نشریه علمی تحقیقات مرتع و بیابان ایران
شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/IJRDR.2021.124173
جلد ۲۸ شماره ۲، صفحه ۳۹۴-۳۸۱، (۱۴۰۰)
شناسه دیجیتال (DOR): 20.1001.1.17350875.1400.28.2.30.6

بررسی کاربرد توأمان عملیات کوددهی و استفاده از گیاهان مرتعی بومی و باکتری‌ها در حذف آلودگی‌های نفتی از خاک

رونک شیرزادیان گیلان[۱]، یحیی پرویزی[۲*]، ابراهیم پذیرا[۳] و فرهاد رجالی[۴]

۱- دانشجوی دکتری، گروه خاک‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲*- نویسنده مسئول، دانشیار، بخش تحقیقات حفاظت خاک و آبخیزداری، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی کرمانشاه، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمانشاه، ایران، پست الکترونیک: y.parvizi1360@gmail.com

۳- استاد، گروه خاک‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۴- دانشیار، مؤسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۷/۰۹ تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۰/۲۴

چکیده

آلودگی خاک توسط آلاینده‌های هیدروکربنی نفتی یکی از مهمترین مشکلات زیست محیطی در مناطق مختلف جهان است. در مناطق نفت‌خیز غرب کشور و در طی سالیان اخیر، استهلاک سامانه استخراج و بهره‌برداری از مخازن نفتی منجر به نشت یا نهشت آلاینده‌های نفتی در خاک و منابع زیستی منطقه شده است. هدف این پژوهش بررسی قابلیت کاربرد گیاهان مرتعی بومی و افزودن باکتری‌ها و مقدار کود مناسب در کاهش آلودگی هیدروکربن‌های نفتی کل (TPHs) خاک بوده است. آزمایش گلدانی در قالب طرح فاکتوریل با طرح پایه کاملا تصادفی (CRD) با چهار تکرار انجام شد. تیمارهای گیاهی شامل سه گیاه بومی یا سازگار مرتعی یونجه وحشی، آگروپایرون و آتریپلکس و تیمارهای باکتری شامل گونه‌های باکتری *Bacillus pumilus* (B_1)، *Pseudomonas putida* (B_2) و استفاده توأم این دو باکتری با توصیه کودی متناسب با آزمون خاک بود. همچنین تیمار شاهد (بدون کشت گیاه، بدون تلقیح باکتری و بدون کوددهی) اعمال شد. نتایج نشان داد که یونجه وحشی با کاهش ۵۵/۱۶ درصدی TPHs خاک کارایی بهتری نسبت به سایر گیاهان داشت. تلقیح باکتری B_1 در برهم‌کنش با دو گیاه یونجه وحشی و آگروپایرون، با تجزیه ۵۶/۱۹ درصد TPHs خاک موفق‌تر از باکتری B2 عمل کرد. اما در گیاه آتریپلکس در برهم‌کنش با باکتری B_2 و با تجزیه ۵۴/۶۴ درصد TPHs خاک موفق‌تر از B_1 بود. با توصیه کامل کودی، گیاهان یونجه وحشی و آتریپلکس با کاهش ۶۸/۵۶ درصدی TPHs خاک بیشترین کارایی را داشتند. در تیمار خاک بدون کشت گیاه، باکتری B_2 همراه با توصیه کودی بهترین عملکرد را داشت. باکتری با بهبود فعالیت‌های متابولیک و توسعه سیستم ریشه و در نهایت افزایش زیتوده گیاه منجر به بهبود کارایی گیاه پالایی می‌شود. نتایج نشان از اثر معنی‌دار برهم‌کنش بین باکتری و نوع گیاه در وزن خشک اندام هوایی گیاه در سطح $\alpha= ۰/۰۱$ بود.

واژه‌های کلیدی: یونجه وحشی، آگروپایرون، آتریپلکس، *Bacillus pumilus*، هیدروکربن‌های نفتی کل، آلتراسونیک.

مقدمه

آلودگی خاک‌ها به هیدروکربن‌های نفتی یکی از مهمترین مشکلات زیست محیطی در برخی از نقاط کشور به‌ویژه در اطراف تأسیسات نفتی است (Mokhtarian *et al.*, 2010). ازاین‌رو، در سالیان اخیر مطالعه آلودگی خاک‌ها به آلاینده‌های نفتی در نقاط مختلف جهان و ازجمله کشور

ایران، توجه زیادی را به خود معطوف نموده است (Pawar *et al.*, 2013; Magdalena *et al.*, 2016). نفت خام ترکیبی پیچیده از هزاران ترکیب هیدروکربنی و غیرهیدروکربنی ازجمله فلزات سنگین است که پس از ورود به خاک بر خواص شیمیایی، فیزیکی و زیستی آن تأثیر گذاشته و سبب کاهش کیفیت خاک می‌شود (Dai *et al.*, 2011). این ترکیبات سبب چسبندگی و اتصال ذرات خاک به یکدیگر، سخت و غیرقابل نفوذ شدن خاک، اختلال در زهکشی و انتشار اکسیژن در خاک می‌شوند. همچنین این آلاینده‌ها منجر به کاهش فعالیت میکروارگانیسم‌های خاک شده و از سوی دیگر تجزیه آنها در خاک، باعث انتشار ترکیبات سمی سولفیدی و سمیت منگنز در خاک می‌شود. به‌علاوه اینکه کاهش فسفر، ازت و کلسیم قابل استفاده خاک از دیگر اثرهای آلودگی‌های نفتی خاک است (Anigboro and Chupakhina *et al.*, 2004; Tonukari, 2008). زیست‌پالایی به‌کارگیری توانایی متابولیسمی موجودات زنده در جهت حذف آلاینده‌های مضر و تبدیل آن به متابولیت‌های بی‌خطر است (Khan *et al.*, 2009; Pawar *et al.*, 2013). گیاه‌پالایی، به‌عنوان مهمترین شیوه زیست-پالایی، یک فناوری نوین، کارآمد و دوست‌دار محیط‌زیست برای پالایش خاک‌های آلوده است که در آن از گیاهان مقاوم و مناسب برای حذف یا کاهش غلظت آلاینده‌های معدنی و آلی (به‌ویژه ترکیبات نفتی) از محیط‌زیست استفاده می‌شود. معمولا تحقیقات گیاه‌پالایی، به سمت استفاده از لگوم‌ها که تثبیت کننده نیتروژن هستند، گرایش دارند. به‌عنوان مثال گونه‌های مختلف یونجه اثری مثبت بر کاهش غلظت آلاینده‌های ناشی از نفت خام در خاک دارند (Soleimani *et al.*, 2010). Valeria و همکاران (۲۰۱۳)، گیاه‌پالایی خاک آلوده به پیرن را با استفاده از ۳ گونه گیاهی مختلف (*Lolium prenne*، *Brassica napus*، *Medicago sativa*) بررسی و مشخص کردند که متوسط میزان حذف پیرن در خاک کشت شده با گیاهان ۳۰ درصد و در خاک شاهد (بدون گیاه) فقط ۱۸ درصد بود. D'Orazio و همکاران (۲۰۱۳)، در تحقیقات انجام شده نشان داده‌اند که در ناحیه ریشه به دلیل بهبود انتقال کسیژن و در نتیجه تحریک جمعیت میکروبی در قسمت ریزوسفر، آلاینده کمتری باقی مانده است. Gouda و همکاران (۲۰۱۷)، با مقایسه روش گیاه‌پالایی، بهبود زیستی و یک روش تلفیقی از هر دو (گیاه‌پالایی و باکتری) را در یک خاک شنی آلوده به هیدروکربن‌های نفتی در سطوح مختلف آلودگی بعد از ۹۰ روز نشان دادند. گیاه‌پالایی به تنهایی ۹۹/۹٪، باکتری ۹۸/۷٪ و ترکیب هر دو روش با یکدیگر ۹۹٪ در حذف هیدروکربن‌های نفتی کارایی دارند. میکروارگانیسم‌ها در حضور منابع کربن، آنزیم‌هایی تولید می‌کنند که مسئول حمله به مولکول‌های هیدروکربن می‌باشند. کارایی فرایند گیاه-پالایی به میزان زیادی بستگی به حضور و فعالیت جامعه میکروبی وابسته به گیاه دارد که حامل ژن‌های تجزیه کننده-اند، این ژن‌ها برای تجزیه آنزیمی آلاینده‌های آلی مورد نیاز هستند و منطقه ریزوسفر میزبان این نوع از باکتری‌های تجزیه کننده است. بنابراین به نظر می‌رسد استفاده توأم از گیاهان سازگار با شرایط محیطی مانند گیاهان بومی همراه با تقویت و توانبخشی ظرفیت زیست‌پالایی خاک با کاربرد میکروارگانیسم‌هایی که توان تجزیه هیدروکربن‌های نفتی را دارند، بتوان مشکل خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی را تا حد زیادی حل نمود. در یک تحقیق Rajaei و Seyedi (۲۰۱۸) نشان دادند که در گیاه معطر *Vetiveria zizanioides* (L.) با توجه به میزان آلودگی در دو خاک آلوده به نفت، یکی آلودگی اولیه با ۳۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم هیدروکربن‌های نفتی آلیفاتیک (APH) و دیگری آلودگی قدیمی با ۷۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از همین آلاینده، در هر دو خاک آلوده در پایان آزمایش که گیاه به مدت ۱۵ ماه رشد کرده بود غلظت APH کاهشی برابر با ۸۸/۵ درصد داشت. در مطالعه دیگری، Panchenko و همکاران (۲۰۱۷) قابلیت گیاه زراعی *Medicago falcata* را در کاهش هیدروکربن‌های نفتی بررسی و با یونجه (*Medicago sativa*) مقایسه کردند. مطالعه میدانی نشان داد که این دو گیاه مقاومت مشابهی به هیدروکربن‌های نفتی خاک نشان داده‌اند و غلظت آلاینده در ریزوسفر آنها ۳۰

درصد کمتر از خاک اطراف آن بود. نتایج آزمایش‌ها نشان داد که گیاه *M. falcata* به دلیل تجزیه بخش عمده روغن-های سنگین، میزان آلودگی را ۱۸ درصد کاهش داد. همچنین، ظرفیت گیاه‌پالایی یونجه وحشی در خاکهای آلوده به هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (PAHs) که آلاینده‌های اولیه با قابلیت جهش‌زا و سرطان‌زا می‌باشند، بررسی شده است که در خاک تحت آزمایش، طی ۲۰ روز ۸۵ درصد و طی ۴۰ روز بیش از ۹۵ درصد PAHs حذف شدند (Alves *et al.*, 2018). در تحقیقی که در شهرستان ملایر انجام شده است از گیاهان مرتعی مختلف مانند گون و جاز به‌منظور حذف عناصری همانند سرب و روی از خاک استفاده شده است (Kord *et al.*, 2018). در پژوهشی دیگر، قابلیت دو گیاه یونجه وحشی و آگروپایرون در احیاء اراضی دیم کم بازده استان خراسان شمالی مورد استفاده قرار گرفت (Ghaderi *et al.*, 2008).

بررسی منابع تحقیق نشان می‌دهد که در نتیجه تلفیق گیاه‌پالایی و دیگر روش‌های زیستی می‌توان به یک تکنیک علمی و کاربردی با کارآمدی بالا برای پاک‌سازی خاک‌های آلوده به نفت دست یافت. در مناطق مورد بررسی در این پژوهش، تاکنون بر روی ظرفیت گیاهان بومی و نیز میکروارگانیسم‌های دارای ظرفیت تصفیه آلاینده‌های نفتی برای حذف این آلاینده‌ها مطالعه‌ای انجام نشده است. همچنین انجام مطالعات تکمیلی برای یافتن راهکارهای استقرار بهتر گیاه و افزایش کارایی گیاه‌پالایی لازم است. یونجه وحشی (*Medicago sativa*) گیاهی چند ساله از خانواده لگوم بوده و برای چرای دام، تولید علوفه و همچنین به‌عنوان کود سبز در اصلاح خاک کاربرد دارد (Dasanna, 2016). آگروپایرون (*Agropyron trichophorum*) از گیاهان چمنی و بومی اروپا و آسیا است و دارای تاج پوششی و ریشه عمیق بوده و نقش مهمی در حفاظت از آب و خاک و کاهش فرسایش مراتع دارد. آتریپلکس (*Atriplex canescens*) گونه‌ای همیشه سبز از خانواده *Amaranthaceae* و سازگار با شرایط محیطی خشک و نیمه‌خشک است. پژوهش‌های متنوعی در مورد گیاه *Artiplex* و کاربردهای مختلف آن انجام شده است. به‌عنوان مثال نتایج یک تحقیق نشان داد در مناطق با شوری زیاد استفاده از گونه‌های *Artiples canescens* و *Artiplex verrocifera* برای استقرار و تولید علوفه امکان‌پذیر است (Ghorbanian *et al.*, 2018).

Bacillus pumilus یک باکتری گرم مثبت و اسپوردار است که اسپورهای آن مقاومت بالایی در برابر تنش‌های محیطی ازجمله خشکی دارند. *Pseudomonas putida* یک باکتری گرم منفی، میله‌ای شکل و ساپروفیت است (Glick, 2010). این دو باکتری بومی خاک‌های ایران هستند.

هدف از این پژوهش، بررسی قابلیت استفاده از گونه‌های مرتعی سازگار با شرایط منطقه (آتریپلکس، یونجه وحشی و آگروپایرون) در گیاه‌پالایی آلاینده‌های نفتی خاک‌های نفت-خیز غرب ایران است. همچنین برای افزایش بازدهی ظرفیت گیاه‌پالایی استفاده از باکتری‌های محرک رشد برای پاک-سازی خاک‌های آلوده به نفت مورد آزمون قرار گرفت. به‌علاوه برای بهبود کارایی گیاه‌پالایی و ارتقاء ظرفیت تصفیه آلاینده‌ها توسط میکروارگانیسم‌ها، پروتکل مبتنی بر غنی-سازی خاک با توصیه کودی مناسب نیز بررسی شده است. این پژوهش در فاصله سال‌های ۱۳۹۸ تا ۱۳۹۹ در استان کرمانشاه انجام شده است.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل با طرح پایه کاملا تصادفی (CRD) طراحی شد. تیمارهای آزمایشی شامل تیمار گیاه در ۴ سطح P_0: بدون گیاه و سه گونه گیاهی بومی و سازگار، P_1: آتریپلکس، P_2: یونجه وحشی، P_3: آگروپایرون و تیمار باکتری و غنی‌سازی نیز در ۴ سطح شامل B_0: بدون باکتری و B_1: *Bacillus pumilus*، B_2: *Pseudomonas putida* و تیمار B_1B_2F: استفاده توأم از دو گونه باکتری ذکرشده همراه با توصیه کامل کودی (NPK و عناصر میکرو) بود.

همچنین تیمار شاهد (بدون کشت گیاه، بدون تلقیح با باکتری و بدون غنی‌سازی) برای حذف اثرهای محیطی بر

کاهش غلظت آلاینده‌های نفتی موجود در نظر گرفته شد. پروتکل تغذیه شامل غنی‌سازی خاک بر اساس آزمون خاک و توصیه کودی مناسب از عناصر ماکرو و میکرو بود.

دو گونه باکتری انتخاب شده، در این مطالعه با شرایط خشک سازگار و مقاوم بوده و بیماری‌زا نبودند. همچنین با توجه به موضوع پژوهش و بررسی سوابق تحقیق، کارایی بالایی در زیست‌پالایی خاک آلوده به هیدروکربن‌های نفتی دارند (Chouychai *et al.*, 2012; Alves *et al.*, 2018). این باکتری‌ها قابلیت بالایی برای تولید متابولیت‌ها دارند. در این تحقیق از مایه تلقیح پودری این باکتری‌ها استفاده شده است. چون مایه تلقیح پودری نسبت به محیط مایع توان ماندگاری بیشتری دارد. باکتری‌ها تا پایان مرحله رشد در محیط کشت نگه داشته شدند. این مدت برای باکتری *P. putida* ۲۴ ساعت و برای باکتری *B. pumilus* برابر با ۷۲ ساعت است. دمای محیط کشت در حدود ۲۵ تا ۲۸ درجه سانتیگراد است. باکتری‌ها محیط تکثیر را ترک نمی‌کنند و به‌همراه محیط کشت مورد استفاده قرار می‌گیرند. این آزمایش به صورت گلدانی، در چهار تکرار و در ۶۸ گلدان انجام شد. اندازه گلدان‌های استفاده شده در این آزمایش ۲۰cm*۱۸cm (ارتفاع * قطر) بود. در هر گلدان ۴ کیلوگرم خاک استفاده شد. دمای گلخانه بین ۳۳ تا ۳۸ درجه سانتیگراد تنظیم گردید. خاک مورد استفاده برای آزمایش گلدانی از منطقه نفت‌خیز غرب ایران در استان کرمانشاه و اطراف واحد بهره‌برداری نفت خام منطقه یادشده تهیه گردید. سطح ۳/۵ درصد وزنی آلودگی نفتی به‌عنوان متداول‌ترین و بیشترین پراکندگی در منطقه مورد آزمایش برای انجام این پژوهش در نظر گرفته شد و این سطح از آلودگی به‌صورت یکنواخت بر روی خاک مورد استفاده اعمال شد. برای این منظور، حجم (V) ۲۰ لیتر نفت خام (با چگالی $d=۰/۸۱ g/cm^3$) با ۴۵۸ کیلوگرم خاک خشک (S_d) ترکیب و آلودگی برابر با ۳/۵ درصد بدست آمده است (رابطه ۱).

$$\text{درصد وزنی آلودگی} = \frac{V \times d}{S_d} \times 100 \qquad \text{رابطه (۱)}$$

این میزان نفت، پس از اختلاط با خاک، به مدت سه روز در هوای آزاد نگه داشته شد و هر روز مخلوط حاصل به هم زده شد تا به‌طور کامل و یکنواخت جذب سطوح ذرات خاک شود. سرانجام مخلوط یکنواخت خاک و نفت در گلدان‌های آزمایشی ۴ کیلوگرمی ریخته شده و برای کشت آماده گردید. قبل از اعمال تیمارها، ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد مطالعه مانند بافت خاک به روش هیدرومتر بایکاس Gee و Bauder (۱۹۹۰)، میزان کربنات کلسیم برابر به روش Richards (۱۹۵۴)، مقدار کربن آلی به روش اصلاح شده والکی و بلاک Nelson و همکاران (۱۹۹۶)، واکنش خاک (pH) با استفاده از گل اشباع با دستگاه pH متر McLean (۱۹۸۲)، هدایت الکتریکی (EC) با دستگاه هدایت‌سنج الکتریکی در عصاره ۲/۵: ۱ Page و همکاران (۱۹۹۲) در آزمایشگاه اندازه-گیری شد (جدول ۱).

جدول ۱- نتایج آزمون خاک مورد استفاده در آزمایش

Clay %	Silt %	Sand %	CU ppm	Zn ppm	Fe ppm	Mn Ppm	O.C %	K Ppm	P ppm	Texture	pH	Ec×10^3 ds m^{-1}	TNV* %
۱۸/۶	۳۳/۴	۴۸	۱/۱	۱/۱۶	۳/۷۶	۴/۸	۰/۵۱	۲۰۰	۳/۸	لوم	۷/۵۹	۱/۳۹	۲۴

*- Total neutralizing Value (آهک معادل)

پس از بررسی‌های میدانی و مطالعه منابع علمی، گونه‌های مرتعی آتریپلکس، یونجه وحشی و آگروپایرون سازگار با شرایط منطقه تشخیص و برای انجام این تحقیق انتخاب شدند. در زمان کاشت، از مایه تلقیح پودری ۲ نوع باکتری انتخاب شده هر یک به میزان ۴ گرم به گلدان‌های تیمارهای مربوطه در عمق دو سانتی‌متری تلقیح و افزوده شد. معمولاً جمعیت باکتری مصرفی را به میزان یک در هزار استفاده می‌کنند. مقدار مایه تلقیح مصرفی برای تأمین این جمعیت باکتری‌ها براساس تراکم جمعیت باکتری (10^8 در هر گرم) در مایه تلقیح مصرفی و وزن خاک (۴ کیلوگرم) حدود ۴ گرم محاسبه و به‌گلدان‌ها اضافه شد. باکتری‌های استفاده شده در این آزمایش از بانک ژنتیک بخش بیولوژی خاک مؤسسه تحقیقات خاک و آب تهیه و مایه تلقیح آنها خریداری شد. برای گلدان‌های تیمار غنی‌سازی، بر اساس آزمون خاک و توصیه کودی از کودهای اوره، سوپرفسفات تریپل و سولفات پتاسیم به‌ترتیب به‌عنوان منبع نیتروژن، فسفر و پتاسیم و همچنین از کود با نام تجاری فلوریش به‌عنوان منبع عناصر کم مصرف استفاده شد. مقدار مصرف عناصر ماکرو بر اساس آزمون خاک محاسبه و به هر گلدان در زمان کشت داده شد. در زمان عملیات داشت دو بار از کود ریزمغذی به غلظت ۲ گرم در لیتر همزمان با آبیاری به‌صورت یکسان به تیمارهای مربوطه داده شد (هر ۳۰ روز یکبار). ترکیبات کود ریزمغذی فلوریش شامل آهن، منگنز، روی و مس کلاته که همگی با EDTA (Ethylene diamine tetra acetic acid) بودند (به‌ترتیب با ۳ درصد، ۲ درصد، ۳ درصد، ۰/۳۵ درصد و بر محلول ۰/۲ درصد بود).

عملیات داشت شامل آبیاری تا حد ظرفیت زراعی (FC) و کنترل آفات و بیماری‌ها به‌صورت یکسان برای کلیه تیمارهای آزمایشی تا تکمیل دوره رویشی (حدود ۱۲ ماه) اعمال شد. آبیاری طوری انجام شد که آب از ته گلدان‌ها خارج نشود. در زمان برداشت، نمونه‌های گیاهی اندام هوایی به‌صورت کف‌بر برداشت و همراه با نمونه ریشه‌ها (پس از جداسازی خاک و شستشوی ریشه) در پاکت نگهداری و برای توزین به آزمایشگاه منتقل شد. همچنین نمونه‌های خاک هر گلدان از محدوده اطراف ریشه جمع‌آوری و پس از کوبیدن و الک کردن با الک ۰/۵ میلی‌متر به آزمایشگاه منتقل شد و هیدروکربن‌های نفتی کل (TPHs) باقیمانده در نمونه‌های خاک تعیین گردید. مقدار TPHs هر نمونه خاک با مقدار قبل از کشت مقایسه و کاهش آن به‌عنوان میزان حذف هیدروکربن‌ها توسط تیمار مربوطه محاسبه گردید. برای تعیین TPHs خاک از روش گراویمتری و حمام التراسونیک استفاده شد (Schwartz *et al.*, 2012). برای این کار، پس از الک کردن خاک ۵ گرم از آن را توزین و ۲ گرم سدیم سولفات به آن اضافه شد. پس از اضافه کردن ۴۰ میلی‌لیتر حلال دی‌کلرومتان به مخلوط، به مدت ۱ ساعت در حمام التراسونیک (EPA ۳۵۵۰) در دمای آب ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس مخلوط به مدت ۵ دقیقه در دستگاه سانتریفوژ با دور ۱۵۰۰ rpm سانتریفوژ شد. پس از سانتریفوژ، محلول رویی برای جذب رطوبت موجود، از ستون سیلیکاژل عبور داده شد و مقداری دیگر از حلال دی‌کلرومتان برای شستن مقدار باقی مانده محلول از ستون عبور داده شد. ستون سیلیکاژل مورد استفاده متشکل از ستون شیشه‌ای با قطر ۱۰ میلی‌متر و ارتفاع ۲۵۰ میلی‌متر و ۶ گرم پشم شیشه و ۵ گرم سیلیکاژل بود.

عصاره به‌دست‌آمده به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق هواخشک شد. پس از تبخیر حلال، مواد باقی مانده در ته ظرف توزین و به‌عنوان مقدار نفت موجود در خاک یادداشت گردید. مقدار نفت استخراج شده از هر نمونه با مقدار نفت خاک در شروع آزمایش مقایسه و کاهش آن به صورت درصد کاهش مشخص شد (Schwartz *et al.*, 2012). برای تحلیل‌های آماری از نرم‌افزارهای SAS، SPSS و Excel استفاده شد.

نتایج

برخی ویژگی‌های آمار توصیفی شاخص‌های اندازه‌گیری شده، در جدول ۲ نشان داده شده است. حداقل میزان TPHs در تیمارهای اندازه‌گیری شده ۰/۵ درصد و حداکثر آن ۲ درصد می‌باشد. میانگین آن نیز ۰/۹ درصد بود که در

مجموع نشانگر اثر تیمارهای اعمال شده در کاهش قابل توجه هیدروکربن‌های نفتی در کلیه تیمارها بود. بر اساس شاخص‌های آماری محاسبه شده توزیع متغیرهای اندازه‌گیری شده از نظر آماری نرمال بود. زیرا شاخصهای واریانس و نیز شاخص‌های اریبی از میانگین مانند کشیدگی و چولگی در اغلب متغیرها نشان از تبعیت آنها از توزیع نرمال داشت.

جدول ۲- برخی شاخص‌های آمار توصیفی متغیرهای اندازه‌گیری شده

متغیرها	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	Variance	C.V	Skewness		Kurtosis	
								Statistic	Std. Error	Statistic	Std. Error
TPHs (%)	۶۸	۰/۵	۲	۰/۹۰۱۵	۰/۲۹۶۷۱	۰/۰۸۸	۳/۲۹	۲/۴۴۴	۰/۲۹۱	۷/۱۳۱	۰/۵۷۴
SDW(gr)	۴۸	۰	۱۴/۴۹	۳/۲۹۸۷	۳/۱۹۷۸۸	۱۰/۲۲۶	۰/۹۷	۱/۰۶۷	۰/۲۹۱	۱/۳۳۴	۰/۵۷۴
TDW(gr)	۴۸	۰	۲۰/۴۸	۳/۹۱۲۴	۴/۰۰۳۵۶	۱۶/۰۲۹	۱/۰۲	۱/۳۸۸	۰/۲۹۱	۳/۱۷۷	.۰/۵۷۴

TPHs: هیدروکربن‌های نفتی کل SDW: وزن خشک اندام هوایی TDW: وزن خشک کل

بررسی نتایج حاصل از تعیین ضریب همبستگی پیرسون (r) بین متغیرهای مورد اندازه‌گیری نشان داد که بین مقادیر سطح آلاینده هیدروکربن‌های نفتی باقیمانده و شاخص‌های وزن خشک ریشه، اندام هوایی و وزن خشک کل همبستگی منفی وجود دارد (جدول ۳). به‌عبارت دیگر با افزایش (TPHs)، شاخص‌های وزن خشک کاهش یافته است. اگرچه کمیت ضریب همبستگی از نظر آماری معنی دار نبوده است ولی مقادیر منفی بیانگر روند اثرهای منفی آلاینده‌های نفتی بر وزن خشک تولیدی گیاهان در کلیه تیمارهاست.

جدول ۳- ضریب همبستگی پیرسون بین متغیرهای وزن خشک و TPHs

متغیرها	TPHs	SDW	RDW	TDW
TPHs	۱	-۰/۲۸۷*	-۰/۱۱۹	-۰/۲۶۷*
SDW	-۰/۲۸۷*	۱	-۰/۵۳۸**	۰/۹۶۵**
RDW	-۰/۱۱۹	۰/۵۳۸**	۱	۰/۷۳۹**
TDW	-۰/۲۶۷*	۰/۹۶۵**	۰/۷۳۹**	۱

*: همبستگی در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار است. **: همبستگی در سطح ۰/۰۱ معنی دار است.
TPHs: هیدروکربن‌های نفتی کل SDW: وزن خشک اندام هوایی RDW: وزن خشک ریشه، TDW: وزن خشک کل

مقادیر TPHs باقیمانده

اثرهای اصلی هر یک از تیمارها بر پالایش هیدروکربن-های نفتی کل تعیین و با مقایسه میانگین‌ها، اولویت اثر شیوه‌های گیاه‌پالایی و استفاده از باکتری‌ها و غنی‌سازی خاک برای بهبود روند تصفیه آلاینده‌های ذکر شده از خاک تعیین شد. تحلیل واریانس اثر تیمارها بر مقادیر TPHs خاک در جدول ۴ نشان داده شده‌است. همچنین بررسی برهم‌کنش استفاده توأم از باکتری، کود و نوع گیاه برای نیل

به پروتکل جامع، کارآمد و کاربردی به شیوه آماری انجام شده است. بر این اساس، اثر گیاه و باکتری و همچنین اثر برهم‌کنش بین گیاه و باکتری در سطح احتمال ۹۹ درصد بر کمیت (TPHs) خاک از نظر آماری معنی‌دار است (جدول ۴). به‌عبارت دیگر کاشت گیاه و نیز استفاده از باکتری به صورت جداگانه و نیز توأم با یکدیگر منجر به کاهش سطوح آلاینده هیدروکربن‌های نفتی خاک شده است.

جدول ۴- تجزیه واریانس اثرهای اصلی و برهم‌کنش تیمارهای آزمایشی بر مقدار TPHs خاک

تیمار	dF	Mean square	F	Sig.
گیاه	۳	۱/۱۵۵	۵۶/۹۹۸	۰/۰
باکتری	۳	۰/۷۴۹	۱۳/۱۳۵	۰/۰
تکرار	۳	۰/۰۰۴	۰/۰۴۷	۰/۹۸۶
گیاه و باکتری	۲۷	۰/۳۵۵	۸۵/۰۰۲	۰/۰

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر تیمارهای باکتری و گیاه بر TPHs باقیمانده خاک با آزمون دانکن

باکتری	گیاه				شاهد	میانگین
	P0	P1	P2	P3		
B1B2F	۰/۶۴۵ ^{f}	۰/۶۱۵ $^{f\&}$	۰/۶۱۵ ^{f}	۰/۶۹۲ ^{f}	--	۰/۶۴۲ ^{D*}
B2	۰/۹۷ ^{bc}	۰/۸۸ ^{cde}	۰/۹۱۷ ^{bcde}	۰/۹۲۷ ^{bcde}	--	۰/۹۲۴ ^{C}
B1	۰/۷۰۷ ^{f}	۰/۹۶ ^{bcd}	۰/۸۵۷ ^{de}	۰/۸۵ ^{e}	--	۰/۸۴۴ ^{C}
B0	۰/۹۹ ^{b}	۰/۹۳۷ ^{bcde}	۰/۸۷ ^{cde}	۰/۹۴۵ ^{bcde}	۱/۹۴ ^{a}	۱/۱۴ ^{B}
شاهد	--	--	--	--	--	۱/۹۴ ^{A}
میانگین	۰/۸۲۸ ^{B}	۰/۸۵ ^{B}	۰/۸۱۵ ^{c}	۰/۸۵۴ ^{B}	۱/۹۴۳ ^{A}	

*: تفاوت میانگین‌هایی که در هر سطر و ستون در یک حرف بزرگ مشترک هستند، از نظر آماری در سطح α=۰/۰۵ معنی‌دار نیست.

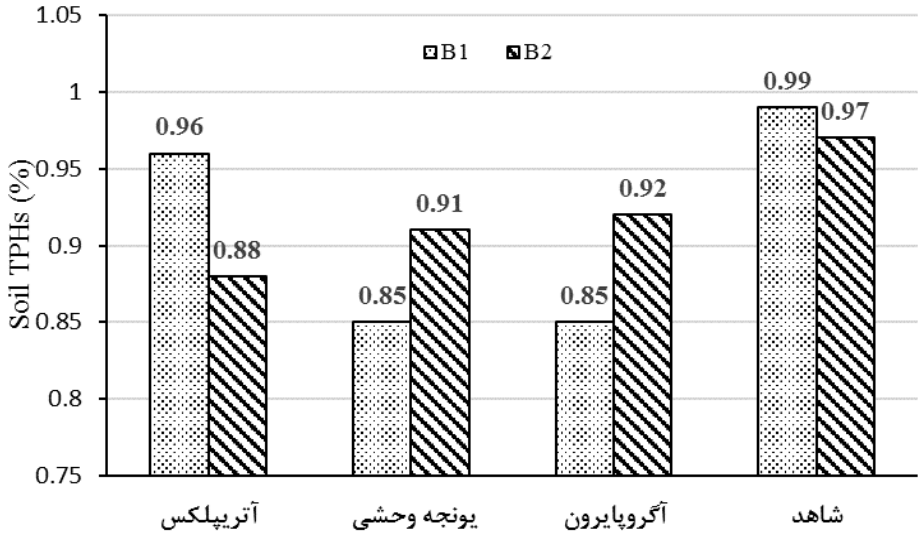
&: تفاوت میانگین‌هایی که در متن جدول در یک حرف کوچک مشترک هستند، از نظر آماری در سطح α=۰/۰۵ معنی‌دار نیست.

P_0: بدون گیاه، P_1 : آتریپلکس، P_2 : یونجه وحشی، P_3 : آگروپایرون

کود: F (Fertilizer) B1: *Bacillus pumilus*, B2*: Pseudomonas putida*

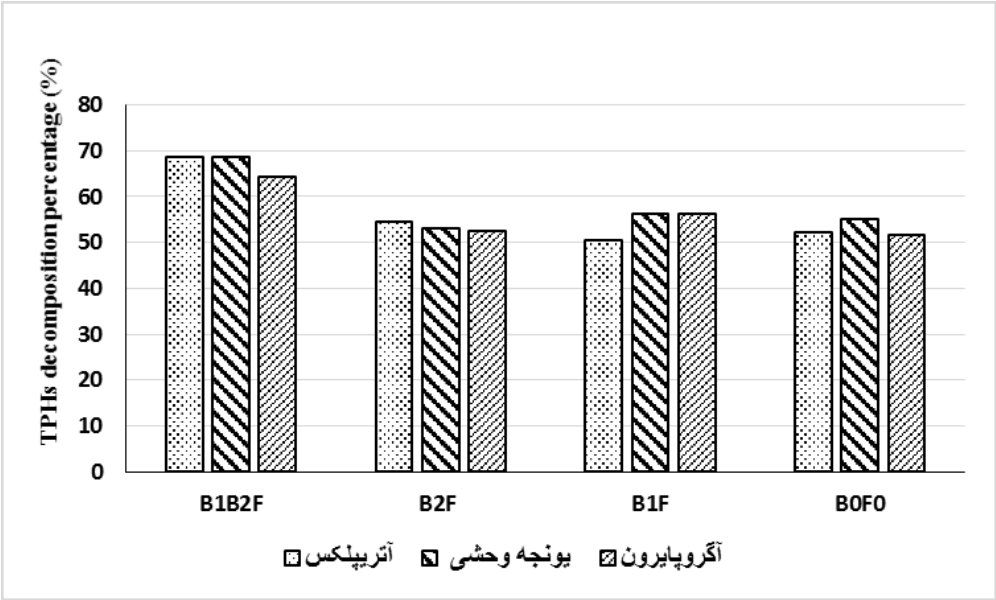
مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن به‌منظور بررسی اثرهای اصلی تیمارها و برهم‌کنش آنها در جدول ۵ نشان داده شده است. نتایج بیانگر آن است که کشت یونجه وحشی بدون استفاده از توصیه کودی و باکتری (B_0F_0) موفق‌تر از دیگر گونه‌ها در پالایش آلاینده‌های نفتی عمل کرده و از نظر آماری با دیگر تیمارهای گیاهی تفاوت معنی‌داری دارد. به‌گونه‌ای که این گیاه به‌طور میانگین با تقلیل سطح TPHs خاک از ۱/۹۴ به ۰/۸۱ درصد، حدود ۵۵/۲ درصد از این آلاینده را تجزیه و از خاک خارج نموده است (جدول ۵). همچنین تفاوت تیمار استفاده از هر دو باکتری همراه با مصرف کود با دیگر تیمارهای باکتریایی و به‌ویژه تیمار شاهد از نظر آماری و در سطح احتمال ۹۹ درصد معنی‌دار است. به‌گونه‌ای که استفاده از این تیمار با تقلیل سطح TPHs از ۱/۹۴ به ۰/۶۴ درصد باعث تجزیه ۷۹ درصد TPHs موجود در خاک شده است (جدول ۵).

بررسی برهم‌کنش بین تیمارها نشان از آن دارد که با پروتکل کامل کودی (B_1B_2F)، گیاهان یونجه وحشی و آتریپلکس با ۶۸/۵۶ درصد بیشترین کارایی را در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی داشته‌اند (جدول ۵ و شکل ۱ و ۲).



شکل ۱ – نمودار اثر برهم‌کنش تیمارهای باکتری و گیاه بر TPHs خاک

در دو مورد از نمونه‌های کشت گیاهان، باکتری B1 در پالایش خاک موفق‌تر از باکتری B2 بوده است، به‌طوری‌که در گیاه یونجه وحشی و آگروپایرون ترکیب باکتری B_1 با گیاه (B_1F_0) ۵۶/۱۹ درصد تجزیه هیدروکربن‌های نفتی کل می‌باشد که موفق‌تر از باکتری B_2 عمل کرده است. اما در گیاه مرتعی آتریپلکس باکتری B_2 با ۵۴/۶۴ درصد تجزیه موفق‌تر از باکتری B_1 در همین گیاه و همچنین موفق‌تر از باکتری B_2 در دو گیاه دیگر عمل کرده است (شکل ۱ و ۲). در تیمار خاک بدون کشت گیاه (شاهد)، باکتری B_2 همراه با توصیه کودی مناسب (B_2F) با ۶۷/۰۲ درصد بهترین عملکرد را داشته است (شکل ۲ و جدول ۶). البته تأثیر باکتری در بهبود فعالیت‌های متابولیکی و توسعه سیستم ریشه و در نهایت افزایش زیتوده گیاه منجر به بهبود کارایی گیاه‌پالایی می‌شود.



شکل ۲- نمودار درصد احیاء در خاک آلوده نفتی در پایان دوره رشد در تیمارهای مختلف باکتری و گیاه

جدول ۶- درصد احیای خاک آلوده فاقد کشت و حاوی باکتری برای تیمارهای مختلف

B_1F_0	B_1F	B_2F_0	B_2F
۴۸/۹۷	۶۳/۹۲	۵۰	۶۷/۰۲

با بررسی جدول ۶ می‌توان نتیجه گرفت که تأثیر باکتری B_2 در تیمار خاک خالی از گیاه و حاوی باکتری، بیشتر از باکتری B_1 بوده است. همچنین نتایج با اعمال غنی‌سازی خاک با پروتکل کودی نسبت به حالت قبل بسیار بهبود یافته است. به‌عبارت بهتر می‌توان گفت پروتکل غنی‌سازی باعث افزایش بازده باکتری و گیاه شده است که در بهبود عملکرد احیای آلودگی نفتی خاک‌ها بسیار مؤثر است.

وزن خشک

اگرچه نوع گیاه متفاوت بوده، اما تحلیل اثر گیاه بر شاخص‌های وزن خشک چندان توجیه علمی نمی‌تواند داشته باشد. همچنین نکته قابل توجه در این تحلیل آن است که اثر باکتری و برهم‌کنش گیاه و باکتری بر وزن خشک اندام هوایی و وزن خشک کل از نظر آماری در سطح ۹۹ درصد معنی‌دار شده است (جدول ۷).

در جدول ۸ مقایسه میانگین اثرهای برهم‌کنش باکتری با نوع گیاه بر وزن خشک کل گیاهان با آزمون دانکن نشان داده شده است که بیانگر تفاوت رفتاری نوع باکتری با گیاهان مختلف در افزایش وزن خشک گیاه می‌باشد. به‌نحوی‌که در کلیه گیاهان کشت شده، کمترین وزن خشک مربوط به خاک تلقیح شده با باکتری B_2 بود. این در حالی است که به‌عنوان مثال در گیاه آگروپایرون کاربرد باکتری B_1 منجر به افزایش تقریباً ۴۳ درصدی در وزن خشک گیاه شده بود.

جدول ۷- آنالیز واریانس اثرهای اصلی و برهم‌کنش تیمارهای آزمایشی بر متغیرهای وزن خشک ساقه و کل

تیمار	df	Mean Square	F	Sig
وزن خشک اندام هوایی (Shoot)				
گیاه	۳	۹۶/۸۴۸	۲۰/۴۹	./۰
باکتری	۳	۱۹/۳۳۹	۱/۹۷۴	۰/۱۲۷
تکرار	۳	۴/۰۱۴	۰/۳۸۲	۰/۷۶۷
گیاه و باکتری	۲۷	۲۹/۶۷۷	۷/۱۹۶	۰/۰
وزن خشک کل (Total)				
گیاه	۳	۱۶۹/۵۱۵	۲۶/۹۸	./۰
باکتری	۳	۲۴/۴۷۰	۱/۵۶۵	۰/۲۰۶
تکرار	۳	۴/۵۵۵	۰/۲۷۵	۰/۸۴۳
گیاه و باکتری	۲۷	۴۸/۶۲۸	۸/۳۸۲	۰/۰

جدول ۸- بررسی اثر برهم‌کنش تیمار باکتری با نوع گیاه بر وزن خشک کل با مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن

		گروه*					
B*P	N	۱	۲	۳	۴	۵	۶
$P_3B_1B_2F$	۴	۱/۹۳۹۵	۱/۹۳۵۰				
P_3B_2	۴	۲/۳۶۷۵	۲/۳۶۷۵	۲/۳۶۷۵			
P_3B_0	۴	۲/۹۵۰۰	۲/۹۵۰۰	۲/۹۵۰۰			
P_2B_0	۴	۲/۹۶۰۰	۲/۹۶۰۰	۲/۹۶۰۰			
P_3B_1	۴		۴/۲۴۵۰	۴/۲۴۵۰	۴/۲۴۵۰		
P_2B_2	۴		۵/۶۴۵۰	۵/۶۴۵۰	۵/۶۴۵۰	۵/۶۴۵۰	
P_2B_1	۴		۵/۷۴۲۵	۵/۷۴۲۵	۵/۷۴۲۵	۵/۷۴۲۵	
P_1B_0	۴			۶/۱۸۲۵	۶/۱۸۲۵	۶/۱۸۲۵	
$P_2B_1B_2F$	۴				۷/۰۹۵۰	۷/۰۹۵۰	
P_1B_2	۴				۷/۷۰۲۵	۷/۷۰۲۵	۷/۷۰۲۵
P_1B_1	۴					۸/۵۳۷۵	۸/۵۳۷۵
$P_1B_1B_2F$	۴						۱۱/۱۴۷۵
Sig.		۰/۱۴۷	۰/۰۵۷	۰/۰۵۶	۰/۰۸۰	۰/۱۴۴	۰/۰۶۰

*: تفاوت میانگین‌ها در هر گروه از لحاظ آماری در سطح $\alpha = ۰/۰۵$ معنی‌دار نیست.

بحث

در این مقاله، ظرفیت گیاه‌پالایی برخی گیاهان مرتعی بومی و سازگار با شرایط ادافیکی منطقه و نیز کارایی باکتری‌های بومی و سازگار با منطقه و نقش آنها در بهبود کارایی گیاهان در حذف کل هیدروکربن‌های نفتی (TPHs) خاک آلوده بررسی و مقایسه شد. از آنجا که مقاومت گیاهان منتخب در این مطالعه در مناطق خشک زیاد است، بنابراین می‌توان این پژوهش را از نیمه غربی تا جنوب‌شرقی ایران تعمیم داد. گیاه مرتعی یونجه وحشی بدون استفاده از پروتکل کودی و باکتری (B_0F_0)، نتیجه بهتری در پالایش آلودگی نفتی خاک نسبت به سایر گیاهان تحت آزمایش داشت که برابر با ۵۵/۱۶ درصد بدست آمده است. Xiao و همکاران (۲۰۱۵) نیز در مطالعه‌ای بر روی کارایی پنج گیاه زینتی در گیاه‌پالایی خاکهای آلوده به هیدروکربن‌های چند حلقه‌ای، نشان دادند که گیاه *Fire phoenix* و گیاه *Medicago sativa* می‌توانند برای پالایش خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های چند حلقه‌ای استفاده شوند. همچنین این تحقیق نشان داد که گیاه *Fire phoenix* در بهبود خواص فیزیکی خاک نیز بهتر عمل کرده است. گیاه آگروپایرون در صورتی که در تلفیق با باکتری B1 کشت شود بسیار موفق عمل می‌کند. به نوعی توفیق این گیاه چمنی را می‌توان به سیستم ریشه‌ای متراکم آن نسبت داد. در تحقیق دیگری، توانایی گیاه‌پالایی چمن بومی و آگروپایرون در یک خاک آلوده به هیدروکربن‌های نفتی، طی یک آزمایش گلخانه‌ای ۷ ماهه مقایسه شد (Saraeian *et al.*, 2018). نتایج نشان داد که آگروپایرون می‌تواند به‌عنوان یک گزینه جایگزین چمن بومی برای تجزیه آلاینده‌های نفتی مطرح شود.

در تیمار خاک بدون کشت گیاه، باکتری B_2 همراه با توصیه کودی مناسب (B_2F) با ۶۷/۰۲ درصد بهترین عملکرد را داشته است. بهترین نوع تیمار برای احیای خاک‌آلوده نفتی، پروتکل کودی همراه با هر دو باکتری (B_1B_2F) در گیاه آتریپلکس و یونجه وحشی با ۶۸/۵۶ درصد بیشترین کارایی را در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی داشته است. بنابراین ترکیب باکتری در کنار کود تأثیر بیشتری در احیاء خاک دارد. همچنین در بیشتر نمونه‌ها باکتری B_1 بیشتر از باکتری B_2 تأثیر داشته است. اگرچه تأثیر مستقیم باکتری در تجزیه و حذف آلاینده‌های نفتی از مشخصات بارز نتایج بدست‌آمده در این پژوهش است، اما در مواردی تأثیر باکتری در بهبود فعالیت‌های متابولیکی و توسعه سیستم ریشه و در نهایت افزایش زیتوده و وزن خشک گیاه منجر به بهبود کارایی گیاه‌پالایی گیاهان کشت شده گردیده بود. Guarino و همکاران (۲۰۲۰)، اثر برهم‌کنش بین ریشه گیاهان و باکتری‌ها را در ارتقاء ظرفیت زیست‌پالایی بسیار مؤثر دانسته‌اند. بنابراین اثر مثبت و معنی‌دار هر دو باکتری استفاده شده در این تحقیق در ارتقاء وزن خشک گیاهی از یکسو و ظرفیت گیاه‌پالایی هر سه گیاه مرتعی کشت شده از سوی دیگر به خوبی دیده می‌شود. این اثرها به خوبی بیانگر آن است که این باکتری‌ها محرک-های بیولوژیکی هستند که منجر به افزایش رشد این گیاهان می‌شوند. Yang و همکاران (۲۰۲۰)، معتقدند که باکتری‌های محرک رشد ریشه به‌طور غیرمستقیم با افزایش ظرفیت رشد و بیوماس ریشه منجر به ارتقاء ظرفیت گیاه‌پالایی خاک توسط گیاهان می‌شوند. از سوی دیگر، در این آزمایش مشخص شد که تلقیح خاک با هر دو باکتری استفاده شده و در غیاب کشت گیاهان نیز به‌طور مؤثری TPHs خاک را تجزیه و از خاک خارج کرده‌اند. نتایج مشابهی توسط Liu و همکاران (۲۰۱۷) به دست آمده بود که نشان از اثربخشی مثبت باکتری‌های *Bacillus spp.* در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی کل خاک داشت.

در نهایت توصیه می‌شود که کشت یونجه وحشی و یا آتریپلکس به‌عنوان سازگارترین گیاهان با شرایط منطقه توأم با کاربرد پروتکل کامل باکتری و توصیه کودی برای تجزیه آلاینده‌های نفتی بسیار مفید بوده و قادر است بیش از دو سوم آلاینده‌های نفتی را تجزیه و از اکوسیستم خاک خارج نماید. همچنین استفاده از پروتکل کودی به‌ویژه کاربرد عناصر میکرو مانند روی و عناصر ماکرو مانند فسفر و پتاسیم به دلیل ارتقاء مقاومت گیاه به خشکی و تنش‌های

محیطی کارایی گیاه‌پالایی را ارتقاء خواهد بخشید.

سپاسگزاری

از مسئولان محترم شرکت بهره‌برداری نفت و گاز غرب بدلیل حمایت در انجام این پژوهش سپاسگزاری می‌شود.

منابع مورد استفاده

– Alves, W. S., Manoel, E. A., Santos, N. S., Nunes, R. O., Domiciano, G. C. and Soares, M. R., 2018. Phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by cv. Crioula: A Brazilian alfalfa cultivar. International Journal of Phytoremediation, 20:747-755.
– Anigboro, A. and Tonukari, N., 2008. Effect of crude oil on invertase and amylase activities in cassava leaf extract and germinating cowpea seedlings. Asian Journal of Biological Sciences, 1: 56-60.
– Chouychai, W., Thongkukiatkul, A., Upatham, S., Pokethitiyook, P., Kruatrachue M. and Lee, H., 2012. Effect of corn plant on survival and phenanthrene degradation capacity of pseudomonas sp. UG14Lr in Two Soils, International Journal of Phytoremediation, 14(6): 585-595.
– Chupakhina, G. N. and Maslennikov, P. V., 2004. Plant adaptation to oil stress. Russian Journal of Ecology, 35:290-295. Translated from Ekologiya; 330-335.
– Dai, C., Hu, Y., Liu, X., Wen, J. and Zhong, C., 2011. Multi-system phytoremediation on oil-contaminated chernozem soilin daqing oilfield. The 1st International Conference on Environmental and Agriculture Engineering, Chengdu, China.
– Dasanna, A. "How to make Alfalfa sprouts".2016. Vegetarian recipes of India, Retrieved 25 October.
– D'Orazio, V., Ghanem, A. and Senesi, N., 2013. Phytoremediation of pyrene contaminated soils by different plant species. CLEAN - Soil, Air, Water, 41(4):377-382.
– Gee, G.W. and Bauder, J.W., 1990. Particle size analisis. P. 383-411. In: A. Klute (ed.) Methods of soil analysis. Part 1. Physical and mineralogical properties. Monograph No. 9. 2nd ed. Medison, WI: SSSA.
– Ghaderi, G. R., Gazanchian, A. and Yousefi, M., 2008. The forage production comparison of alfalfa and wheatgrass as affected by seeding rate on mixed and pure cropping. Iranian journal of Range and Desert Reseach, 15(2): 256-268.
– Ghorbanian, D., Sharafieh, H., Mozaffari, M., Amirjan, M. and Mirakhorli, R., 2018. Investigating the possibility of the establishment of the two species of the genus *Atriplex* (*Atriplex canescens* and *Atriplex verrocifera* (and comparing their forage production in saline and low yield soils. Iranian Journal of Range and Desert Research, 25(4): 761-769.
– Guarino, C., Marziano, M., Tartaglia, M., Prigioniero, A., Postiglione, A., Scarano, P. and Sciarrillo, R., 2020. Poaceae with PGPR bacteria and arbuscular mycorrhizae partnerships as a model system for plant microbiome manipulation for phytoremediation of petroleum hydrocarbons contaminated agricultural soils. Agronomy Journal, https://doi.org/10. 547.10.3390/agronomy10040547.
– Gouda, A. H., El-Gendy, A. S., Abd El-Razek, T. M. and El-Kassas, H. I., 2017. Evaluation of phytoremediation and bioremediation for sandy soil contaminated with petroleum hydrocarbons. International Journal of Environmental Science and Development, 7: 826- 830.
– Khan, S., Hesham, AE-L., Qing, G., Shuang, L. and He, J., 2009. Biodegradation of pyrene and catabolic genes in contaminated soils cultivated with *Lolium multiflorum* L. Journal of Soils and Sediments, 9(5):482-91.
– Kord, B., Safikhani, F., Khademi, A. and Pourabbasi, S., 2018. Investigating the role of rangeland plants in remediation of soils contaminated with lead and zinc. Iranian journal of Range and Desert Reseach, 25(1): 78-88.
– Magdalena, P., Grażyna, A. and Zofia, P., 2016. Monitoring the changes in a bacterial community in petroleum-polluted soil bioaugmented with hydrocarbon-degrading strains. Applied Soil Ecology, 105: 76–85.
– Glick, B., 2010. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. Biotechnology Advances, 28(3): 67-74.
– Liu, S. H., Zeng, G. M., Niu, Q. Y., Liu, Y., Zhou, L., Jiang, L. H., Tan, X. F., Xu, P., Zhang, C. and Cheng, M., 2017. Bioremediation mechanisms of combined pollution of PAHs and heavy metals by bacteria and fungi: a mini review. Bioresource Technology, 224:25–33.
– McLean, E. O., 1982. Soil pH and lime requirement. Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties, (methodsofsoilan2). 199-224.
– Mokhtarian, N., Talaie, A. R., Jaafarzadeh, N., Talaie, M. R. and Beheshti, M., 2010. Producing biosurfactants from purified microorganisms

obtained from oil-contaminated soil. Journal of Water and Wastewater, 3: 20-27.
– Nelson, D. W., Sommers, L. E., Sparks, D. L., Page, A. L., Helmke, P. A., Loeppert, R. H. and Sumner, M. E., 1996. Total carbon, organic carbon, and organic matter. Methods of Soil Analysis: Part 3 Chemical Methods. 961-1010.
– Page, A. L., Miller, R. H. and Keeney, D. R., 1992. Method of Soil Analysis. Part 2 Chemical and Mineralogical Properties. 2nd. SSSA pub., Madison, Wis.
– Panchenko, L., Muratova, A. and Olga Turkovskaya, O., 2017. Comparison of the phytoremediation potentials of *Medicago falcata* L. And *Medicago sativa* L. in aged oil sludge-contaminated soil. Environmental Science and Pollution Research, 24: 3117–3130.
– Pawar, A. N., Ugale, S. S., More, M. G., Kokani, M. F. and Khandelwal, S. R., 2013. Biological degradation of naphthalene: A New Era. Journal of Bioremediation and Biodegradation, 4(7): 1-5.
– Rajaei, S. and Seyedi, S. M., 2018. Phytoremediation of Petroleum-Contaminated Soils by Vetiveria zizanioides (L.) Nash. Clean-Soil, Air and Water, 46 (8): 568-580.
– Richards, L. A., 1954. Diagnosis and improvement of saline and alkali soils. Soil Science, 78(2): 154.
– Schwartz, G., Ben-Dor, E. and Eshel, G., 2012. Quantitative analysis of total petroleum hydrocarbons in soils: comparison between reflectance spectroscopy and solvent extraction by 3 certified laboratories. Applied and Environmental Soil Science, DOI: 10.1155/2012/751956.
– Saraeian, Z., Haghighi, M., Etemadi, N., HajAbbasi, M. A. and Afyuni, M., 2018. Phytoremediation effect and growth responses of *Cynodon* spp. and *Agropyron desertorum* in a petroleum-contaminated soil. Soil and Sediment Contamination, An International Journal. 27(5): 393-407.
– Soleimani, M., Afyuni, M., Hajabbasi, M. A., Nourbakhsh, F., Sabzalian, M. R. and Christen, J. H., 2010. Phytoremediation of on aged petroleum contaminated soil using endophyte infected and non-infected grasses. Chemosphere, 81: 1084-1090.
– Valeria, D., Alaa, G. and Senesi, N., 2013. Phytoremediation of pyrene contaminated soils by different plant species. Clean - Soil, Air, Water, 41 (4): 377–382.
– Xiao, N., Liu, R., Jin, C. and Dai, Y., 2015. Efficiency of five ornamental plant species in the phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. Ecological Engineering., 75: 384–391.
– Yang, Y., Liu, Y., Li, Z., Wang, Z., Li, C. and Wei, H., 2020. Significance of soil microbe in microbial-assisted phytoremediation: an effective way to enhance phytoremediation of contaminated soil. International Journal of Environmental Science and Technology, 17(4): 2477–2484.

Investigation of simultaneous application of fertilization operations and use of native rangeland plants and bacteria in the removal of petroleum pollution from soil

R. Shirzadian Gilan[1], Y. Parvizi[2*], E. Pazira[3] and F. Rejali[4]

1-Ph.D. Student, Department of Soil Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2*-Corresponding author, Associate Professor, Department of Soil Conservation and Watershed Management, Agricultural and Natural Resources Research Center of Kermanshah, AREEO, Kermanshah, Iran, Email: yparvizi1360@gmail.com
3- Professor, Department of Soil Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
4- Associate Professor, Soil and Water Research Institute, AREEO, Tehran, Iran

Received:09/30/2020 Accepted:01/13/2021

Abstract

Soil pollution by petroleum hydrocarbon pollutants is one of the most important environmental problems in different parts of the world. In the oil-rich regions of the west of the country and recent years, the depreciation of the oil extraction and exploitation system has led to leakage and distribution of oil pollutants in the soil and biological resources of the region. This study aimed to investigate the potential use of native rangeland plants and the addition of bacteria, and the amount of appropriate fertilizer to reduce pollution of total petroleum hydrocarbons (TPHs) in the soil. The pot experiment was performed in the form of a factorial design with a completely randomized design (CRD) with four replications. Plant treatments included three native or compatible plants of *Medicago sativa*, *Agropyron trichophorum*, and *Atriplex canescens* and bacterial treatments included *Bacillus pumilus* (B1), *Pseudomonas putida* (B2), and the combined use of these two bacteria with fertilizer recommendation based on soil testing. Also, control treatment (no plant culture, no bacterial inoculation, and no fertilization) was applied. The results showed that *Medicago sativa*, with a 55.16% reduction in soil TPHs had better performance than other plants. Inoculation of B1 bacterium in interaction with *Medicago sativa* and *Agropyron trichophorum* by decomposing 56.19% of soil TPHs was more successful than B2. However, *Atriplex canescens* was more successful than B1 in interacting with B2 bacteria and decomposing 54.64% of soil TPHs. With full fertilizer recommendation, *Medicago sativa* and *Atriplex canescens* plants were most effective, with a 68.56% reduction in soil TPHs. In soil treatment without plant cultivation, B2 bacterium had the best performance along with fertilizer recommendation. Bacteria improve phytoremediation efficiency by improving metabolic activities and developing the root system, and ultimately increasing plant biomass. The results showed a significant effect of interaction between bacteria and plant type on plant shoot dry weight at the level of $\alpha = 0.01$.

Keywords: *Medicago sativa*, *Agropyron trichophorum*, *Atriplex canescens*, *Bacillus pumilus*, TPHs, Ultrasonic.