیت تجزیه ی زیستی قارچ های جداسازی شده با استفاده از روش اصلاح شده ی معرف اکسیداسیون و احیا ۶,۲ دی کلروفنول اندوفنول (۲, ۶-dichlorophenol indophenols) (DCPIP) نیز بررسی شد.به این صورت از پرگنه های قارچی ۷ روزه ۲ برش آگار (هر کدام ۱ سانتیمتر مربع) جدا کرده و به درون یک فلاسک ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط مایع باکتو باشنل-هاس تکمیل شده با ۱٪ (v/v) نفت خام، ۱۰/. ٪ (v/v) توئین ۸۰ و ۰۰۸/. گرم بر ۵۰ میلی لیتر از معرف اکسیداسیون و احیا اضافه شد، نمونه ها در دمای ۲ ± ۲۸ انکوبه شدند. به عنوان کنترل نمونه حاوی نفت خام فاقد پرگنه قارچی استفاده شد. انکوباسیون در دمای اتاق (۲ ± ۲۸) با شیک کردن مداوم با دور ۱۸۰RPM به مدت هفت روز انجام شد. ارلن ها روزانه برای تغییر رنگ از آبی تیره به بی رنگ (صورتی و یا زرد و سپس به بی رنگ) بررسی شدند. ترکیب محیط حاوی؛ سولفات منیزیم، ۲۰/. گرم؛ کلرید کلسیم ($CaCl_2$)، ۰۲/. گرم؛ فسفات دی هیدروژن پتاسیم، ۱/۰۰ گرم؛ فسفات هیدروژن دی پتاسیم (K_2HPO_4)، ۱/۰۰ گرم؛ کلرید آهن ($FeCl_2$)، ۰۵/. گرم؛ نیترات آمونیوم (NH_4NO_3)، ۱/۰۰ گرم استفاده شد. توین ۸۰ (۱۰/.٪)، معرف اکسیداسیون و احیا (۶,۲ دی کلروفنول اندوفنول ۲٪) و نفت خام (۱٪) به محیط مایع اضافه گردید (*et al.*, ۲۰۰۹; Al-Nasrawi, George-Okafor ۲۰۱۲).

نتایج:

در مطالعه حاضر هفت پرگنه قارچ از محیط MSM جداسازی شد. از این محیط برای مشاهده رشد قارچ ها تحت شرایط شدید و امکان مصرف نفت خام به عنوان تنها منبع کربن استفاده شد. شکل ۱ رشد قارچ ها روی محیط MSM را نشان می دهد. قارچ های جداسازی شده شامل *Acremonium spp*، *Alternaria spp*، *Aspergillus nidulans*، *Aspergillus terreus*، *Fusarium spp*، *Penicillium spp* and *Paecilomyces spp* بودند. جدول ۱ توانایی جدایه های قارچی در تجزیه زیستی نفت خام توسط بررسی آزمایش ارلن مایر (استفاده از معرف اکسیداسیون و احیا) را نشان می دهد. در این مرحله برای تایید پتانسیل تجزیه زیستی جدایه های قارچی، از محیط مایع باکتوباشنل-هاس استفاده شد، کل تغییر رنگ (آبی به بی رنگ) در برخی از فلاسک ها مشاهده شد در حالی که فلاسک های دیگر تا حدی تغییر رنگ را نشان دادند. پرگنه های قارچی که برای تجزیه زیستی هیدروکربن ها بالقوه بودند به عنوان *Acremonium spp* ، *Alternaria spp*، *Aspergillus nidulans*، *Aspergillus terreus*، *Fusarium spp*، *Paecilomyces spp* and *Penicillium spp* شناسایی شدند. در میان جدایه ها، آن هایی که سریعترین شروع تغییر رنگ را داشتند، برای تجزیه زیستی نفت خام تایید شدند (شکل۲).

شکل ۱: قارچ های جداسازی شده در محیط MSM حاوی ۱٪ نفت خام

جدول ۱: توانایی تجزیه زیستی نفت خام توسط بررسی آزمایش ارلن مایر

قارچ ها	آزمایش قابلیت تجزیه زیستیDCPIP (بی رنگ شدن در ارلن مایر)
Acremonium spp	(بعد از ۴ روز) +
Alternaria spp	(بعد از ۲ روز) +++
Aspergillus nidulans	(بعد از ۳ روز) ++
Aspergillus terreus	(بعد از ۲ روز) +++
Fusarium spp	(بعد از ۷ روز) -
Paecilomyces spp	(بعد از ۲ روز) +++
Penicillium spp	(بعد از ۲ روز) +++

شکل ۲: توانایی تجزیه ی زیستی نفت خام در محیط مایع باکتو باشنل-هاس به همراه شناساگر اکسیداسیون و احیا (از سمت چپ، کنترل و *Alternaria spp*)

بحث و نتیجه گیری

جدول ۱ نشان می دهد که این قارچ ها قادرند نفت خام را با نسبت های مختلف مصرف کنند. پرگنه های قارچی *Aspergillus ،Alternaria spp ،Aspergillus terreus ،nidulans* *Penicillium spp* and *Paecilomyces spp* برای تضمین توانایی شان در تجزیه نفت خام مورد تایید قرار گرفتند. برخی از این موجودات پیش از این به عنوان تجزیه کنندگان زیستی هیدروکربن ها توسط آوریل و همکاران، ادات و همکاران گزارش شده اند (April *et al.*, ۲۰۰۰; Oudot *et al.*, ۱۹۹۳). توانایی این پرگنه ها برای تولید تغییر رنگ در محیط مایع باکتو باشنل- هاس که احتمالاً به دلیل احیا معرف (اندیکاتور) توسط محصولات اکسید شده ی تجزیه هیدروکربن ها است. کل تغییر رنگ (رنگ آبی به بی رنگ) این واقعیت را تایید می کند که جدایه ها اکسیدکننده های هیدروکربنی بالقوه هستند (Obire and Anyanwu, ۲۰۰۹). توانایی تجزیه ترکیبات نفت خام به اجزای آن، منجر به اکسیداسیون منبع کربن در اجزای نفت خام می شود. وجود سه شاخص منجر به توانایی این قارچ ها در فرآیند تجزیه زیستی می شود، اول، تغییرات در رنگ محیط کشت از آبی به بی رنگ، دوم ناپدید شدن نفت خام از حد وسط و سوم یک توده از رشد قارچ در ته محیط کشت در حال رشد باشد. مکانیسم تجزیه زیستی نفت خام با ترکیب یک پذیرنده الکترون مانند DCPIP در محیط کشت اتفاق می افتد، ممکن است توانایی قارچ ها برای استفاده از سوبسترا با مشاهده تغییر رنگ DCPIP از آبی (اکسید) به بی رنگ (احیا) تعیین شود (Al-Nasrawi, ۲۰۱۲).این مطالعه، نشان داد که تمام جدایه های قارچی که مورد آزمایش قرار گرفتند، قادر به جذب نفت خام، ولی در نسبت های مختلف بودند. برخی از گونه ها مانند *Alternaria spp ،Aspergillus nidulans ،Aspergillus terreus* and *Paecilomyces spp ،Penicillium spp* فعال تر از دیگران بودند. در این میان جدایه های که کل تغییر رنگ را ایجاد کردند، سریعترین شروع و بیشترین میزان تجزیه زیستی را نشان دادند. علت استفاده از ۰/۱٪ توئین ۸۰ در طول سنجش بر اساس یافته های پیشین این است که فعالیت تجزیه زیستی را افزایش می دهد (Obire and Anyanwu, ۲۰۰۹). از آن جایی که توئین ۸۰ یک سورفکتانت است با کاهش کشش سطحی بین نفت و محیط کشت میکروبی باعث افزایش دسترسی میکروب ها و تماس آن ها باترکیبات نفتی شده و مصرف آن ها را توسط قارچ ها تسهیل می نماید که نتیجه این فرآیند، افزایش میزان تجزیه زیستی خواهد بود.میزان زیاد تجزیه هیدروکربن ها توسط قارچ های *Aspergillus nidulans ،Alternaria spp* *Paecilomyces spp ،Aspergillus terreus* and *Penicillium spp* می تواند ناشی از رشد عظیم و واکنش های تولید آنزیم در طول مراحل رشد باشد. این را می توان با گزارش بوگان و لامار، که نشان دادند آنزیم های لیگنینولیتیک خارج سلولی قارچ پوسیدگی سفید در پاسخ به مراحل رشد تولید می شوند، تایید کرد (Bogan and Lamar, ۱۹۹۶).در تحقیق حاضر، قارچ های *Alternaria spp ،Aspergillus nidulans ،Aspergillus terreus* and *Paecilomyces spp ،Penicillium spp* پرگنه های قارچی کاملی بودند که توانایی فعالی برای تجزیه نفت خام را نشان دادند. الشافی و همکاران گزارش کردند که در مقایسه با سایر ایزوله های قارچی، جدایه های *Aspergillus* و *Penicillium* در جذب هیدروکربن ها توانگر بوده و قادر به تجزیه نفت خام می باشند (Elshafie *et al.*, ۲۰۰۷). دیویس و وستلیک نشان دادند که قارچ ها تنوع و سازگاری فوق العاده ای در استفاده از مولکول های مختلف آلی به عنوان یک منبع کربن را نشان می

دهند با این حال توانایی هایشان برای تجزیه یک هیدروکربن خاص به عنوان یک منبع انرژی و یا زیست توده ممکن است متفاوت باشد. ترکیب مواد شیمیایی نفت خام نیز می تواند یک عامل در تعیین انواعی از قارچ ها باشد، که ممکن است بر روی آن رشد کند (Llanos and Kjøller, ۱۹۷۶; Davies and Westlake, ۱۹۷۹).در مطالعاتی که تعداد قابل توجه ای از قارچ های خاک به طور موثر، هر چند به آرامی از هیدروکربن های نفتی استفاده می کنند، جنس های *Aspergillus* و *Penicillium* گزارش شده اند (Cerniglia and Gibson, ۱۹۸۰). مطالعات انجام شده بر روی جداسازی قارچ های رشته ای در محیط های حاوی نفت و فرآورده های آن یک تنوع بسیار مشابه ای از جنس ها ی که در مطالعه حاضر یافت شد، مانند*Alternaria spp* ، *Aspergillus spp*، *Aspergillus spp*، *Penicillium spp* and *Paecilomyces spp* را نشان دادند (Obire and Anyanwu, ۲۰۰۹; Al-Nasrawi, ۲۰۱۲; Chaillan *et al.*, ۲۰۰۴). ثابت شد که این قارچ ها برای تجزیه هیدروکربن ها بهتر می باشند. به این ترتیب، می توان آن ها را به طور موثر برای تجزیه نفت زمین های کشاورزی آلوده به نفت، مورد استفاده قرار داد. تمام ارگانیسم های مورد استفاده در این پژوهش بومی محیط زیستی بودند که از آن جدا شدند و همه آن ها برای تجزیه زیستی آلاینده های آلی تست شدند. تجزیه ی زیستی آلاینده ها بهترین وسیله برای حذف کامل آلاینده های نفتی است.تجزیه زیستی که از اهمیت زیست محیطی بسیار بالایی برخوردار است به عنوان کمک به فرآیندهای اصلاح زیستی مطرح می باشد. در حال حاضر پیشرفت در بیوتکنولوژی تایید کرده است که ترکیبات مختلف هیدروکربن های نفت خام توسط میکروارگانیسم ها به عنوان تنها منبع کربن مصرف می شوند. این هیدروکربن ها، هم یک هدف و هم یک محصول متابولیسم میکروبی می باشند. استفاده از قابلیت های زیست پالایی موجودات زنده بومی برای تمیز کردن آلاینده ها موفقیت آمیز، عملی و دارای ارزش اقتصادی است.

منابع:

Adekunle, A.A., Adebambo, O.A., ۲۰۰۷. Petroleum hydrocarbon utilization by fungi isolated from *Detarium senegalense* (J. F Gmelin) seeds. Journal of American Science ۳, ۶۹-۷۶.

Al-Nasrawi, H.A., ۲۰۱۲. Biodegradation of crude oil by fungi isolated from Gulf of Mexico. Journal of Bioremediation Biodegradation ۳, ۱۴۷-۱۵۲.

Alvarez, P.J.J., Vogel, T.M., ۱۹۹۱. Substrate interactions of benzene, toluene, and para-xylene during microbial degradation by pure cultures and mixed culture aquifer slurries. Applied and Environmental Microbiology ۵۷, ۲۹۸۱–۲۹۸۵.

April, T.M., Fought, J.M., Currah, R.S., ۲۰۰۰. Hydrocarbon-degrading filamentous fungi isolated from flare pit soils in northern and western Canada. Canadian Journal of Microbiology ۴۶, ۳۸–۴۹.

Ashraf, R., Ali, T.A., ۲۰۰۶. Effect of oil (crude petroleum) on the survival and growth of soil fungi. Pakistan International Journal of Biotechnology ۳, ۱۲۷-۱۳۳.

Atlas, R.M., ۱۹۸۱. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective. Journal of Microbiological Reviews ۴۵, ۱۸۰-۲۰۹.

Bartha, R., Atlas, R.M., ۱۹۷۷. The microbiology of aquatic oil spills. Adv Appl Microbiology ۲۲, ۲۲۵-۲۶۶.

Bijofp, G., ۲۰۰۳. Fungal bioremediation. Bioremediation Journal ۷, ۱۱۷-۱۲۸.

Bogan, B.W., Lamar, R., ۱۹۹۶. Polycyclic aromatic hydrocarbon degrading of Phanerochaete chrysosporium HHB-۱۶۲۵ and its extra cellular ligninolytic enzymes. Applied environmental of microbiology ۶۲, ۱۵۹۷-۱۶۰۳.

Cappuccino, J.G., Sherman, N., ۱۹۹۸. Microbiology a Laboratory Manual. ۵th edn CBS, ۲۰۶ p.

Cerniglia, C.E., Gibson, D.T., ۱۰۸۰. Fungal oxidation of (+/-)-۹,۱۰-dihydroxy-۹,۱۰-dihydrobenzo[a]pyrene: formation of diastereomeric benzo [a]pyrene ۹,۱۰-diol ۷,۸-epoxides. Proc Natl Acad Sci U S A ۷۷, ۴۵۵۴-۴۵۵.

Cerniglia, C.E., Perry, J.J., ۱۹۷۳. Crude oil degradation by microorganisms isolated from the marine environment. J Basic Microbiology Environment-Health-Techniques ۱۳, ۲۹۹–۳۰۶.

Chaillan, F., Fleche, A.L., Bury, E., Phantavong, Y., Crimount, P., Saliot, A., ۲۰۰۴. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degradading microorganisms. Research Microbiology ۱۵۵, ۵۸۷-۵۹۵.

Chaudhry, S., Luhach, J., Sharma, V., Sharma, Ch., ۲۰۱۲. Assessment of diesel degrading potential of fungul isolates from sludge contaminated soil of petroleum refinery, Haryana. Research of Microbiology ۷, ۱۸۲-۱۹۰.

Davies, J.S., Westlake, D.W.S., ۱۹۷۹. Crude oil utilization by fungi. Can J Microbiology ۲۵, ۱۴۶–۱۵۶.

Elshafie, A., Alkindi, A.Y., Al-Busaidi, S., Bakheit, C., Albahry, S.N., ۲۰۰۷. Biodegradation of crude oil and N-alkanes by fungi isolated from Oman. Marine Pollution Bulletin ۵۴, ۱۶۹۲–۱۶۹۶.

Erdogan, E., Karaca, A., ۲۰۱۱. Bioremediation of crude oil polluted soils. Asian Journal of Biotechnology ۳, ۲۰۶-۲۱۳.

Fisher, F., Cook, N.B., ۱۹۹۸. Fundamentals of Diagnostic Mycology. Philadelphial. WB Saunders Company.

George-Okafor, U., Tasie, F., Florence, M.O., ۲۰۰۳. Hydrocarbon degradation potentials of indigenous fungal isolates from petroleum contaminated soils. J of physical Nature science ۳, ۱-۶.

Kalaiselvi, S., Panneerselvam, A., ۲۰۱۱. Ecology of soil fungi in paddy Field of Tamilnadu-Thanjavur District. Der Chemica Sinica ۲, ۹-۱۹.

Kristanti Ayu, R., Hadibarata, T., Toyama, T., Tanaka, Y., Mori, K., ۲۰۱۱. Bioremediation of Crude Oil by White Rot Fungi *Polyporus sp.* S۱۳۳. J of Microbiology and Biotechnology ۲۱, ۹۹۵–۱۰۰۰.

Kvenvolden, K.A., Cooper, C.K., ۲۰۰۳. Natural seepage of crude oil into the marine environment. Geo-Marine Letters ۲۳, ۱۴۰–۱۴۶.

Llanos, C., Kjøller, A., ۱۹۷۶. changes in the flora of soil fungi following oil waste application. Oikos ۲۷, ۳۷۷-۳۸۲.

Mittal, A., Singh, P., ۲۰۰۹. *S*tudies on biodegradation of crude oil by *Aspergillus niger.* The South Pacific. Journal of Natural Science ۲۷, ۵۷-۶۰.

Obire, O., Anyanwu, E.C., ۲۰۰۹. Impact of various concentrations of crude oil on fungal populations of soil. International Journal of Environmental Science Technology ۶, ۲۱۱-۲۱۸.

Obire, O., Anyanwu, E.C., Okigbo, R.N., ۲۰۰۸. Saprophytic and crude oil-degrading fungi from cow dung and poultry droppings as bioremediating agents. International Journal of Agricultural Technology ۴ , ۸۱-۸۹.

Oudot, J., Duport, J., Haloui, S., Roquebert, M.F., ۱۹۹۳. Biodegradation potential of hydrocarbon assimilating tropiocal fungi. Soil Biology and Biochemistry ۲۵, ۱۱۶۷-۱۱۷۳.

Raper, K.B., Thom, C.A., ۱۹۴۹. A Manual of Penicillia. Williams and Wilkins Co, Baltimore, Md. U.S.A.

Thom, C., Raper, K.B., ۱۹۵۴. A Manual of Aspergilli. Williams and Wilkins Co, Baltimore, Md. U.S.A, ۴۰۴ p.