پژوهش

پاکسازی زیستی خاک‌های آلوده به نفت

حمیده حیدری، زهرا حسینی
دبیر راهنما: شهره سلیمی
مرکز تحقیقات انجمن زیست‌شناسی پژوهش‌سرای دانش‌آموزی محمد بن زکریای رازی۱ ری

چکیده

در این پروژه مشـخص شـد که در بعضی از منابع طبیعی، مانند خاک و آب میکروارگانیسـم‌هایی وجود دارد که می‌توانند مواد نفتی را تجزیه کنند. آزمایش‌های انجام شده روی ۹ نمونه خاک نشان داد که خاک مناطق میدان آرژانتین، اسفندآباد و رسوبات فین کاشان دارای میکروارگانیسم‌های مؤثرتری برای تجزیه مواد نفتی نسبت به سایر مناطق است. پس از پاکسازی خاک‌های آلوده به نفت به‌وسیلهٔ میکرواگانیسم‌های موجود در نمونه‌های مذکور، میزان کشت گیاه گندم در خاک‌های تیمار شده با نمونه‌های خاکی و انجام کروماتوگرافی برای تعیین ترکیبات نفتی مورد آزمایش قرار گرفت. آزمایش‌ها نشان دادند که میزان رشد گندم در خاک‌های تیمار شده با نمونه‌های خاکی مورد بررسی، بیشتر از خاک‌هایی است که صرفاً آلوده به نفت‌اند.

کلیدواژه‌ها: پاکسازی زیستی، میکروارگانیسم، قارچ، باکتری، آنزیم.

مقدمه

پاکسازی زیستی فرایندی تدریجی است و در آن از موجودات زنده در از بین بردن سموم محیط استفاده می‌کنند. این فرایند یکی از مؤثرترین روش‌های سـاماندهی محیط‌های آلوده و پاکسازی خاک‌های آلوده است (۴). این روش پاکسازی در بسیاری از کشورها، خصوصاً کشـورهای اروپایی، مورد اسـتفاده قرار گرفته و نتایج موفقیت‌آمیز داشته است (۴). پاکسازی زیستی هم در هر دو شرایط، in situ[1] و هم در ex situ[2] پیشرفت‌های علمی بسیاری داشته است که علت اصلی آن افزایش استفاده از مخرب‌های زیستی توسط انسان‌هاست (۴). در تجزیهٔ زیستی، میکروارگانیسم‌ها از مواد آلوده‌کنندهٔ محیط به‌عنوان مادهٔ غذایی و عامل انرژی‌زا استفاده می‌کنند (۲). امروزه یکی از مشکلاتی که مردم جهان با آن روبه‌رو هستند، مشکلات زیست‌محیطی است. افزایش روزافزون آلاینده‌هایی که بسیار دیر تجزیه می‌شوند یا اصلاً تجزیه نمی‌شوند از سال‌های دور اساس فعالیت و تحقیق بسیاری از دانشمندان شده است.

ابتدا دانشمندان از روش‌های علم شیمی و مواد شیمیایی استفاده می‌کردند تا این آلاینده‌ها را تجزیه کنند اما مواد استفاده شده و مواد باقیماندهٔ حاصل از واکنش آنها خود باعث آلودگی محیط زیست می‌شد. از طرف دیگر این صنعت از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نبود. امروزه دانشمندان سعی می‌کنند با روش‌های زیستی این مواد را تجزیه کنند و موجودات و مواد زیستی را با روش‌های مهندسی ژنتیک و نانو زیست فناوری چنان تغییر دهند و ترکیب کنند که بتوانند در سطح صنعتی و مقرون به صرفهٔ اقتصادی و حداقل مصرف برای این تجزیهٔ زیستی، استفاده کنند. بسیاری از کشورهای توسعه‌یافته تا حدی به این صنعت دست یافته‌اند(۳). در ایران نیز بعضی از زمین‌های کشاورزی به علت نشت لوله‌های نفتی و استخراج نفت، آلوده شده‌اند و قابل کشت نیستند.

باتوجه به اینکه اکنون ما واردکننده صنعت تجزیهٔ زیستی با قیمت‌های گزاف هستیم، در صورتی که روش‌های پاکسازی زیستی برای خاک و آب‌های زیرزمینی حاوی مواد آلوده‌کننده، در کشورهایی که به این صنعت دست پیدا کرده‌اند، به‌دلیل مقرون و به صرفه بودن به‌طور وسیع مورد استفاده قرار می‌گیرد (۵- ۶).

ما در انجمن زیست‌شناسی دانش‌آموزی پژوهش سرای رازی با طراحی پروژه‌های پژوهشی، با استفاده از رنگ‌آمیزی و معرف‌های مختلف و باتوجه به امکانات پژوهش‌سـرا درصدد برداشـتن گامی هرچند اندک در جهت انجام این صنعت تجزیهٔ زیستی بر آمدیم تا بتوانیم با اعلام نتایج این بررسی در جهت خودکفایی کشور از این صنعت به کشورهای پیشرفته سهمی داشته باشیم.

مواد آزمایش

۱. نمونه‌های خاک (اســتریل- پالایشــگاه- مناطق اطراف شهری و سایر مناطق)
۲. نمونه‌های آب
۳. نفت خام
۴. کاغذ لیتموس
۵. میتل آمین
۶. میتل اورانژ
۷. برم تیمول بلو
۸. سبز میتل
۹. فنیل فتالنین
۱۰. متلین بلو
۱۱. پیرو گالل
۱۲. فوشین بازی
۱۳. کاغذ کروماتوگرافی
۱۴. استون
۱۵. کاغذ صافی
۱۶. اتانول
۱۷. کاغذ باطله

وسایل

۱. اتــو کلاو (Zaim medical- Iran Tab- Zaeem 87419)
پلیت
بشر
استوانه مدرج
ترازو (با دقت ۰/۰۱)
میکروتیوپ استریل شده
پیپت
لوله آزمایش

روش انجام آزمایش

مقدار خاک آلودهٔ گرفته شــده از روابط عمومی پالایشــگاه نفت شــهری را به ۶ دســته ۳۰ gr وزن کردیم و به مقدار مســاوی در ۵ لیــوان یک‌بار مصرف ریختیم. ایــن در حالی بود که ۳ نمونه خاک را اســتریل کرده بودیم (به‌عنوان شاهد) و گندم را خیس کردیم و پس از آنکه ریشــه‌های آن‌ها به طول ۱ سانتی‌متر رسید در هر لیوان ۱۰ گندم را کاشتیم. تعداد گندم رشد کرده و میزان رشد را پس ۳۰ روز طبق جدول یک یادداشت کردیم.

تیمار خاک‌های آلوده با نمونه‌های زیستی

نمونه‌های موجود خاک (۱۰ gr) را که از مناطق مختلف ازجمله مناطق اطراف شهری جمع‌آوری شده بود به خاک‌های پالایشگاه که به مقدار مســاوی (هر کدام ۳۰ gr) در پلیت توزین شــده بود اضافه کردیم. پس از گذشت ۳۰ روز مراحل زیر را انجام دادیم.

مقــداری از هر نمونــه را در میکروتیوپ‌های از قبل تهیه شــده ریختیــم، به‌طوری که تنها یک‌چهارم حجم میکروتیوپ اســتریل را داشته باشد. از آنجا که بعضی مواد به عنوان واسطه به واکنش تجزیه کمک می‌کنند، ما از هر نوع نمونه ۲ لوله تهیه کردیم و به یکی از لوله‌ها علاوه‌بر مواد لولهٔ دیگر کاغذ باطله خیس کرده و له شده (به‌عنوان لایهٔ ســلولزی) را نیز اضافه کردیــم که این لایه نیز تنها یک‌چهارم حجم لوله را به خود اختصاص می‌داد. در مرحلهٔ آخر مقداری از نفت‌خام را در لوله‌ها می‌ریختیم به‌طوری که تنها یک‌چهارم حجم لوله را داشته باشــد. بدین ترتیب یک‌دوم لوله‌ها بدون لایهٔ ســلولزی و سه چهارم لوله‌های دارای لایهٔ سلولزی پر شد. هدف از کامل پر نکردن لوله این بــود که در آخر حجمی از لوله بــرای اضافه کردن معرف رنگی باقی

نمونهٔ خاک	نمونهٔ شماره۱	نمونهٔ شماره۲	نمونهٔ شماره۳	نمونهٔ شماره۴	نمونهٔ شماره۵	نمونهٔ شماره۶
تعداد گندم رشد کرده	۱	۱	۲	۰	۰	۰
طول رشد بلندترین گندم	۲/۵	۲	۲	۰	۰	۰

جدول شماره۱ شمارش تعداد گندم‌های رشد کرده در خاک‌های تیمار نشده طراف پالایشگاه

معرف رنگی	متیل آمین	تورنسل	میتل اورنژ	برم تیمول بلو	سبز متیل	فنل فتالئین	متیلن بلو	پیروگالل
معرف+ حلال آب	سفید	بنفش کم‌رنگ	نارنجی	سبز لجنی	آبی	سفید	آبی پررنگ	قهوه‌ای
معرف+نفت	ایجاد رسوب دانه دانه	بدون تغییر رنگ و شکل	بدون تغییر	سیاه	بدون تغییر	بدون تغییر	ایجاد رسوب دانه دانه	بدون تغییر

جدول ۲ اثر معرف‌های رنگی بر نفت خام

بماند. پس از یک هفته تغییرات ظاهری رخ داده در میکروتیوپ‌ها را یادداشت کردیم. این عمل تا چند ماه ادامه داشت.

مرحلـهٔ بعدی انتخاب معرف مناسـب برای نفـت خام به فرض تجزیه شـده بود. با مشـورت آقای دکتر وطنی، استاد دانشکدهٔ فنی دانشـگاه تهران و مطالعه کتب مختلف نتوانسـتیم یک معرف رنگی اختصاصی برای نفت خام و تجزیه شده پیدا کنیم. لذا سعی کردیم با آزمایش روی معرف‌های رنگی موجود در آزمایشگاه معرفی پیدا کنیم

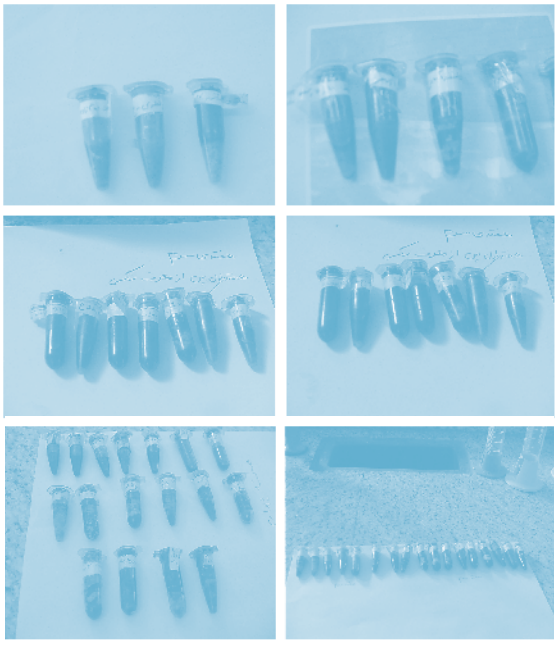
به‌طور کلی پاکسـازی زیسـتی راهی مؤثـر و مقرون به صرفه بـرای پاکسـازی آب‌های زیرزمینـی و خاک‌های آلوده پیشنهاد می‌کند. مزیت‌های این روش در مقایسه با مضرات آن بیشتر است، گواه اینکه بسیاری از کشورها این روش را برای پاکسازی انتخاب می‌کنند

که اولاً با نفت خام تغییر رنگ بدهد ثانیاً رنگ آن با نفت تجزیه شده نیز تغییر کند.

از آنجا که فقط برم تیمول بلو با نفت **تغییر** رنگ **واضح** داد آن را به‌عنوان معرف رنگی انتخاب کردیم. به میکروتیوپ‌ها معرف رنگی برم تیمول بلو را به‌طوری که تنها یک‌سـوم حجم لوله را داشته باشد اضافه کردیم و تغییرات رنگ آن را طی چند هفته یادداشـت کردیم.

در این پروژه ما درصدد برداشتن گامی هرچند اندک در جهت انجام این صنعت تجزیهٔ زیستی برآمدیم تا بتوانیم با اعلام نتایج این بررسـی در جهت خودکفایی کشور از این صنعت به کشورهای پیشرفته، سهمی داشته باشیم

خوشبختانه رنگ برم تیمول با نفت‌خام قبل از تیمار با مواد زیستی و پس از تیمار فرق می‌کرد و از سیاه به سبز و قرمز تغییر رنگ می‌داد.



شکل۱ تصاویر بالا نمونه‌های دانش‌آموزان را پس از تیمار با نمونه‌های زیستی و تغییر رنگ نمونه‌ها در مقابل معرف‌های رنگی مختلف نشان می‌دهند.

تغییرات نمونه زیستی	تغییرات ظاهری		تغییر رنگ	
	بدون کاغذ	با کاغذ	بدون کاغذ	با کاغذ
نمونهٔ شمارهٔ ۱	–	کاهش حجم	قهوه‌ای روشن	سبز
نمونهٔ شمارهٔ ۲	–	کاهش حجم	قهوه‌ای روشن	سبز
نمونهٔ شمارهٔ ۳	–	کاهش حجم	قهوه‌ای روشن	سبز
نمونهٔ شمارهٔ ۴	–	کاهش حجم	سبز یشمی	سبز
نمونهٔ شمارهٔ ۵	–	کاهش حجم	سبز یشمی	سبز
نمونهٔ شمارهٔ ۶	–	کاهش حجم	سبز	سبز

جدول۳ اثر نمونه‌های زیستی را بر خاک پالایشگاه و تغییرات مشاهده شده را ثبت کردیم.

آزمایش‌های مشـابه را روی نمونه‌های جمع‌آوری شده تکرار کردیم. نتایج به شرح ذیل است:

از آنجا که تغییر رنگ نمونه‌های تیمار شـده دلیل قانع‌کننده‌ای برای تجزیه نفت‌خام نیست در گام بعدی برای اثبات اینکه نفت درون

تغییرات نمونه زیستی	تغییرات ظاهری		تغییر رنگ	
	بدون کاغذ	با کاغذ	بدون کاغذ	با کاغذ
خاک امامزاده	-	کاهش حجم	سبزرنگ	سبز رنگ
خاک قارچ‌دار	کاهش حجم	کاهش حجم	قهوه‌ای روشن	سبز
خاک نوبنیاد	-	-	سبز یشمی	سبزرنگ
خاک قنات	کاهش حجم	کاهش حجم	-	سبزرنگ
خاک سرلک رشت	-	کاهش حجم	قهوه ای مایل به قرمز	سبزرنگ و نارنجی
خاک اسفندآباد	لایه لایه شدن	کاهش حجم	تغییر رنگ نداد	به صورت لایه لایه سبز شده است
خاک خیابان لنگری	کاهش حجم	کاهش حجم بسیار	-	سبز رنگ
آب فردیس کرج	کاهش حجم	لایه لایه شده و حباب هوا بین لایه‌ها وجود داشت	-	سبز و قرمز
آب بید گنه کرج	کاهش حجم	لایه لایه شده و حباب هوا بین لایه‌ها وجود داشت	-	سبز
آب موتور کرج	کاهش حجم	لایه لایه شده و حباب هوا بین لایه‌ها وجود داشت	-	سبز
آب قنات زمان‌آباد	کاهش حجم	لایه لایه شده و حباب هوا بین لایه‌ها وجود داشت	-	سبز
آب آبشار سرلک	بدون تغییر	بدون تغییر	قهوه‌ای تیره	سبز و نارنجی
آب خیابان لنگری		کاهش حجم	-	سبز رنگ
آب آهک	کاهش حجم	کاهش حجم	-	-

جدول ۴ اثر نمونه‌های زیستی بر نفت خام

شکل ۲ انجام کروماتوگرافی روی کاغذ را نشان می‌دهد

میکروتیوپ تجزیه شـده‌اند یا خیر از روش کروماتوگرافی اسـتفاده کردیم. البته برای نشان دادن تجزیه یک ماده می‌توانیم از روش‌های مختلف مثل تقطیر جزء به جزء، کروماتوگرافی، الکتروفورز اسـتفاده کرد اما چون حجم مادهٔ اسـتفاده شـدهٔ ما کم بـود از روش تقطیر استفاده نکردیم.

مراحل انجام کروماتوگرافی

۱. ابتدا کاغذهای کروماتوگرافی را به عرض ۲ سانتی‌متر و طول ۲۵ سـانتی‌متر بریدیم. ۲ سانتی‌متر بالای لبهٔ کاغذ را بامداد علامت

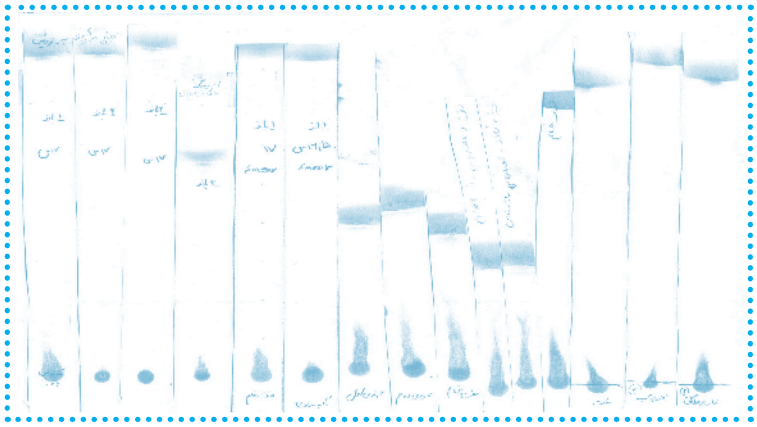
شکل ۳ انجام کروماتوگرافی روی کاغذ را نشان می‌دهد

گذاشتیم.

۲. روی یـک کاغـذ نمونهٔ نفت‌خـام و روی کاغذهای دیگر نمونهٔ نفت خام حاوی مواد زیستی را گذاشتیم.

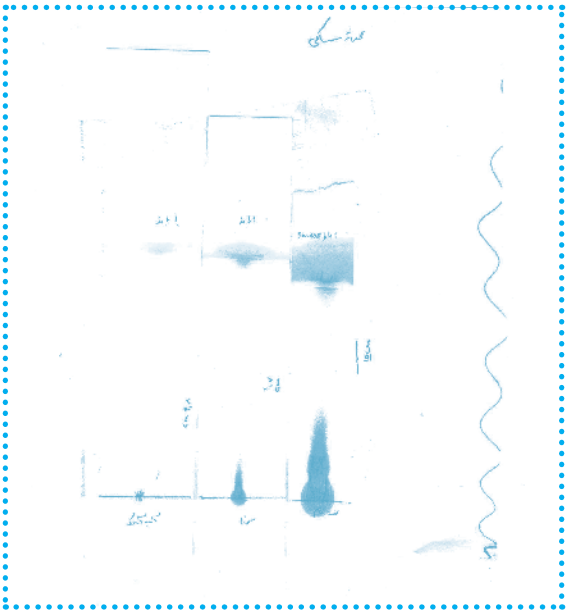
۳. درون اسـتوانهٔ مدرج‌هـا را حلال بوتانل پرکـرده و کاغذهای کروماتوگرافـی را درون آنها گذاشتیم.

۴. وقتی حلال به یک سـانتی‌متر لبهٔ بالایی کاغذ رسـید کاغذ را از درون استوانه مدرج خارج کرده و پس از خشک شدن از آن عکس گرفتیم.



شکل ۴ نتایج کروماتوگرافی

چنانچه در شکل (۴ و ۵) مشاهده می‌شود سرعت حرکت مواد در نمونـهٔ نفت‌خام و نمونه‌های تیمار شـده فرق می‌کند که دلیل بر تغییرات حاصل بر نفت می‌باشد.



شکل ۵ نتایج کروماتوگرافی

کاشت گندم مجدد

برای اینکه مطمئن شویم نفت موجود در خاک آلوده تجزیه شده و برای کشت قابل استفاده است، نمونه‌های تیمار شده را مانند مرحلهٔ اول که در خاک‌های مناطق اطراف پالایشگاه گندم کشت داده بودیم عمل کردیم و در نمونه‌های تیمار شـدهٔ خود به کشـت گندم روی آوردیم.

استفاده گیاه گندم دو علت داشت:

الف) گندم گیاهی مقاوم است

ب) گندم یکی از گیاهان بومی منطقهٔ شهر ری است.

در آخر نتایج کشت گندم را در جدولی نوشتیم

نوع زمین نمونه زیستی	تعداد گندم رشد کرده در خاک آلوده به نفت	طول رشد بلندترین گندم در خاک آلوده به نفت	تعداد گندم رشد کرده در خاک استریل شده (نمونه شاهد)	طول رشد بلندترین گندم در خاک استریل شده (نمونه شاهد)	تعداد گندم رشد کرده در خاک آلودهٔ تیمار شده	طول رشد بلندترین گندم در خاک تیمار شده
خاک میدان معلم	۱	۴	۰	۰	۹	۵
خاک امامزاده	-	۲	۰	۰	۴	۵/۵
خاک باغچهٔ پژوهش‌سرا	-	۲	۱	۱/۵	۶	۴/۵
خاک قنات	-	۳	۱	۲	۱	۴
خاک بید گنه	-	۶	۰	۰	۲	۴
خاک خیابان لنگری	۲	۵	۰	۰	۱۰	۷
خاک اسفندآباد	۱	۹	۰	۰	۱۰	۶/۵
رسوب فین کاشان	-	۶	۰	۰	۱۰	۸
خاک با قارچ درختی	۵	۹	۲	۲/۵	۱۰	۷/۵
خاک سرلک	۱	۱۰	۰	۰	۷	۵
خاک کرج	۳	۸	۰	۰	۱۰	۷/۵

جدول ۵ مشخصات گندم‌های رشد کرده در زمین های سالم، آلودهٔ تیمار شده، خاک آلوده به نفت

نتایج آزمایش

نمونه‌های زیستی ما شامل خاک، آب و قارچ بود. هر آزمایش ۲ بار تکرار می‌شـد. هدف ما قابل کشت شدن زمین‌های آلوده به نفت بود. آنچه مشـخص نیست نتایج براسـاس نوع خاک و نمونهٔ زیستی استفاده شده اختلاف داشت اما ظاهراً چنانچه خاک آلوده تحت تأثیر تجزیهٔ زیسـتی قرار گیرد نه تنها قابل کشت می‌شود بلکه نسبت به خاک معمولی حاصلخیزتر نیز شده است.

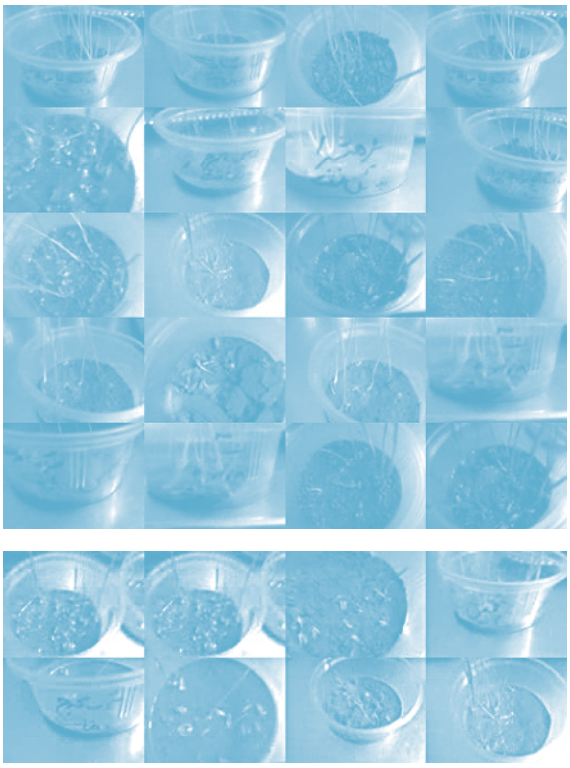
با توجه به نمودار ۱ نتیجه می‌شود که گندم در خاک استریل شدهٔ پالایشگاه هیچ رشدی ندارد و امکان رشد گندم در خاک غیراستریل اطراف پالایشگاه بسیار کم است.

باتوجه به نمودار ۲ نتیجه می‌شود که خاکی که همراه قارچ است با وجود آلوده بودن به نفت‌خام اثر مؤثرتری بر رشد گندم‌ها دارد.

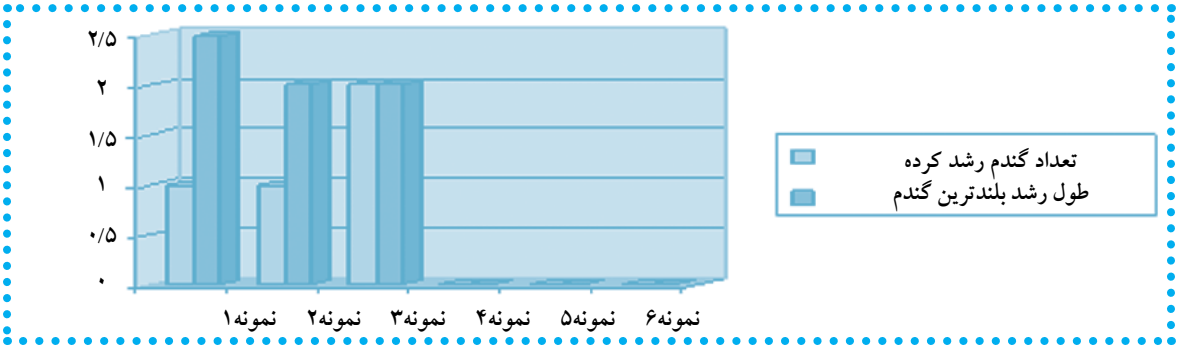
با توجه به نمودار ۳ نتیجه می‌شـود که خاک‌های مناطق میدان معلم، خیابان لنگری، اسـفندآباد، رسوب فین کاشان، خاک همراه با قارچ درختی، خاک کرج دارای میکروارگانیسم‌هایی مؤثرتری نسبت به سایر نمونه‌ها هستند که می‌توانند شرایطی را برای رشد گندم در خاک‌های آلودهٔ پالایشگاه فراهم کنند.

بحث:

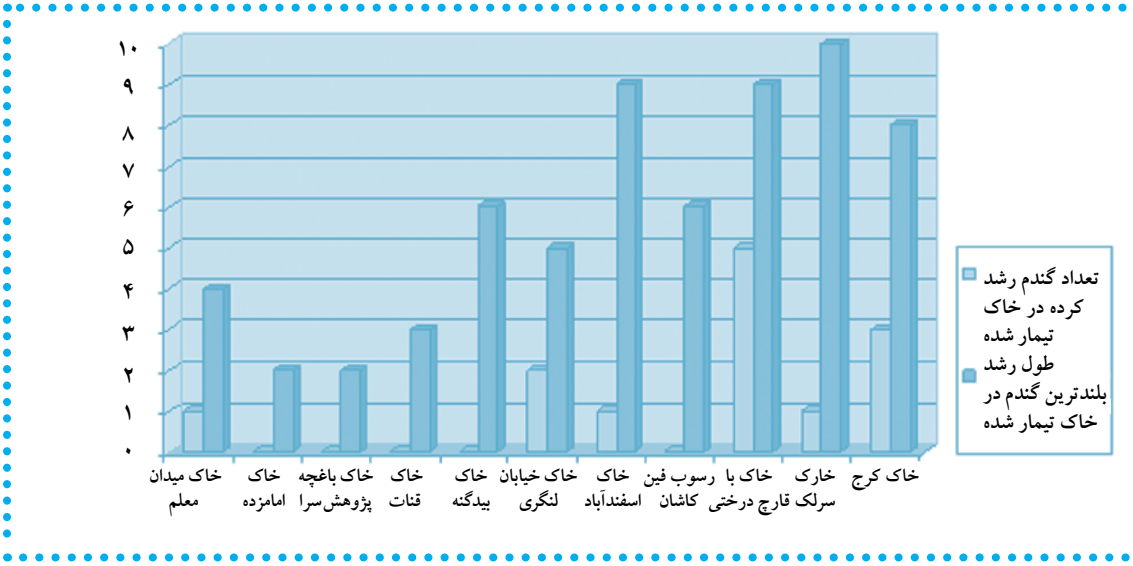
به‌طور کلی پاکسـازی زیستی راهی مؤثر و مقرون به صرفه برای پاکسـازی آب‌هـای زیرزمینی و خاک‌های آلوده پیشـنهاد می‌کند.



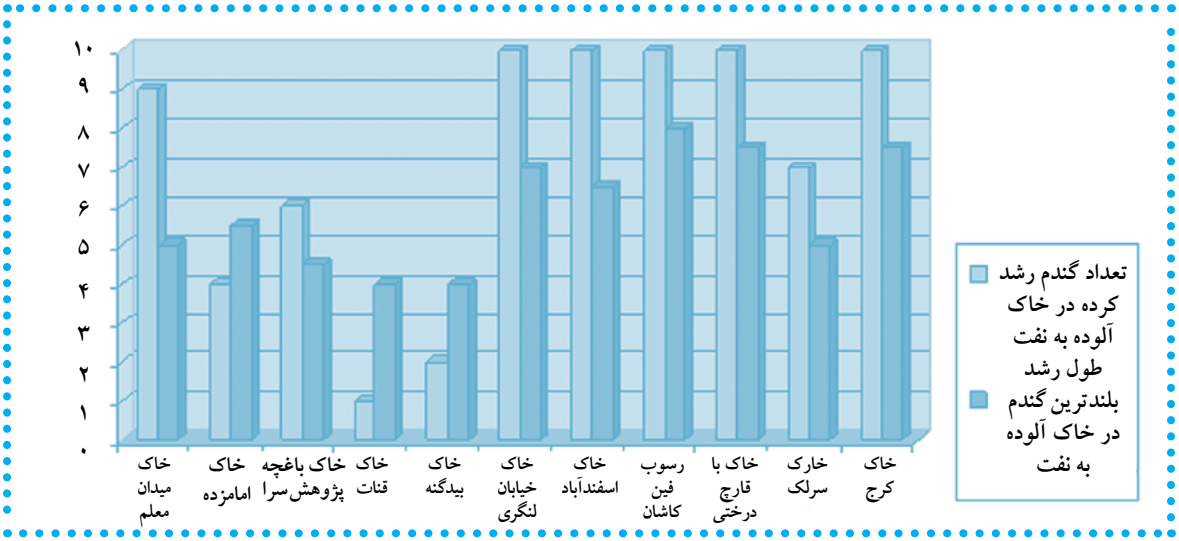
شکل ۶ گندم‌های رشد کرده در زمین‌های آلودهٔ تیمار شده



نمودار ۱- ۲ تعداد و طول گندم‌های رشد کرده در خاک آلودهٔ پالایشگاه در شرایط استریل و غیراستریل



نمودار ۳- ۲ تعداد و طول گندم‌های رشد کرده در نمونه‌های خاکی تیمار شده



نمودار ۲- ۲ تعداد و طول گندم‌های رشد کرده در نمونه‌های خاکی جمع‌آوری شده از مناطق مختلف

مزیت‌های این روش در مقایسه با مضرات آن بیشتر است، گواه اینکه بسیاری از کشورها این روش را برای پاکسازی انتخاب می‌کنند (۴).

بعضی منابع خاک جمع‌آوری شـده به‌خوبی نفت خام را تجزیه کرده بود علائم این تجزیه برای ما، تغییر رنگ نفت خام سیاه به رنگ سبز و قرمز با استفاده از معرف رنگی، تغییر سرعت حرکت نفت، تعداد لایه‌های ایجاد شـده روی کاغذ کروماتوگرافی و رشد گندم در خاک، واجد آلاینده نفتی بود که بدون افزایش عامل مورد بررسـی، رشـد نمی‌کرد. برای ما مسلم شد که در بعضی خاک‌ها میکروارگانیسم‌هایی از قبیل باکتری‌ها و قارچ‌هایی وجود دارند که می‌توانند مواد نفتی را تجزیه کنند. لازم به تذکر اسـت که در سـال ۲۰۰۴ آزمایشی انجام گرفته[1] و به نتایج مشابهی منجر شده است.

در این پروژه ما درصدد برداشـتن گامی هرچند اندک در جهت انجـام این صنعت تجزیهٔ زیسـتی برآمدیم تا بتوانیـم با اعلام نتایج این بررسـی در جهت خودکفایی کشـور از این صنعت به کشورهای پیشـرفته، سهمی داشته باشیم. امید است افرادی دیگر در ادامهٔ این پروژه نتایج مؤثرتری به ثمر رسانند.

پیشنهادها

۱. تخلیص و جداسـازی باکتری‌ها و قارچ‌های مؤثر در پاکسازی آلاینده‌های نفتی از منابع طبیعی

۲. بررسـی و مقایسـه کارایی این باکتری‌ها و قارچ‌ها نسبت به یکدیگر پاکسازی آلاینده‌های نفتی از منابع طبیعی

۳. ایجاد باکتری‌ها و قارچ‌های موتانت با استفاده از موتاژن‌ها که قدرت تجزیه کردن آلاینده‌های نفتی را بیشتر دارند.

پی‌نوشت

۱. درون موجود زنده

۲. خارج از شرایط موجود زنده

منابع

1. A, Rao,m,potential of extra cellular enzymes inremediation of polluted gianfred soils,2004,university of Napoli, Italy

2. Hammel, K. E., and P. J. Tardone. 1988. The oxidative 4-dechlorination of polychlorinated phenols is catalyzed by extracellular fungal lignin peroxidase. Biochemistry 27:6563-6568.

3. Janssen, G. G., T. M. Baldwin, D. S. Winetzky, L. M. Tierney, H. Wang, and C. J. Murray. 2004. Selective targeting of a laccase from Stachybotrys chartarum covalently linked to a carotenoid-binding peptide. J. Pept. Res. 64:10-24.

4. Karhunen, E., A. Kantelinen, and M. L. Niku-Paavola. 1990. Mn-dependent peroxidase from the lignin-degrading white rot fungus Phlebia radiate. Arch. Biochem. Biophys. 279:25-31.

5. Sasek, V., J. A. Glaser, and P. Baveye. 2003. The utilization of bioremediation to reduce soil contamination: problems and solution. Kluwer Academic publishers, Amsterdam, The Netherlands.

6. van der Gast, C., A. S. Whiteley, M. Starkey, C. J. Knowles, and I. P. Tompson. 2003. Bioaugmentation strategies for remediating mixed chemichal effluents. Biotechnol. Prog. 19:1156-1161

7. Vyas, B. R. M., S. Bakowsky, V.Šašek, and M. Matucha. 1994. Degradation of anthracene by selected white rot fungi. FEMS Microbiol. Ecol. 14:65-70.

8. wangij, bioreme diation process, swhgwj898. cupedu. cn, 2007.

9. White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Talor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p. 315-322. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (ed), PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, Calif.

10. Wunch, K. G., T. Feibelman, and J. W. Bennett. 1997. Screening for fungi capable of removing bezo[a]pyrene in culture. Appl. Microbiol. Bitotechnol. 47-620:624.

11. zablotowicz,. R.M,.spedeliH.K,.Bioremediation of contaminated soils, 757, southern weed seipnce laboratory.

12. Zak D., Holmes W., MacDonald N. and Pregitzer K (1999) Soil temperature, matri potential, and the kinetics of microbial respiration and nitrogen mineralization. Soil Science Society of Amerrica Journal; 63: 575-584.

13. Zjang J. and Chiao C. (2002) Novel Approches for remediation of pesticide pollutants. International Journal Environmental and Pollution; 18(5):423-433

14. Zhou J. Xia B., Huang H., Palumbo A. and Tiedge J. (2004) Microbial diversity and heterogeneity in sandy subsurface soils. Applied and Environmental Microbiology; 70 (3): 1723-1734