

مطالعه آزمایشگاهی حذف زیستی بنزن و تولوئن با استفاده از دو قارچ *Aspergillus terreus* و *Exophiala xenobiotica*

محمدسعید محمدی، بهروز میرزایی*

گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی مهندسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

مهدی داوری

گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

چکیده: در جهان رو به رشد امروز، صنایع بزرگی مانند نفت، گاز و پتروشیمی، تعیین کننده حیات و گردش اقتصادی دنیا محسوب می شوند، ولی از مهم ترین مشکل های این صنایع، آلودگی بیش از حد و در نتیجه، اثر سوء بر روی محیط زیست می باشد. در این پژوهش، امکان حذف دو آلاینده ی مهم نفتی یعنی بنزن و تولوئن برای اولین بار به کمک دو قارچ بومی نوین جداسازی شده از خاک آلوده به نفت به نام *Aspergillus terreus* و *Exophiala xenobiotica* در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. چهار عامل مؤثر بر فرایند حذف شامل دما، زمان، غلظت و pH مورد مطالعه قرار گرفت. نتیجه ها نشان داد که بیشترین جذب آلاینده در دمای ۲۵ درجه ی سلسیوس، زمان تماس ۱۰ روز کامل برای قارچ *A. terreus* و ۲۵ روز کامل برای قارچ *E. xenobiotica*، همچنین غلظت ۵ mL/L از هر دو آلاینده و pH=۷ رخ می دهد. در مقایسه قدرت حذف کنندگی دو قارچ با یکدیگر، مشخص شد که برای آلاینده بنزن زمانی که اثر غلظت، زمان تماس قارچ با آلاینده و دما بررسی شدند، قارچ *E. xenobiotica* و زمانی که اثر pH بررسی شد، قارچ *A. terreus* عملکرد بهتری در جذب آلاینده از محیط کشت از خود نشان می دهد. در مقابل، برای آلاینده تولوئن در بررسی هر چهار عامل یاد شده، عملکرد قارچ *A. terreus* بهتر بود. به طور کلی بر اساس نتیجه های به دست آمده در شرایط بهینه هر چهار پارامتر، قارچ *A. terreus* برای آلاینده بنزن با درصد حذف ۶۸/۳۵ و برای آلاینده تولوئن با درصد حذف ۸۴/۲۷ بهترین عملکرد را داشت.

واژگان کلیدی: حذف زیستی، بنزن، تولوئن، *Aspergillus terreus*، *Exophiala xenobiotica*

KEYWORDS: Bioremediation, Benzene, Toluene, *Aspergillus terreus*, *Exophiala xenobiotica*.

مقدمه

عامل هایی مانند دفع و دورریز نامناسب پساب ها و دورریزهای مرکزهای صنعتی مربوطه مانند پالایشگاه ها و پتروشیمی ها، وارد محیط زیست شوند [۱]. بخشی از آلاینده ها به ویژه بخشی که از نظر

رشد روز افزون فعالیت های صنعتی از یک سو و رعایت نکردن الزام های زیست محیطی از سوی دیگر، سبب شده است تا در چند دهه اخیر، بخش عظیمی از آلاینده های هیدروکربنی به واسطه

*Email: mirzayib@uma.ac.ir

* عهده دار مکاتبات

جذب سطحی، تبدیل کاتالیستی، جذب با نانومواد، تجربه گرمایی، اصلاح شیمیایی و... از سرعت جذب پایینی برخوردار است، ولی از نقاط قوت این روش می توان به استفاده از میکروارگانسیم های بومی و مفید در هر مکان اشاره نمود که با هزینه کم در دسترس قرار می گیرند و بدون هیچ نوع اثر مخرب زیست محیطی برای حذف آلاینده ها، به کار گرفته می شوند [۱۷، ۱۸].

شیردام^۶ و همکاران در سال ۲۰۰۹ میلادی، گونه های *Exophiala* را که تجزیه کننده نفت و ترکیب های آروماتیک چند حلقه ای (PAHs^۷) است، از خاک آلوده نفتی جداسازی و تأثیر شرایط محیطی مانند pH، دما، غلظت و زمان را بر روی تجزیه هیدروکربن ها (روغن دیزل، نفتالین و فناترن) مورد بررسی قرار دادند. نتیجه های آن ها نشان داد که این قارچ ها قادر به حذف ۹۸/۲۵ درصد روغن دیزل، ۹۹/۱۴ درصد نفتالین و ۱۷/۵ درصد فناترن در دمای ۳۰ درجه سلسیوس، pH برابر با ۷ و غلظت اولیه ۰/۱ درصد هیدروکربن در مدت ۲۵ روز می باشند [۱۰]. برنوار^۸ و همکاران در سال ۲۰۱۴ میلادی، سه نوع قارچ بومی *Penicillium Trichosporon* و *Fusarium* را که قادر به تجزیه کل کربن آلی (TOC^۹) بودند، از لجن نفتی پالایشگاه نفت جداسازی کردند. این سه قارچ در نوع و غلظت متفاوت بودند و در دمای ۲۷ درجه سلسیوس و ۳۳ درجه سلسیوس رشد داده شده بودند [۱۹]. یولی یانتو^{۱۰} و همکاران در سال ۲۰۱۳ میلادی به بررسی چگونگی حذف آسفالتین از خاک با استفاده از قارچ *Pestalotiopsis sp. NG007* پرداختند. آن ها برای حذف آسفالتین نخست چند قارچ را مورد بررسی قرار دادند و بهترین قارچ برای این کار را جنس قارچی *Pestalotiopsis* معرفی کردند [۲۰]. لورس^{۱۱} و همکاران در سال ۲۰۱۲ میلادی به مقایسه بین فرایند زیست پالایی PAH بین دو مقیاس آزمایشگاهی و صنعتی پرداخته و نشان دادند که نرخ نسبی تخریب حلقه های آروماتیک با تعداد حلقه ها معادله وارون دارد. همچنین آن ها به بررسی تخریب حلقه های آروماتیک و چگونگی تجزیه آن ها به آلکان های زنجیره ای یا ترکیب های آروماتیک کم خطرتر پرداختند [۲۱]. وقبو^{۱۲} در سال ۲۰۰۹ میلادی برخی گونه های جنس قارچی *Aspergillus* را از خاک های آلوده نفت جداسازی کردند. این سویه توانست مقدار ۱ درصد حجمی از نفت خام را در مدت ۱۰ روز

ساختاری شبیه به ترکیب های طبیعی هستند، سریعاً توسط میکروارگانسیم های موجود در خاک، آب و یا تحت تأثیر عامل های فیزیکی و زیستی تجزیه و حذف می شوند، ولی بخش بزرگی از آن که دارای ساختارهای جدید، پایدار و به خصوص حلقوی می باشند، به کندی تجزیه می شوند و یا در موردهای این تجزیه به قدری کند صورت می گیرد که در عمل غیر قابل تجزیه به شمار می آیند [۲، ۳]. سازمان محیط زیست آمریکا، ۱۶ مورد از هیدروکربن های آروماتیک حلقوی را به عنوان آلاینده، معرفی کرده است که هشت مورد از این هیدروکربن ها سرطان زا بوده و در محیط فراوان هستند [۴]. هیدروکربن های آروماتیک حلقوی به دلیل داشتن ضریب تفکیک^۲ بالا، می توانند روی سطح ذره های جذب شده و در محیط خاک رسوب کنند و همچنین دارای خاصیت آب گریزی بالایی بوده و مقاومت زیادی در محیط از خود نشان می دهند. این هیدروکربن ها شامل دو یا تعداد بیش تری از حلقه های بنزنی هستند که به شکل های خطی، گوشه ای و خوشه ای به هم دیگر متصل شده اند [۵، ۶]. از مواد آروماتیکی مهم در نفت می توان به بنزن، تولوئن و زایلین اشاره نمود [۷]. زنجیره های اشباع نشده ساخته شده از آروماتیک های C₆، C₇ یا C₈ (بنزن، تولوئن، زایلین) مهم ترین منابع زیرساختی برای صنایع پتروشیمی محسوب می شوند [۸، ۹].

قارچ های موجود در داخل خاک به کمک تولید آنزیم های خارج سلولی خود باعث شکسته شدن پیوندهای حلقوی ترکیب های آروماتیکی شده و از کربن آن ها به عنوان منبع تغذیه استفاده می کنند. این امر سبب تجزیه ی کامل هیدروکربن های حلقوی شده و یا باعث تجزیه ی آن ها به مواد کم ضرتر و یا حتی بی ضرر و سودمند می شوند [۱۰، ۱۱]. در روش زیست سالم سازی^۳ یا سمیت زدایی زیستی، از میکروارگانسیم ها به ویژه قارچ ها به منظور تخریب زیستی^۴ یا تجزیه زیستی آلاینده های آلی و در نتیجه پاک سازی محیط استفاده می شود. این موضوع، یک روش ساده و اقتصادی و با تأثیر دراز مدت برای پاک سازی آب و خاک از آلاینده های آلی به ویژه در صافی های زیستی^۵ صنعتی به شمار می رود [۱۲-۱۴]. در واقع این نوع قارچ ها، هیدروکربن های حلقوی فرار را به عنوان منبع یگانه کربن و انرژی جذب می کنند [۱۵، ۱۶]. این روش در مقایسه با فرایندهای دیگر مانند

(۱) EPA

(۳) Bioremediation

(۵) Biofilters

(۷) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

(۹) Total Organic Carbon

(۱۱) Lors

(۲) Separation factor

(۴) Biodegradation

(۶) Shirdam

(۸) Bernauer

(۱۰) Yuli Yanto

(۱۲) Ogbo

قارچی روی این محیط کشت احیا و در انکوباتور ۲۵ درجه‌ی سلسیوس قرار گرفت.

پارامترهای موثر بر فرایند

پارامترهای موثر بر فرایند حذف آلاینده توسط قارچ شامل غلظت، دما، زمان و pH محیط در این پژوهش مورد مطالعه قرار گرفت. با توجه به ظرفیت و توانایی قارچ‌ها در حذف آلاینده‌ها، غلظت آلاینده‌های مورد سنجش ۵، ۱۰ و ۱۵ mL/L انتخاب شد [۲۴، ۲۰]. برای تهیه غلظت به عنوان نمونه ۵ mL/L آلاینده‌ی بنزن، نخست ۹۵ میلی‌لیتر محیط کشت PDA در بشر استریل در زیر هود لامینار ریخته شد و ۵ میلی‌لیتر بنزن خالص به آن افزوده شد و سپس محیط کشت دارای بنزن درون شش عدد تشتک پتری ریخته شد. برای هر غلظت، آزمایش‌های مربوطه ۳ بار تکرار شد. پس از جامد شدن محیط کشت، در سه تشتک پتری، بلوک قارچ مورد نظر قرار داده شد و سه تشتک پتری دیگر بدون تماس با قارچ به عنوان محیط‌های شاهد انتخاب شدند. همین روند برای سایر غلظت‌ها با سایر آلاینده‌ها و قارچ دوم نیز تکرار شد. سپس تشتک‌های پتری درون انکوباتور گذاشته شدند تا قارچ‌ها رشد کرده و کل فضای تشتک پتری را اشغال کنند.

آزمایش در دماهای ۱۹، ۲۵ و ۳۲ درجه سلسیوس انجام شد. دمای مناسب برای رشد قارچ، دمای محیط (۲۵ درجه سلسیوس) است، ولی با توجه به نوسان‌های دمایی در محیط واقعی افزون بر دمای محیطی، دو دمای دیگر (بیش‌تر از دمای محیط و کم‌تر از دمای محیط) نیز مورد ارزیابی قرار گرفت تا عملکرد قارچ در شرایط دمایی گوناگون مورد سنجش قرار گیرد. pH محیط کشت در بررسی آلاینده‌های مورد سنجش با استفاده از هیدروکلریک اسید^۷ و سدیم هیپروکسید^۸ در مقادیر ۵/۵، ۷ و ۸ تنظیم شد. قارچ‌ها در شرایط محیطی خنثی بهتر رشد می‌نمایند، لیکن وجود آلاینده‌ها و مواد گوناگون در محیط اطراف باعث تغییر pH می‌شود. به همین دلیل، در این پژوهش با تغییر pH محیط به سه حالت اسیدی، بازی و خنثی، میزان رشد قارچ بررسی شد و میزان حذف آلاینده و کاهش آن در هر سه حالت مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به بازه عملکردی pH محیط برای رشد قارچ، تغییر pH مورد سنجش در حالت‌های اسیدی و بازی نباید از میزانی که باعث رشد نکردن قارچ باشد، فراتر رود [۲۵]. استخراج و اندازه‌گیری آلاینده‌ها برای قارچ *A. terreus* در سه زمان ۴، ۸ و ۱۴ روز و برای قارچ *E. xenobioica*

به طور کامل تجزیه کند. آن‌ها pH بهینه را برابر ۷/۵ و دمای بهینه را ۳۰ درجه سلسیوس به دست آوردند [۲۲].

در این پژوهش، عملکرد دو گونه قارچی بومی نوین به نام *Aspergillus terreus* و *Exophiala xenobiotica* که از خاک‌های آلوده به مواد نفتی انبار نفت تبریز جداسازی و با روش‌های ریخت‌شناختی و مولکولی شناسایی شده بود، برای اولین بار در فرایند حذف دو آلاینده مهم نفتی یعنی بنزن و تولوئن مورد مطالعه قرار گرفت. به منظور بررسی بهتر عملکرد قارچ‌ها، تأثیر پارامترهای مهم شامل غلظت آلاینده، زمان تماس، pH محیط و دما بر فرایند حذف آلاینده‌ها توسط دو قارچ ارزیابی شد.

بخش تجربی

مواد

بنزن، تولوئن و سدیم سولفات^۱ مورد استفاده در این پژوهش از شرکت آلمانی Merck خریداری شد. اتیل استات^۲ و استون^۳ از شرکت ساخت و تولید مواد شیمیایی و آزمایشگاهی مجلی تهیه شد. محیط کشت PDA^۴، دکستروز^۵ و آگار^۶ نیز از شرکت آلمانی Merck خریداری شد. دو قارچ به دست آمده از خاک‌های آلوده به مواد نفتی انبار نفت تبریز که در تابستان ۱۳۸۸ مطابق روش *ایوتسو* و همکاران (۱۹۸۱) جداسازی و با روش‌های ریخت‌شناختی و مولکولی شناسایی شده بود [۲۳]، در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت. این دو جدایه قارچی شامل *Aspergillus terreus* (با شماره بین‌المللی CBS131828 ثبت شده در موسسه قارچ‌شناسی آکادمی علوم هلند) با نام UMA374 در کلکسیون قارچ‌شناسی دانشگاه محقق اردبیلی و *Exophiala xenobiotica* (با شماره ملی IRAN1734C ثبت شده در مجموعه قارچ‌های زنده موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی ایران) با نام UMA301 در کلکسیون قارچ‌شناسی دانشگاه محقق اردبیلی شناخته می‌شوند.

تهیه محیط کشت و آماده‌سازی قارچ

در این پژوهش، تأثیر استفاده از دو گونه قارچی *Aspergillus terreus* و *Exophiala xenobiotica* در کاهش میزان دو آلاینده بنزن و تولوئن مورد بررسی قرار گرفت. برای آماده‌سازی و رشد جدایه‌های قارچی از محیط کشت PDA استفاده شد [۲۱]. بدین ترتیب که جدایه‌های

(۱) Sodium Sulfate

(۳) Acetone

(۵) Dextrose

(۷) HCl

(۲) Ethyl Acetate

(۴) Potato Dextrose Agar

(۶) Agar

(۸) NaOH

محاسبه میزان کاهش آلاینده نیز، نخست از هر سه تکرار میانگین گرفته شد و نتیجه‌های به دست آمده با یکدیگر مقایسه شد.

نتیجه‌ها و بحث

میزان کاهش دو آلاینده توسط هر دو قارچ و تأثیر پارامترهای گوناگون در این فرایند مورد ارزیابی قرار گرفت.

غلظت

در شکل ۱ داده‌های مربوط به تأثیر غلظت در حذف آلاینده‌ها توسط دو نوع قارچ ترسیم شده است. نتیجه‌ها نشان دادند که قارچ *A. terreus* در تماس با آلاینده بنزن (شکل ۱-۱) در غلظت ۵ mL/L با ۶۸/۳۵٪ و در تماس با آلاینده تولوئن (شکل ۱-۲) در غلظت ۵ mL/L با میزان ۷۲/۳۲٪ بیش‌ترین درصد حذف را دارد و همچنین با افزایش غلظت بنزن و تولوئن، درصد حذف کاهش پیدا می‌کند. قارچ *E. xenobiotica* در تماس با آلاینده بنزن (شکل ۱-۳) در غلظت ۵ mL/L، با درصد حذف ۶۸/۳۵٪ و در تماس با آلاینده تولوئن (شکل ۱-۴) در غلظت ۵ mL/L با ۳۵/۱۸٪ بهترین عملکرد را داشته است. در مورد این قارچ هم با افزایش غلظت بنزن و تولوئن، درصد حذف کاهش پیدا می‌کند. افزایش غلظت آلاینده باعث افزایش انباشتگی آلاینده‌های آروماتیکی در محیط کشت شده و این امر باعث رشد نکردن کافی قارچ و در نتیجه سبب کاهش درصد حذف توسط هر دو گونه قارچی برای هر دو نوع آلاینده می‌شود. نتیجه‌های به دست آمده در این پژوهش حاضر با نتیجه‌های کاپوتورتیتی و همکاران در سال ۲۰۰۴ میلادی مطابقت دارد، بدین ترتیب که نشان داده شد درصد حذف آلاینده بنزن آلفا پیرین با گونه قارچی *A. terreus* با افزایش غلظت از ۲۵ ppm به ۵۰ ppm از ۶۰ درصد به ۲۷/۵ کاهش پیدا می‌کند [۲۶].

زمان

اثر زمان در حذف آلاینده‌ها توسط دو قارچ در شکل ۲ آورده شده است. با توجه به نتیجه‌های به دست آمده، هر چقدر قارچ *A. terreus* مدت زمان بیش‌تری را در تماس با آلاینده بنزن (شکل ۲-۱) در اختیار داشته باشد، از توانایی بالایی در حذف آلاینده بنزن برخوردار خواهد بود. به طوری که این قارچ توانسته در مدت زمان ۸ و ۱۴ روز به ترتیب مقدارهایی برابر با ۵۵/۳۴٪ و ۶۰/۲۳٪ آلاینده بنزن را از محیط کشت حذف کند. در نتیجه می‌توان گفت که مدت زمان مناسب برای تماس آلاینده بنزن با قارچ *A. terreus* ۸ تا ۱۰ روز می‌باشد.

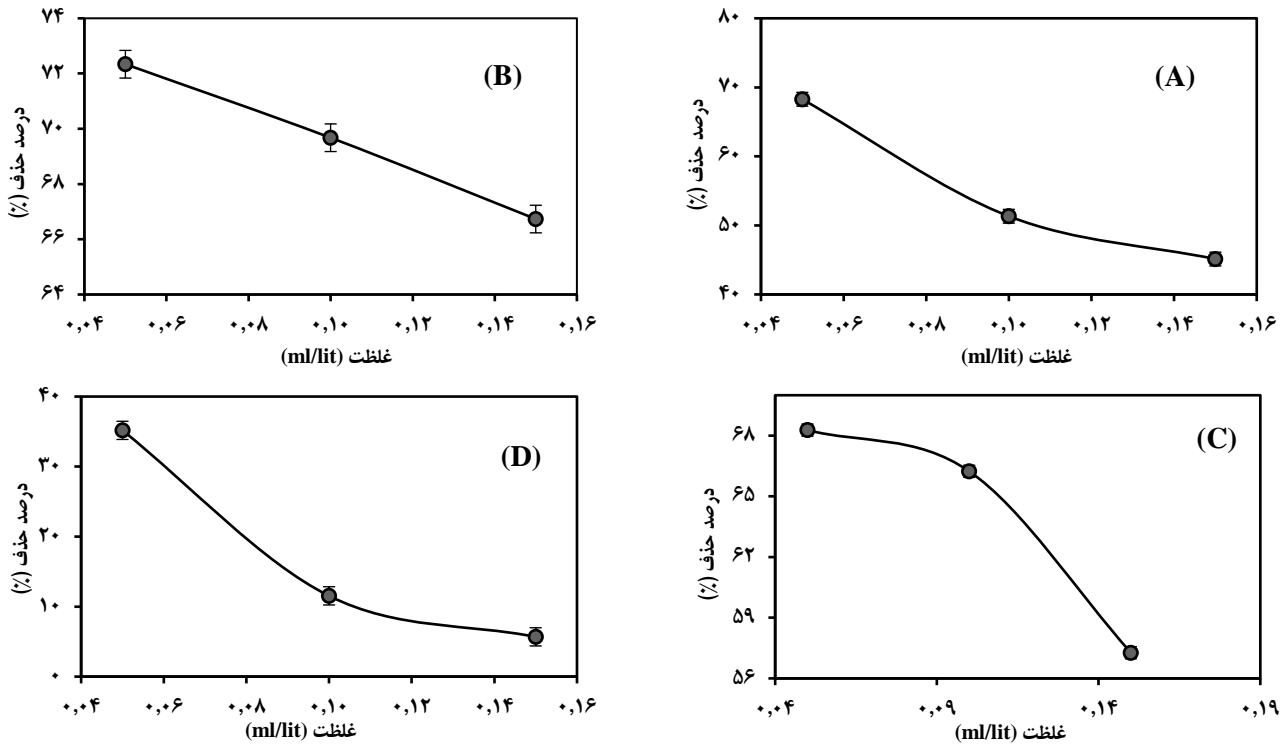
در زمان‌های ۱۰، ۱۵ و ۲۰ روز انجام گرفت. شایان ذکر است که قارچ *A. terreus* رشد بسیار سریعی داشته و طی ۸ الی ۱۰ روز تشک پتری ۸ سانتی‌متری را به طور کامل پر می‌کند، در حالی که این زمان برای قارچ *E. xenobiotica*، ۱۸ الی ۲۵ روز می‌باشد.

استخراج و آنالیز

پس از گذشت زمان‌های تعیین شده، تشک‌های پتری از انکوباتور بیرون آورده شدند و محیط‌های کشت دارای آلاینده که در این مدت در تماس با قارچ قرار گرفته بودند به همراه محیط‌های کشت شاهد بدون قارچ، از تشک‌های پتری جدا و داخل بشر ریخته شدند و سپس برای ذوب روی گرم‌کن گذاشته شدند. پس از آن، نمونه‌ها با استفاده از کاغذ صافی صاف شدند تا قارچ و سایر اجزای آن به طور کامل جدا شود. به فراورده خروجی از صافی، سدیم سولفات افزوده شد تا حالت خمیری پیدا کند (افزودن سدیم سولفات به این دلیل است که آلاینده به سدیم سولفات وارد شود و باعث جذب رطوبت و خشک شدن محلول شود و مانع از خروج آلاینده از محیط توسط گرما شود)، سپس به محلول به دست آمده، دو حجم مساوی اتیل استات افزوده شد تا مقداری رقیق شده و به سادگی درون لوله آزمایش ریخته شود. در ادامه، به لوله‌ها استون افزوده شد تا محلول، تشکیل فاز تعلیقی و غیر همگن ندهد (این کار باعث تشکیل نشدن فاز اتیل استات نامحلول در زیر بخش محلول سدیم سولفات می‌شود). لوله‌های آزمایش داخل حمام فراصوت دو بار به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شدند. سپس لوله‌ها در آن با دمای ۶۰ تا ۷۰ درجه سلسیوس قرار داده شد و مدت ۱۸ ساعته آن زمان داده شد تا مواد درون لوله‌ها به طور کامل خشک شوند. پس از بیرون آوردن لوله‌ها، مواد درون لوله‌ها تخلیه و توسط هاونگ به طور کامل آسیاب شد. مواد پودر شده درون بشر ریخته شده و روی همزن مغناطیسی قرار گرفت و به آن آب مقطر افزوده شد تا پودر به طور کامل درون آب مقطر حل شود. سپس محلول پایانی برای آنالیز درون دستگاه اسپکتروفتومتری PG Instrument Ltd مدل T90+ ساخت کشور انگلستان گذاشته شد. دقت طول موج این دستگاه ۳/۰± nm است و قابلیت اندازه‌گیری طول موج در بازه ۱۹۰-۱۱۰۰ نانومتر را دارا می‌باشد. بدین ترتیب جذب بنزن از محلول‌ها در طول موج ۲۰۰ نانومتر و تولوئن در ۲۶۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد. داده‌های خروجی از دستگاه توسط نمودار برستیجی به غلظت تبدیل شد و از معادله (۱) میزان درصد حذف آلاینده توسط قارچ محاسبه شد:

$$(1) \quad \text{درصد حذف} = \frac{C_1 - C_2}{C_1} \times 100$$

که در آن C_1 غلظت شاهد و C_2 غلظت آلاینده می‌باشد. برای



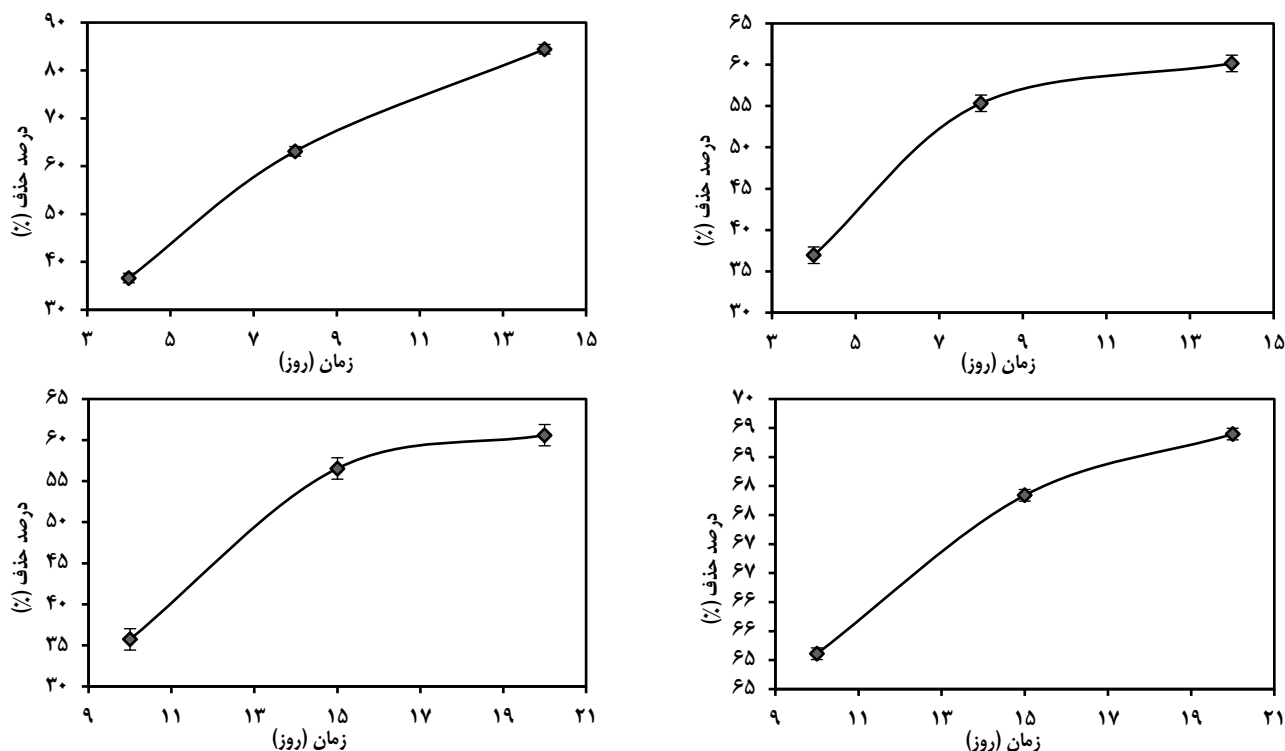
شکل ۱ - (A) روند تغییر حذف بنزن در غلظت‌های گوناگون توسط قارچ *A. terreus*، (B) روند تغییرات حذف تولوئن در غلظت‌های گوناگون توسط قارچ *A. terreus*، (C) روند تغییر حذف بنزن در غلظت‌های گوناگون توسط قارچ *E. xenobiotica* و (D) روند تغییر حذف تولوئن در غلظت‌های گوناگون توسط قارچ *E. xenobiotica*

انجام می‌گیرد، کم‌تر از این زمان به دلیل نبود رشد کافی قارچ و بیش‌تر از این زمان به دلیل پیر شدن میسلیم‌های قارچی، تغییر محسوسی در روند حذف آلاینده ایجاد نمی‌شود. همچنین باید در نظر داشت که قارچ *E. xenobiotica* به دلیل کند رشد بودن نسبت به قارچ *A. terreus* زمان بیش‌تری را برای رشد لازم دارد. در نتیجه، بازه زمانی بیش‌تری باید مورد سنجش قرار گیرد. نتیجه‌های به‌دست آمده با نتیجه‌های یوری و همکاران در سال ۲۰۰۹ میلادی که نشان‌دهنده حذف ۳۰ الی ۶۰ درصدی آلاینده بنزن آلفا پیرین توسط گونه قارچی *Aspergillus sp. BAP14* در مدت زمان ۳ الی ۱۲ روز بود، مطابقت دارد. همچنین می‌توان دید که قارچ‌های استفاده شده در این پژوهش در مدت همانند، عملکرد بهتری از خود نشان داده‌اند [۲۷].

دما

شکل ۳ تأثیر دما را بر عملکرد دو قارچ نشان می‌دهد. با توجه به نتیجه‌های به دست آمده در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس، قارچ *A. terreus* در برخورد با آلاینده‌های بنزن (شکل ۳-۱) و تولوئن (شکل ۳-۲) به ترتیب ۶۸/۲۷٪ و ۷۲/۳۳٪ از آلاینده‌ها را حذف

گذشت بیش از این زمان تغییر محسوسی در حذف آلاینده بنزن ایجاد نمی‌کند. همچنین هر چقدر قارچ *A. terreus* مدت زمان بیش‌تری را در تماس با آلاینده تولوئن باشد (شکل ۲-۱)، میزان حذف تولوئن از محیط کشت نیز بیش‌تر می‌شود، به طوری که این قارچ در مدت زمان ۱۴ روز کامل به میزان ۸۴/۲۷٪ آلاینده را از محیط حذف کرده است. بر اساس شکل ۲-۲ با گذشت زمان، میزان حذف بنزن توسط قارچ *E. xenobiotica* نیز بیش‌تر می‌شود. نتیجه‌ها نشان می‌دهد که این قارچ در مدت زمان ۱۰ و ۲۰ روز توانسته به ترتیب میزان ۶۵/۱۰٪ و ۶۸/۱۸٪ آلاینده بنزن را حذف کند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که زمان مناسب برای تماس آلاینده بنزن با قارچ *E. xenobiotica* ۱۰ الی ۱۵ روز می‌باشد. نتیجه‌های همانند برای این قارچ در تماس با آلاینده تولوئن به نیز دست آمد. همان‌گونه که در شکل ۲-۳ آمده است، این قارچ در مدت ۲۰ روز کامل، ۶۰/۶۰٪ از آلاینده تولوئن را از محیط کشت حذف کرده است. روشن است که با افزایش زمان تماس قارچ با آلاینده، رشد قارچ بیش‌تر شده و سطح بیش‌تری از محیط کشت را پوشش می‌دهد. این امر باعث افزایش درصد حذف آلاینده شده، ولی با توجه به توانایی قارچ، میزان رشد کامل قارچ در مدت زمان خاصی

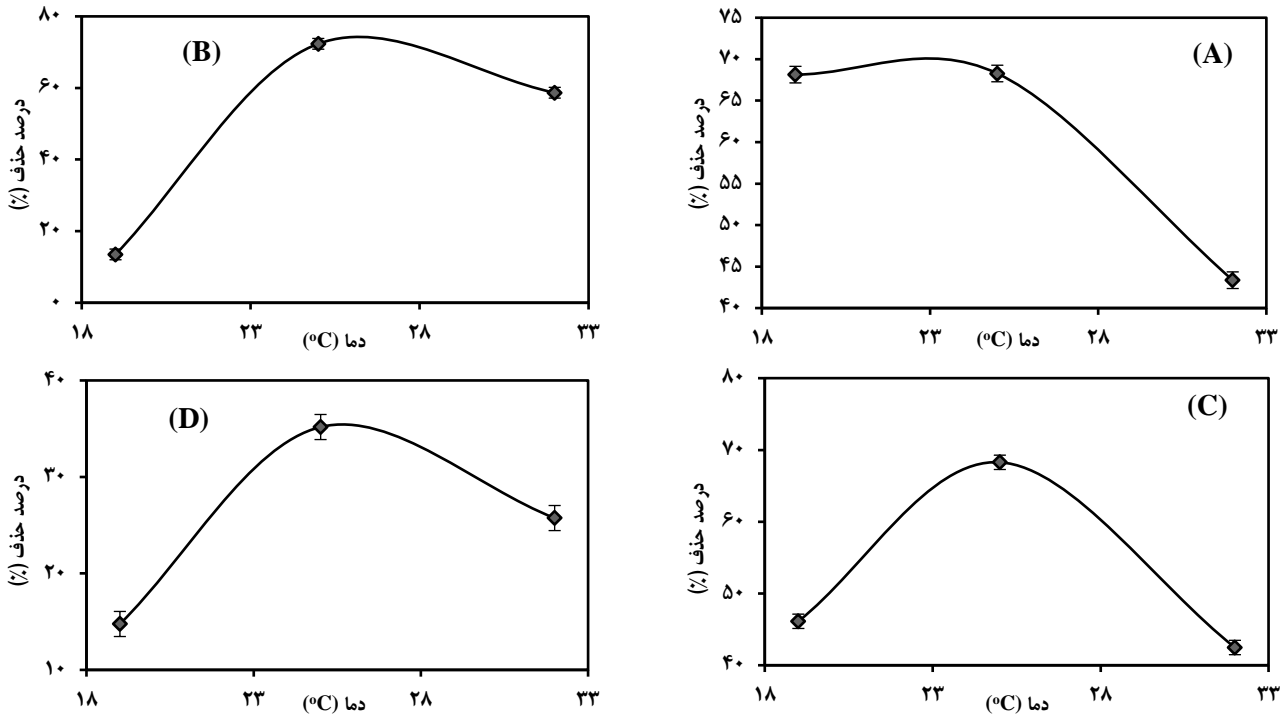


شکل ۲ - (A) روند تغییر حذف بنزن در زمان‌های متفاوت توسط قارچ *A. terreus*، (B) روند تغییرات حذف تولوئن در زمان‌های گوناگون توسط قارچ *A. terreus*، (C) روند تغییرات حذف بنزن در زمان‌های گوناگون توسط قارچ *E. xenobiotica* و (D): روند تغییرات حذف تولوئن در زمان‌های گوناگون توسط قارچ *E. xenobiotica*

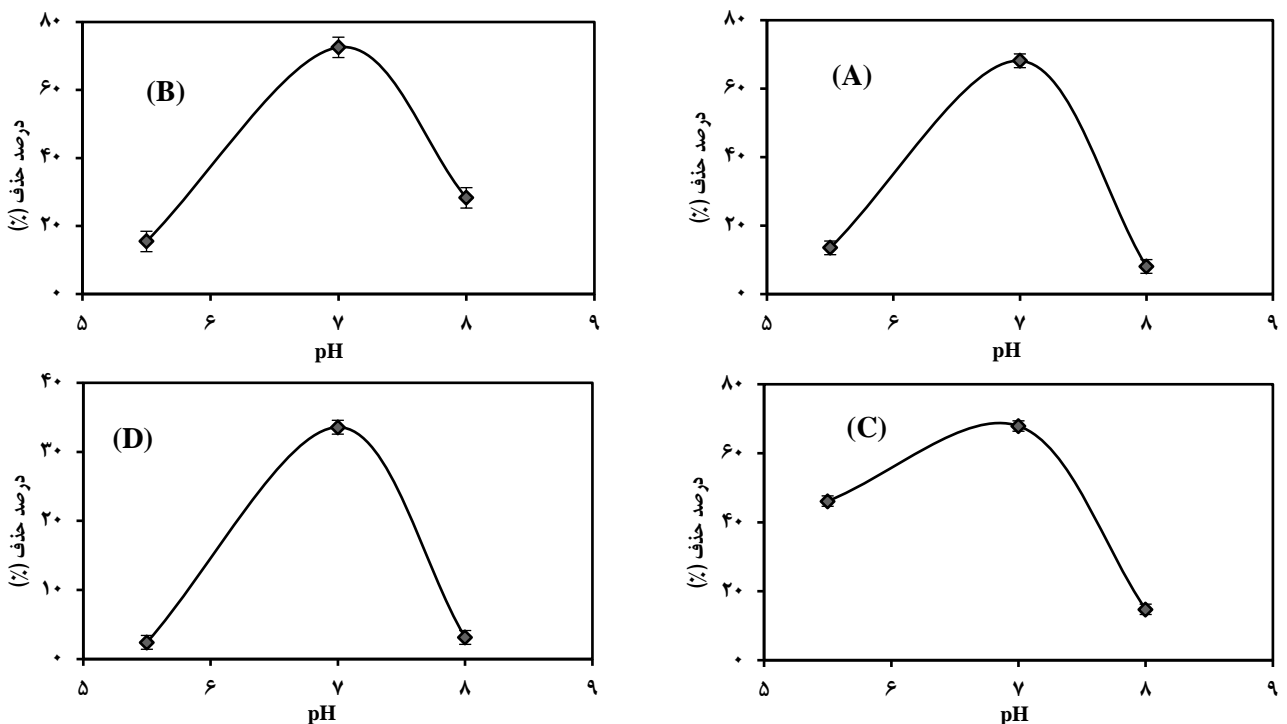
pH

نتیجه‌های مربوط به تأثیر pH بر عملکرد دو قارچ در شکل ۴ ترسیم شده است. با توجه به نتیجه‌های به دست آمده، قارچ *A. terreus* برای آلاینده بنزن (شکل ۴-A) در pH=7 با درصد حذف ۶۸/۱۷٪ بیش‌ترین کارایی را نشان داد. همچنین این قارچ برای آلاینده تولوئن (شکل ۴-B) در pH=7 با درصد حذف ۷۲/۳۱٪ بیش‌ترین تأثیر را داشت. قارچ *E. xenobiotica* برای آلاینده‌های بنزن (شکل ۴-C) و تولوئن (شکل ۴-D) در pH=7 به ترتیب با درصد حذف ۶۷/۱۴٪ و ۷۲/۳۳٪ بیش‌ترین کارایی را داشت. بنابراین با هرگونه نوسان در pH محیط، درصد حذف به شدت کاهش پیدا می‌کند. بهترین شرایط برای رشد قارچ‌ها شرایط محیطی خنثی می‌باشد و با اسیدی و بازی شدن محیط، رشد قارچ مختل شده و این امر باعث حذف نشدن آلاینده توسط قارچ می‌شود. *یولی یانتو* و همکاران در سال ۲۰۱۳ میلادی نشان دادند که بیش‌ترین میزان حذف برخی آلاینده‌های هیدروکربنی چند حلقه‌ای از خاک توسط گونه قارچی *Pestalotiopsis sp. NG007* در pH=7، برابر با ۵۷٪ بوده است [۲۰].

کرده است. بر اساس نتیجه‌های به دست آمده، با افزایش دما، درصد حذف برای هر دو آلاینده کاهش پیدا می‌کند. نتیجه‌های مربوط به تأثیر دما بر عملکرد قارچ *E. xenobiotica* برای حذف آلاینده بنزن و تولوئن به ترتیب در شکل ۳-C و شکل ۳-D نشان داده شده است. همان‌گونه که دیده می‌شود بیش‌ترین حذف آلاینده‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس رخ داده که برای بنزن و تولوئن به ترتیب ۶۸/۲۹٪ و ۳۵/۱۸٪ می‌باشد. نوسان‌های دمایی باعث عدم رشد کافی قارچ و در نتیجه، باعث کاهش درصد حذف می‌شود. هر دو قارچ در دمای محیطی (۲۵ درجه سلسیوس) بیش‌ترین میزان رشد را دارد. نتیجه‌های به دست آمده با نتیجه‌های کاپوتورتی و همکاران در سال ۲۰۰۴ میلادی مطابقت دارد. آن‌ها نشان دادند که برای حذف آلاینده بنزن آلفا پیرین توسط گونه قارچی *A. terreus*، دمای بهینه، ۲۴ درجه سلسیوس می‌باشد و در این دما ۶۰ درصد آلاینده حذف می‌شود. در این پژوهش، عملکرد قارچ‌های مورد بررسی به خصوص قارچ *A. terreus* در این دما در حذف آلاینده‌های بنزن و تولوئن نسبت به حذف آلاینده بنزن آلفا پیرین بهتر بوده است [۲۶].



شکل ۳ - (A) روند تغییر حذف بنزن در دماهای گوناگون توسط قارچ *A. terreus*، (B) روند تغییر حذف تولوئن در دماهای گوناگون توسط قارچ *A. terreus*، (C) روند تغییر حذف بنزن در دماهای گوناگون توسط قارچ *E. xenobiotica* و (D) روند تغییر حذف تولوئن در دماهای گوناگون توسط قارچ *E. xenobiotica*



شکل ۴ - (A) روند تغییر حذف بنزن در pH گوناگون توسط قارچ *A. terreus*، (B) روند تغییر حذف تولوئن در pH گوناگون توسط قارچ *A. terreus*، (C) روند تغییر حذف بنزن در pH گوناگون توسط قارچ *E. xenobiotica* و (D) روند تغییر حذف تولوئن در pH گوناگون توسط قارچ *E. xenobiotica*

جدول ۱ - بررسی معنی دار بودن تأثیر غلظت و نوع قارچ بر روی حذف آلاینده‌ی بنزن و تولوئن

غلظت (۱۵ mL/L)	غلظت (۱۰ mL/L)	غلظت (۵ mL/L)	آلاینده	قارچ
۴۵/۱۲(c, A)	۵۱/۳۴(b, B)	۶۸/۳۵(a, A)	بنزن	<i>A. terreus</i>
۵۷/۳۲(e, C)	۶۶/۲۹(d, A)	۶۸/۳۵(d, A)	بنزن	<i>E. xenobiotica</i>
۵۷/۳۲(b, B)	۶۶/۲۹(a, A)	۶۸/۳۵(a, A)	تولوئن	<i>A. terreus</i>
۵/۶۴(e, E)	۱۱/۵۶(d, D)	۳۵/۱۸(c, C)	تولوئن	<i>E. xenobiotica</i>

حروف متفاوت در جدول نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح غلظت ۵ mL/L با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد.

جدول ۲ - بررسی معنی دار بودن تأثیر زمان و نوع قارچ بر روی حذف آلاینده‌ی بنزن و تولوئن

۱۴ روز	۸ روز	۴ روز	آلاینده	قارچ
۶۰/۲۳(b, C)	۵۵/۳۴(b, B)	۳۶/۱۲(a, A)	بنزن	<i>A. terreus</i>
۸۴/۲۷(c, C)	۶۳/۳۳(b, B)	۳۶/۶۷(a, A)	تولوئن	
۲۰ روز	۱۵ روز	۵ روز	آلاینده	قارچ
۶۰/۶۰(e, B)	۶۷/۸۶(c, D)	۶۵/۱۴(c, C)	بنزن	<i>E. xenobiotica</i>
۶۸/۱۸(c, E)	۵۶/۵۶(e, D)	۳۵/۷۵(a, A)	تولوئن	

است و نشانگر این موضوع می‌باشد که این قارچ با افزایش غلظت تا ۱۰ mL/L همچنان توانایی حذف این آلاینده را به خوبی از خود نشان می‌دهد و افزایش غلظت از ۱۰ mL/L به بالا باعث کاهش کارایی این قارچ می‌شود. این نتیجه در معادله با قارچ *A. terreus* و آلاینده تولوئن نیز به دست آمده است. در مقایسه کارایی دو قارچ در حذف آلاینده بنزن در سطح غلظت ۵ mL/L، وجود حرف‌های یکسان نشان دهنده نبود اختلاف معنی دار در این غلظت است، ولی در معادله با آلاینده تولوئن، قارچ *A. terreus* عملکرد بهتری نشان داد.

زمان

همان‌گونه که در جدول ۲ دیده می‌شود قارچ *A. terreus* در زمان ۱۴ روز پس از کشت، بیش‌ترین درصد حذف آلاینده بنزن و تولوئن را دارد و نبود حرف یکسان در این ردیف، نشان دهنده اختلاف معنی دار در بین زمان‌های گوناگون است و این موضوع افزایش کارایی قارچ با گذشت زمان و رشد کامل قارچ در معادله با قارچ *E. xenobiotica* و آلاینده تولوئن در زمان ۲۰ روز نیز صادق می‌باشد. در مورد قارچ *E. xenobiotica* با آلاینده بنزن، بیش‌ترین درصد حذف مربوط به زمان ۲۰ روز می‌باشد، ولی وجود حرف‌های یکسان بین همه دوره‌های زمانی نشان دهنده نبود اختلاف معنی دار بین گذر زمان می‌باشد که نشان می‌دهد افزایش زمان، تأثیر چشمگیری در میزان حذف این آلاینده ندارد. مقایسه دو قارچ در حذف آلاینده بنزن در بالاترین زمان رشد نشان می‌دهد که قارچ *E. xenobiotica* عملکرد بهتری را دارد، ولی در مورد آلاینده

اعتبارسنجی

معنی دار بودن تمامی داده‌ها پس از تجزیه و تحلیل با نرم‌افزار MSTATC نسخه ۱/۶ مورد ارزیابی قرار گرفت. سنجش انجام شده نشان دهنده معنی دار بودن درصد حذف آلاینده‌ها در محیط کشت دارای قارچ نسبت به محیط کشت شاهد و همچنین معنی دار بودن تفاوت اثر تجزیه‌ای دو قارچ نسبت به یکدیگر است. مقایسه میانگین با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ mL/L صورت گرفت. حروف مشترک، نشان دهنده نبود اختلاف معنی دار و حرف‌های متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح ۵ mL/L است. عدد‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، از نظر آماری در یک گروه قرار می‌گیرند. معنی دار بودن درصد حذف‌های به دست آمده در جدول ۱ تا ۴ نشان داده شده که در ادامه به تفسیر هریک از آن‌ها پرداخته می‌شود.

غلظت

همان‌گونه که در جدول ۱ دیده می‌شود قارچ *A. terreus* با آلاینده بنزن در غلظت ۵ mL/L بیش‌ترین میزان حذف را دارد و نبود حرف یکسان در این ردیف، نشان دهنده اختلاف معنی دار در بین غلظت‌های گوناگون است و این امر که با افزایش غلظت از سطح ۵ mL/L به بالا، کارایی قارچ کاهش می‌یابد، در معادله با قارچ *E. xenobiotica* و آلاینده تولوئن نیز صادق است. در مورد اثر قارچ *E. xenobiotica* روی آلاینده بنزن نیز بیش‌ترین درصد حذف در غلظت ۵ mL/L دیده شد، ولی وجود حرف‌های یکسان بین غلظت ۵ و ۱۰ mL/L نشان دهنده نبود اختلاف معنی دار بین این دو غلظت

جدول ۳ - بررسی معنی دار بودن تأثیر دما و نوع قارچ بر روی حذف آلاینده‌ی بنزن و تولوئن

قارچ	آلاینده	۱۹ درجه سلسیوس	۲۵ درجه سلسیوس	۳۲ درجه سلسیوس
A. terreus	بنزن	۶۸/۱۷(a,A)	۶۸/۲۷(a,A)	۴۳/۴۰(b,C)
		۴۶/۵۰(c,C)	۶۸/۲۹(d,A)	۴۲/۴۷(c,C)
E. xenobiotica	تولوئن	۱۳/۵۶(a,A)	۷۲/۳۳(b,B)	۵۸/۶۷(c,C)
		۱۴/۷۰(d,A)	۳۵/۱۸(e,D)	۲۵/۷۳(f,E)

جدول ۴ - بررسی معنی دار بودن تأثیر pH و نوع قارچ بر روی حذف آلاینده‌ی بنزن و تولوئن

قارچ	آلاینده	pH=۷	pH=۵/۵	pH=۸
A. terreus	بنزن	۶۸/۱۷(a, A)	۱۳/۵۶(b, B)	(c, C)۷/۹۷
		۶۸/۱۴(d, A)	۴۶/۰۹(e, D)	(f, B)۱۴/۷۰
E. xenobiotica	تولوئن	۷۲/۳۱(a, A)	۱۵/۴۲(b, B)	(c, C)۲۸/۲۸
		۳۳/۷۲(d, C)	۲/۳۵(e, D)	(e, D)۳/۲۱

تولوئن، قارچ *A. terreus* عملکرد بهتری نشان داد.

دما

همان گونه که در جدول ۳ آمده است، قارچ *A. terreus* در دمای ۲۵ درجه سلسیوس بیشترین درصد حذف آلاینده تولوئن را دارد و نبود حرف یکسان در این ردیف، نشان دهنده اختلاف معنی دار در بین دماهای گوناگون است. همین موضوع در معادله با قارچ *E. xenobiotica* و آلاینده بنزن و تولوئن نیز دیده می شود. در مورد تأثیر قارچ *A. terreus* روی آلاینده بنزن، بیشترین میزان حذف مربوط به دمای ۲۵ درجه سلسیوس می باشد، ولی وجود حرف های یکسان بین دماهای ۲۵ و ۱۹ درجه سلسیوس نشان دهنده نبود اختلاف معنی دار بین این دو دما است و این نکته را تأیید می کند که این قارچ با افزایش دما از ۱۹ تا ۲۵ درجه سلسیوس همچنان توانایی حذف این آلاینده را به خوبی نشان می دهد ولی با تغییر دما از ۲۵ به ۳۲ درجه سلسیوس، کارایی این قارچ کاهش می یابد. در مقایسه توانایی دو قارچ در حذف آلاینده بنزن در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، وجود حروف یکسان نشان دهنده نبود اختلاف معنی دار در این سطح دمایی است، اما در معادله با آلاینده تولوئن، قارچ *A. terreus* عملکرد بهتری نشان می دهد.

pH

همان گونه که در جدول ۴ دیده می شود، هر دو قارچ *A. terreus* و *E. xenobiotica* بیشترین درصد حذف آلاینده بنزن و تولوئن را در pH=۷ دارند و نبود حرف یکسان در این ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار در بین pH های گوناگون است. در مقایسه کارایی دو قارچ

در حذف بنزن در pH=۷ وجود حرف های یکسان، نشان دهنده نبود اختلاف معنی دار در این pH است، ولی در حذف تولوئن، قارچ *A. terreus* کارایی بهتری را نشان می دهد.

نتیجه گیری

در این پژوهش، کارایی دو قارچ *A. terreus* و *E. xenobiotica* برای حذف دو آلاینده بنزن و تولوئن در محیط کشت مورد ارزیابی قرار گرفت. پارامترهای مؤثر در فرایند حذف آلاینده ها شامل غلظت، دما، زمان و pH ارزیابی شدند که نتیجه گیری کلی به دست آمده از این پژوهش را می توان به شرح زیر جمع بندی نمود:

۱- افزایش غلظت آلاینده سبب کاهش درصد حذف توسط هر دو گونه قارچی برای هر دو نوع آلاینده می شود. همچنین مقایسه دو قارچ برای حذف آلاینده بنزن در غلظت ۵ mL/L نشان داد که هر دو قارچ به تقریب به یک اندازه توانایی حذف این آلاینده را دارند، در حالی که برای حذف آلاینده تولوئن در غلظت ۵ mL/L، قارچ *A. terreus* توانایی بالاتری دارد.

۲- نبود زمان کافی برای رشد قارچ باعث می شود تا در بازه هایی که قارچ رشد کافی نکرده، درصد حذف آلاینده ها پایین باشد. بنابراین زمان کافی برای رشد هر دو گونه قارچی لازم است تا قارچ به اندازه ی توانایی خود، آلاینده را از محیط حذف نماید. در بررسی تأثیر زمان، نتیجه ها نشان داد که قارچ *A. terreus* در مدت ۸ تا ۱۰ روز و قارچ *E. xenobiotica* در ۲۵ روز به رشد کافی می رسند.

۳- هر دو گونه قارچی برای رشد خود نیازمند شرایط دمایی مناسب هستند. مقایسه کارایی دو قارچ برای حذف آلاینده بنزن

در نتیجه، حلقه آروماتیکی آن راحت‌تر شکسته شده و ساختار تولوئن از حالت حلقوی و پایدار به حالت زنجیره‌ای تغییر می‌کند و کربن آن به راحتی جذب قارچ می‌شود. ولی بنزن به دلیل تقارن کامل و رزونانس حلقه آروماتیکی خود، از پایداری بیش‌تری برخوردار است و برای جدا کردن کربن از حلقه آروماتیکی آن به انرژی بیش‌تری نیاز است.

سرانجام، بر اساس نتیجه‌های به دست آمده از این پژوهش می‌توان دریافت که فرایند حذف زیستی با به کارگیری قارچ‌های نوین راه حلی نویدبخش و سازگار با محیط زیست برای رفع مشکل آلودگی نفتی می‌باشد و پس از پژوهش‌های تکمیلی در محیط واقعی، استفاده از این دو گونه قارچی برای کاهش آلاینده‌های صنعتی امکان‌پذیر خواهد بود.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۲۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۰۸

در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نشان داد که هر دو قارچ به‌تقریب به یک اندازه، توانایی حذف این آلاینده را دارا می‌باشند و برای حذف آلاینده تولوئن، قارچ *A. terreus* عملکرد بهتری از خود نشان داد. ۴- تغییر شرایط محیطی مانند تغییر pH در کارایی قارچ‌ها تأثیر به‌سزایی دارد و این امر باعث رشد نیافتن کافی قارچ‌ها و کاهش درصد حذف آلاینده‌ها می‌شود. قارچ‌ها در محیط خنثی رشد بهتری داشته و عملکرد بهتری را از خود نشان دادند. مقایسه دو قارچ برای حذف آلاینده بنزن در pH=۷ نشان داد که هر دو قارچ به‌تقریب به یک اندازه، توانایی حذف این آلاینده را دارا هستند و در حذف آلاینده تولوئن، قارچ *A. terreus* عملکرد بهتری داشت. ۵- مقایسه کلی کاهش دو آلاینده بنزن و تولوئن نشان داد که هر دو قارچ مورد مطالعه، توانایی بیش‌تری برای حذف آلاینده تولوئن دارند. این امر به دلیل این است که تولوئن دارای یک استخلاف گروه متیلی است که باعث به هم خوردن توازن حلقه آروماتیکی می‌شود و کربن مربوط به حلقه آروماتیکی، آسان‌تر از آن جدا می‌شود.

مراجع

- [1] Nourozieh H., Kariznovi M., Abedi J., [Measurement and Modeling of Solubility and Saturated-Liquid Density and Viscosity for Methane/Athabasca-Bitumen Mixtures](#), *SPE Journal*, **21(1)**: 180-189 (2016).
- [2] Mirsal I., ["Soil Pollution: Origin, Monitoring & Remediation"](#), Springer Science & Business Media, (2008).
- [3] Jhonson C., ["Biology of Soil Science"](#), Oxford Book Company, (2009).
- [4] Abadie J., Abbott B., Abbott R., Abernathy M., Accadia T., Acernese F., Adams C., Adhikari R., Ajith P., Allen B., [Predictions for the Rates of Compact Binary Coalescences Observable by Ground-Based Gravitational-Wave Detectors](#), *Classical and Quantum Gravity*, **27(17)**: 173001-173011 (2010).
- [5] Sims R.C., Overcash M., ["Fate of Polynuclear Aromatic Compounds \(PNAs\) in Soil-Plant Systems, in Residue Reviews"](#), Springer, 1-68 (1983).
- [6] Dean-Ross D., Cerniglia C., [Degradation of Pyrene by Mycobacterium Flavesceus](#), *Applied Microbiology and Biotechnology*, **46(3)**: 307-312, (1996).
- [7] Tharanivasan, A.K., ["Asphaltene Precipitation from Crude Oil Blends, Conventional Oils, and Oils with Emulsified Water"](#), University of Calgary, (2012).
- [8] Antos G.J., Aitani A.M., ["Catalytic Naphtha Reforming, Revised and Expanded"](#), CRC Press, (2004).
- [9] Obire O., Putheti R.R., ["Fungi in Bioremediation of Oil Polluted Environments"](#), Sigma Xi Scientific Research Society, (2009).

- [10] Shirdam R., Daryabeigi Zand A., Mehrdadi N., [Removal of Total Petroleum Hydrocarbons \(TPHs\) from Oil-Polluted Soil in Iran](#), *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering (IJCCE)*, **28(4)**: 105-113 (2009).
- [11] Tripathi P., Khare P., Barnawal D., Shanker K., Srivastava P.K., Tripathi R.D., Kalra A., [Bioremediation of Arsenic by Soil Methylating Fungi: Role of Humicola Sp. Strain 2WS1 in Amelioration of Arsenic Phytotoxicity in Bacopa Monnieri L](#), *Science of the Total Environment*, **716**: 136758 (2020).
- [12] Jasmin M., Syukri F., Kamarudin M., Karim M., [Potential of Bioremediation in Treating Aquaculture Sludge](#), *Aquaculture*, **519**: 734905 (2019).
- [13] Singh R.K., Tripathi R., Ranjan A., Srivastava A.K., [Fungi as Potential Candidates for Bioremediation](#), in [Abatement of Environmental Pollutants](#), *Abatement of Environmental Pollutants*, 177-191 (2020).
- [۱۴] محمدی‌ها م، امانی ح، کریمی نژاد ح، بررسی جذب زیستی فلزهای سنگین روی و کبالت توسط قارچ غیر زنده *Phanerochaet crysosperium PTCC 5270*، نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران، (۳) ۳۸: ۱ تا ۱۲ (۱۳۹۸).
- [15] Prenafeta-Boldu F.X., Summerbell R., De Hoog G.S., [Fungi Growing on Aromatic Hydrocarbons: Biotechnology's Unexpected Encounter with Biohazard](#), *FEMS Microbiology Reviews*, **30(1)**: 109-130 (2006).
- [16] Thion C., Cébron A., Beguiristain T., Leyval C., [PAH Biotransformation and Sorption by Fusarium Solani and Arthrobacter Oxydans Isolated from a Polluted Soil in Axenic Cultures and Mixed Co-Cultures](#), *International biodeterioration & biodegradation*, **68**: 28-35 (2012).
- [17] Azubuike C.C., Chikere C.B., Okpokwasili G.C., [Bioremediation Techniques–Classification based on Site of Application: Principles, Advantages, Limitations and Prospects](#), *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **32(11)**: 180 (2016).
- [18] Zhang B., Guo Y., Huo J., Xie H., Xu C., Liang S., [Combining Chemical Oxidation and Bioremediation for Petroleum Polluted Soil Remediation by BC-nZVI Activated Persulfate](#), *Chemical Engineering Journal*, **382**: 123055 (2020).
- [19] Bernauer T., Meins E., [Technological Revolution Meets Policy and the Market: Explaining Cross-National Differences in Agricultural Biotechnology Regulation](#), *European Journal of Political Research*, **42(5)**: 643-683 (2014).
- [20] Yanto D.H.Y., Tachibana S., [Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons by a Newly Isolated Pestalotiopsis sp. NG007](#), *International Biodeterioration & Biodegradation*, **85**: 438-450 (2013).
- [21] Lors C., Damidot D., Ponge J.-F., Périé F., [Comparison of a Bioremediation Process of PAHs in a PAH-Contaminated Soil at Field and Laboratory Scales](#), *Environmental Pollution*, **165**: 11-17 (2012).
- [22] Ogbo E.M., [Effects of Diesel Fuel Contamination on Seed Germination of Four Crop Plants- Arachis Hypogaea, Vigna Unguiculata, Sorghum Bicolor and Zea Mays](#), *African Journal of Biotechnology*, **8(2)**: 1-10 (2009).

- [23] Davari M., Arzanlou M., Babai A.A., [Identification of some Fungal Species Involved in Biodegradation of Petroleum Pollutants in Northwest of Iran](#), *Rostaniha*, **12**: 1-12 (2011).
- [24] Merkl N., Schultze-Kraft R., Infante C., [Phytoremediation in the Tropics—The Effect of Crude Oil on the Growth of Tropical Plants](#), *Bioremediation Journal*, **8(3-4)**: 177-184 (2004).
- [25] Lebrero R., Ángeles R., Pérez R., Muñoz R., [Toluene Biodegradation in an Algal-Bacterial Airlift Photobioreactor: Influence of the Biomass Concentration and of the Presence of an Organic Phase](#), *Journal of Environmental Management*, **183**: 585-593 (2016).
- [26] Capotorti G., Digianvincenzo P., Cesti P., Bernardi A., Guglielmetti G., [Pyrene and Benzo \(a\) Pyrene Metabolism by An Aspergillus Terreus Strain Isolated from a Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Polluted Soil](#), *Biodegradation*, **15(2)**: 79-85 (2004).
- [27] Wu Y.-R., He T.-T., Lun J.-S., Maskaoui K., Huang T.-W., Hu Z., [Removal of Benzo \[a\] Pyrene by a Fungus Aspergillus sp. BAP14](#), *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **25(8)**: 1395-1401 (2009).