

## زیست‌پالایی خاک‌های آلوده به روغن موتور مصرف شده با استفاده از گیاه آلاله

### *Ranunculus arvensis* L. و برخی قارچ‌های ریزوسفری

فریبا محسن زاده\* و سودابه خدابنده لو

همدان، دانشگاه بوعلی سینا، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۹۶/۶/۸ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۱۶



#### چکیده

آلودگی خاک با روغن موتور مصرف شده (سوخته) مشکل مشترک اغلب کشورهای درحال توسعه و صنعتی است. زیست‌پالایی خاک‌های آلوده به روغن موتور، با استفاده از گیاهان و باکتریها و قارچ‌های تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی میسر است. پژوهش‌های پیشین نشان داده که برخی از گیاهان و قارچ‌ها نسبت به آلودگی با ترکیبات نفتی مقاوم هستند و در خاک‌های آلوده به نفت و مشتقات نفتی رشد می‌کنند. زیست‌پالایی آلودگی روغن موتور، با استفاده از گونه‌های قارچی و باکتریایی مقاوم به آلودگی انجام می‌شود. آلاله *Ranunculus arvensis* L. گیاهی است که از یک منطقه صنعتی تعمیرگاهی در شهر همدان جمع‌آوری شد. علاوه بر این، قارچ‌های میکوریزی همراه ریشه این گیاه نیز جمع‌آوری شد. نتایج نشان داد ۱۴ گونه قارچی در میکوریز این گیاه وجود دارد که ۸ تای آن با کلیدهای تاکسونومیک شناسایی شدند. در خاک‌های غیر آلوده ۸ گونه قارچی از ریزوسفر این گیاه جداسازی شد که ۴ مورد قابل شناسایی بود. آزمون زیست‌پالایی با استفاده از کشت گلدانی گیاه آلاله همراه با قارچ‌های میکوریزی نشان داد بیشترین عملکرد زیست‌پالایی مربوط به مجموعه کنسرسیوم قارچ و گیاه به میزان ۷۸٪ کاهش آلودگی است. موثرترین گونه‌های قارچی، قارچ‌های *Trichoderma harizana* و *Fusarium acuminatum* بودند که هر کدام به تنهایی به ترتیب موجب کاهش به میزان ۶۹ و ۵۷ درصدی آلودگی شدند. بر اساس نتایج ما گونه‌های قارچی نقش عمده در زیست‌پالایی خاک‌های آلوده به روغن موتور سوخته دارند.

واژه‌های کلیدی: روغن موتور سوخته، قارچ‌های ریزوسفری، زیست‌پالایی، آلاله

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۸۱۳۸۳۸۱۰۵۸، پست الکترونیکی: fmohsenzade@gmail.com

#### مقدمه

مورد توجه جدی قرار گرفته است (۹، ۲۱). مطالعات پیشین نشان داده که برخی گیاهان و میکروارگانیسمها نسبت به آلودگی فرآورده‌های نفتی مقاوم هستند و می‌توانند هیدروکربنهای نفتی را تجزیه و یا به سایر مواد تبدیل کنند (۱۰). از روش زیست‌پالایی برای حذف آلودگی خاک با نفت خام (۳۶، ۲۹، ۳۱، ۴، ۳) روغن موتور (۱۱) و گازوییل (۸) استفاده شده است. با توجه به اینکه در گیاه پالایی خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی، تجزیه زیستی ترکیبات توسط قارچ‌های همزیست ریشه گیاهان

آلودگی خاک با مشتقات نفتی به ویژه روغن موتور استفاده شده (روغن موتور سوخته) مشکل عمومی و رایج زیست‌محیطی در اغلب کشورها است (۲۱، ۲۲). روش‌های مختلفی برای پاکسازی خاک‌های آلوده وجود دارد که عبارتست از: شستشو، جابجایی خاک‌های آلوده. استفاده از شوینده‌ها و زیست‌پالایی (۱۶). زیست‌پالایی عبارتست از استفاده از گیاهان و میکروارگانیسمها برای حذف تجزیه و یا سم‌زدایی آلاینده‌های زیست‌محیطی که روشی کم‌هزینه و سازگار با محیط زیست است و در سال‌های اخیر

آن آلودگی واضح خاک با روغن موتور تخلیه شده از خودروها دیده می‌شود. در ناحیه آلوده پوشش گیاهی متشکل از چند گونه گیاهی مشاهده شد که گیاه آلاله *R. arvensis* مشخص‌ترین گیاه رویش یافته در خاکهای آلوده به روغن موتور بود.

**جداسازی قارچهای همزیست ریشه:** قطعات ریشه گیاه آلاله برداشت و به قطعات یک سانتی متری برش داده شد. قطعات ریشه با آب جاری شستشو داده شد و سپس در دمای آزمایشگاه به مدت ۲۴ ساعت هوادهی شد تا خشک شوند. قطعات ریشه به مدت ۵ دقیقه در محلول هیپو کلرید سدیم ۱٪ و سپس به همین مدت در اتانول ۷٪ قرار داده شدند تا میکروارگانیسمهای چسبیده به سطح قطعات ریشه حذف شوند. سپس قطعات ریشه با آب مقطر شستشو داده شد و پس از خشک شدن در پتری دیشهای حاوی محیط کشت *Potato Dextrose Agar* (PDA) دارای لاکتیک اسید قرار داده شدند. پتری دیشها به مدت چهار روز در دمای  $25 \pm 2$  در انکوباتور نگه داری شدند. بعد از چهار روز کلنی‌های رشد کرده جداسازی شد و هر کدام به صورت جداگانه و منفرد در محیط کشت PDA کشت داده شد. پس از رشد کلنی‌های ایزوله شده با استفاده میکروسکپ نوری خصوصیات ریشه و اندامهای زایشی قارچها به دقت مورد مطالعه قرار گرفت و با استفاده از ویژگی‌های ریختی و صفات تاکسونومیک و همچنین مراجعه به کتابهای مرجع (۱۷، ۳۵) گونه‌های قارچی مورد شناسایی قرار گرفت.

**ارزیابی حذف روغن موتور سوخته:** ۴۰ گلدان پلاستیکی با ۵۰ سانتی متر طول و ۴۰ سانتی متر قطر با ۴ کیلوگرم خاک زراعی استریل پر شد. گلدانها به ۱۰ گروه پنج تایی تقسیم شدند. گروه بندی گلدانها به شرح زیر بود:

۱) خاک استریل

۲) خاک استریل همراه با دو بوته گیاه آلاله

انجام می‌شود (۲۳، ۲۴، ۱۴)، سیستم ریشه ای گیاهان نقش مهمی بر عهده دارد. سیستم ریشه ای می‌تواند با ترشحات ویژه خود مواد لازم جهت رشد میکروارگانیسمها را تامین کند (۱۰، ۱۹) و یا با تغییر شرایط فیزیکی خاک عمل تجزیه را تسهیل نماید (۶).

Merkel و همکاران (۲۱) نشان دادند که برخی از گیاهان مناطق گرمسیری نه تنها نسبت به آلودگی ترکیبات نفتی مقاوم هستند بلکه در خاکهای آلوده به خوبی رشد می‌کنند و سیستم ریشه ای خود را توسعه می‌دهند یافته‌های مشابهی در مورد گیاهان مناطق معتدله و سردسیر نیز گزارش شده است (۲۲، ۲۳). همچنین گزارشهای متعددی در دسترس است که نشان می‌دهند برخی از گونه‌های قارچی می‌توانند در خاکهای آلوده به مشتقات نفتی به خوبی رشد کنند و در تجزیه زیستی نفت خام (۴، ۲۲، ۲۳). گازویل (۳، ۸) و روغن موتور مصرف شده (۱۱) موثر باشند.

مناطق متعدد زراعی و غیر زراعی در اغلب کشورها وجود دارد که خاک آنها آلوده به ترکیبات و فراورده‌های نفتی است که آلودگی با روغن موتور سوخته (مصرف شده) یکی از موارد مهم به شمار می‌رود (۲۲). هدف از پژوهش حاضر بررسی توان زیست‌پالایی گیاه آلاله *R. arvensis* رویش یافته در خاکهای آلوده به روغن موتور سوخته یک مجتمع تعمیرگاهی واقع در شهرستان همدان و قارچهای همزیست آن در تجزیه زیستی روغن سوخته و حذف این آلاینده زیست محیطی است.

## مواد و روشها

**جمع آوری گیاه مورد مطالعه:** منطقه مورد مطالعه یک مجتمع تعمیرگاهی خودوهای سنگین واقع در شهرستان همدان (استان همدان) است. تعمیرگاه گاراژی واقع در جنوب شهر همدان ابتدای جاده ملایر است که در آن تعمیرات کامیون و اتوبوس انجام می‌شود و در بخشی از

بخش باقیمانده با تراوزی آزمایشگاهی با دقت بالا توزین گردید. درصد روغن موتور باقیمانده با استفاده از وزن روغن باقیمانده نسبت به وزن روغن در ابتدای آزمایش محاسبه گردید.

**مطالعات آماری:** برای ارزیابی آماری داده‌های آزمایش و مقایسه گروه‌های آزمایشی با شاهد از آنالیز واریانس (ANOVA) یکطرفه و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن انجام شد. آنالیز آماری داده‌ها با نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام شد. هر داده به صورت میانگین حداقل سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار محاسبه گردید. نمودارها با نرم افزار Excell نسخه ۲۰۱۰ رسم گردید.

## نتایج

**نتایج جداسازی قارچ‌های همزیست ریشه:** قارچ‌های ریزوسفری (همزیست ریشه) گیاه آلاله رویش یافته در خاک‌های آلوده به روغن موتور جداسازی و بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و کلیدهای تاکسونومی مورد شناسایی قرار گرفتند. حدود چهارده گونه قارچی همزیست ریشه گیاه آلاله جداسازی شد که شناسایی فقط هشت گونه با روش‌های متداول (کلیدهای تاکسونومیک) میسر گشت (جدول ۱). گونه‌های شناسایی شده عبارتند از:

*Alternaria alternata*, *Cladosporium* sp., *Fusarium acuminatum*, *F. equiseti*, *F. reticulatum*, *Penicillium* sp., *Rhizoctonia* sp. and *Trichoderma harzianum*

از ریشه گیاهان آلاله رویش یافته در خاک‌های غیر آلوده نیز ۸ گونه قارچی جداسازی شد که فقط ۴ گونه قارچی با استفاده از روش‌های متداول تاکسونومیک شناسایی گردید. این گونه‌ها عبارتند از:

*Alternaria alternate*, *Penicillium* sp., *Rhizoctonia* sp. and *Trichoderma harzianum*

**نتایج زیست‌پالایی:** بعد از دو ماه آزمون‌های زیست‌پالایی با استفاده گیاه آلاله و قارچ‌های همزیست ریشه آن، غلظت

۳) خاک استریل + قارچ *Alternaria* sp

۴) خاک استریل + قارچ *Alternaria* sp + دو بوته گیاه آلاله

۵) خاک استریل + قارچ *Trichoderma harzianum*

۶) خاک استریل + قارچ *Trichoderma harzianum* + دو بوته گیاه آلاله

۷) خاک استریل + قارچ *Fusarium acuminatum*

۸) خاک استریل + قارچ *Fusarium acuminatum* + دو بوته گیاه آلاله

۹) خاک استریل + هر سه قارچ فوق

۱۰) خاک استریل + هر سه قارچ فوق + دو بوته گیاه آلاله

همه گلدانها با ۱۰٪ وزنی روغن موتور سوخته (مصرف شده) خودروها آلوده شدند. همه گلدانها در شرایط یکسان به مدت دو ماه نگهداری شدند که عبارتست از دمای روزانه حدود ۲۷ درجه سانتیگراد. رطوبت ۷۰٪ و روشنایی ۱۶ ساعت در روز. نمونه برداری هر ۱۰ روز یکبار از خاک گلدانها از عمق ۵ سانتی متری به مقدار ۱۰ گرم انجام گرفت. نمونه‌ها در کیسه‌ای پلاستیکی ریخته شد و در یخچال نگهداری شدند.

**اندازه‌گیری مقدار روغن موتور در خاک:** اندازه‌گیری

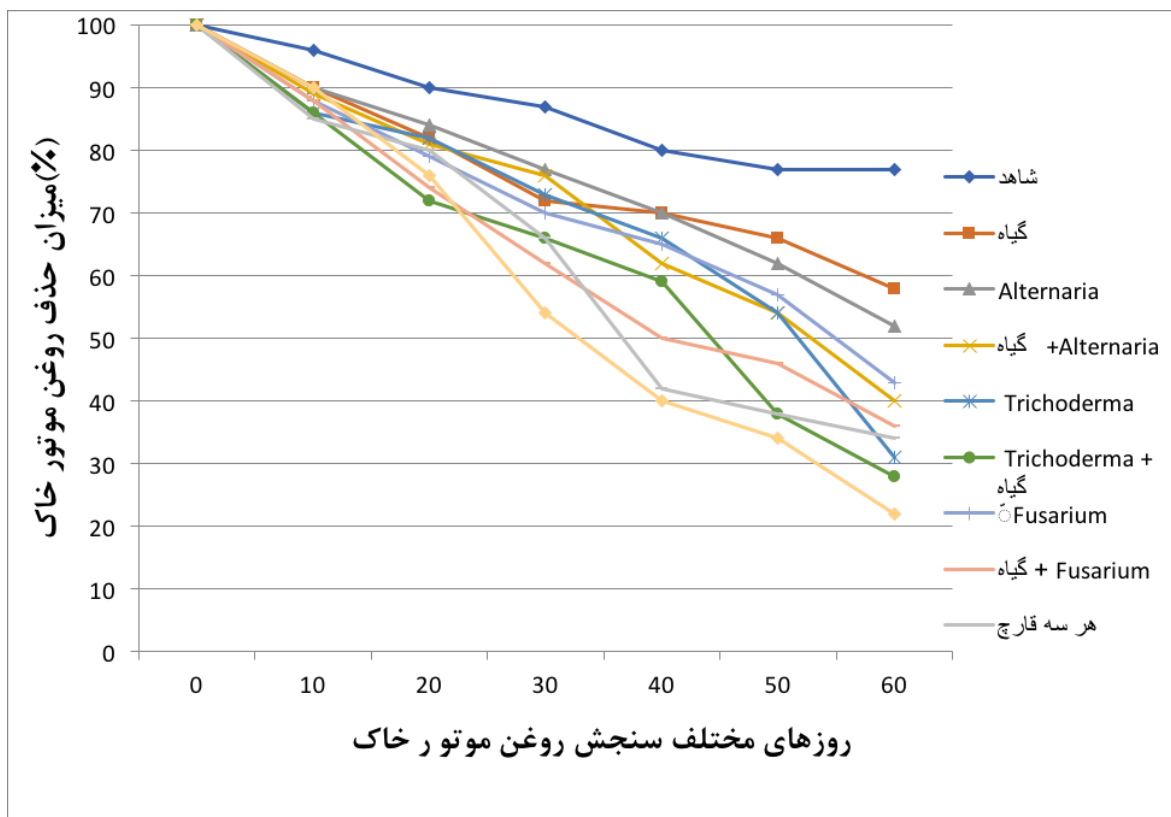
مقدار روغن موتور باقیمانده در خاک بر اساس روش EPA 9071 A و EPA 3540 B انجام شد (۳۳). مقدار ۵ گرم از خاک هر نمونه با اسید کلریدریک ۱ نرمال اسیدی شد تا pH آن به ۲ رسید و سپس با استفاده از سولفات منیزیم (۵/۲ گرم) به مدت ۱۵ دقیقه آب‌گیری شد. نمونه خاکها در چند لایه کاغذ صافی بسته بندی شد و در دستگاه سوکسوله قرار داده شدند. استخراج روغن موتور با استفاده از ۲۵ میلی لیتر دی کلرومتان به مدت ۸ ساعت انجام شد. بخش استخراج شده با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۴ صاف شد. حلال با استفاده از دستگاه تبخیر کننده روتاری (Rotary evaporator) تبخیر شد و

تیمار کاهش یافته است اما این کاهش در گلدانهای تحت تیمار بسیار بیشتر بود (شکل ۱).

روغن موتور خاک در گلدانهای شاهد و تحت تیمار اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که میزان آلودگی خاک به روغن موتور در طی آزمایش در همه گلدانهای شاهد و تحت

جدول ۱- مقایسه جمعیت‌های قارچی همراه ریشه *Ranunculus arvensis* در خاکهای آلوده به روغن موتور مصرف شده و غیر آلوده

قارچهای ناحیه غیر آلوده	قارچهای ناحیه آلوده
<i>Alternaria alternate</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>Rhizoctonia</i> sp. and <i>Trichoderma harzianum</i> and 4 others	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Cladosporium</i> sp., <i>Fusarium acuminatum</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. reticulatum</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>Rhizoctonia</i> sp., <i>Trichoderma harzianum</i> and 6 others



شکل ۱- میزان حذف زیستی روغن موتور استفاده شده (بر حسب) از خاکهای آلوده به روغن موتور با استفاده از گیاه آلاله و برخی از قارچهای همزیست ریشه. در ابتدای آزمایش همه گروهها دارای آلودگی با روغن موتور به میزان ۱۰٪ بودند. نتایج نشان داد که آلودگی خاک با روغن موتور با زیست پالایی حذف شده است. بیشترین حذف نتیجه عملکرد کنسرسيوم قارچ- گیاه بوده است (۷۸٪). در همه گروههای تیماری کاهش معنی دار درصد آلودگی با روغن موتور نسبت به گروه شاهد مشاهده شد ( $P \leq 0.01$ ). هر داده میانگین حداقل سه تکرار است. به علت جلوگیری از شلوغی بیش از حد شکل انحراف معیار نمودارها حذف شده است.

روز اول آزمایش روند کاهش مقدار روغن موتور خیلی کند و آرام است (شکل ۱). بیشترین مقدار کاهش مربوط به روزهای ۲۰ الی ۴۰ است. بعد از ۴۰ روز کاهش مقدار

بیشترین کاهش غلظت روغن موتور خاک مربوط به گروه تیماری گلدانهای دارای گیاه آلاله همراه با هر سه قارچ مورد آزمون بود. این مقدار کاهش در پایان آزمایش ۷۸٪ اندازه گیری شد. نمودار تهیه شده نشان می‌دهد که در ۲۰

روغن موتور سوخته دارد که علت آن می‌تواند پیچیدگی بیشتر ترکیبات شیمیایی مواد تشکیل دهنده نفت خام نسبت به روغن موتور باشد (۱۴). وجود غلظت‌های بالای فلزات سنگین در نفت خام یکی دیگر از دلایل احتمالی است (۲۴). کاهش رشد و مسمومیت گیاهان تحت تیمار آلودگی نفتی در برخی از گیاهان گزارش شده است که عبارتند از: *Festuca rubra* و *Puccinellia maritime* (۵)، *Trifolium* (۱۹). همچنین گزارش شده که برخی گراس‌ها و بقولات کاملاً به آلودگی با ترکیبات نفتی مقاوم هستند و در حذف آلودگی نیز موثر می‌باشند (۲۱، ۳۰).

قارچ‌های همزیست ریشه گیاه آلاله رویش یافته در خاک‌های آلوده به روغن موتور سوخته جمع‌آوری، جداسازی و با روش‌های متداول تاکسونومیک مورد شناسایی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در ریزوسفر گیاهان رشد کرده در خاک‌های آلوده به روغن موتور سوخته ۱۴ جدایه قارچی وجود دارد که ۸ جدایه آن با کلیدهای تاکسونومیک شناسایی شد که عبارتند از:

*Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium acuminatum*, *F. equiseti*, *F. reticulatum*, *Penicillium* sp., *Rhizoctonia* sp. and *Trichoderma harzianum*.

در حالیکه در ریزوسفر گیاهان آلاله رویش یافته در خاک‌های غیر آلوده به روغن موتور فقط ۸ سویه قارچی جداسازی شد و چهار مورد با روش‌های تاکسونومیک شناسایی گردید. مفهوم نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که در خاک‌های آلوده به روغن موتور غنای گونه‌های قارچی همزیست ریشه بیشتر از خاک‌های غیر آلوده است. این یافته با برخی از پژوهش‌های پیشین در مورد سایر ترکیبات نفتی و نفت خام همسویی دارد (۶، ۱۸، ۳۴). گزارش مشابهی در مورد افزایش جمعیت و تنوع باکتری‌های بی‌هوازی در ریزوسفر ریشه آفتاب‌گردان و جو دوسر و همچنین افزایش جمعیت باکتری‌های هوازی در ریزوسفر جو دوسر گزارش شده است (۲). علت احتمالی آن می‌تواند استفاده قارچ‌ها از مواد آلی موجود در روغن موتور به عنوان مواد

آلودگی روغن موتور روند کندتری به خود می‌گیرد اما هنوز چشمگیر و قابل توجه بود (شکل ۱).

در گروه‌های تیماری گلدانهای حاوی قارچ بیشترین کاهش مقدار روغن موتور سوخته مربوط به دو قارچ *Trichoderma harzianum* و *Fusarium acuminatum* بود که به ترتیب موجب کاهش ۵۷ درصدی و ۶۹ درصدی آلودگی روغن موتور شدند. در مورد گروه‌های تیماری با قارچ (بدون گیاه) نیز مشاهده شد که روند کاهش در ۲۰ روز اول بسیار کند است اما بعد از ۲۰ روز روند حذف روغن موتور شدت می‌گیرد. افزایش روند حذف روغن موتور در گروه‌های تحت تیمار قارچ نسبت به گروه تحت تیمار قارچ همراه با گیاه آهسته‌تر بود (شکل ۱).

در گروه تحت تیمار گیاه آلاله بدون قارچ‌های همزیست کاهش آلودگی خاک با روغن موتور مشاهده شد (شکل ۱). در این گروه تیماری روند حذف آلودگی روغن موتور یک روند نسبتاً ثابتی بود و از الگوی حذف روغن موتور توسط قارچ‌ها پیروی نمی‌کرد.

## بحث

آلودگی با ترکیبات نفتی مشکل عمده زیست محیطی در بسیاری از کشورها است (۲۰). آلودگی با ترکیبات مشتق از نفت موجب اثرات سوء بر سلامت انسان و سایر موجودات زنده است (۲۶). نتایج این پژوهش نشان داد که آلودگی با روغن موتور سوخته تا غلظت ۱۰٪، گیاه مورد پژوهش (آلاله) و قارچ‌های همزیست ریشه آن را آسیب نمی‌زند. بر اساس گزارشات پیشین، برخی از گیاهان تیره بقولات و گراس‌ها قادرند آلودگی خاک با نفت خام را تا میزان ۵٪ تحمل کنند و در این آلودگی به رشد و نمو خود ادامه دهند (۱۹، ۳۶). یافته‌های پژوهش حاضر تحمل غلظت‌های بالاتر آلودگی روغن موتور سوخته (۱۰٪) را نسبت به نفت خام نشان داد که مفهوم آن این است که نفت خام مسمومیت بیشتر و اثرات سوء بیشتری نسبت به

آلودگی روغن موتور روند کندتری به خود می‌گیرد اما هنوز چشمگیر و قابل توجه است (شکل ۱). می‌توان علت این پدیده را مربوط به روند رشد میکروارگانیسمها دانست (۲۴، ۳۴). به این معنی که در بیست روز اول قارچهای ریزوسفری در حال رشد و تکثیر هستند و به همین دلیل کارایی کمی در تجزیه زیستی و زیست‌پالایی روغن موتور سوخته دارند. پس از آن تجزیه زیستی و زیست‌پالایی شتاب می‌گیرد و پس از مدتی به این علت که رشد قارچها کاهش می‌یابد و جمعیت آنها در محیط به حالت حداکثری در می‌آید فرایند تجزیه زیستی و زیست‌پالایی با سرعت تقریباً ثابتی ادامه می‌یابد (شکل ۱).

در گروههای تیماری حاوی قارچ بیشترین کاهش به دو قارچ *Trichoderma harziana* و *Fusarium equiseti* بود که به ترتیب موجب کاهش ۶۹ درصدی و ۵۷ درصدی آلودگی روغن موتور شدند. در مورد گروههای تیماری با قارچ (بدون گیاه) نیز مشاهده شد که روند کاهش در ۲۰ روز اول بسیار کند است اما بعد از ۲۰ روز روند حذف روغن موتور شدت می‌گیرد. افزایش روند حذف روغن موتور در گروههای تحت تیمار قارچ نسبت به گروه تحت تیمار قارچ همراه با گیاه آهسته تر بود (شکل ۱). علت این پدیده را می‌توان نقش هم‌افزایی میانکنش گیاه - میکروارگانیسم در فرایند تجزیه زیستی ترکیبات موجود در روغن موتور سوخته دانست (۲۱، ۱۱). به این معنی که گیاه، مواد غذایی لازم برای رشد قارچها و ترکیبات محرک رشد آنها را ترشح می‌کند (۲۱، ۳۱). از طرف دیگر سیستم ریشه ای گیاه با تسهیل هوارسانی به خاک اکسید شدن ترکیبات فوق توسط قارچها را افزایش می‌دهد (۲۲). اما عمل اصلی تجزیه بر عهده قارچها است.

بر اساس نتایج پژوهش حاضر و گزارشات پیشین می‌توان گفت زیست‌پالایی ترکیبات با پایه نفتی، علاوه بر باکتریها (۱۰) به طور عمده نتیجه تجزیه زیستی توسط ریزوسفر گیاهان است و قارچهای موجود در ریزوسفر گیاهان یکی

غذایی و منبع کربن باشد (۲۴) و یا دخالت قارچهای ریزوسفری در کاهش تنش آلودگی خاک با روغن موتور باشد که مورد اخیر در مورد سایر آلاینده‌ها از جمله فلزات سنگین نیز گزارشات مشابهی در دست است (۷). افزایش تنوع در قارچهای ریزوسفری و همچنین میزان رشد قارچها در محیطهای آلوده با ترکیبات نفتی و نفت خام گزارش شده است (۱۳، ۱۲، ۲۳، ۲۷، ۲۴). بررسیهای چندی نیز نشان داده افزایش قارچهای ریزوسفری در گیاهان یک مکانیسم تدافعی و مقاوت به تنشهای محیطی از جمله تنش شوری است (۱).

بعد از دو ماه آزمونهای زیست‌پالایی با استفاده از گیاه آلاله و قارچهای همزیست ریشه آن، غلظت روغن موتور خاک در گلدانهای شاهد و تحت تیمار اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که میزان آلودگی خاک به روغن موتور در طی آزمایش در همه گلدانهای شاهد و تحت تیمار کاهش یافته است اما این کاهش در گلدانهای تحت تیمار بسیار بیشتر بود (شکل ۱). کاهش میزان روغن موتور سوخته در خاک گلدانهای شاهد را می‌توان نتیجه تبخیر مواد تشکیل دهنده روغن موتور خام در نظر گرفت که در مطالعات پیشین نیز به آن اشاره شده است (۲۲، ۲۳). با توجه به اینکه کاهش آلودگی با روغن موتور سوخته به طور معنی‌داری ( $P \leq 0.05$ ) در گروههای تیماری از گروه شاهد بیشتر است می‌توان نتیجه‌گیری کرد که فرایند زیست‌پالایی با استفاده از گروههای تیماری، در پژوهش حاضر موفق عمل کرده است.

بیشترین کاهش غلظت روغن موتور خاک مربوط به گروه تیماری گلدانهای دارای گیاه آلاله همراه با هر سه قارچ مورد آزمون بود. این مقدار کاهش در پایان آزمایش ۷۸٪ اندازه‌گیری شد. نمودار تهیه شده نشان می‌دهد که در ۲۰ روز اول آزمایش روند کاهش مقدار روغن موتور خیلی کند و آرام است (شکل ۱). بیشترین مقدار کاهش مربوط به روزهای ۲۰ الی ۴۰ است. بعد از ۴۰ روز کاهش مقدار

ریزوسفری موجب بالاترین راندمان حذف روغن موتور سوخته (۷۸ درصد) از خاک شد.

### تقدیر و تشکر

این پژوهش با استفاده از گرنت پژوهشی ارایه شده توسط معاونت پژوهشی دانشگاه بوعلی سینا انجام شده است و نویسندگان از حمایت‌های مالی و امکانات فراهم شده توسط این معاونت محترم تشکر می‌نمایند.

از مهمترین عوامل به شمار می‌رود (۱۴ و ۲۸). نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که قارچ‌های مورد مطالعه قادر به تجزیه زیستی و حذف روغن موتور سوخته از خاک هستند و بیشترین راندمان مربوط به قارچ *Trichoderma* می‌باشد (۵۷٪ کاهش آلودگی) و نتایج همچنین نشان داد گیاه آلاله نیز قادر به حذف روغن موتور سوخته است و راندمان کاهش آلودگی خاک طی دو ماه آزمایش زیست‌پالایی ۴۲ درصد است. بر اساس داده‌های حاصله، در این پژوهش، استفاده توأم از گیاه آلاله همراه با قارچ‌های

### منابع

- ۱- حاجی بلند، ر.، دشتبانی، ف.، اصغر زاده، ن. ع. (۱۳۹۶). جوانه‌زنی، فتوسنتز و رشد دو گونه هالوفیت پوکسنلیا دیستانس و آلوروپوس لیتورالیس تحت شرایط شوری و همزیستی آن‌ها با قارچ‌های میکوریز آربوسکول‌دار در شرایط طبیعی زیستگاه در دشت تبریز. *مجله پژوهش‌های گیاهی*، جلد ۳۰ (۴): ۷۶۴-۷۷۵.
- ۲- کیارستمی، خ.، غفاری رهبر، ف.، روانبخش، ش. (۱۳۹۲). مطالعه رشد و واکنش دفاعی ریشه گیاهان در خاک‌های آلوده به نفت. *مجله پژوهش‌های گیاهی*، جلد ۲۶ (۴): ۵۰۹-۵۰۰.
- ۳- محسن زاده، ف. (۱۳۹۶). بررسی قابلیت تجزیه زیستی برخی از فراورده‌های نفتی توسط باکتری‌های بومی ریزوسفر گیاهان. *مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی*. جلد ۳۰ (۱): ۱۳۶-۱۵۲.
- ۴- محسن زاده، ف.، ظفری، د.، نوری صفا، ب. (۱۳۹۵). سازش پذیری برخی از گونه‌های قارچ تریکودرما (*Trichoderma*) به آلودگی نفتی. *مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی*. جلد ۲۹ (۳): ۳۳۰-۳۳۱.
- 5-Alrumman, S.A, Standing, D.B. and Paton, G.I. 2015. Effects of hydrocarbon contamination on soil microbial community and enzyme activity. *J. King Saud Univ. Sci.* 27: 31-41.
- 6-Anderson, T.A., E.A. Guthrie, and B.T. Walton. 1993. Bioremediation in the rhizosphere-plant roots and associated microbes clean contaminated soils. *Environmental Science and Technology* 27: 2630-2636.
- 7-Baker, J.M. 1999. The effect of oils on plants. *Environmental Pollution* 1: 27-44.
- 8-Chaineau, C.H., J.L. More, and J. Oudot. 2000. Biodegradation of fuel oil hydrocarbons in the rhizosphere of maize. *Journal of Environmental Quality* 29: 568-578
- 9-Chehregani, A., F. Mohsenzadeh, F. Vaezi. 2008. Introducing a new metal accumulator plant and the evaluation of its ability in removing heavy metals. *Toxicological and Environmental Chemistry* 91: 1105-1114
- 10-Cunningham, S.D., T.A. Anderson, P.A. Schwab, and F.C. Hsu. 1996. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Advanced Agronomy* 56: 44-114
- 11-Dominguez-Rosado, E., and J. Pichtel. 2004. Phytoremediation of soil contaminated with used motor oil: II. Greenhouse studies. *Environmental Engineering Science* 21: 169-180
- 12-Dritsa V, F. Rigas, K. Natsis, and R. Marchant. 2007. Characterization of a fungal strain isolated from a polyphenol polluted site. *Bioresource Technology* 98: 1741-1747
- 13-Eggen, T., A. Majcherczyk. 1998. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in contaminated soil by white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *International Journal of Biodeterioration and Biodegradation* 4: 111-117
- 14-Frick, C.M., R.E. Farrell, and J.J. Germida. 1999. "Assessment of phytoremediation as an *in-situ* technique for cleaning oil-contaminated sites". Petroleum Technology Alliance Canada, Calgary.
- 15-Friedrich, J., P. Zalar, M. Mohorcic, U. Klun, and A. Krzan. 2007. Ability of fungi to degrade synthetic polymer nylon-6. *Chemosphere* 67: 2089-2095
- 16-Garcia, M.A., L.Y. Yanez-Trujillo, J.A. Zermeno-Eguia Liz, and M. Gutierrez-Rojas.

2000. Diagnostic and resulting approaches to restore petroleum-contaminated soil in a Mexican tropical swamp. *Water Science and Technology* 42: 377-384
- 17-Gilman, J.C. 1998. "A manual of soil fungi". Daya Publishing House. USA.
- 18-Hashem, A.R. 2007. Bioremediation of petroleum contaminated soils in the Arabian Gulf region: A review. *Journal of Kuwait Science* 19: 81-91
- 19-James, G.S., and K.A. Karuna. 2012. "Bioremediation of Petroleum and Petroleum Products". Wiley. USA.
- 20-Klokk, M. 1984. Effects of oil pollution on the germination and vegetative growth of five species of vascular plant. *Oil and Petrochemical Pollution* 2: 25-30
- 21-Merkel, N., R. Schultze-Kraft, and C. Infante. 2004b. Phytoremediation of petroleum-contaminated soils in the tropics- Preselection of plant species from eastern Venezuela. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 78: 185-192
- 22-Mohsenzade, F., S. Nasser, A. Mesdaghinia, R. Nabizadeh, D. Zafari, and A. Chehregani. 2009a. Phytoremediation of petroleum-contaminated soils: pre-screening for suitable plants and rhizospheric fungi. *Toxicological and Environmental Chemistry* 91: 1105-1114
- 23-Mohsenzadeh, F., S. Naseri, A. Mesdaghinia, R. Nabizadeh, A. Chehregani, and D. Zafari. 2009b. Identification of petroleum resistant plants and rhizospheric fungi for phytoremediation of petroleum contaminated soils. *Journal of Japan Petroleum Institute* 52: 198-204
- 24-Mohsenzadeh, F., and Z. Shirkhani. 2016. Removing of crude oil from polluted areas using the isolated fungi from Tehran oil refinery. *Soil and Sediment Contamination* (Online published).
- 25-Nelson, P.E., T.A. Tousooun, and W.F.O. Marasas. 1983. "Fusarium species: An Illustrated manual for identification". The Pennsylvania State University Press. USA.
- 26-Nicolotti, G., and S. Egli. 1998. Soil contamination by crude oil: impact on the mycorrhizosphere and on the revegetation potential of forest trees. *Environmental Pollution* 99: 37-43
- 27-Obuekwe, C.O., A.M. Badrudeen, E. Al-Saleh, and J.L. Mulder. 2005. Growth and hydrocarbon degradation by three desert fungi under conditions of simultaneous temperature and salt stress, *International Journal of Biodeterioration and Biodegradation* 56: 197-206
- 28-Orji, F.A., A.a. Iblene, and E.N. Dike. 2012. Laboratory scale bioremediation of petroleum hydrocarbon- polluted mangrove swamps in the Niger Delta using cow dung. *Malaysian Journal of Microbiology* 8: 219-228.
- 29-Radwan, S.S., H. Al-Awadhi, N.A. Sorkhoh, and I.M. El-Nemer. 1998. Rhizospheric hydrocarbon-utilizing microorganisms as potential contributors to phytoremediation for the oily Kuwait desert. *Microbiological Research* 153: 247-251
- 30-Schroder, P., P.J. Harve, and J.P. Schwitzguebel. 2002. Prospects for the phytoremediation of organic pollutants in Europe. *Environmental Science and Pollution Research* 9: 1-3
- 31-Thapa, B., K.C. Ajay-Kumar, and A. Ghimire. 2012. A review on bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil. *Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology* 8: 164-170.
- 32-Ulfig, K., G. Plaza, A. Worsztynowicz, T. Manko, A.J. Tien, and R.L. Brigmon. 2003. Keratinolytic fungi as indicators of hydrocarbon contamination and bioremediation progress in a petroleum refinery. *Polish Journal of Environmental Studies* 12: 245-250
- 33-US EPA. 1994. United States Environmental Protection Agency Quality Assurance Management Staff, Washington, DC 20460.
- 34-Uzman, D.H., A.M. Ibrahim, S. and Abdullahi. 2012. Potentials of bacterial isolates in bioremediation of petroleum refinery wastewater. *Journal of Applied phytotechnology in Environmental Sanitation* 1: 131-138.
- 35-Watanabe, T. 2002. Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphology and key to species. 2<sup>nd</sup> Ed. CRC Press
- 36-Wiltse, C.C., W.L. Rooney, Z. Chen, A.P. Schwab, and M.K. Banks. 1998. Greenhouse evaluation of agronomic and crude oil-phytoremediation potential among alfalfa genotypes. *Journal of Environmental Quality* 27: 169-173.



## Bioremediation of used engine-oil polluted soils with *Ranunculus arvensis* L. plant and its root associated fungi

Mohsenzadeh F. and Khodabandelou S.

Biology Dept., Faculty of Sciences, Bu-Ali Sina University, Hamedan, I.R. of Iran

### Abstract

Pollution of soils with used-engine oil is a common problem in both developmental and industrial countries. Previous researches showed that some resistant plants and their root associated fungal strains can grow in petroleum and its derivate polluted soils. Bioremediation of engine oil contamination of soils is based on the stimulation of petroleum hydrocarbon-degrading fungal and microbial communities. *Ranunculus arvensis* L. (Ranunculaceae) is one of these that collected from an industrial garage in Hamedan. Root-associated fungi of the plant were determined, showing the presence of 16 species of which 8 were determined taxonomically. Eight fungal strains were also found in non-polluted soils that four ones were determined taxonomically. Bioremediation tests with *R. arvensis*, with and without the fungal strains, showed that joint application of the plant and its root associated fungal strains was more effective than of the plant and the fungi separately. The most effective fungal strains were *Fusarium acuminatum* and *Trichoderma harizana* with removing 57 and 69% decreasing respectively. Based on the results, the fungal strains had the main role in bioremediation of engine oil-polluted soils.

**Key words:** Used engine oil, Rhizospheral fungi, Bioremediation, *Ranunculus arvensis*