

مطالعه باکتریایی ریشه ذرت (*Zea mays* L.) در خاک آلوده به نفت

پریسا محمدی^{۱*}، سپیده عامری تورزنی^۲، خدیجه کیارستمی^۲، سارا غروی^۳ و زهرا فلاهی^۴

دریافت: ۱۳۹۲/۲/۱۶ / پذیرش: ۱۳۹۴/۲/۲۱

^۱گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا (س)

^۲گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا (س)

^۳گروه بیوتکنولوژی، دانشکده 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 تجزیه آلاینده‌های متنوع آلی خاک نقش مهمی دارند. در این تحقیق به بررسی میکروبی ریشه گیاه ذرت پس از طی یک دوره رشد ۶۰ روزه در سه نوع خاک شاهد، آلوده به نفت و آلوده به نفت همراه با کود نیتروژنی پرداخته شد و باکتری‌های ناحیه ریشه شناسایی شد. پس از تعیین مقاوم‌ترین باکتری به نفت خام، توانایی تولید بیوسورفکتانت در باکتری‌های جدا شده 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 جدا شده از خاک‌های آلوده توانایی تولید مقادیر مختلف بیوسورفکتانت را دارند.

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

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

Parisa Mohammadi^{1*}, Sepideh Ameri Toorzani², Khadijeh Kiarostami², Sara Gharavi³ and Zahra Fallahi⁴

Received 06.05.2013/ Accepted 11.05.2015

¹Department of Microbiology, Faculty of Biological Science, Alzahra University, Tehran, Iran

²Department of Plant Science, Faculty of Biological Science, Alzahra University, Tehran, Iran

³Department 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 (NH₄NO₃, K₂HPO₄). 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

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 مثابه مرحله‌ای از تصفیه به کار 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، تجزیه ترکیبات مقاوم افزایش می‌یابد. گیاه‌پالایی از طریق فعالیت میکروارگانیسم‌های سیستم ریشه‌ای، امروزه برای پاک کردن نواحی آلوده به کار 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 تجزیه 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. از آنجایی که باکتری‌های مختلف از ترکیبات آلی معدودی می‌توانند استفاده کنند، گیاه می‌تواند با تولید و ترشح ترکیبات متنوع، جمعیت‌های میکروبی ناحیه 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 از طریق برخی گیاهان و ریزوباکتری‌های بومی پرداخت. او با هدف زیست‌پالایی خاک-های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی از طریق 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 تجزیه 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 می‌کنند. 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 تیره گندمیان موجب افزایش تجزیه نفت خام می‌شود. براساس شواهد حاصل از این مطالعه، گیاه-پالایی توأم با تجزیه 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 از طریق 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 تجزیه آلاینده‌های آلی در خاک می‌شود. سهرابی و همکاران در سال ۱۳۸۵ به تحقیق درباره پاک‌سازی زیستی خاک‌های آلوده به اتیل بنزن، تولوئن و نفتالن پرداختند. مهم‌ترین نتیجه 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.

رقت 10^{-1} بدست آمد و دیگر رقت‌ها به‌طور متوالی از این رقت تهیه شد (Jones *et al.*, 2004).

تهیه محیط کشت برای شمارش کلنی‌ها

برای شمارش کلنی‌ها از محیط Plate Count Agar استفاده شد. برای این منظور، $100 \mu\text{L}$ از هریک از رقت‌های تهیه‌شده روی محیط کشت مذکور منتقل و با استفاده از میله 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 $30-300$ کلنی برای این منظور مورد استفاده قرار گرفت. پس از شمارش کلنی‌ها، برای محاسبه تعداد کل میکروب‌ها از رابطه 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 $30-300$ بود انتخاب شد. سپس براساس مورفولوژی کلنی، رنگ آمیزی 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 جدایه 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 $1 \text{ گرم } \text{KH}_2\text{PO}_4$ ، $1 \text{ گرم } \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، $1 \text{ گرم } \text{NH}_4\text{NO}_3$ ، 2 ، $0.5 \text{ گرم } \text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ در 1000 میلی‌لیتر آب مقطر استفاده شد و در ارلن‌های شیاردار به حجم 500 میلی-

هدف از این تحقیق مقایسه تعداد کل باکتری‌های ناحیه ریشه در تیمارهای مختلف خاک و شناسایی فراوان‌ترین آن‌ها است. با شناسایی باکتری‌های ناحیه ریشه در تیمارهای مختلف می‌توان تغییر تنوع باکتریایی را بررسی کرد. درباره جدایه‌های خاک-های آلوده آزمون تولید بیوسورفکتانت انجام گرفت و جذب آن‌ها در 600 نانومتر اندازه‌گیری شد تا مقاوم‌ترین باکتری به ترکیبات نفتی جدا و با روش‌های معمول کلاسیک تا حد جنس یا در صورت امکان گونه شناسایی شود.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی خاک

بذر ذرت (*Zea mays* L.) رقم ۷۰۴ از موسسه 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 مثابه شاهد، خاک آلوده شامل خاک حاصل‌خیز همراه با غلظت ۲ درصد نفت خام و خاک حاصل‌خیز همراه با غلظت ۲ درصد نفت خام و 500 میلی‌گرم آمونیوم نترات و 50 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 ریشه هر گیاه برای بررسی‌های میکروبی در دمای 20°C - نگهداری شد.

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

ده گرم خاک ریزوسفر به 100 میلی‌لیتر بافر K_2HPO_4 اضافه شد. برای تهیه بافر مورد نظر 0.5 گرم K_2HPO_4 و $10/1$ گرم NaCl در 1000 میلی‌لیتر 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 1 میلی‌لیتر از سوسپانسیون خاک در لوله حاوی 9 میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی ریخته شد و بدین ترتیب

سنجش بیوسورفکتانت

برای این منظور در یک پتری دیش به قطر ۲۵ سانتی متر ۵۰ میلی لیتر آب مقطر ریخته شد و سپس ۲۰ μL نفت خام نیز به آن اضافه شد که این مقدار نفت به صورت لایه نازکی در سطح آب قرار می گرفت. با افزودن ۱۰ μL سوسپانسیون باکتریایی حاوی بیوسورفکتانت احتمالی، ناحیه شفاف در لایه نفتی ایجاد شد. با افزایش غلظت این ماده، قطر منطقه شفاف نیز افزایش یافت. در این مرحله از سدیم دودسیل سولفات به منزله شاهد استفاده شد (Morikawa et al., 2000; Youssef et al., 2004).

برای شناسایی مولکولی جدایه 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 نمونه خاک تیمار شده با نفت و کود بیش از نمونه خاک تیمار شده با نفت، به تنهایی، 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 می یابد و این امر باعث کاهش میکروارگانیسم‌ها می شود. این کاهش با افزودن کود، اصلاح می گردد. شناسایی باکتری‌ها با روش‌های معمول کلاسیک انجام گرفت (Muratova et al., 2008).

رنگ آمیزی گرم برای تمام جدایه‌ها انجام شد و در صورت لزوم رنگ آمیزی اختصاصی اسپور برای باکتری‌های میله‌ای شکل 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 شناسایی شده در جدول ۳ آمده است.

لیتر توزیع و استریل شد (Wang, 2008). در داخل هر ارلن ۵۰ میلی لیتر محیط پایه نمکی، ۵ میلی لیتر سوسپانسیون باکتری با کدورت معادل ۰/۵ مکفارلند (10^8 cell/ml) و ۰/۸ میلی لیتر نفت خام تلقیح شد. برای شاهد نیز از ۵۰ میلی لیتر محیط پایه نمکی معدنی و ۰/۸ میلی لیتر نفت خام بدون سوسپانسیون باکتری استفاده شد. ارلن‌ها به مدت یک هفته روی شیکر انکوباتور در دمای 25°C و دور ۱۳۰ rpm 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 تأیید 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 می تواند معیاری برای تعیین مصرف ترکیبات نفتی از طریق باکتری و نیز رشد باکتری‌ها در محیط کشت باشد. اندازه گیری پروتئین باکتری مورد نظر شامل دو مرحله لیز سلول‌ها و رنگ آمیزی پروتئین هاست. برای لیز کردن سلول‌ها، ۱ میلی لیتر از نمونه در اپندورف قرار داده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ g سانتریفوژ شد. سپس ۱ میلی لیتر آب مقطر به رسوب فوق اضافه شد و پس از به هم زدن ۰/۵ میلی لیتر محلول ۰/۳ مولار NaOH به آن اضافه و به خوبی هم زده شد. اپندورف‌ها به مدت ۹۰ دقیقه در حمام 60°C قرار داده شد. اندازه گیری پروتئین به روش برادفورد انجام گرفت. سپس ۱۰۰ μL از نمونه لیز شده سلول‌های باکتری در لوله آزمایش استریل ریخته شد و پس از آن ۱ میلی لیتر معرف برادفورد به این مخلوط اضافه و ورتکس شد. پس از ۱۰ دقیقه سکون در طول موج ۵۹۵ نانومتر جذب نوری نمونه خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد، از غلظت‌های صفر تا ۲ میلی گرم نمونه سرم آلبومین گاوی استفاده شد. در نهایت سنجش پروتئین هر ۲۴ ساعت یک بار برای نمونه انجام گرفت (Bradford, 1976).

جدول ۱- محاسبه 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 حاصل خیز همراه با غلظت ۲٪ نفت خام، ** خاک آلوده همراه با ۵۰۰ میلی گرم آمونیوم نیترات و ۵۰ میلی گرم K₂HPO₄.

*Polluted soil including fertile soil with 2% concentration of crude oil, **polluted soil with 500 mg of ammonium nitrate and 50 mg K₂HPO₄.

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 ۴۲°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 پنی سیلین و نوویوسین- حضور اسپور

Flavobacterium و PF8 متعلق به جنس *Moraxella* بود. جدایه PF7 به لحاظ ویژگی‌های شکلی و کشتی به جنس *Staphylococcus* شباهت داشت اما آزمون‌های بیوشیمیایی و آنزیمی مورد استفاده برای تشخیص باکتری، کافی نبود، بنابراین بررسی‌های مولکولی جهت شناسایی دقیق تر انجام شد.

با استفاده از نتایج جدول ۳ مشخص شد که جدایه‌های P₀₁ و P₀₂ متعلق به جنس *Pseudomonas*، P₀₃ متعلق به جنس *Actinobacillus*، P₁₁ و P₁₇ متعلق به جنس *Corynebacterium*، P₁₃، P₁₄ و PF4 متعلق به *Coryneform groups*، P₁₅ و PF3 متعلق به جنس *Bacillus*، P₁₂ متعلق به جنس *Rhodococcus*، PF5 متعلق به جنس *Alcaligenes*.

جدول ۳- جدایه‌های به دست آمده 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	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-

P₀₁ و P₀₂: *Pseudomonas*. P₀₃: *Actinobacillus*. P₁₁ و P₁₇: *Corynebacterium*. P₁₂: *Rhodococcus*. P₁₃, PF4 و PF10 :
Coryneform groups. P₁₄ و PF3: *Bacillus*. P₁₅: *Alcaligenes*. PF5: *Moraxella*. PF7: *Staphylococcus*. PF8: *Flavobacterium*.
P₀₁ & P₀₂: *Pseudomonas*. P₀₃: *Actinobacillus*. P₁₁ & P₁₇: *Corynebacterium*. P₁₂: *Rhodococcus*. P₁₃, PF4 & PF10 :
Coryneform groups. P₁₄ & PF3: *Bacillus*. P₁₅: *Alcaligenes*. PF5: *Moraxella*. PF7: *Staphylococcus*. PF8: *Flavobacterium*.

پروتئین برای جدایه مزبور در طول موج ۵۹۵ نانومتر ۰/۱ بود. همچنین از آنجایی که میزان افزایش پروتئین می‌تواند معیاری برای تعیین میزان مصرف نفت از طریق باکتری در محیط کشت باشد، افزایش مقدار پروتئین، تولید بیشتر توده سلولی باکتری مدنظر را نشان می‌دهد (Vasileva & Galabova, 2002). آزمون مربوط به تولید بیوسورفکتانت برای ۱۱ باکتری جداسازی شده از خاک آلوده دارای ۲ درصد نفت خام و خاک آلوده همراه با ۵۰۰ میلی گرم آمونیوم نیترات و ۵۰ میلی گرم K₂HPO₄ انجام شد. نتایج نشان داد تمام جدایه‌ها توانایی تولید بیوسورفکتانت را در مقادیر مختلف دارند (جدول ۴).

پس از شناسایی اولیه، به منظور غربال‌گری باکتری‌های مقاوم به آلاینده‌های نفتی، جدایه‌های نفتی مربوط به خاک‌های 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 تأیید شد. نتایج تحقیقات گذشته نشان می‌دهد که میزان تولید بیوسورفکتانت برای هر دو منبع نفت خام و گلیسرول یکسان است، اما از آنجاکه گلیسرول ساختار ساده‌تری نسبت به نفت خام دارد، در این مرحله سنجش پروتئین نیز با استفاده از گلیسرول برای سوییچ مورد نظر انجام شد (نصیری آذر، ۱۳۸۱؛ ریسمانی، ۱۳۸۵). بیشترین میزان جذب

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 3 (<i>Coryneform groups</i>) 1	۶/۵
PF7 (<i>Staphylococcus</i>)	۴
PF8 (<i>Flavobacterium</i>)	۴
P 1 (<i>Corynebacterium</i>) 1	۳
P 4 (<i>Bacillus</i>) 1	۳
PF5 (<i>Moraxella</i>)	۳
P 2 (<i>Rhodococcus</i>) 1	۲
PF10 (<i>Coryneform groups</i>)	۲
PF3 (<i>Bacillus</i>)	۱/۵
P 5 (<i>Alcaligenes</i>) 1	۱
P 7 (<i>Corynebacterium</i>) 1	۰/۵

نتایج DNA استخراج شده به روش SET بافر

مقدار DNA استخراج شده 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 استخراج شده.

Table 5. Results of quantification of extracted DNA.

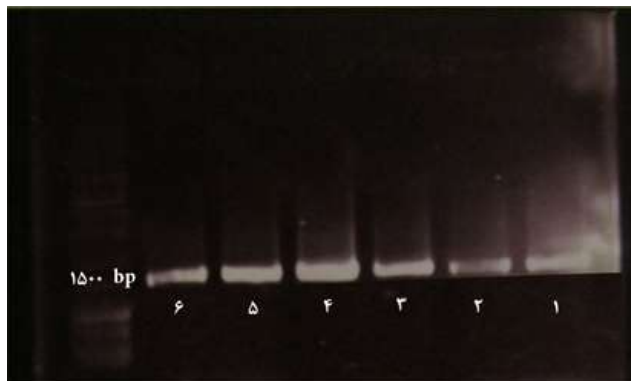
Nucleic Acid Concentration	Unit	A ₂₆₀	A ₂₈₀	۲۶۰/۲۸۰	۲۶۰/۲۳۰	Sample Type	Factor
۲۱۶/۳	ng/μl	۴/۳۲۷	۲/۴۱۹	۱/۷۳	۱/۱۷	DNA	۵۰-۰۰

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

نتایج واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) ژن ۱۶ S rRNA

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 همه شیب‌های دمایی با هم مخلوط

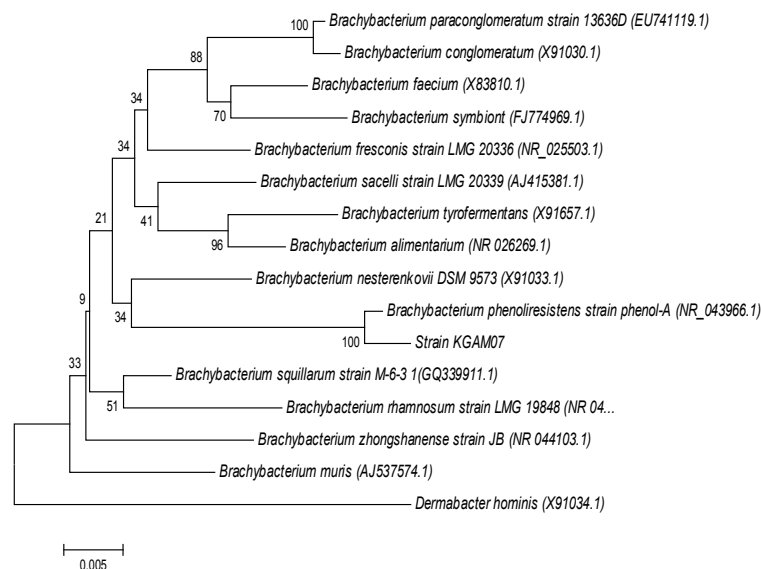
شد و بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد بارگذاری شد و

سپس به منظور تعیین توالی، DNA از ژل استخراج شد.

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

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	<i>Brachybacterium phenoliresistant</i>
٪۹۷	GQ339911.1	M-6-3	<i>Brachybacterium squillarum</i>
٪۹۷	NR044103.1	JB	<i>Brachybacterium zhongshanense</i>
٪۹۷	NR042109.1	LMG19848	<i>Brachybacterium rhamnosum</i>



شکل ۲- درخت ژنتیکی رابطه بین جدایه KGAM07 با دیگر سویه‌های *Brachy bacterium* 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 *Brachy bacterium* sp. Neighbour-joining method shows using MEGA 505 for 1413. Rate Bootstrap (1000 replication) as a percentage of each category is given in knots.

۳۰ و ۴۰ درصد نفت خام هستند که حضور آن‌ها در چنین محیط‌هایی به واسطه مقاومت آندوسپور آن‌ها در مقابل استرس نفتی است (Ijah & Antai, 2003). تحقیق حاضر مشخص کرد که میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده به جنس‌های مذکور محدود نمی‌شوند و بنابر مطالعه حاضر یکی از باکتری‌های جدا شده از تیمار خاک آلوده دارای کد، (PF7) *Staphylococcus saprophyticus* بود. حضور این باکتری در خاک آلوده دارای کد را می‌توان به این دلیل دانست که افزودن کود نیتروژنی زمینه رشد را برای این باکتری فراهم کرده است. علت تفاوت باکتری‌های به دست آمده 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 کننده منبع کربن انواع خاصی از میکروارگانیسم‌ها خواهد بود. همچنین اعتقاد بر این است که میکروارگانیسم‌های جدا شده از محیط‌های آلوده به نفت خام، این ترکیب پیچیده شیمیایی را به طور کارآمدتری نسبت به میکروارگانیسم‌های جدا شده از محیط‌های غیر آلوده به نفت تجزیه می‌کنند. وضعیت تماس میکروب‌ها با چنین عوامل

محصول PCR به دست آمده جهت تعیین توالی به شرکت Macro کره جنوبی فرستاده شد. این توالی‌ها پس از ویرایش با نرم‌افزار Bioedit، برای مقایسه توالی‌های مذکور با توالی‌های DNA ریبوزومی دیگر باکتری‌ها در پایگاه‌های ژنتیکی (NCBI و Ribosomal Database Project EZ Taxon) بلاست شد.

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

مقاوم‌ترین باکتری به نفت خام از جنس *Brachy bacterium* بود. میکروارگانیسم‌های خاک در فرایندهای مربوط به تجزیه مواد و تبدیل آن‌ها به دیگر مواد ساده‌تر شرکت می‌کنند. آن‌ها همچنین نقش فعالی در تجزیه نفت خام دارند. تحقیقات نشان داده است باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام که از خاک‌های آلوده به نفت جدا شده‌اند متعلق به جنس‌های *Micrococcus*، *Corynebacterium*، *Pseudomonas*، *Bacillus*، *Moraxella*، *Flavobacterium*، *Alcaligenes*، *Vibrio* و *Acinetobacter* هستند که گونه‌های جنس *Bacillus* باکتری‌های غالب به‌ویژه در آلودگی‌های

et al., 2002; Huang et al., 2004; Kirk et al., 2005a; Zhung et al., 2007; Greenberg et al., 2007a)

اطلاعات محدودی در باب 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). یکی از روش‌ها برای افزایش کارایی گیاه‌پالایی هیدروکربن‌های نفتی، گیاه‌پالایی به‌وسیله تراوه‌های ریشه است (Kirk et al., 2005a; Philips et al., 2006).

بیوسورفاکتانت‌ها مواد آلی دوقطبی هستند که میکروارگانیزم‌ها 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 بیوسورفاکتانت عمل کنند و دسترسی زیستی هیدروکربن‌های آروماتیک را بهبود بخشند (List & Alexander, 1999). از جمله تولیدکنندگان بیوسورفاکتانت می‌توان به *Nocardia amarae* (Robert et al., 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, 1994) و عملاً از کشت‌های حاوی بیوسورفاکتانت به‌دست‌آمده از *Bacillus Rhodococcus* و *Pseudomonas Acinetobacter* در حذف آلودگی‌های نفتی استفاده شده است. در اکوسیستم‌های پاک، مصرف‌کننده‌های هیدروکربنی عموماً کمتر از ۱٪ درصد جامعه میکروبی را تشکیل می‌دهند. این درحالی است که در اکوسیستم‌های آلوده

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 می‌شوند (Ijah, 1998). Norino و همکاران اثرات مثبت ریزوسفر گیاه ذرت و جو دوسر را بر روی میکروارگانیزم‌های 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 میکروارگانیزم‌های خاک ناحیه 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 ناحیه ریزوسفر است. هرچه تماس میکروارگانیزم‌های خاک با گیاه بیشتر باشد فعالیت تجزیه‌کنندگی میکروارگانیزم‌ها و در نتیجه کارایی گیاه‌پالایی افزایش می‌یابد. همچنین رهاسازی آنالوگ‌های ساختاری مانند ترکیبات فنلی به‌وسیله گیاهان ممکن است رشد میکروب‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن‌ها را افزایش دهد (Donnelly et al., 1994; Fletcher & Hedge, 1995). ریشه گیاه باعث ورود اکسیژن به خاک می‌شود. در فرایند تحریک گیاهی اکسیژن، رشد قارچ‌ها و باکتری‌ها را تشدید می‌کند. درمقابل میکروارگانیزم‌ها مقادیر زیاد توکسین را قبل از این که به ریشه 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) به‌وسیله 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 ناحیه تماس خاک ریشه نسبت داده می‌شود. مسئله اصلی در استفاده از گیاه‌پالایی توقف رشد گیاهان، در غلظت‌های بالای این نوع هیدروکربن هاست (Lin

فراهم آورد. افزودن کود باعث بهبود وضعیت رشد تعدادی از میکروارگانیسم‌ها می‌شود. میکروارگانیسم‌ها نه تنها از ترکیبات نفتی به مثابه منبع کربن استفاده می‌کنند، بلکه با تولید بیوسورفکتانت‌های مختلف می‌توانند در حذف این نوع آلاینده‌ها موثر واقع شوند. بررسی‌های بیشتر بیوشیمیایی باید انجام گیرد تا سازوکارهای حذف آلاینده‌های نفتی از طریق میکروارگانیسم‌ها، شناخته شود. همچنین شرایط بهینه مصرف و یا تولید بیوسورفکتانت برای هریک از سویه‌ها باید تعیین شود. روش‌های مولکولی نوین می‌توانند به تغییر و دینامیک جمعیت‌های میکروبی کمک کنند.

به نفت، مقدار و تعداد این میکروارگانیسم‌ها می‌تواند به ۱۰۰ درصد میکروارگانیسم‌های زنده برسد. در این تحقیق جدایه *Mycobacterium* نسبت به *Staphylococcus saprophyticus* بیوسورفکتانت بیشتری تولید کرد. به نظر می‌رسد *S. saprophyticus* توانایی بیشتری در استفاده از نفت خام به منزله منبع کربن داشته است اگرچه بیوسورفکتانت کمتری تولید کرده است.

با توجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه چنین نتیجه گیری می‌گردد که وجود آلاینده‌های نفتی به مثابه عامل تنش می‌تواند در تغییر جمعیت‌های میکروبی موثر واقع گردد و زمینه مناسب را برای حضور میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده ترکیبات نفتی

References / منابع

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). Phytoremediation of Hydrocarbon-Contaminated Soil. – Lewis Publishers, Boca Raton: 3-88.

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. رساله دکترا. بررسی زیست پالایی خاک های آلوده به هیدروکربن های نفتی از طریق برخی گیاهان و ریزوباکترهای بومی. – دانشگاه شهرکرد با همکاری پژوهشکده ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری.

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

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

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

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 in combatting 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 bacterial 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 Valdez spilled 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 sludge. Effect of inorganic fertilizer. – J. Environ. Qual. 130: 395-403.

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

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 Poupert, 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. – Biochimica 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 cereal 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-ionic organics 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 dispersion and 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. مطالعه باکتریایی ریشه ذرت (*Zea mays* L.) در خاک آلوده به نفت. – یافته های نوین در علوم زیستی ۲: ۱۴-۱.

