مطالعهٔ باکتریایی ریشهٔ ذرت (*Zea mays* L.) در خاک آلوده به نفت

پریسا محمدی[۱*]، سپیده عامری تورزنی[۲]، خدیجه کیارستمی[۲]، سارا غروی[۳] و زهرا فلاحی[۱]

دریافت: ۱۳۹۲/۲/۱۶/ پذیرش: ۱۳۹۴/۲/۲۱

[۱]گروه میکروبیولوژی، دانشکدهٔ علوم زیستی، دانشگاه الزهرا (س)
[۲]گروه علوم گیاهی، دانشکدهٔ علوم زیستی، دانشگاه الزهرا (س)
[۳]گروه بیوتکنولوژی، دانشکدهٔ علوم زیستی، دانشگاه الزهرا (س)
*مسئول مکاتبات: p.mohammadi@alzahra.ac.ir

چکیده. هیدروکربن‌های نفتی یکی از شایع‌ترین آلوده‌کننده‌های محیط زیست هستند که مشکلات جدی زیست‌محیطی ایجاد می‌کنند. گیاه‌پالایی خاک آلوده هماهنگ با سیستم ریشه‌ای گیاه انجام می‌شود. ریزوسفر گیاه همراه با میکروارگانیسم‌های این ناحیه در افزایش تجزیهٔ آلاینده‌های متنوع آلی خاک نقش مهمی دارند. در این تحقیق به بررسی میکروبی ریشهٔ گیاه ذرت پس‌از طی یک دورهٔ رشد ۶۰ روزه در سه نوع خاک شاهد، آلوده به نفت و آلوده به نفت همراه با کود نیتروژنی پرداخته شد و باکتری‌های ناحیهٔ ریشه شناسایی شد. پس از تعیین مقاوم‌ترین باکتری به نفت خام، توانایی تولید بیوسورفکتانت در باکتری‌های جداشده از خاک‌های آلوده بررسی شد. نتایج شمارش تعداد باکتری‌ها نشان داد که تعداد کل کلنی‌های میکروبی خاک شاهد از دو تیمار دیگر بیشتر بود و در میزان تنوع میکروارگانیسم‌ها نیز تفاوت مشاهده شد. مشخص شد که تمام باکتری‌های جداشده از خاک‌های آلوده توانایی تولید مقادیر مختلف بیوسورفکتانت را دارند.

واژه‌های کلیدی. گیاه‌پالایی ، میکروارگانیسم، بیوسورفکتانت، آلودگی نفتی، تیرهٔ گندمیان

The bacterial evaluation of maize root (*Zea mays* L.) in oil-polluted soil

Parisa Mohammadi[1*], Sepideh Ameri Toorzani[2], Khadijeh Kiarostami[2], Sara Gharavi[3] and Zahra Fallahi[4]

Received 06.05.2013/ Accepted 11.05.2015

[1]Department of Microbiology, Faculty of Biological Science, Alzahra University, Tehran, Iran
[2]Department of Plant Science, Faculty of Biological Science, Alzahra University, Tehran, Iran
[3]Department of Biotechnology, Faculty of Biological Science, Alzahra University, Tehran, Iran

*Correspondent author: p.mohammadi@alzahra.ac.ir

Abstract. Total petroleum hydrocarbons (TPHs) is one of the most important environmental challenges. Phytoremediation of oil-polluted soil depends on microorganisms of the rhizosphere. This study attempts to evaluate the microbial impact of *Zea mays* rhizosphere during a 60 day period using three different treatments: control soil, oil-polluted soil and oil-polluted soil including fertilizer (NH_4No_3, K_2HPO_4). Then, the rhizosphere bacteria were identified. The results showed that CFU per gram of control soil was higher than other treated soils, an indication of oil stress on microbial population. In addition, more bacterial diversity was observed in soils and different bacteria were isolated from the soils. Finally, the most resistant bacteria to the oil pollution were assayed. The assay of isolates indicated that all of those separated from the oil-polluted soil have the ability to produce biosurfactant in different quantities. Further investigation must be carried out to optimize the degradation of oil by these isolates.

Keywords. phytoremediation, microorganism, biosurfactant, oil pollution, Poaceae

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.1.2.9]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.1.1]

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.1.2.9]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.1.1]

مقدمه

آلودگی نسبتاً زیاد خاک و رسوبات با هیدروکربن‌های نفتی مشکل جدی جهانی است که اغلب در کشورهایی که نفت تولید، منتقل یا تصفیه می‌کنند مشاهده می‌شود. در ایران به‌ویژه در اطراف پالایشگاه‌هایی مانند پالایشگاه تهران آلودگی خاک مشکل اساسی زیست محیطی ایجاد کرده است. در مناطق آلوده به نفت، گیاه‌پالایی می‌تواند در سطح آلودگی‌های متوسط یا بیشتر، بعد از دیگر اقدامات پالایش به مثابهٔ مرحله‌ای از تصفیه به‌کار رود و کیفیت خاک را بهبود بخشد. گیاه‌پالایی با استفاده از گیاهان مناسب و مقاوم مانع تجمع آلودگی‌های نفتی و دیگر ترکیبات می‌شود (Banat *et al.,* 1995). درحقیقت در این تکنولوژی از گیاهان استفاده می‌شود و با تحریک جمعیت‌های میکروبی نزدیک سطح مشترک ریشه-خاک، تجزیهٔ ترکیبات مقاوم افزایش می‌یابد. گیاه‌پالایی ازطریق فعالیت میکروارگانیسم‌های سیستم ریشه‌ای، امروزه برای پاک کردن نواحی آلوده به‌کار می‌رود (Walton & Anderson, 1990; Andeson & Coats, 1994; Boyle & Shann 1995; Reilly *et al*., 1996; Danne *et al.,* 2001). سیستم ریشه-ای گیاه با میکروارگانیسم‌های اطرافش نقش مهمی در افزایش قدرت تجزیهٔ آلاینده‌های مختلف آلی نشان می‌دهد (Aprill & Sims, 1990; Anderson *et al.,* 1993; Cunningham *et al.,* 1996; Flathman & Lanza, 1998; Banks *et al.,* 2000; Hutchinson *et al.,* 2001; Chaudry *et al.,* 2002). برای یک گیاه‌پالایی موفق، هم گیاه و هم میکروارگانیسم باید بتوانند در خاک آلوده به نفت به‌خوبی رشد کنند. ازآنجایی‌که باکتری‌های مختلف از ترکیبات آلی معدودی می‌توانند استفاده کنند، گیاه می‌تواند با تولید و ترشح ترکیبات متنوع، جمعیت‌های میکروبی ناحیهٔ ریزوسفر را تحریک و رشد آن‌ها را افزایش دهد. در سال‌های اخیر تحقیقات زیادی در این زمینه صورت گرفته است و به شناسایی و جداسازی میکروارگانیسم‌های موجود در خاک‌های آلوده به نفت پرداخته شده است و از باکتری‌های جداشده به همراه گیاهان برای کاهش آلودگی استفاده می‌شود (Culhane *et al.,* 2011; Tanase *et al.,* 2011; Harichova *et al.,* 2011). رجایی در سال ۱۳۹۰ به بررسی زیست‌پالایی خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی ازطریق برخی گیاهان و ریزوباکتری‌های بومی پرداخت. او با هدف زیست‌پالایی خاک-های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی ازطریق برخی گیاهان و ریزوباکتری‌های بومی، خاک ریزوسفری مناطق آلوده به نفت خام میدان نفتی مارون در استان خوزستان را با استفاده از محیط کشت انتخابی تحت مطالعه قرار داد که مشاهدات این مطالعه بیانگر وجود ژن‌های مهم مسیر تجزیهٔ ترکیبات نفتی مانند alk و xyl در سطح ژنوم جدایه‌های باکتریایی در نمونه‌های خاک ریزوسفری آلوده به نفت خام این منطقه است که به سهولت در حضور نفت خام که تنها منبع کربن و انرژی رشد است، رشد می کنند. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که در نواحی آلوده به نفت خام جنوب کشور، گونه‌های باکتریایی وجود دارند که به سبب حضور طولانی‌مدت نفت در این مناطق قابلیت تجزیه-کنندگی نفت را کسب نموده اند و استفاده از این جدایه‌ها توأم با کشت گیاهانی همچون تیرهٔ گندمیان موجب افزایش تجزیهٔ نفت خام می‌شود. براساس شواهد حاصل از این مطالعه، گیاه-پالایی توأم با تجزیهٔ میکروبی با استفاده از گیاهان و باکتری‌های بومی می‌تواند تکنیک کاربردی و کارآمدی برای پاک‌سازی خاک‌های آلوده به نفت خام و مشتقات نفتی باشد.

بصالت‌پور و همکاران در سال ۱۳۸۷ به روش تحریک گیاهی، به بررسی پالایش خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی اطراف پالایشگاه تهران پرداختند. آنان نتیجه گرفتند که حضور پوشش گیاهی ازطریق افزایش قابلیت دسترسی زیستی هیدروکربن‌ها به افزایش ترشحات ریشه و تحریک رشد و فعالیت باکتری‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های نفتی در خاک می‌انجامد که این امر موجب بهبود خواص فیزیکی خاک و در-نتیجه سبب افزایش تجزیهٔ آلاینده‌های آلی در خاک می شود.

سهرابی و همکاران در سال ۱۳۸۵ به تحقیق دربارهٔ پاکسازی زیستی خاک‌های آلوده به اتیل بنزن، تولوئن و نفتالن پرداختند. مهم‌ترین نتیجهٔ حاصل از این تحقیق این است که با جداسازی جمعیت‌های باکتریایی خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی و تهیه یک مایع تلقیح مناسب می‌توان هیدروکربن‌های آروماتیک را به روش زیستی حذف کرد.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.1.2.9]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.1.1]

هدف از این تحقیق مقایسهٔ تعداد کل باکتری‌های ناحیهٔ ریشه در تیمارهای مختلف خاک و شناسایی فراوان‌ترین آن‌ها است. با شناسایی باکتری‌های ناحیهٔ ریشه در تیمارهای مختلف می‌توان تغییر تنوع باکتریایی را بررسی کرد. دربارهٔ جدایه‌های خاک-های آلوده آزمون تولید بیوسورفکتانت انجام گرفت و جذب آن‌ها در ۶۰۰ نانومتر اندازه گیری شد تا مقاوم‌ترین باکتری به ترکیبات نفتی جدا و با روش‌های معمول کلاسیک تا حد جنس یا درصورت امکان گونه شناسایی شود.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی خاک

بذر ذرت (*Zea mays* L.) رقم ۷۰۴ از موسسهٔ اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شد. نفت خام از پالایشگاه آبادان تهیه و با غلظت ۲ درصد با خاک حاصل‌خیز مخلوط شد. pH خاک تحت مطالعه اندازه‌گیری شد که مقدار آن برابر با ۷ بود. خاک حاصل‌خیز تحت مطالعه مخلوطی از رس و ماسه بود. در این آزمایش ۳ تیمار خاک حاصل‌خیز به مثابهٔ شاهد، خاک آلوده شامل خاک حاصل‌خیز همراه با غلظت ۲ درصد نفت خام و خاک حاصل‌خیز همراه با غلظت ۲ درصد نفت خام و ۵۰۰ میلی‌گرم آمونیوم نیترات و ۵۰ میلی‌گرم K_2HPO_4 تحت مطالعه قرار گرفت. بذرها در گلدان‌ها کاشته و آبیاری هرروز در حد ظرفیت زراعی انجام شد. بعد از ۶۰ روز گیاهان رشدیافته برداشت شد و خاک اطراف ریشهٔ هر گیاه برای بررسی‌های میکروبی در دمای ۲۰°C- نگه‌داری شد.

تهیه رقت‌های 10^{-1} – 10^{-6} از خاک ریزوسفر

ده گرم خاک ریزوسفر به ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر K_2HPO_4 اضافه شد. برای تهیهٔ بافر مورد نظر ۰/۵ گرم K_2HPO_4 و ۱۰/۱ گرم NaCl در ۱۰۰۰میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و با استفاده از اتوکلاو استریل شد. سوسپانسیون مد نظر یک ساعت روی شیکر قرار گرفت تا ذرات خاک کاملاً از هم جدا شوند. سپس ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون خاک در لولهٔ حاوی ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی ریخته شد و بدین‌ترتیب رقت 10^{-1} بدست آمد و دیگر رقت‌ها به‌طور متوالی از این رقت تهیه شد (Jones *et al.,* 2004).

تهیهٔ محیط کشت برای شمارش کلنی‌ها

برای شمارش کلنی‌ها از محیط Plate Count Agar استفاده شد. برای این منظور، ۱۰۰ µL از هریک از رقت‌های تهیه‌شده روی محیط کشت مذکور منتقل و با استفاده از میلهٔ شیشه‌ای استریل پخش شد. کشت‌ها با سه بار تکرار انجام شد. پلیت‌ها تا ظهور کلنی باکتری‌ها گرماگذاری شد. سپس کلنی‌های به‌دست آمده با استفاده از دستگاه شمارش کلنی مدل Sana SL-902 شمارش شدند. پلیت‌های دارای ۳۰۰-۳۰ کلنی برای این منظور مورد استفاده قرار گرفت. پس‌از شمارش کلنی‌ها، برای محاسبهٔ تعداد کل میکروب‌ها از رابطهٔ زیر استفاده شد:

$$N = \sum C/ (n_1 + 0.1\, n_2)d$$

N= تعداد کل باکتری‌ها در هر میلی‌لیتر

C= تعداد کل کلنی‌های شمارش شده در کل پلیت‌های قابل شمارش

d= ضریب رقت اولین سری قابل شمارش

n_1= تعداد پلیت‌ها در اولین رقت قابل شمارش

n_2= تعداد پلیت‌ها در دومین رقت قابل شمارش

شناسایی باکتری‌ها

برای هر تیمار خاک رقت‌های مناسبی که تعداد کلنی‌های آن بین ۳۰۰-۳۰ بود انتخاب شد. سپس براساس مورفولوژی کلنی، رنگ‌آمیزی گرم و آزمایش‌های بیوشیمیایی شناسایی باکتری‌ها در حد جنس و در صورت امکان در حد گونه انجام شد (Baron & Finegold, 1990).

غربال‌سازی باکتری‌های مقاوم به نفت خام

یازده جدایهٔ باکتری شناسایی شده از خاک‌های آلوده و خاک آلوده همراه با کود برای بررسی‌های بیشتر انتخاب شد. برای این منظور از محیط پایه نمکی معدنی حاوی ۱ گرم KH_2PO_4، ۱ گرم K_2HPO_4، ۱ گرم NH_4NO_3، ۰/۲ گرم $MgSo_4.7H_2O$، ۰/۰۵ گرم $FeCl_3$، ۰/۰۲ گرم $CaCl_2.H_2o$ در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استفاده شد و در ارلن‌های شیاردار به حجم ۵۰۰ میلی-

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.1.2.9]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.1.1]

لیتر توزیع و استریل شد (Wang, 2008). در داخل هر ارلن ۵۰ میلی‌لیتر محیط پایه نمکی، ۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری با کدورت معادل ۰/۵ مک‌فارلند ($1/5 \times 10^8$ cell/ml) و ۰/۸ میلی‌لیتر نفت خام تلقیح شد. برای شاهد نیز از ۵۰ میلی‌لیتر محیط پایه نمکی معدنی و ۰/۸ میلی‌لیتر نفت خام بدون سوسپانسیون باکتری استفاده شد. ارلن‌ها به‌مدت یک هفته روی شیکر انکوباتور در دمای ۲۵°C و دور rpm ۱۳۰ قرار گرفتند و جذب آن‌ها هر ۲۴ ساعت در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. باکتری که بیشترین جذب را نشان داد برای بررسی‌های بیشتر انتخاب شد. برای تأئید عملکرد تجزیه‌ای، باکتری مورد نظر در محیط نمکی فوق حاوی گلیسرول ۱ درصد کشت داده شد و هر ۲۴ ساعت جذب آن در ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. میزان پروتئین می‌تواند معیاری برای تعیین مصرف ترکیبات نفتی ازطریق باکتری و نیز رشد باکتری ها در محیط کشت باشد. اندازه‌گیری پروتئین باکتری موردنظر شامل دو مرحله لیز سلول‌ها و رنگ-آمیزی پروتئین‌هاست. برای لیز کردن سلول‌ها، ۱ میلی‌لیتر از نمونه در اپندورف قرار داده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ g سانتریفوژ شد. سپس ۱ میلی‌لیتر آب مقطر به رسوب فوق اضافه شد و پس‌از به‌هم‌زدن ۰/۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۳ مولار NaOH به آن اضافه و به‌خوبی هم‌زده شد. اپندورف ها به مدت ۹۰ دقیقه در حمام ۶۰°C قرار داده شد. اندازه‌گیری پروتئین به روش برادفورد انجام گرفت. سپس ۱۰۰ µL از نمونه لیزشده سلول‌های باکتری در لولهٔ آزمایش استریل ریخته شد و پس از آن ۱ میلی‌لیتر معرف برادفورد به این مخلوط اضافه و ورتکس شد. پس‌از ۱۰ دقیقه سکون در طول موج ۵۹۵ نانومتر جذب نوری نمونه خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد، از غلظت-های صفر تا ۲ میلی‌گرم نمونه سرم آلبومین گاوی استفاده شد. درنهایت سنجش پروتئین هر ۲۴ ساعت یک‌بار برای نمونه انجام گرفت (Bradfford, 1976).

سنجش بیوسورفکتانت

برای این منظور در یک پتری‌دیش به قطر ۲۵ سانتی‌متر ۵۰ میلی لیتر آب مقطر ریخته شد و سپس ۲۰ µL نفت خام نیز به آن اضافه شدکه این مقدار نفت به صورت لایهٔ نازکی در سطح آب قرار می‌گرفت. با افزودن ۱۰ µL سوسپانسیون باکتریایی حاوی بیوسورفکتانت احتمالی، ناحیهٔ شفافی در لایهٔ نفتی ایجاد شد. با افزایش غلظت این ماده، قطر منطقهٔ شفاف نیز افزایش یافت. در این مرحله از سدیم‌دودسیل‌سولفات به‌منزلهٔ شاهد استفاده شد (Morikawa *et al.,* 2000; Youssef *et al.,* 2004).

برای شناسایی مولکولی جدایهٔ باکتریایی از روش تعیین توالی ژن ۱۶s rRNA به طریق Lie و همکاران استفاده شد. DNA استخراج شده جهت تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره ارسال شد.

نتایج و بحث

براساس نتایج، CFU خاک شاهد در هر گرم خاک بیشتر از دو تیمار دیگر بود. این درحالی است که تعداد میکروارگانیسم‌ها در نمونهٔ خاک تیمارشده با نفت و کود بیش‌از نمونهٔ خاک تیمارشده با نفت، به‌تنهایی، بود (جدول ۱). این نتیجه بر این مطلب دلالت دارد که افزایش جمعیت میکروبی ناشی از افزودن کود به محیط است. Muratova و همکاران بیان کردند که با آلودگی نفتی مواد مغذی کاهش می‌یابد و این امر باعث کاهش میکروارگانیسم‌ها می‌شود. این کاهش با افزودن کود، اصلاح می‌گردد. شناسایی باکتری‌ها با روش‌های معمول کلاسیک انجام گرفت (Muratova *et al.,* 2008).

رنگ‌آمیزی گرم برای تمام جدایه‌ها انجام شد و درصورت لزوم رنگ‌آمیزی اختصاصی اسپور برای باکتری‌های میله‌ای‌شکل گرم مثبت صورت گرفت. آزمون‌های تشخیصی مطابق جدول-های کتاب‌های Clinical and pathogenic microbiology و Diagnostic microbiology و باتوجه به امکانات موجود در آزمایشگاه میکروبیولوژی انتخاب شد. این آزمون‌ها برای باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت در جدول ۲ ارائه شده است و فهرست باکتری‌های شناسایی‌شده در جدول ۳ آمده است.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.1.2.9]

[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.1.1]

جدول ۱- محاسبهٔ میانگین CFU در هر گرم خاک شاهد، خاک آلوده* و خاک آلوده همراه با کود** با سه بار تکرار.

Table 1. The computation of CFU average per gram of control soil, polluted soil and soil polluted with fertilizer performed thrice.

	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	میانگین CFU/ml
شاهد	>300	>300	152	<300	<30	<30	130000
	>300	>300	102	60	<30	<30	
	>300	>300	89	<300	<30	<30	
آلوده	>300	209	78	<30	<30	<30	25757.58
	>300	179	99	<30	<30	<30	
	>300	220	65	<30	<30	<30	
آلوده+کود	>300	>300	102	<30	<30	<30	38750
	>300	>300	<30	<30	<30	<30	
	>300	293	70	<30	<30	<30	

*خاک آلوده حاوی خاک حاصل‌خیز همراه با غلظت ۲٪ نفت خام، ** خاک آلوده همراه با ۵۰۰ میلی‌گرم آمونیوم نیترات و ۵۰ میلی‌گرم K_2HPO_4.

*Polluted soil including fertile soil with 2% concentration of crude oil, **polluted soil with 500 mg of ammonium nitrate and 50 mg K_2HPO_4.

جدول ۲- فهرست آزمون‌های بیوشیمیایی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی در سه نوع خاک شاهد، آلوده و خاک آلوده همراه با کود.

Table 2. Biochemical tests for gram-positive and gram-negative bacteria in control soil, polluted soil and soil polluted with fertilizer.

باکتری‌های گرم منفی	**اکسیداز- کاتالاز- رشد روی MAC- سیترات- MRVP- استامید- رشد در ٤٢°C- SIM- OF گلوکز و گزیلوز- TSI**
باکتری‌های گرم مثبت	اکسیداز- کاتالاز- همولیز در محیط آگار با خون گوسفندی- اوره براث- استارچ آگار- رشد روی MSA- احیای نیترات- بایل اسکولین- مصرف قندهای مانوز و زایلوز- آزمون حساسیت به دیسک‌های پنی‌سیلین و نووبیوسین- حضوراسپور

با استفاده از نتایج جدول ۳ مشخص شد که جدایه‌های P_01 و P_02 متعلق به جنس *Pseudomonas*، P_03 متعلق به جنس *Actinobacillus*، P_11 و P_17 متعلق به جنس *Corynebacterium*، P_13، PF4 و PF10 متعلق به *Coryneform groups*، P_14 و PF3 متعلق به جنس *Bacillus*، P_12 متعلق به جنس *Rhodococcus*، P_15 متعلق به جنس *Alcaligenes*، PF5 متعلق به جنس *Moraxella* و PF8 متعلق به جنس *Flavobacterium* بود. جدایهٔ PF7 به‌لحاظ ویژگی‌های شکلی و کشتی به جنس *Staphyloccus* شباهت داشت اما آزمون‌های بیوشیمیایی و آنزیمی مورد استفاده برای تشخیص باکتری، کافی نبود، بنابراین بررسی‌های مولکولی جهت شناسایی دقیق‌تر انجام شد.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.1.2.9]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.1.1]

جدول ۳- جدایه‌های به‌دست‌آمده از سه نوع خاک شاهد، آلوده و آلوده همراه با کود.

Table 3. Isolates obtained from control soil, polluted soil, and soil polluted with fertilizer.

جدایه آزمون	P 1 0	P 2 0	P 3 0	P 1 1	P 2 1	P 3 1	P 4 1	P 5 1	P 7 1	PF5	PF4	PF3	PF7	PF8	PF10
شکل	باسیل	باسیل	باسیل	باسیل	باسیل	باسیل	باسیل	باسیل	باسیل	باسیل	باسیل	باسیل	کوکسی	باسیل	باسیل
واکنش گرم	−	−	+	+	+	+	+	−	+	−	+	+	+	−	+
آزمون KOH	+	+	−	−	−	−	−	+	−	+	−	−	−	+	−
کاتالاز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
اکسیداز	+	+	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	+	−
حضور اسپور	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	+	−	−	−

PF10 و PF4، P_13. *Rhodococcus* P_12:. *Corynebacterium*: P_17 و P_11. *Actinobacillus*: P_03. *Pseudomonas*: P_02 و P_01
Coryneform groups. P_14 و PF3 :*Bacillus*. P_15 :*Alcaligenes*. PF5 :*Moraxella*. PF7 :*Staphyloccus*. PF8 :*Flavobacterium*.
PF10 & PF4، P_13. *Rhodococcus* P_12:. *Corynebacterium*: P_17 & P_11. *Actinobacillus*: P_03. *Pseudomonas*: P_02 & P_01
Coryneform groups. P_14 & PF3 :*Bacillus*. P_15 :*Alcaligenes*. PF5 :*Moraxella*. PF7 :*Staphyloccus*. PF8 :*Flavobacterium*.

پس‌از شناسایی اولیه، به منظور غربال‌گری باکتری‌های مقاوم به آلاینده‌های نفتی، جدایه‌های نفتی مربوط به خاک های آلوده در محیط پایه معدنی کشت داده شد و جذب محیط اندازه‌گیری شد. بررسی‌ها نشان داد که بیشترین میزان جذب در ۶۰۰ نانومتر مربوط به *Staphylococcus saprophyticus* بود که این نتیجه با گلیسرول ۱ درصد نیز تأئید شد. نتایج تحقیقات گذشته نشان می‌دهد که میزان تولید بیوسورفکتانت برای هر دو منبع نفت خام و گلیسرول یکسان است، اما ازآنجاکه گلیسرول ساختار ساده‌تری نسبت به نفت خام دارد، در این مرحله سنجش پروتئین نیز با استفاده از گلیسرول برای سویهٔ مورد نظر انجام شد (نصیری آذر، ۱۳۸۱؛ ریسمانی، ۱۳۸۵). بیشترین میزان جذب پروتئین برای جدایهٔ مزبور در طول موج ۵۹۵ نانومتر ۰/۱ بود. همچنین ازآنجایی‌که میزان افزایش پروتئین می‌تواند معیاری برای تعیین میزان مصرف نفت ازطریق باکتری در محیط کشت باشد، افزایش مقدار پروتئین، تولید بیشتر تودهٔ سلولی باکتری مدنظر را نشان می‌دهد (Vasileva & Galabova, 2002).

آزمون مربوط به تولید بیوسورفکتانت برای ۱۱ باکتری جداشده از خاک آلوده دارای ۲ درصد نفت خام و خاک آلوده همراه با ۵۰۰ میلی‌گرم آمونیوم‌نیترات و ۵۰ میلی‌گرم K_2HPO_4 انجام شد. نتایج نشان داد تمام جدایه‌ها توانایی تولید بیوسورفکتانت را در مقادیر مختلف دارند (جدول ۴).

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.1.2.9]

[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.1.1]

جدول ۴- تولید بیوسورفکتانت در جدایه‌های خاک‌های آلوده و خاک آلوده همراه با کود.

Table 4. The production of bio surfactant isolates recovered from polluted soils and soil polluted with fertilizer.

جدایه	قطر لایه تشکیل شده روی لایه نفتی (cm)
P_{1} 3 (*Coryneform* groups)	۶/۵
PF7 (*Staphylococcus*)	۴
PF8 (*Flavobacterium*)	۴
P_{1} 1 (*Corynebacterium*)	۳
P_{1} 4 (*Bacillus*)	۳
PF5 (*Moraxella*)	۳
P_{1} 2 (*Rhodococcus*)	۲
PF10 (*Coryneform* groups)	۲
PF3 (*Bacillus*)	۱/۵
P_{1} 5 (*Alcaligenes*)	۱
P_{1} 7 (*Corynebacterium*)	۰/۵

نتایج DNA استخراج‌شده به روش SET بافر

مقدار DNA استخراج‌شده از باکتری PF7 که به شکل KGAM07 کدگذاری شد به استفاده از روش SET بافر با کمک دستگاه Nano Drop اندازه گیری شد (جدول ۵).

جدول ۵- نتایج تعیین مقدار DNA استخراج‌شده.

Table 5. Results of quantification of extracted DNA.

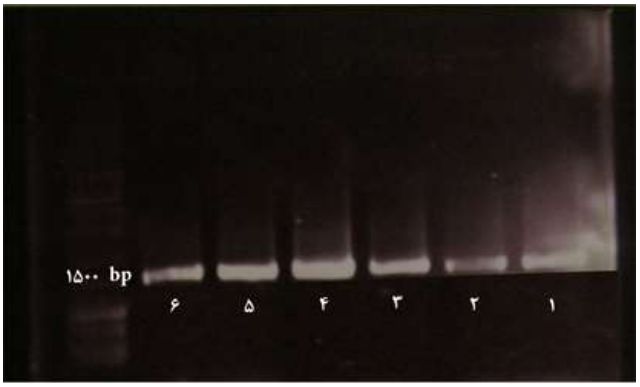
Nucleic Acid Concentration	Unit	A_{260}	A_{280}	۲۶۰/۲۸۰	۲۶۰/۲۳۰	Sample Type	Factor
۲۱۶/۳	ng/µl	۴/۳۲۷	۲/۴۱۹	۱/۷۳	۱/۱۷	DNA	۵۰-۰۰

نتایج واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) ژن ۱۶ S rRNA

نتایج PCR در همهٔ شیب‌های دمایی حضور باند مربوط را نشان داد (شکل ۱).

شکل ۱- ژل آگاروز ۲ درصد بارگذاری شده، خط ۱ تا ۶ محصول ۱۴۱۳ بازی PCR. دما از راست به چپ افزایش یافته است.

Fig. 1. 2% agarose gel, lane 1 to 6 PCR products of 1413. The temperature increases from right to left.



۱: دما ۵۵°C، محصول PCR مقدار ۱۰ µl، ۲: دما ۵۶/۷ °C، محصول PCR مقدار ۱۰ µl، ۳: دما ۵۸/۲ °C، محصول PCR مقدار ۱۰ µl، ۴: دما ۶۰°C، محصول PCR مقدار ۱۰ µl، ۵: دما ۶۱/۴ °C، محصول PCR مقدار ۱۰ µl، ۶: دما ۶۲/۵°C، محصول PCR مقدار ۱۰ µl، چاهک آخر ۳ µl نشانگر base plus ۱۰۰

نتایج استخراج DNA از ژل با استفاده از کیت

محصولات PCR در همهٔ شیب‌های دمایی با هم مخلوط شد و بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد بار گذاری شد و سپس به منظور تعیین توالی، DNA از ژل استخراج شد.

جدول ۶- میزان شباهت جدایهٔ KGAM07 با برخی باکتری‌های ثبت‌شده در بانک ژنی براساس ترادف ۱۴۱۳ نوکلئوتید ژن ۱۶S rDNA.

Table 6. KGAM07 similarity to some bacterial strains recorded in the gene bank based on sequence of 1413 nucleotides of 16S rDNA genes.

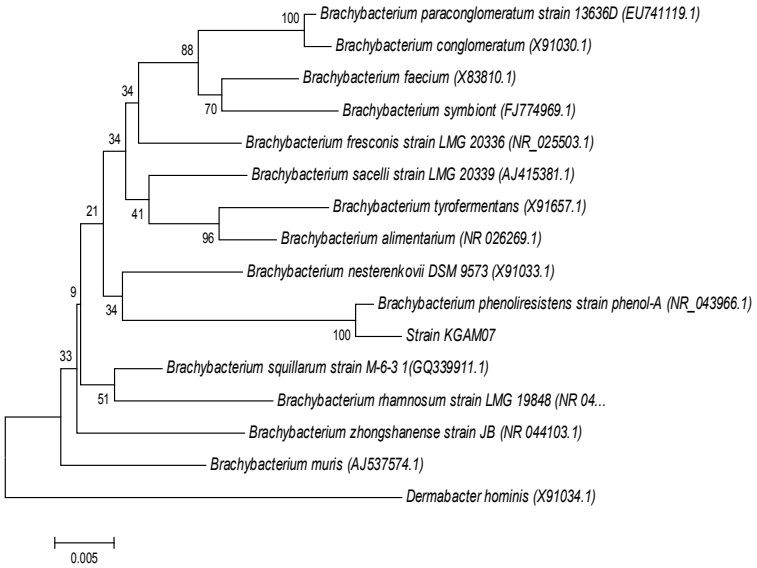
درصد میزان تشابه	شماره دسترسی	سویه	نزدیکترین سویه‌های شناسایی شده با بیشترین تشابه نوکلئوتیدی
٪۹۹	NR043966.1	Phenol- A	*Brachybacterium phenoliresistant*
٪۹۷	GQ339911.1	M-6-3	*Brachybacterium squillarum*
٪۹۷	NR044103.1	JB	*Brachybacterium zhongshanense*
٪۹۷	NR042109.1	LMG19848	*Brachybacterium rhamnosum*

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.1.2.9]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.1.1]

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.1.2.9]

[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.1.1]



شکل ۲- درخت ژنتیکی رابطهٔ بین جدایهٔ KGAM07 با دیگر سویه‌های *Brachybacterium* sp. با استفاده از نرم‌افزار MEGA 505 و با روش Neighbour-Joining برای ۱۴۱۳ باز. میزان Bootstrap (1000 replication) به صورت درصد در گره هر شاخه آورده شده است.

Fig. 2. Genetic tree between KGAM07 isolate with other strains of Brachybacterium sp. Neighbour-joining method shows using MEGA 505 for 1413. Rate Bootstrap (1000 replication) as a percentage of each category is given in knots.

محصول PCR به‌دست‌آمده جهت تعیین توالی به شرکت Macro کرهٔ جنوبی فرستاده شد. این توالی‌ها پس‌از ویرایش با نرم افزار Bioedit، برای مقایسهٔ توالی‌های مذکور با توالی‌های DNA ریبوزومی دیگر باکتری‌ها در پایگاه‌های ژنتیکی (Ribosomal Database Project EZ Taxon و NCBI) بلاست شد.

جهت هم‌ردیف‌سازی این توالی‌ها از نرم‌افزار Clustal W استفاده شد و برای ترسیم درخت ژنتیکی، نرم‌افزار MEGA 5.05 به‌کار گرفته شد.

مقاوم‌ترین باکتری به نفت خام از جنس *Brachybacterium* بود. میکروارگانیسم‌های خاک در فرایندهای مربوط به تجزیهٔ مواد و تبدیل آن‌ها به دیگر مواد ساده‌تر شرکت می‌کنند. آن‌ها همچنین نقش فعالی در تجزیهٔ نفت خام دارند. تحقیقات نشان داده است باکتری‌های تجزیه کنندهٔ نفت خام که از خاک‌های آلوده به نفت جدا شده‌اند متعلق به جنس های *Micrococcus*، *Corynebacterium*، *Bacillus*، *Pseudomonas*، *Alcaligenes*، *Flavobacterium*، *Moraxella*، *Aeromonas*، *Acinetobacter* و *Vibrio* هستند که گونه‌های جنس *Bacillus* باکتری‌های غالب به‌ویژه در آلودگی‌های ۳۰ و ۴۰ درصد نفت خام هستند که حضور آن‌ها در چنین محیط‌هایی به‌واسطهٔ مقاومت آندوسپور آن‌ها درمقابل استرس نفتی است (Ijah & Antai, 2003). تحقیق حاضر مشخص کرد که میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده به جنس‌های مذکور محدود نمی‌شوند و بنابر مطالعهٔ حاضر یکی از باکتری‌های جدا شده از تیمار خاک آلوده دارای کود، (PF7) *Staphylococcus saprophyticus* بود. حضور این باکتری در خاک آلودهٔ دارای کود را می‌توان به این دلیل دانست که افزودن کود نیتروژنی زمینهٔ رشد را برای این باکتری فراهم کرده است. علت تفاوت باکتری‌های به‌دست‌آمده در این مطالعه با دیگر مطالعات، به تفاوت در ترکیب شیمیایی نفت خام مورد استفاده مربوط می‌شود؛ زیرا هر نفت خامی ترکیب شیمیایی خاص خود را دارد و بنابراین تامین کنندهٔ منبع کربن انواع خاصی از میکروارگانیسم‌ها خواهد بود. همچنین اعتقاد بر این است که میکروارگانیسم‌های جداشده از محیط‌های آلوده به نفت خام، این ترکیب پیچیدهٔ شیمیایی را به‌طورکارآمدتری نسبت به میکروارگانیسم‌های جداشده از محیط‌های غیرآلوده به نفت تجزیه می‌کنند. وضعیت تماس میکروب‌ها با چنین عوامل

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.1.2.9]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.1.1]

آلاینده‌ای، این موجودات را با این ترکیبات سازگار کرده است؛ بنابراین فاز تأخیری رشد کوتاه و سرعت رشد افزایش می‌یابد. مشاهدات نشان داده است که باکتری‌ها در مقایسه با مخمرها، تجزیه‌کنندگان بهتری برای نفت خام محسوب می شوند (Ijah, Norino .1998) و همکاران اثرات مثبت ریزوسفر گیاه ذرت و جو دوسر را بر روی میکروارگانیسم‌های دو نوع خاک آلوده و غیر آلوده به ترکیبات نفتی مطالعه کردند. تحقیقات نشان داد که ذرت در مقایسه با جو دوسر اثر تحریک‌کنندگی بیشتری بر جمعیت میکروبی خاک دارد. توانایی گیاهان برای تحریک رشد میکروارگانیسم‌های خاک ناحیهٔ اطراف ریشه به تراوه‌های ریشه مربوط می‌شود (Rovira, 1965; Bowen, 1980; Curl & Truelove, 1986; Norino *et al.,* 2004).

در سال ۲۰۰۸، Muratova و همکاران بیان کردند موفقیت گیاه‌پالایی آلاینده‌های هیدروکربنی خاک ناشی از افزایش فعالیت میکروبی در ناحیهٔ ریزوسفر است. هرچه تماس میکروارگانیسم‌های خاک با گیاه بیشتر باشد فعالیت تجزیه-کنندگی میکروارگانیسم‌ها و درنتیجه کارایی گیاه پالایی افزایش می‌یابد. همچنین رهاسازی آنالوگ‌های ساختاری مانند ترکیبات فنلی به‌وسیلهٔ گیاهان ممکن است رشد میکروب‌های تجزیه‌کنندهٔ هیدروکربن‌ها را افزایش دهد (Donnelly *et al.,* 1994; Fletcheir & Hedge, 1995). ریشهٔ گیاه باعث ورود اکسیژن به خاک می‌شود. در فرایند تحریک گیاهی اکسیژن، رشد قارچ‌ها و باکتری‌ها را تشدید می‌کند. درمقابل میکروارگانیسم‌ها مقادیر زیاد توکسین را قبل از این‌که به ریشهٔ گیاه وارد شوند تجزیه می‌کنند.

گزارش‌های کمی مبنی بر جذب F_3 (هیدروکربن‌های با طول زنجیره C10-C16) و F_4 (هیدروکربن‌های با طول زنجیره C34-C50) به‌وسیلهٔ گیاه وجود دارد (Meudece *et al.,* 2006) و گیاهان به‌تنهایی توانایی پالایش هیدروکربن‌های نفتی با وزن مولکولی بالا را ندارند (Karmar, 2005). بنابراین سازوکار اصلی گیاه‌پالایی این دسته از هیدروکربن‌های نفتی به تحریک جمعیت میکروبی در ناحیهٔ تماس خاک ریشه نسبت داده می‌شود. مسئلهٔ اصلی در استفاده از گیاه‌پالایی توقف رشد گیاهان، در غلظت‌های بالای این نوع هیدروکربن هاست (Lin *et al.,* 2002; Huang *et al.,* 2004; Kirk *et al.,* 2005a; Zhung *et al.,* 2007; Greenberg *et al.,* 2007a).

اطلاعات محدودی درباب جمعیت‌های میکروبی و تنوع آن‌ها در مسیر گیاه‌پالایی در دسترس است (Krik *et al.,* 2005; Phillip *et al.,* 2006; Maila *et al.,* 2006). سرنوشت هیدروکربن‌های نفتی در محیط، به طبیعت و غلظت هیدروکربن‌ها، سازوکار بین فاکتورهای شیمیایی، ژئوشیمیایی و زیستی وابسته است (Bordenava *et al.,* 2007). یکی‌از روش‌ها برای افزایش کارایی گیاه‌پالایی هیدروکربن‌های نفتی، گیاه‌پالایی به‌وسیلهٔ تراوه‌های ریشه است (Kirk *et al.,* 2005a; Philips *et al.,* 2006).

بیوسورفاکتانت‌ها مواد آلی دوقطبی هستند که میکروارگانیسم‌ها تولید می‌کنند و باعث کاهش کشش سطحی دو فاز مایع و یا فاز مایع و گاز می‌شوند. بنابراین تولید این مواد می‌تواند روش موثری برای مقابله با آلودگی‌های نفتی باشد. طی مطالعات انجام‌شده اثبات شده است که تراوه‌های برخی گیاهان می‌توانند همانند بیوسورفکتانت عمل کنند و دسترسی زیستی هیدروکربن‌های آروماتیک را بهبود بخشند (List & Alexander, 1999). ازجمله تولیدکنندگان بیوسورفکتانت می‌توان به *Nocardia amarae*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Rhodococcus* اشاره کرد (Robert *et al.,* 1989; Sutton, 1992). تولید بیوسورفکتانت میکروبی برای به‌تعلیق درآوردن آلاینده‌های هیدروکربنی نفتی بطور گسترده‌ای گزارش شده است (Broderick & Cooney, 1982; Harvey *et al.,* 1990; Oberbremer *et al.,* 1990; Wasko & Bratt 1990; Francy *et al.,* 1991; Zhang & Miller 1992). بیوسورفاکتانت‌ها خاصیت امولسیون‌سازی هیدروکربن‌ها را دارند (Atlas & Bartha, 1992; Bertrand *et al.,* 1994) و عملاً از کشت‌های حاوی بیوسورفکتانت به‌دست‌آمده از *Rhodococcus*، *Bacillus*، *Pseudomonas* و *Acinetobacter* در حذف آلودگی‌های نفتی استفاده شده است. در اکوسیستم‌های پاک، مصرف‌کننده-های هیدروکربنی عموماً کمتر از ۱٪ درصد جامعه میکروبی را تشکیل می‌دهند. این درحالی است که در اکوسیستم‌های آلوده

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.1.2.9]

[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.1.1]

به نفت، مقدار و تعداد این میکروارگانیسم‌ها می‌توانند به ۱۰۰ درصد میکروارگانیسم‌های زنده برسد. در این تحقیق جدایهٔ *Mycobacterium* نسبت به *Staphylococcuss saprophyticus* بیوسورفکتانت بیشتری تولید کرد. به‌نظر می‌رسد *S. saprophyticus* توانایی بیشتری در استفاده از نفت خام به‌منزلهٔ منبع کربن داشته است اگرچه بیوسورفکتانت کمتری تولید کرده است.

باتوجه به نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه چنین نتیجه گیری می گردد که وجود آلاینده های نفتی به مثابهٔ عامل تنش می‌تواند در تغییر جمعیت‌های میکروبی موثر واقع گردد و زمینهٔ مناسب را برای حضور میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده ترکیبات نفتی فراهم آورد. افزودن کود باعث بهبود وضعیت رشد تعدادی از میکروارگانیسم‌ها می‌شود. میکروارگانیسم‌ها نه تنها از ترکیبات نفتی به مثابهٔ منبع کربن استفاده می‌کنند، بلکه با تولید بیوسورفاکتانت‌های مختلف می‌توانند در حذف این نوع آلاینده‌ها موثر واقع شوند. بررسی‌های بیشتر بیوشیمیایی باید انجام گیرد تا سازوکارهای حذف آلاینده‌های نفتی ازطریق میکروارگانیسم‌ها، شناخته شود. همچنین شرایط بهینه مصرف و یا تولید بیوسورفاکتانت برای هریک از سویه‌ها باید تعیین شود. روش‌های مولکولی نوین می‌توانند به تغییر و دینامیک جمعیت‌های میکروبی کمک کنند.

منابع/ References

بصالت پور، ا.، حاج عباسی، م. ع.، خوشگفتار منش، ا. ح. و **افیونی، م.** ۱۳۸۷. بررسی پالایش های خاک های آلوده به هیدروکربن های نفتی اطراف پالایشگاه تهران به روش تحریک گیاهی. – مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی ۱۵: ۳۵-۲۲.

رجایی، س. ۱۳۹۰. رسالهٔ دکترا. بررسی زیست پالایی خاک های آلوده به هیدروکربن های نفتی ازطریق برخی گیاهان و ریزوباکترهای بومی". – دانشگاه شهرکرد با همکاری پژوهشکده ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری.

ریسمانی، ا. ۱۳۸۵. پایان نامهٔ کارشناسی ارشد. تولید میکروبی، خالص سازی و تعیین خصوصیات بیوسورفکتانت تولید شده ازطریق یک باکتری عامل". – دانشکده علوم، دانشگاه الزهرا.

سهرابی، م.، شریعت، م.، حقیقی، ب. و **رنجبر، د.** ۱۳۸۵. پاک‌سازی بیولوژیکی خاک های آلوده به اتیل بنزن، تولوئن و نفتالن. – مجلهٔ علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زنجان ۵۴ : ۱۷- ۲۳.

نصیری‌آذر، م. ۱۳۸۱. پایان نامهٔ کارشناسی ارشد. تولید و جداسازی بیوسورفکتانت از باکتری های تجزیه کننده نفت خام. – دانشکده علوم، دانشگاه الزهرا.

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

Anderson, **T.A.** and **Coats**, **J.R.** 1994. Bioremediation through rhizosphere technology. – Ann. Rev. Microbiol. 19: 241-266.

Aprill, **W.** and **Sims**, **R.C.** 1990. Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. – Chemosphere 20: 253-265.

Atlas, **R.M.** and **Bartha**, **R.** 1992. Hydrocarbon biodegradation and oil-spill bioremediation. – Adv. Microbiol. Eco. 12: 287-338.

Banat, I.M. 1995. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation. – Bioresource Technol. 51: 1-12.

Banks, **M.K.**, **Govindaraju**, **R.S.**, **Schwab**, **A.P.** and **Kulakow**, **P**. 2000. – Part I: Field demonstration. In: Fiorenza S, Oubre CL, Ward C.H. (Eds). Phytoremedialion of Hydrocarbon-Contaminated Soil. – Lewis Publishers, Boca Raton: 3-88.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.1.2.9]

[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.1.1]

Baron, **J.** and **Finegold**, **M.** 1990. Diagnostic microbiology. Eight edition, C.V. – Mosby Company. 323-424.

Bertrand, **J.C.**, **Bonin**, **P.**, **Goutx**, **M.**, **Gauthier**, **M.** and **Mille**, **G.** 1994. The potential application of biosurfactants incombatting hydrocarbon pollution in marine environment. – Res. Microbiol. 145: 53-56.

Bordenave, **S.**, **Goni-Urriza**, **M.S.**, **Caumette**, **P.** and **Duran**, **R.** 2007. Effects of heavy fuel oil on the bacterial community structure of a pristine microbial mat. – Appl. Environ. Microbiol. 73: 6089-6097.

Bowen, **G.D.** 1980. Misconceptions, concepts and approaches in rhizospherobiology. In: Ellwood, D.C; Latham, M.J, Hedger J.N; Lynch, J.M; Slater, J.H. (Eds). – Contemporary Microbial Ecology, Academic Press, New York. 283-304.

Boyle, **J.** and **Shann**, **J.** 1995. Biodegradation of phenol,2,4-DCP and 2,4,5-T in field collected rhizosphere and nonrhizosphere soils. – J. Environ. Qual. 24: 782-785.

Bradford, **M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. – Anal. Biochem.72: 248-254.

Broderick, **L.S.** and **Cooney**, **J.J.** 1982. Emulsification of hydrocarbons by bacteria from freshwater ecosystems. – Dev. Ind. Microbiol. 23:425-434.

Chaudry, **Q.**, **Schroder**, **P.**, **Werck-Reichhart**, **D.**, **Wand**, **G.** and **Marecik R.** 2002. Prospects and limitations of phytoremediation for the removal of persistent pesticides in the environment. – Environ. Sci. Pollut. Res. 9: 4-17.

Culhane, **J.**, **Otieno**, **N.**, **Germaine**, **K.**, **Brazil**, **D.**, **Ryan**, **D.** and **Dowling**, **D.** 2011. Development of endophytic and rhizospheric bacreial inoculants with remediation potential for practical application in the bio-energy crop industry. – 15th International Biodeterioration and Biodegradation Symposium.

Cunningham, **S.D.**, **Anderson**, **T.A.**, **Schwab**, **A.P.** and **Hsu**, **F.C.** 1996. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. – Adv. Agr. 56: 55-114.

Curl, **E.A.** and **Truelove**, **B.** 1986. – The Rhizosphere. Berlin: Springer-Verlag.

Daane, **L.L.**, **Harjono**, **L.**, **Zylstra**, **G.J.** and **Haggblom**, **M.M.** 2001. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons degrading bacteria associated with the rhizosphere of salt marsh plants. – J. Appl. Environ. Microbiol. 67: 2683-2691.

Donnelly, **P.K.**, **Hedge**, **R.S.** and **Fletcher**, **J.S.** 1994. Growth of PCB-degrading bacteria on compounds from photosynthetic plants. – Chemosphere 28: 981-988.

Flathman, **P.E.** and **Lanza**, **G.R.** 1998. Phytoremediation: Current views on an emerging technology. – J. Soil. Cont. 7: 415-432.

Francy, **D.S.**, **Thomas**, **J.M.**, **Raymond**, **R.L.** and **Ward**, **C.H.** 1991. Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. – J. Ind. Microbiol. 8: 237-246.

Greenberg, **B.M.**, **Huang**, **X.D.**, **Gerhardt**, **K.**, **Glick**, **B.R.**, **Gurska**, **J.**, **Wang**, **W.**, **Lampi**, **M.**, **Khalid**, **D.**, **Isherwood**, **D.**, **Chang**, **P.**, **Wang**, **H.**, **Wu**, **S.S.**, **Yu**, **X.M.**, **Dixon**, **D.G.** and **Gerwing**, **P.** 2007. Field and laboratory tests of a multi-process 214 phytoremediation system for decontamination of petroleum and salt impacted soils. – Batelle Press. Chapter B-04.

Harichova, **J.**, **Karelva**, **E.**, **Godocikova**, **J.**, **Buckova**, **M.**, **Puskarova**, **A.**, **Polek**, **B.**, **Ferianc**, **P.** and **Pangallo**, **D.** 2011. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and long-chain hydrocarbons by bacterial strains isolated from polluted soil. – 15th International Biodeterioration and Biodegradation Symposium.

Harvey, **S.**, **Elashvili**, **I.**, **Valdes**, **J.J.**, **Kamely**, **D.** and **Chakrabarty**, **A.M.** 1990. Enhanced removal of exxon valdezspilled oil from Alaskan gravel by a microbial surfactant. – Bio. Tech. 8: 228-230.

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

Hutchinson, **S.L.**, **Banks**, **M.K.** and **Schwab**, **A.P.** 2001. Phytoremediation of aged petroleum sludg. Effect of inorganic fertilizer. – J. Environ. Qua.130: 395-403.

Ijah, **U.J.J.** 1998. Studies on relative capabilities of bacterial and yeast isolates from tropical soil in

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.1.2.9]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.1.1]

degrading crude oil. – Waste Manage 18: 293-299.

Ijaha, **U.J.J.** and **Antaib**, **S.P.** 2003. Removal of Nigerian light crude oil in soil over a 12-month period. – Int. Biodeterior. Biodegrad. 51: 93-99.

Jones, **K.**, **Sun**, **W.**, **Tang**, **C.** and **Robert**, **F.** 2004. Phytoremediation of petroleum hydrocarbons in tropical coastal soils II. Microbial response to plant roots and contaminant. – Environ. Sci. Pollut. Res. 11: 340-346.

Kaksonen, **A.H.**, **Jussila**, **M.M.**, **Lindstrom**, **K.** and **Suominen**, **L.** 2006. Rhizosphere effect of *Galega orientalis* in oil-contaminated soil. – Soil Biol. Biochem. 38: 817-827.

Kirk, **L.**, **Klironomos**, **J.**, **Lee**, **H.** and **Trevors**, **J.** 2005. The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil. – Environ. Pollut. 133: 455-465.

Kramer, **U.** 2005. Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils. – Current Opinion in Biotech. 16: 133-141.

Lin, **Q.X.**, **Mendelssohn**, **I.A.**, **Suidan**, **M.T.**, **Lee**, **K.** and **Venosa**, **A.D.** 2002. The dose-response relationship between No. 2 fuel oil and the growth of the salt marsh grass, Spartina alterniflora. – Mar. Pollut. Bull. 44: 897-902.

Liste, **H.** and **Alexander**, **M.** 1999. Rapid screening of plants promoting phenanthrene. – Journal of Environmental Quality 28: 1376-1377.

Maila, **M.P.**, **Randima**, **P.**, **Dronen**, **K.** and **Cloete**, **T.E.** 2006. Soil microbial communities: Influence of geographic location and hydrocarbon pollutants. – Soil Biol. Biochem. 38: 303-310.

Meudec, **A.**, **Dussauze**, **J.**, **Deslandes**, **E.** and **Poupart**, **N.** 2006. Evidence for bioaccumulation of PAHs within internal shoot tissues by a halophytic plant artificially exposed to petroleum-polluted sediments. – Chemosphere 65: 474-481.

Morikawa, **M.**, **Hirata**, **Y.** and **Imanaka**, **T.** 2000. A study on the structure–function relationship of lipopeptide biosurfactants. – Biochemica ET Biophysica Acta 1488: 211-218.

Muratova, **A.Y**, **Dmitrieva**, **T.V**, **Panchenko**, **L. V** and **Turkovskaya**, **O.V.** 2008. Phytoremediation of oil-sludge-contaminated soil. – Int. J. Phytorem. 10: 486-502.

Norino, **E.O.**, **Norino**, **S.**, **Zaripore**, **I.P.** and **Breus**, **I.P.** 2004. – Influence of cerial plant on microorganism of leached chernozem polluted by hydrocarbons. Bioremed Symp Orlando, Florida, VSA, 2-5, FO3.

Oberbremer, **A.**, **Muller-Hurtiq**, **R.** and **Wagner**, **E.** 1990. Effect of the addition of microbial surfactants on hydrocarbon degradation in a soil population in a stirred reactor. – Appl. Microbiol. Biotech. 32: 485-489.

Phillips, **L.A.**, **Greer**, **C.W.** and **Germida**, **J.J.** 2006. Culture-based and culture-independent assessment of the impact of mixed and single plant treatments on rhizosphere microbial communities in hydrocarbon contaminated flare-pit soil. – Soil Biol. Biochem. 38: 2823-2833.

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

Robert, **M.**, **Mercadé**, **M.E.**, **Bosch**, **M.P.**, **Parra**, **J.L.**, **Espuny**, **M.J.**, **Manresa**, **M.A.**, and **Guinea**, **J. 1989.** Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T 1. – Biotech. Lett. 11: 871-874.

Rovira, **A.D.** 1965. Interactions between plant roots and soil microorganisms. – J. Environ. Qual. 28: 1376-1377.

Sutton, **R.** 1992. Use of biosurfactants produced by *Nocardia amarae* for removal and recovery of non-ionicorganics from aqueous solutions. – Water Sci. Tech. 26: 9-11.

Tanase, **A.**, **Chiciudean**, **I.**, **Ionescu**, **R.**, **Csutak**, **D.**, **Pelinescu**, **D.**, **Vassu**, **T.** and **Stoica**, **I.** 2011. Characterization of hydrocarbon-degrading microbial strains isolated from oil-polluted soil. – 15th International Biodeterioration and Biodegradation Symposium.

Vasileva, **E.** and **Galabova**, **D.** 2002. Hydrolytic enzymes and surfactants of bacterial isolates from lubricant-contaminated waste water. – Z. Naturforsch 58: 87-92.

Walton, **B.T.** and **Anderson**, **T.A**. 1990. Microbial degradation of trichloroethylene in the rhizosphere: potential application to biological remediation of waste sites. – Appl. Environ. Microbiol. 56: 1012-1016.

Wang, **W.** 2008. Toxicity assessment of PAHs and metals to bacteria and the roles of soil bacteria in phytoremediation of petroleum hydrocarbons. – Ph.D thesis, Waterloo, Ontario, Canada.

Wasko, **M.P.** and **Bratt**, **R.P.** 1990. Properties of a biosurfactant produced by the fuel contaminant *Ochrobactrum anthropii*. – Inter. Biodeter. 27: 265-73.

Youssef, **N.H.**, **Duncan**, **E.K.**, **Nagle**, **D.P.**, **Savage**, **N.K.**, **Knapp**, **M.R.** and **Mc Inerney**, **M.J.** 2004. Comparizon of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganism. – J. Microbiol. Meth. 56: 339-347.

Zhang, **Y.** and **Miller**, **R.M.** 1992. Enhanced octadecane dispersionand biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). – Appl. Environ. Microbiol. 58: 3276-3282.

Zhuang, **X.**, **Chen**, **J.**, **Shim**, **H.** and **Bai**, **Z.** 2007. New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. – Environ. Int. 33: 406-13.

Mohammadi, P., Ameri Toorzani, S., Kiarostami, K., Gharavi, S. and Fallahi, Z. 2015. The bacterial evaluation of maize root (*Zea mays* L.) in oil-polluted soil. – Nova Biologica Reperta 2:1-14.

محمدی، پ.، آمری تورزانی، س.، کیارستمی، خ.، قروی، س. و فلاحی، ز. ۱۳۹۴. مطالعهٔ باکتریایی ریشهٔ ذرت (*Zea mays* L.) در خاک آلوده به نفت. – یافته های نوین در علوم زیستی ۲: ۱۴-۱.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.1.2.9]

[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.1.1]

[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.2.1.1] [DOR: 20.1001.1.24236330.1394.2.1.2.9] [Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]