



پایش تغییرات تنفسی خاک لوم‌شنی آلوده به نفتا سبک در تیمارهای مختلف

زیست‌پالایی

زکیه عافیت، مریم نوروزپور، محمدرضا ساریخانی* و ناصر علی‌اصغرزاد

دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، گروه علوم و مهندسی خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران؛

zakieh.afiati1994@gmail.com

دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، گروه علوم و مهندسی خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران؛

Maryamnorozpoor72@gmail.com

دانشیار بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، گروه علوم و مهندسی خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران؛

rsarikhani@yahoo.com

استاد بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، گروه علوم و مهندسی خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران؛

n-aliasghar@tabrizu.ac.ir

« مقاله پژوهشی »

دریافت: ۱۴۰۲/۴/۵ و پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۲۰

چکیده

هیدروکربن‌های نفتی یکی از شایع‌ترین گروه‌های آلوده‌کننده آلی در محیط‌زیست می‌باشند. زیست‌پالایی خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی یک فرآیند مؤثر برای پاک‌سازی آلاینده‌های نفتی در محیط‌زیست است، در تحقیق حاضر در یک خاک لوم شنی برای کاهش یا از بین بردن آلاینده‌ی نفتا سبک با غلظت ۱٪ در خاک، از روش‌های مختلف زیست‌پالایی از جمله تحریک زیستی، تلقیح زیستی و تیمار تلفیقی (شامل تیمار توأم تلقیح زیستی و تحریک زیستی) استفاده شد. این آزمایش به صورت طرح اسپلیت‌پلات با سه عامل (آلودگی، زیست‌پالایی و زمان) با ۳ تکرار در گلدان‌های ۳ کیلوگرمی انجام شد. پس از اجرای آزمایش در فواصل زمانی صفر، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ روز، از گلدان‌های آزمایشی نمونه‌برداری شد و مقادیر تنفس پایه و برانگیخته اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که اعمال تیمارهای زیست‌پالایی باعث کاهش آلودگی نفتا سبک شده و همچنین آلودگی نفتی، فعالیت ریزجانداران (میکروارگانسیم‌ها) خاک را نیز تحت تأثیر قرار داد، به طوری که بیشترین مقدار تنفس پایه و برانگیخته در روزهای ابتدائی به دست آمد، اما با گذشت زمان تنفس پایه نسبت به تنفس برانگیخته افت شدیدتری داشت، به نظر جامعه میکروبی به گلوکز افزوده شده، به عنوان منبع کربن ساده و در دسترس پاسخ داده و تنفس برانگیخته کاهش کمتری داشت، اما تنفس پایه احتمالاً با کمبود منابع کربن مواجه شده و کاهش بیشتری داشت. از میان تیمارهای زیست‌پالایی، تیمار تلفیقی نسبت به دیگر تیمارهای زیست‌پالایی در سطح احتمال ($P < 0.01$) تأثیر بیشتری در کاهش هیدروکربن‌های نفتی داشت. به نظر کاربرد تیمارهای تلفیقی علاوه بر بالا بردن جمعیت میکروبی فعال درگیر در تجزیه ترکیبات نفتی و تأمین شرایط بهینه برای فعالیت آن‌ها، باعث تحریک جمعیت میکروبی بومی خاک شده و روشی مناسب برای حذف ترکیبات نفتی باشد.

کلمات کلیدی: تحریک‌زیستی، تلقیح‌زیستی، تنفس برانگیخته، تنفس پایه

* آدرس ایمیل نویسنده مسئول: rsarikhani@yahoo.com



مقدمه

فعالیت‌های مختلف از جمله اکتشافات نفت، حمل‌ونقل، نشت ناشی از تانکرهای نفتی و یا نشت نفت طی فرآیندهای مختلف بازیافت آن، منجر به انتشار مقدار بسیار زیادی از ضایعات هیدروکربنی به محیط‌زیست شده است که آلودگی‌های بزرگی را ایجاد می‌کند (پنگ و همکاران، ۲۰۰۸). وجود تولیدات پتروشیمی به مقدار بیش از ۳۰ میلیون تن در سال و وجود بیش از ۲۵۰۰۰ کیلومتر خطوط انتقال نفت و گاز و بیش از ۱۳۰۰ ایستگاه سوخت‌گیری و ۱۰۰۰۰ تانکر حمل نفت و فرآورده‌های نفتی در ایران، می‌تواند عاملی برای آلودگی منابع خاک و آب کشور به نفت و فرآورده‌های نفتی باشد (طلائی و همکاران، ۱۳۸۹). وجود هیدروکربن‌های نفتی در خاک، خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و زیست‌محیطی خاک را تحت تأثیر قرار می‌دهد (راماداس و همکاران، ۲۰۱۵). در این میان نفتا به طبقه‌ای از سوخت‌های هیدروکربنی با اشتعال‌پذیری بالا گفته می‌شود که در برج تقطیر پالایش نفت خام بین گازهای سبک و نفت سفید قرار می‌گیرد. نفتا شامل هیدروکربن‌های دارای ۵ تا ۱۲ اتم کربن است، که نقطه‌جوش آن‌ها از ۳۰ تا ۲۰۰ درجه سلسیوس متغیر است. یعنی اگر نفت خام را از ۳۰ تا ۲۰۰ درجه سلسیوس حرارت دهیم و بخش جوشیده را جدا کنیم نفتا به دست خواهد آمد. معمولاً ۱۵ تا ۳۰ درصد نفت خام در این حرارت به جوش می‌آید در نتیجه همین میزان از نفت خام را می‌توان به‌طور مستقیم به نفتا تبدیل کرد. اما نفتا در بازار معمولاً در دو نوع نفتا سبک (هیدروکربن‌های ۵ و ۶ کربنی) و نفتا سنگین (هیدروکربن‌های ۶ تا ۱۲ کربنی) عرضه می‌شود (نوروزپور و همکاران، ۱۴۰۲). نفتا به‌عنوان یکی از مهم‌ترین مواد اولیه مورد استفاده در صنعت پتروشیمی است. به‌طور مثال از نفتا به‌عنوان خوراک اصلی تولید فراورده‌های مختلف پتروشیمی از جمله حلال‌ها و رقیق‌کننده‌ها، مواد اولیه انواع پلاستیک، الیاف مصنوعی،

الکل‌های صنعتی و برای تولید مواد شوینده استفاده می‌کنند (نوروزپور و همکاران، ۱۴۰۲). با توجه به اثرات مضر هیدروکربن‌های نفتی، اقدامات لازم برای کاهش سطح آن‌ها در محیط‌زیست ضروری است. روش‌های متعددی برای کاهش آثار زیست‌محیطی آلودگی نفتی توسعه یافته است، ولی مطالعه روی روش‌های ساده، سریع و ارزان‌قیمت در این زمینه ضروری است. یکی از بهترین روش‌های احیای خاک‌های آلوده استفاده از توانایی میکروارگانیسم‌ها در تجزیه ترکیبات سمی، طی فرآیند پاک‌سازی بیولوژیکی است. پاک‌سازی بیولوژیکی ترکیبات نفتی در خاک را می‌توان به‌وسیله تحریک میکروارگانیسم‌های بومی، افزایش مواد غذایی و اکسیژن به خاک یا تلقیح کنسرسیوم میکروبی به خاک بهبود بخشید (نوروزپور و همکاران، ۱۴۰۲). روش‌های زیست‌پالایی خاک به دو دسته اصلی تقسیم می‌شوند: تلقیح‌زیستی و تحریک‌زیستی، که روش تلقیح‌زیستی به معرفی ریز جانداران بومی و غیربومی تخریب‌کننده نفت می‌پردازد که پس از جداسازی و شناسایی گونه‌های کارآمد تجزیه‌کننده نفت امکان تلقیح آن‌ها به خاک آلوده فراهم می‌شود (افشارنیا و همکاران، ۱۴۰۱). اما در روش تحریک‌زیستی، تشدید فعالیت سوخت‌وساز گونه‌های بومی تجزیه‌کننده نفت با اضافه کردن مواد مغذی و یا اصلاح‌گرهای آلی انجام می‌گیرد، تا حذف ترکیبات نفتی افزایش یابد (وو و همکاران، ۲۰۱۶). مرتضوی و همکاران (۲۰۱۳) طی مطالعه‌ای، تجزیه‌زیستی نفت خام را در حضور میکروارگانیسم‌های بومی خاک در رسوبات ساحلی شمال خلیج مکزیک در سه تیمار شاهد (شن و رسوبات ساحلی به‌تنهایی)، رسوبات آلوده به نفت خام و رسوبات آلوده به نفت خام همراه با ماده آلی را با همدیگر مقایسه کردند و نتایج نشان داد که تجزیه‌زیستی نفت خام در تیمار رسوبات آلوده به نفت به همراه ماده آلی حدود ۷۶٪ بیشتر از تجزیه‌زیستی ذاتی تیمار شاهد بود.

گذشت چهار ماه تنفس پایه خاک کاهش نشان داد. آن‌ها دلیل این کاهش را کاهش مواد غذایی برای میکروب‌ها و رسیدن به فاز ثابت و مرگ میکروبی توجیه کردند. با این حال زیست پالایی خاک‌های آلوده به نفت می‌تواند به شدت تحت تأثیر ماهیت هیدروکربن‌ها و مدت زمان آلودگی قرار گیرد.

با توجه به تنوع ترکیبات نفتی و کاربرد آن‌ها در حوزه‌های مختلف، هدف این مطالعه اجرای روش‌های مختلف زیست پالایی از قبیل تحریک زیستی (شامل تأمین نیتروژن و فسفر (با نسبت ۱:۵:۲۰ C:N:P)، افزودن کود دامی (۵٪ w-w) و سورفکتانت^۱ Tween 80 (۳٪/۰/۰))، تیمار تلقیح زیستی (استفاده از کنسرسیون باکتریایی (*Arthrobacter* sp. COD2- (۵٪ v-w) ، *Stenotrophomonas nitritireducens* COD5-6 ، *S. acidamainiphila* COD1-1 (به میزان ۵٪ v-w))، تیمار تلفیقی (شامل تیمار توأم تلقیح زیستی و تحریک زیستی) به منظور حذف زیستی ترکیب نفتی نفتا سبک است. علاوه بر مقایسه این روش‌ها با هم، بررسی روند تغییرات فعالیت تنفسی خاک در تیمارهای مورد استفاده بخش دیگری است که مورد توجه قرار می‌گیرد تا بتوان مقایسه‌ای بین خاک آلوده و شاهد تحت تأثیر تیمارهای مختلف انجام داد.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی خاک و اعمال تیمارهای زیست پالایی

در این آزمایش از یک خاک دارای بافت لوم شنی استفاده شد. خاک مورد نظر از ایستگاه خلعت پوشان دانشگاه تبریز نمونه برداری شد و برای استفاده در گلدان‌های ۳ کیلوگرمی از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شد. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در (جدول ۱) آورده شده است.

شاخص‌های بیولوژیکی عنوان یک روش مناسب برای بررسی اثر آلاینده در خاک هستند. ریزجانداران خاک، به کوچک‌ترین تنش‌های اکوسیستمی بسیار حساس بوده و با تنظیم میزان فعالیت، بیومس میکروبی و ساختار جامعه خود به سرعت در حال پاسخگویی به عوامل تنش‌زا می‌باشند. همچنین تنوع ساختاری یک جامعه باکتریایی نیز به تغییرات محیطی بسیار حساس است و در واکنش با آن‌ها تغییر می‌کند. تنفس خاک، تنفس برانگیخته و سهم متابولیکی (q_{CO_2}) شاخص‌های حساسی برای تعیین اثر متغیرهای محیطی بر فعالیت میکروبی خاک هستند که از این پارامترها برای تجزیه و تحلیل اثر عوامل محیطی و تنش‌های وارده بر جمعیت میکروبی خاک بهره‌گیری می‌شود (نوروزپور و همکاران، ۱۴۰۲؛ مایلا و کلوت، ۲۰۰۵؛ میسباندرو و همکاران، ۲۰۱۳). تنفس یکی از مهم‌ترین فرآیندهای بیولوژیک خاک است، که توسط ریزجانداران خاک صورت می‌گیرد. تنفس ریزجانداران خاک فرآیندی انرژی‌زاست که طی آن ترکیبات آلی با مبادله جفت الکترون‌ها، اکسایش یافته و دی‌اکسیدکربن متصاعد می‌شود. به‌طور کلی عواملی نظیر دما، رطوبت، pH، میزان مواد آلی، نوع و وضعیت آن (تازه و پوسیده) بر فعالیت تنفسی ریز جانداران خاک تأثیر دارد. در شرایط آزمایشگاهی علاوه بر تنفس پایه و طبیعی خاک می‌توان با افزودن سوبسترا به خاک تنفس حاصل از سوبسترا (SIR) را اندازه‌گیری کرد (ابراهیمی و همکاران، ۲۰۱۹).

حسن شاهیان و همکاران (۱۳۸۹) برای تجزیه مواد مختلف هیدروکربنی دو سویه از باکتری‌های *سودوموناس* و *سینتوباکتر* را از خلیج فارس جداسازی نمودند، آن‌ها میزان کارایی باکتری *سودوموناس* را در تجزیه نفت ۴۱ درصد گزارش کردند. افشارنیا (۱۳۹۷)، برای کاهش هیدروکربن‌های نفتی در خاک آلوده پالایشگاه تبریز از جدایه‌های باکتریایی تجزیه‌کننده نفت (شامل COD 1-1، COD 1-4، COD 2-1، COD 2-3 و COD 5-6) استفاده کردند و مشاهده کردند که تنفس پایه خاک در روزهای ابتدائی افزایش یافت ولی بعد از

¹ Surfactant

جدول ۱- نتایج تجزیه فیزیکی و شیمیایی خاک مورد آزمایش

pH گل اشباع	EC _e (dS/m)	فسفر قابل جذب (mg/kg) اولسن	پتاسیم قابل جذب (mg/kg) استات آمونیم ۱N	درصد کربن آلی	رس (درصد)	سیلت (درصد)	شن (درصد)	بافت	رطوبت	
									آهک (درصد)	ظرفیت مزرعه (درصد وزنی)
۷/۵۶	۱/۹۰	۳	۱۹۸	۰/۱۷	۱۸	۱۳	۶۹	Sandy Loam	۲/۸۵	۱۲/۵۷

استفاده شد (افشارنیا و همکاران، ۱۴۰۱). جدایه‌های مورد استفاده در این آزمایش از بانک میکروبی گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه تبریز تهیه شدند. هر سه جدایه ابتدا به‌طور جداگانه در محیط کشت نوترینت برات به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۲۶ درجه سلسیوس کشت داده شدند و پس از رسیدن به جمعیت مناسب (10^8 CFU/ml) به میزان ۵٪ حجمی-وزنی (۱۵۰ میلی‌لیتر زادمایه باکتریایی در ۳۰۰۰ گرم خاک) به خاک‌های مورد آزمایش بر اساس چینش آزمایش تلقیح شدند. در تحریک زیستی، بعد از تهیه کود گاوی، کودها به مدت چهار روز هوا خشک شد و سپس از الک دو میلی‌متری عبور داده شد و با نسبت ۵٪ وزنی مورد استفاده قرار گرفت (افشارنیا و همکاران، ۱۴۰۱). کود مورد استفاده به ترتیب دارای ۲۴/۹۶، ۱/۵۲ و ۰/۵ درصد کربن، نیتروژن و فسفر بود. در مورد تیمار نیتروژن و فسفر که مربوط به تأمین عناصر نیتروژن و فسفر بود با توجه به نسبت ۲۰:۵:۱ (C:N:P)، جهت تأمین عناصر نیتروژن و فسفر به ترتیب از منابع نترات آمونیوم و فسفات پتاسیم استفاده شد (به‌عنوان نمونه در خاک آلوده با تیمار کود شیمیایی نیتروژن و فسفر، ۰/۷۹ گرم کود از منبع فسفات پتاسیم و ۳/۴ گرم کود از منبع نترات پتاسیم به ازای ۳ کیلوگرم خاک گلدان استفاده شد). همچنین جهت استفاده از سورفاکتانت Tween 80 در تیمارهای مربوطه از نسبت ۰/۳ درصد حجمی-وزنی استفاده شد (دشتی و همکاران، ۲۰۱۵). در تیمار تلفیقی مخلوطی از کنسرسیون باکتریایی با ۵٪ حجمی-وزنی، کود گاوی با ۵٪ وزنی-وزنی، کود شیمیایی نیتروژن و فسفر و سورفاکتانت Tween 80 با ۰/۳٪ حجمی-وزنی استفاده شد. با توجه

برای انجام آزمایش پس از آمیخته کردن خاک با نفتا سبک (به میزان ۱٪) و اعمال تیمارها، نمونه خاک در گلدان‌ها ریخته شد و سپس نمونه خاک‌های آلوده شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۱۲۰ روز نگهداری شدند. برای اجرای این آزمایش از تیمارهای مختلف زیست‌پالایی یعنی تحریک زیستی، تلقیح زیستی و روش تلفیقی استفاده شد. نمونه‌ها در طول آزمایش، هفته‌ای یک‌بار با روش مخلوط کردن هوادهی شدند و هفته‌ای دو بار رطوبت نمونه خاک‌ها با روش اسپری کردن آب روی نمونه خاک‌ها تا حد ۷۰-۸۰ درصد ظرفیت نگه‌داشت آب‌خاک (FC) تنظیم شد. قبل از شروع آزمایش با استفاده از صفحات فشاری FC خاک اندازه‌گیری شده بود. در روزهای ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ از هر گلدان به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت زیستی تنفس پایه و تنفس برانگیخته نمونه‌برداری انجام شد. با توجه به توضیحات فوق فاکتورهای آزمایش شامل فاکتور آلودگی (وجود و عدم وجود آلودگی)، فاکتور زیست‌پالایی (شامل تیمار شاهد، تلقیح باکتری، تأمین نیتروژن و فسفر، استفاده از سورفاکتانت، افزودن کود دامی و تیمار تلفیقی) بودند. تعداد تکرار در آزمایش نیز ۳ بوده است. با توجه به اینکه نمونه‌برداری در زمان‌های مختلف در طول آزمایش نیز وجود داشته است فاکتور سوم نیز زمان بوده است.

تلقیح زیستی و تحریک زیستی و تیمار تلفیقی

برای انجام تلقیح زیستی از جدایه‌های باکتریایی تجزیه‌کننده نفت *Arthrobacter* sp. COD2-3، *Stenotrophomonas nitritireducens* COD5-6 و *Stenotrophomonas acidamainiphila* COD1-1

به ۱۰ گرم خاک مرطوب همانند روش فوق اندازه‌گیری شد، با این تفاوت که CO₂ متصاعد شده پس از گذشت ۶ ساعت به روش تیتراسیون اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش به صورت طرح فاکتوریل اسپلیت پلات بر پایه طرح کاملاً تصادفی به اجرا درآمد، که در آن زمان (۹ زمان مختلف، از روز صفر تا ۱۲۰ روز)، آلاینده (وجود و عدم وجود نفتا سبک) و تیمارهای زیست‌پالایی (شامل تیمار شاهد، تلقیح باکتری، تأمین نیتروژن و فسفر، استفاده از سورفکتانت، افزودن کود دامی و تیمار تلفیقی)، فاکتورهای سه‌گانه آزمایش بودند. مقایسه‌های میانگین در سطح احتمال یک درصد با آزمون LSD توسط نرم‌افزار آماری SPSS-24 انجام گرفت. نمودارها نیز توسط نرم‌افزار Excel ترسیم شدند.

نتایج و بحث

طبق نتایج حاصل از پایش فعالیت‌های زیستی خاک طی زیست‌پالایی، بین فاکتورهای آلودگی (خاک شاهد و خاک‌آلوده به نفتا سبک)، تیمارهای زیست‌پالایی (خاک شاهد بدون تیمار زیست‌پالایی، تلقیح کنسرسیون باکتریایی، سورفکتانت Tween 80، کود شیمیایی نیتروژن و فسفر، کود گاوی و تلفیقی) و فاکتور زمان (۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ روز) در سطح احتمال ۱٪ ($P < 0/01$) اختلاف معنی‌داری وجود داشت (جدول ۲). با توجه به (شکل ۱)، مقدار تنفس پایه به ترتیب در تیمار تلفیقی، سورفکتانت Tween 80 و تلقیح کنسرسیون باکتریایی بیشترین مقدار به دست آمد و پس از آن‌ها کود گاوی، خاک شاهد و کود شیمیایی نیتروژن و فسفر، از نظر مقدار BR در یک گروه آماری قرار گرفتند.

به توضیحات فوق تیمارهای آزمایشی مورد استفاده در این تحقیق شامل تیمار شاهد، تلقیح باکتری، تأمین نیتروژن و فسفر، استفاده از سورفکتانت، افزودن کود دامی و تیمار تلفیقی بود. قابل‌ذکر است که سورفکتانت‌های مختلف شیمیایی (نظیر توین ۸۰) و زیستی از طریق امولسیون نمودن ترکیبات نفتی باعث افزایش انحلال‌پذیری این ترکیبات در محیط آبی و در نتیجه افزایش دسترسی زیستی میکروارگانیسم‌های زنده به این ترکیبات و بهبود شرایط تجزیه و مصرف آن‌ها می‌شوند. همچنین تأمین عناصر نیتروژن، فسفر و پتاسیم به مقدار و نسبت مناسب در پیشبرد زیست‌پالایی مؤثر است بدین خاطر در تحقیق حاضر با توجه به نتایج آنالیز خاک و حضور ماده نفتی صرفاً نیتروژن و فسفر مورد استفاده قرار گرفت که این تیمار خاص نیز به صورت اختصاری نیتروژن و فسفر نامگذاری شد.

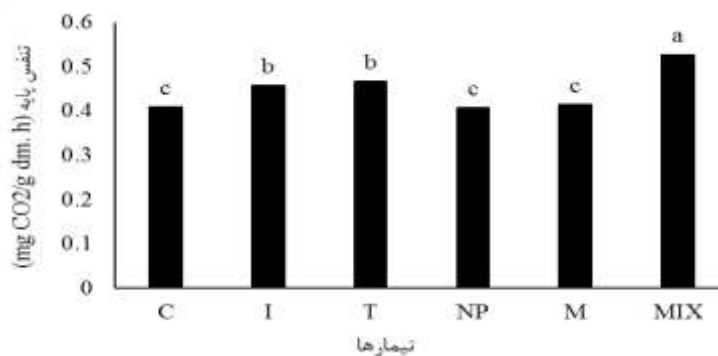
اندازه‌گیری تنفس پایه و تنفس برانگیخته

اندازه‌گیری تنفس پایه به روش تیتراسیون انجام شد (اندرسون، ۱۹۸۵). ۱۰ گرم خاک مرطوب به داخل ظرف شیشه‌ای درب‌دار ۱/۵ لیتری با ۱۰ میلی‌لیتر محلول هیدروکسید سدیم ۰/۱ مولار به مدت سه روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس گرماگذاری شد. پس از اتمام انکوباسیون، به منظور تعیین تنفس پس از تخلیه محلول هیدروکسید سدیم به درون ارلن، داخل ظرف دو مرتبه با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر شستشو داده شد و سپس دو میلی‌لیتر محلول کلرید باریم ۰/۵ مولار اضافه شد و ۳-۴ قطره شناساگر فنل‌فتالین به محلول اضافه شد و با اسید کلریدریک ۰/۱ مولار تیتراژ شد. برای نمونه شاهد نیز همین مراحل کار بدون افزودن نمونه خاک اجرا شد. در تنفس برانگیخته پس از افزودن ۴۰ میلی‌گرم گلوکز (۰/۴ درصد)

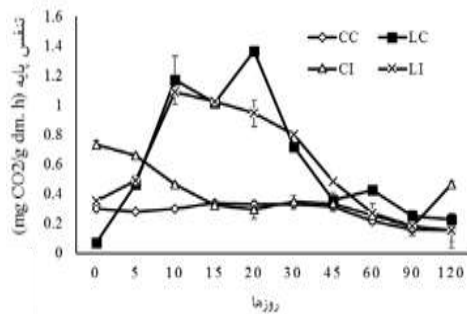
جدول ۲- تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده

میانگین مربعات			منابع تغییرات
تنفس پایه	تنفس برانگیخته	درجه آزادی	
۱/۶۰۵**	۱۰/۵۴۰**	۹	فاکتور زمان (A)
۰/۰۰۲	۰/۰۲۷	۲۰	خطا
۰/۱۳۰**	۱/۸۱۸**	۵	فاکتور تیمار زیست‌پالایی (B)
۰/۰۷۳**	۰/۵۱۹**	۴۵	اثر متقابل A×B
۳/۶۹۳**	۱۲/۱۳۷**	۱	فاکتور آلودگی (C)
۱/۲۱۴**	۴/۴۳۳**	۹	اثر متقابل A×C
۰/۱۲۱**	۰/۴۳۹**	۵	اثر متقابل B×C
۰/۰۷۱**	۰/۴۰۶**	۴۵	اثر متقابل A×B×C
۰/۰۰۷	۰/۰۳۹	۲۲۰	خطا
۱۸/۴۱	۶/۳۶	---	ضریب تغییرات %

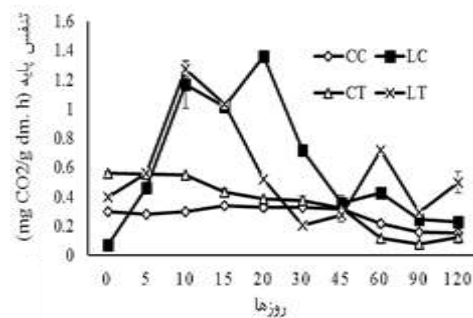
**معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۱٪ (P<0.01)



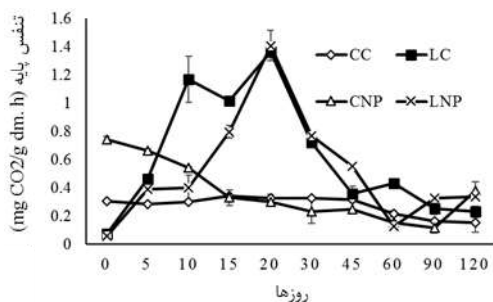
شکل ۱- مقادیر تنفس پایه اندازه‌گیری شده در خاک تحت تیمارهای مختلف زیست‌پالایی (خاک شاهد (C)، کنسرسیونم باکتریایی (I)، سورفکتانت Tween 80 (T)، کود شیمیایی نیتروژن و فسفر (NP)، کود گاوی (M) و تیمار تلفیقی (MIX))



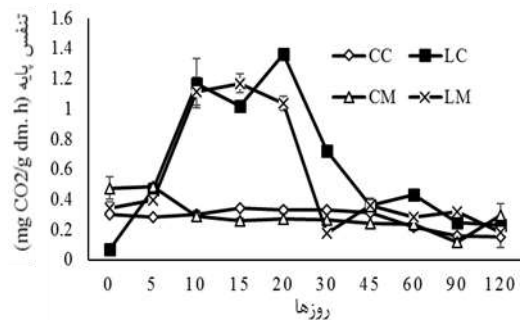
شکل ۲-الف) روند تغییرات زمانی مقادیر تنفس پایه در خاک شاهد بدون تیمار زیست‌پالایی (CC)، خاک شاهد تیمار شده با کنسرسیون باکتریایی (CI)، خاک آلوده به نفتا سبک بدون کنسرسیون باکتریایی (LC) و خاک آلوده تلقیح شده با کنسرسیون باکتریایی (LI)



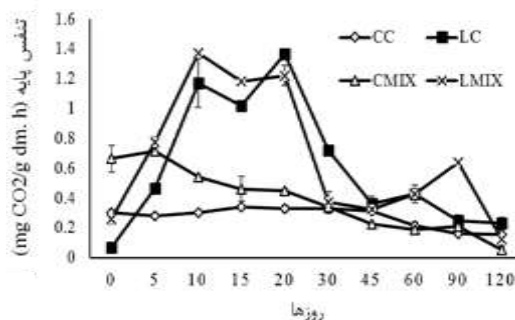
شکل ۲-ب) روند تغییرات زمانی مقادیر تنفس پایه در خاک شاهد بدون تیمار زیست‌پالایی (CC)، خاک شاهد تیمار شده با سورفکتانت Tween 80 (CT)، خاک آلوده به نفتا سبک بدون تیمار Tween 80 (LC) و خاک آلوده تیمار شده با Tween 80 (LT)



شکل ۲-ج) روند تغییرات زمانی مقادیر تنفس پایه در خاک شاهد بدون تیمار زیست‌پالایی (CC)، خاک شاهد تیمار شده با کود شیمیایی نیتروژن و فسفر (CNP)، خاک آلوده به نفتا سبک بدون تیمار کود شیمیایی نیتروژن و فسفر (CNP) و خاک آلوده به نفتا سبک تیمار شده با کود شیمیایی نیتروژن و فسفر (LNP)



شکل ۲-د) روند تغییرات زمانی مقادیر تنفس پایه در خاک شاهد بدون تیمار زیست‌پالایی (CC)، خاک شاهد تیمار شده با کود گاوی (CM)، خاک آلوده به نفتا سبک بدون تیمار کود گاوی (LC) و خاک آلوده تیمار شده با کود گاوی (LM)



شکل ۲-۵) روند تغییرات زمانی مقادیر تنفس پایه در خاک شاهد بدون تیمار زیست‌پالایی (CC)، خاک شاهد تحت تیمار تلفیقی (CMIX)، خاک آلوده به نفتا سبک بدون تیمار تلفیقی (LC) و خاک آلوده با تیمار تلفیقی (LMIX)

است. اما تأثیر تلقیح زیستی روی تخریب نفت یک موضوع مهم و چالش‌برانگیز است. برخی مطالعات نشان می‌دهند که تلقیح زیستی تنها باعث افزایش راندمان تخریب هیدروکربن‌ها به‌طور موقت می‌شود در حالیکه تحریک زیستی یک روش زیست‌پالایی مناسب برای حذف مؤثر آلاینده‌ها است (کاپوبی و همکاران، ۲۰۱۱). زائو و همکاران (۲۰۱۱)، در آزمایش خود از کنسرسیوم باکتریایی شامل *Microbacterium Rhizobium sp.*، *Brucella Bacillus sp.*، *Rhodococcus sp.*، *Pseudomonas sp.*، *Roseomonas sp.* استفاده کردند. تقریباً ۵۲٪ نفت خام با غلظت اولیه ۱۰۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در ۳۰ درجه سانتی‌گراد طی هفت روز حذف شد، و میزان حذف هیدروکربن‌های آلیفاتیک و آروماتیک به ترتیب ۷۱/۴٪ و ۳۶٪ بوده است. نوروزپور و همکاران (۱۴۰۲)، در تحقیقی مشابه برای کاهش آلودگی هیدروکربن‌های نفتی، بعد از ایجاد ۷ درصد آلودگی نفتا سنگین از جدایه‌های باکتریایی (COD 2-3، COD 1-1 و COD 5-6)، استفاده کرد و نتایج ایشان نشان داد؛ مقدار تنفس پایه در نمونه خاک تلقیح شده با کنسرسیوم باکتریایی نسبت به نمونه خاک بدون تلقیح بیشتر است. تلقیح میکروبی در هر دو خاک آلوده و غیر آلوده در روزهای ابتدایی منجر به افزایش تنفس پایه خاک شده است، همچنین تنفس پایه در حضور آلاینده

طبق نتایج به‌دست‌آمده در تنفس پایه در تیمارهای کنسرسیوم باکتریایی (I) (شکل ۲-الف)، کود شیمیایی نیتروژن و فسفر (NP) (شکل ۲-ب)، تیمار Tween 80 (T) (شکل ۲-ج)، تیمار کود گاوی (M) (شکل ۲-د) و تلفیقی (MIX) (شکل ۲-ه) در روزهای ابتدایی با شیب زیاد افزایش و از روز ۱۵ تا ۳۰ م با شدت کاهش‌یافته و بعد از روز ۳۰ با شیب کاهشی ملایم پیش رفته است. همچنین میزان تنفس پایه در تیمارهای تلفیقی، سورفکتانت Tween 80 و تلقیح کنسرسیوم باکتریایی بیشترین مقدار به دست آمد.

با توجه به (شکل ۲-الف)، افزایش معنی‌دار تنفس پایه در سطح احتمال یک درصد در روزهای ابتدایی نشان‌دهنده این است که میکروارگانیسم‌های موجود در خاک و میکروارگانیسم‌های افزوده‌شده به خاک، از هیدروکربن‌های نفتی به‌عنوان منبع کربن استفاده کرده‌اند و فعالیت میکروبی آن‌ها افزایش می‌یابد، اما همان‌طور که مشاهده می‌شود باگذشت زمان و کاهش میزان هیدروکربن‌های در دسترس، فعالیت و جمعیت میکروارگانیسم‌ها، و در نهایت میزان تنفس پایه اندازه‌گیری شده نیز کاهش‌یافته است. تلقیح زیستی زمانی نتیجه-بخش خواهد بود که آلاینده روی میکروارگانیسم‌های بومی خاک تأثیر منفی داشته باشد (وو و همکاران، ۲۰۱۳). بررسی‌ها نشان داده‌اند که روش تلقیح زیستی یک روش مناسب برای تخریب آلاینده‌های نفتی در خاک آلوده

(خاک‌آلوده به نفتای سنگین) نسبت به خاک شاهد بیشتر اندازه‌گیری شده است.

با توجه به (شکل ۲-ب)، میزان تنفس پایه در روزهای ابتدایی در سطح احتمال یک

درصد افزایش یافته است، به نظر می‌رسد علت زیاد شدن تنفس پایه در خاک‌آلوده و غیر آلوده در حضور سورفکتانت Tween 80، در روزهای ابتدایی این است که میکروارگانیسم‌ها از سورفکتانت Tween 80 به‌عنوان منبع کربن استفاده کرده‌اند و همچنین دلیل افزایش بیشتر تنفس پایه در خاک‌آلوده به نفتا سبک نسبت به خاک غیر آلوده این است که در حضور سورفکتانت Tween 80، فراهمی زیستی منابع کربن هیدروکربن‌های نفتی برای میکروارگانیسم‌ها زیاد می‌شود. و ناصری قندعلی و همکاران (۱۳۹۴) برای کاهش آلودگی نفت خام با آلودگی مصنوعی از پارامترهای شیمیایی و بیولوژیکی استفاده کردند. میزان تنفس میکروبی در تیمارهای تلقیح شده با کنسرسیون باکتریایی (باکتری‌های سودوموناس پوتیدا و باسیلوس لاتروسپروس) به‌علاوه سورفکتانت Tween 20، بیشتر بوده و اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد داشت. ترکیبات نفتی سنگین به دلیل حلالیت پایین دارای ماندگاری بالا در محیط‌زیست هستند که این امر باعث کاهش دسترسی زیستی آن‌ها می‌شود (منیف و همکاران، ۲۰۱۵). سورفکتانت‌های مختلف شیمیایی و زیستی از طریق امولسیون نمودن هیدروکربن‌های نفت خام باعث افزایش انحلال‌پذیری این ترکیبات در محیط آبی و در نتیجه افزایش دسترسی زیستی میکروارگانیسم‌های زنده به این ترکیبات و بهبود شرایط تجزیه و مصرف آن‌ها می‌شوند (سوزا و همکاران، ۲۰۱۴). لای و همکاران (۲۰۰۹)، طی تحقیقی به بررسی اثر دو سورفکتانت زیستی رامنولیپید، سورفاکتین و دو سورفکتانت شیمیایی توین ۸۰ و تریتون ایکس ۱۰۰ (مقادیر تمامی آن‌ها برابر ۰/۲٪ وزنی/ حجمی) در تجزیه زیستی نفت خام از خاک پرداختند و بیان کردند هرکدام از این ترکیبات میزان

تجزیه را به ترتیب ۲۳، ۱۴، ۶، و ۴٪ افزایش داده که رامنولیپید بیشترین مقدار تغییر مثبت را نشان داد.

با توجه به (شکل ۳-ج)، میزان تغییرات تنفس پایه در نمونه خاک‌های آلوده به نفتا سبک نسبت به نمونه خاک‌های بدون آلودگی به‌خصوص در روزهای ابتدایی بیشتر است. به نظر می‌رسد در روزهای ابتدایی چون منبع غذایی در دسترس میکروارگانیسم‌ها زیاد است میزان تنفس نیز در این دوره افزایشی است، ولی با گذشت زمان و مصرف شدن هیدروکربن‌های موجود در خاک و در نتیجه تنفس پایه روند کاهشی داشته است. کمتر بودن میزان تنفس پایه در تیمار LNP نسبت به LC، به‌ویژه در فاصله ۵ تا ۲۰ روز را شاید بتوان این‌گونه عنوان داشت که اضافه شدن کود شیمیایی نیتروژن و فسفر کمک نموده است تا شرایط ایده‌آل‌تری برای میکروارگانیسم‌ها از نظر افزایش بیومس کربن فراهم شود و به‌جای اینکه کربن موجود در نفتا سبک را بیشتر به شکل CO₂ دفع نمایند در زی‌توده خود ذخیره نموده‌اند. نوروزپور و همکاران (۱۴۰۲)، برای کاهش آلودگی هیدروکربن‌های نفتی، بعد از ایجاد ۷ درصد آلودگی نفتا سنگین از کود شیمیایی نیتروژن و فسفر با نسبت ۱:۵:۲۰ C/N/P استفاده کردند. در نتایج آن‌ها نیز میزان تنفس پایه در نمونه خاک‌های تحت تیمار کود شیمیایی نیتروژن و فسفر نسبت به نمونه خاک‌های بدون کود شیمیایی نیتروژن و فسفر در روزهای ابتدایی بیشتر بود و با گذشت زمان و کاهش منبع کربن نفتی میزان تنفس آن‌ها نیز کاهش یافت. جعفری و همکاران (۱۳۹۲) طی تحقیقی در خاک‌آلوده به نفت کوره واقع در شرکت ملی پخش و پالایش فرآورده‌های نفتی در شهرستان شاهرود، کود شیمیایی نیتروژن، فسفر و پتاسیم را در دو نسبت ۱:۱:۱۰ و ۱:۲:۲۰ و کمپوست زباله شهری را در سه سطح ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد جداگانه به گلدان‌ها اعمال کردند و در مدت ۱۲ هفته مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که بیشترین مقدار تجزیه مربوط به تیمار کمپوست زباله شهری با نسبت ۱۵ درصد و کود شیمیایی نیتروژن، فسفر و پتاسیم با نسبت ۱:۲:۲۰ بود که

به ترتیب ۵۹٪ و ۶۲٪ از نفت کاهش یافته بود. با افزودن نیتروژن، فسفر و پتاسیم میزان سرعت تنفس میکروبی به دلیل مصرف ترکیبات آسان تجزیه‌پذیر به شدت افزایش یافت. سپس سرعت تنفس میکروبی به دلیل وجود ترکیباتی با وزن مولکولی بالا، کاهش پیدا کرده و از تعداد میکروارگانیسم‌ها نیز کاسته شده و ادامه تجزیه با کندی همراه بود. والورث و همکاران (۱۹۹۵) به این نتیجه رسیدند که تجزیه هیدروکربن‌های خاک را می‌توان به وسیله کاربرد عناصر غذایی مانند نیتروژن و به مقدار کمی فسفر افزایش داد. تجزیه نفت به علت وارد کردن مقادیر عظیم کربن آلی به خاک باعث افزایش نسبت C/N می‌شود که برای رشد و فعالیت میکروارگانیسم‌های خاک نامناسب است، اما با تأمین مواد غذایی معدنی از طریق کوددهی می‌توان این نسبت را تعدیل کرد (کیم و همکاران، ۲۰۰۵). هوادهی فعال و افزایش عناصر غذایی ازت و فسفر در قالب یک فرایند زیست‌پالایی اثر معنی‌داری بر تحرک و تنوع باکتری‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن در خاک آلوده به نفت ایجاد می‌کند (آرامسای و همکاران، ۲۰۰۰).

با توجه به (شکل ۲-د)، همانطور که در تیمارهای قبلی هم مشاهده شد میزان تنفس پایه در خاک‌های آلوده در روزهای ابتدایی بسیار بیشتر از خاک بدون آلودگی (شاهد) بود. در خاک‌های آلوده شده با نفتا سبک چون میزان هیدروکربن در دسترس میکروارگانیسم‌ها زیاد است، از آن به‌عنوان منبع کربن استفاده کرده و فعالیت و در نتیجه میزان تنفس آن‌ها نیز افزایش یافته است. دلیل بالا بودن تنفس پایه در تیمار کود گاوی در روزهای ابتدایی ناشی از: ۱) میکروارگانیسم‌های بومی موجود در کود گاوی، ۲) بهبود خواص فیزیکی خاک و افزایش تهویه خاک در نتیجه کاربرد کود گاوی، ۳) وجود عناصر غذایی در کود گاوی و تأمین منبع غذایی برای میکروارگانیسم‌ها، اما باگذشت زمان و کاهش منبع غذایی و میزان آلاینده میزان تنفس پایه نیز کاهش یافته است. افشارنیا (۱۳۹۷)، برای کاهش آلودگی نفت خام در خاک آلوده در

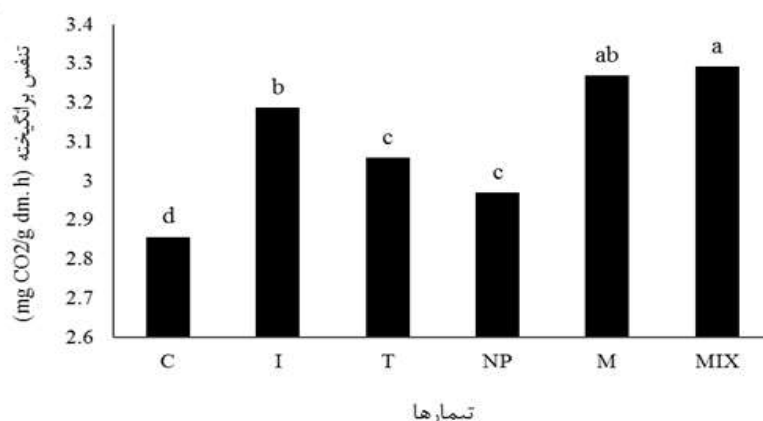
پالایشگاه تبریز از کود گاوی به میزان ۵٪ (وزنی-وزنی) استفاده کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که در روزهای ابتدایی تنفس پایه خاک افزایش یافته بود و پس از ۴ ماه تنفس پایه خاک کاهش چشمگیری داشت دلیل این امر را می‌توان به کاهش عناصر غذایی برای میکروارگانیسم‌های خاک و رسیدن به فاز ثابت و مرگ میکروبی مربوط دانست. کود گاوی علاوه بر فراهم کردن مواد مغذی بر میکروارگانیسم‌ها به دلیل بهبود خواص فیزیکی شیمیایی خاک‌های آلوده باعث سازگاری سریع میکروب‌ها به خاک آلوده شده و نهایتاً منجر به افزایش فعالیت میکروبی و تجزیه بالای ترکیبات نفتی در خاک شده است (افشارنیا، ۱۳۹۷). مینایی تهرانی و همکاران (۱۳۸۴)، برای زیست-پالایی خاک آلوده به نفت خام سنگین ۲ درصد از مواد افزودنی از قبیل کود شیمیایی نیتروژن و فسفر، کود حیوانی ۵ درصد به‌عنوان مکمل و تراشه‌های چوب استفاده نمودند. نتایج آن‌ها نشان داد؛ کود حیوانی سبب افزایش عناصر موردنیاز برای تکثیر باکتری‌ها و افزایش جمعیت آن‌ها در خاک شد. و همچنین بیشترین کاهش به میزان ۶۵ درصد در تیماری که به آن هم‌زمان کود شیمیایی و تراشه چوب افزوده شده بود اتفاق افتاد. مقدار کاهش در تیماری که به آن کود حیوانی اضافه شده بود حدود ۶۰ درصد و استفاده از کود شیمیایی به‌تنهایی باعث کاهش نفت در حدود ۵۵ درصد شده بود.

با توجه به (شکل ۲-ه)، در حالت کلی میزان تنفس پایه در خاک آلوده تحت تیمار تلفیقی بیشتر از خاک آلوده بدون تیمار تلفیقی بود. به نظر می‌رسد افزایش تنفس پایه در خاک‌های تحت تیمار تلفیقی به علت حضور سورفکتانت تویین ۸۰ که به فراهمی زیستی هیدروکربن‌ها کمک کرده، همچنین وجود کود شیمیایی نیتروژن و فسفر و کود گاوی به تحریک زیستی کمک کرده است و در نتیجه میزان فعالیت جمعیت میکروبی افزوده شده به خاک و جمعیت میکروبی بومی خاک افزایش یافته است. اگرچه افزایش تنفس میکروبی در مواردی به مصرف ترکیبات سهل‌التجزیه نسبت داده می‌-

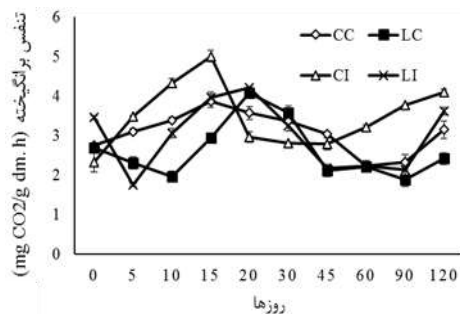
تنفس برانگیخته

نتایج به دست آمده از تنفس برانگیخته (SIR) نشان داد که بین فاکتور آلودگی (خاک شاهد و خاک آلوده به نفتا سبک)، فاکتور تیمارهای زیست پالایی (خاک شاهد بدون تیمار زیست پالایی، تلقیح کنسرسیوم باکتریایی، سورفکتانت Tween 80، کودهای شیمیایی نیتروژن و فسفر، کود گاوی و تلفیقی) و فاکتور زمان (۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ روز) در سطح احتمال ۱٪ ($P < 0.01$) اختلاف معنی دار وجود دارد. با توجه به شکل ۳، نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر فاکتور تیمارهای زیست پالایی در سطح احتمال ۱ درصد بر تنفس برانگیخته اثر معنی داری داشت. طبق مقایسات میانگین بیشترین تنفس برانگیخته به ترتیب مربوط به تیمار تلفیقی، کود گاوی و تیمار کنسرسیوم باکتریایی است و پس از آن تیمار Tween 80، کود شیمیایی نیتروژن و فسفر و خاک شاهد در رتبه‌های بعدی هستند. به نظر می‌رسد گروه‌های میکروبی موجود در تیمارهای تلفیقی، کود گاوی و افزودن مایه تلقیح باکتریایی به گلوکز مصرف شده پاسخ داده و میزان تنفس برانگیخته را افزایش داده‌اند.

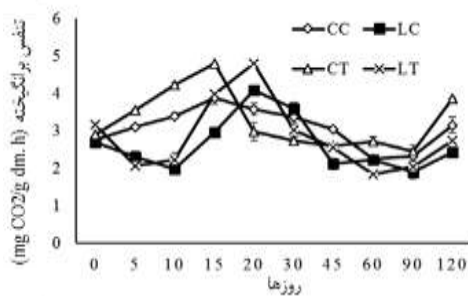
شود و در ادامه به دلیل وجود مواد با وزن ملکولی بالاتر و کمتر مورد استفاده قرار گرفتن آن توسط جامعه میکروبی باعث کاهش تنفس می‌شود (جعفری و همکاران، ۱۳۹۲). اما در آزمایش پیش رو نفتا سبک استفاده شده به عنوان یک منبع کربن ۵ تا ۶ کربنه شناخته می‌شود که به نظر به راحتی مورد استفاده ریز جانداران قرار می‌گیرد و پس از مصرف آن روند تغییرات تنفس ثابت شده است. گومز و سرتاج (۲۰۱۴)، برای خاک مزرعه آلوده به نفت با غلظت ۹۴۰ میکروگرم بر گرم از تلقیح زیستی (استفاده از کنسرسیوم میکروبی) و تحریک زیستی (استفاده از کمپوست آلی) به عنوان تیمار زیست پالایی استفاده کردند. استفاده از کنسرسیوم میکروبی و کمپوست آلی نشان داد که کارایی حذف به ترتیب ۵۵٪ و ۵۲٪ بود. ولی در خاک آلوده به نفت با غلظت ۱۶۶ میکروگرم بر گرم از مخلوط کنسرسیوم میکروبی و کمپوست استفاده شد و در مدت ۴۰ روز، کاهش آلودگی به میزان ۸۲٪ مشاهده شد.



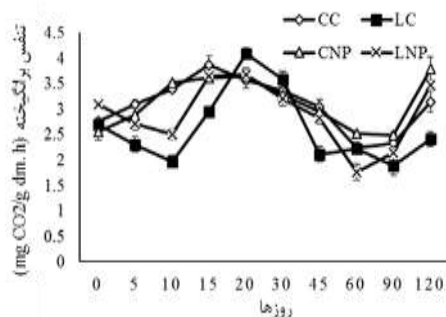
شکل ۳- مقادیر تنفس برانگیخته اندازه‌گیری شده در خاک تحت تیمارهای مختلف زیست پالایی (خاک شاهد (C)، کنسرسیوم باکتریایی (I)، سورفکتانت Tween 80 (T)، کود شیمیایی نیتروژن و فسفر (NP)، کود گاوی (M) و تیمار تلفیقی (MIX))



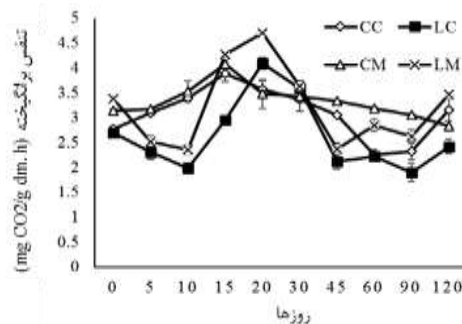
شکل ۴-الف) روند تغییرات زمانی مقادیر تنفس برانگیخته در خاک شاهد بدون تیمار زیست‌پالایی (CC)، خاک شاهد تیمار شده با کنسرسیوم باکتریایی (CI)، خاک آلوده به نفتا سبک بدون کنسرسیوم باکتریایی (LC) و خاک آلوده تلقیح شده با کنسرسیوم باکتریایی (LI)



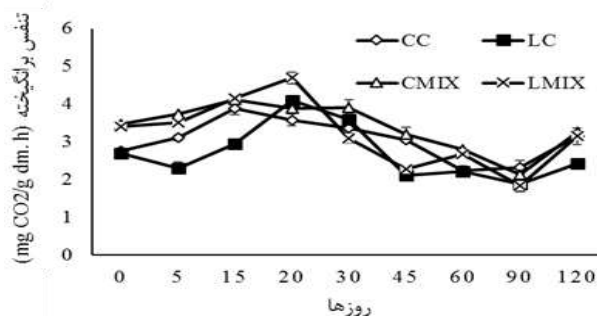
شکل ۴-ب) روند تغییرات زمانی مقادیر تنفس برانگیخته در خاک شاهد بدون تیمار زیست‌پالایی (CC)، خاک شاهد تیمار شده با سورفکتانت Tween 80 (CT)، خاک آلوده به نفتا سبک بدون تیمار Tween 80 (LC) و خاک آلوده تیمار شده با Tween 80 (LT)



شکل ۴-ج) روند تغییرات زمانی مقادیر تنفس برانگیخته در خاک شاهد بدون تیمار زیست‌پالایی (CC)، خاک شاهد تیمار شده با کود شیمیایی نیتروژن و فسفر (CNP)، خاک آلوده به نفتا سبک بدون تیمار کود شیمیایی نیتروژن و فسفر (LC) و خاک آلوده به نفتا سبک تیمار شده با کود شیمیایی نیتروژن و فسفر (LNP)



شکل ۴-د) روند تغییرات زمانی مقادیر تنفس برانگیخته در خاک شاهد بدون تیمار زیست‌پالایی (CC)، خاک شاهد تیمار شده با کود گاوی (CM)، خاک آلوده به نفتا سبک بدون تیمار کود گاوی (LC) و خاک آلوده تیمار شده با کود گاوی (LM)



شکل ۴-ه) روند تغییرات زمانی مقادیر تنفس برانگیخته در خاک شاهد بدون تیمار زیست‌پالایی (CC)، خاک شاهد تحت تیمار تلفیقی (CMIX)، خاک آلوده به نفتا سبک بدون تیمار تلفیقی (LC) و خاک آلوده با تیمار تلفیقی (LMIX)

طبق نتایج به دست آمده در تنفس برانگیخته در تیمارهای کنسرسیوم باکتریایی (I) (شکل ۴-الف)، کود شیمیایی نیتروژن و فسفر (NP) (شکل ۴-ب)، تیمار توئین ۸۰ (T) (شکل ۴-ج)، تیمار کود گاوی (M) (شکل ۴-د) و تیمار تلفیقی (MIX) (شکل ۴-ه)، مقدار تنفس برانگیخته در خاک‌های تحت تیمارهای زیست‌پالایی نسبت به نمونه خاک‌های بدون تیمار زیست‌پالایی بیشتر است. در واقع گلوکز افزوده شده باعث تحریک بیشتر میکروارگانیسم‌های موجود در خاک شده و میزان تنفس ناشی از سوبسترا را افزایش داده است. اما با گذشت زمان و مصرف شدن منابع کربنی اعم از گلوکز یا نفتا سبک و دیگر عناصر غذایی در خاک‌های آلوده و شاهد میزان تنفس برانگیخته نیز کاهش پیدا کرده است. همان‌گونه که از شکل مشخص است (تا ۱۰ روز تحت) در خاک‌های آلوده شده با نفتا سبک، جمعیت میکروبی با شوک مواجه بوده‌اند و میزان تنفس برانگیخته کاهش یافته است. به نظر در این فاصله زمانی گروه‌های میکروبی حساس حذف شده‌اند و به مرور شاهد نمونه‌گیری جامعه میکروبی به آلاینده و افزایش SIR هستیم. اما در مورد خاک‌های غیر آلوده که به نظر با کمبود منابع کربنی یا ماده آلی مواجه بوده‌اند به محض افزودن گلوکز، تنفس برانگیخته افزایش یافته و به طوری که تا روز ۱۵ به بیشترین مقدار خود رسیده است. با توجه به اینکه میزان تنفس برانگیخته در خاک‌های تیمار شده با کنسرسیوم باکتریایی نسبت به خاک‌های تیمار نشده به خصوص در روزهای ابتدایی زیاد است، به نظر می‌رسد جدایه‌های باکتریایی اضافه شده در هر دو خاک آلوده و شاهد باعث این افزایش شده و همچنین در خاک آلوده میکروارگانیسم‌های خاک از منبع آلودگی (نفتا سبک) به عنوان منبع کربن استفاده کرده‌اند اما با گذشت زمان و کاهش غلظت آلاینده‌ها تنفس برانگیخته و جمعیت میکروبی نیز کاهش یافته است (شکل ۴-الف).
رجایی و همکاران (۱۳۹۱) برای پاک‌سازی خاک آلوده به نفت خام هم‌زمان از تکنیک‌های بیولوژیکی و گیاه‌پالایی استفاده کردند. برای این منظور محیط کشت

مخلوطی از باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام را تهیه و در خاک آلوده با غلظت ۱۰ درصد تلقیح کردند. به طور کلی SIR ارتباط نزدیکی با ماده آلی سهل‌الوصول و توده زنده میکروبی داشت، اندرسون و همکاران (۱۹۸۵) با افزودن گلوکز تنفس میکروبی همواره افزایش یافت. افزایش SIR در خاک آلوده ممکن است به دلیل بالا بودن توده زنده میکروبی جوان و فعال باشد. معمولاً SIR نشان‌دهنده جمعیت جوان و فعال در خاک است (کوزیاکو، ۲۰۰۲). از طرف دیگر افزایش SIR در خاک آلوده ممکن است به دلیل عدم دسترسی آسان میکروارگانیسم‌های خاک به سوبسترای نفتی یا تجزیه‌پذیری اندک ترکیبات نفتی باقی‌مانده در این خاک‌ها نیز باشد (رجایی و همکاران، ۱۳۹۱).

با توجه به (شکل ۴-ب)، میزان تنفس برانگیخته در خاک آلوده تیمار شده سورفکتانت Tween 80 (LT) نسبت به خاک آلوده بدون تیمار سورفکتانت Tween 80 (LC) در روزهای ابتدایی بیشتر و در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار است. از روز ۲۰ به بعد کمی کاهش پیدا کرده است. به نظر خود ماده توئین به عنوان منبع کربن مورد استفاده جامعه میکروبی قرار گرفته و دلیل افزایش SIR به‌ویژه تا روز ۱۵ام در نمونه خاک‌های غیر آلوده به نفتا سبک است. اما در مورد خاک‌های آلوده حضور نفتا سبک تا ۱۰ روز تحت اثر کاهشی بر SIR داشته که شاید به دلیل سمیت این ماده به جامعه میکروبی و وارد کردن شوک بر آن باشد، اما بعد از آن به مرور افزایش یافته و در حضور توئین در روز ۲۰ام بالاترین مقدار تنفس SIR به ثبت رسیده است. همچنین دلیل افزایش تنفس برانگیخته در روزهای ابتدایی می‌تواند ناشی از این باشد که سورفکتانت Tween 80 با افزایش فراهمی زیستی ماده نفتی باعث شده هیدروکربن‌های نفتی خاک به راحتی در دسترس میکروارگانیسم‌های بومی خاک قرار بگیرند و میزان تجزیه نفت و تنفس برانگیخته افزایش یابد. اما با گذشت زمان و کاهش منبع هیدروکربنی و جمعیت بومی خاک، تنفس برانگیخته نیز کاهش یافته است. حلالیت

(۲۰۰۰) گزارش داد؛ که تحریک بیولوژیکی خاک‌های آلوده به نفت با عناصر غذایی مانند کود شیمیایی حاوی نیتروژن، فسفر و پتاسیم باعث افزایش تجزیه زیستی و تجزیه هیدروکربن‌ها به میزان ۲۷ تا ۵۳ درصد می‌شود.

با توجه به (شکل ۴-د)، دلیل افزایش تنفس برانگیخته در حضور کود گاوی چه در خاک آلوده و چه در خاک غیرآلوده (شاهد) را می‌توان در وجود منابع غذایی (کربن و سایر عناصر غذایی) موردنیاز جامعه میکروبی و بهبود شرایط فیزیکی خاک (نظیر تهویه و...) جستجو کرد. هرچند اثر افزایشی SIR در خاک آلوده به نفتا سبک با افزودن کود گاوی بیش از خاک شاهد است و این بیانگر آن است که کود دامی شرایطی را فراهم کرده که دسترسی نفتا سبک برای جامعه میکروبی جهت تجزیه بیشتر شده است. هارتیش و کواشیک (۲۰۰۹) گزارش کردند؛ استفاده از کود گاوی، خوکی، کمپوست و کاه و کلس موجب بهبود ساختمان خاک و اکسیژن‌رسانی و تأمین انرژی برای جمعیت میکروبی خاک شده و باعث افزایش تجزیه PAHها در خاک می‌گردد. بطوریکه افزودن کود گاوی و خوکی موجب تجزیه ۹۰ درصدی آنها در عرض پنج هفته گردید و بیشترین اثر آن بر روی PAHهای سه حلقوی مانند فناترن و آتراسن دیده شد و از این روش می‌توان در حذف PAHها در فرایند کمپوست سازی نیز استفاده کرد.

با توجه به (شکل ۴-ه)، تنفس برانگیخته در خاک آلوده تحت تیمار تلفیقی (LMIX) نسبت به خاک آلوده بدون تیمار تلفیقی (LC)، در روزهای ابتدایی بیشتر است اما باگذشت زمان روند تغییرات تنفس برانگیخته در هر دو به یکدیگر نزدیک می‌شود. با توجه به اینکه میزان تنفس برانگیخته در خاک‌های تحت تیمار تلفیقی نسبت به خاک‌های تیمار نشده به‌خصوص در روزهای ابتدایی زیاد است، به نظر دلیل این افزایش حضور جدایه‌های باکتریایی، سورفکتانت توپین ۸۰، کود شیمیایی نیتروژن و فسفر و کود گاوی مورد استفاده در تیمار تلفیقی است. جدایه‌های باکتریایی افزوده شده و

هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای در محلول‌های آبی بسیار کم بوده و دسترسی زیستی این ترکیبات یک عامل محدودکننده برای حمله قارچی و میکروبی به آن-هاست به همین منظور اضافه کردن سورفکتانت‌هایی از قبیل توپین ۸۰ موجب افزایش حلالیت و دسترسی زیستی این ترکیبات می‌شود (میائو دانگ و همکاران، ۲۰۰۶).

با توجه به (شکل ۴-ج)، میزان تنفس برانگیخته در خاک آلوده تیمار شده با کود شیمیایی نیتروژن و فسفر تا روز ۱۰ کمی کاهش داشته و سپس از روز ۱۰ تا ۲۰ افزایش، از ۲۰ تا ۶۰ کاهش و از روز ۶۰ به بعد دوباره افزایش یافته است. به نظر می‌رسد از روز ۱۰ تا ۲۰ در خاک آلوده تیمار شده با کود شیمیایی نیتروژن و فسفر، باکتری‌های بومی خاک از عناصر غذایی نیتروژن و فسفر و منبع هیدروکربن نفتی تغذیه کرده‌اند و میزان فعالیت و جمعیت میکروبی و در نتیجه تنفس برانگیخته افزایش یافته است اما باگذشت زمان و کاهش منبع غذایی و منبع کربن، فعالیت و جمعیت میکروبی نیز کاهش یافته است. وجود عناصر غذایی کافی یکی از مهم‌ترین عوامل مؤثر در افزایش ریز جانداران خاک است و زمانی که مواد غذایی خاک پاسخگوی جامعه میکروبی نباشد ریز جانداران حساس از بین خواهند رفت (چاندر و همکاران، ۲۰۰۶). شریفی حسینی و همکاران (۱۳۸۸) با به‌کارگیری نفت خام با غلظت ۱٪ و کود شیمیایی نیتروژن، فسفر و پتاسیم، با غلظت صفر، ۱ و ۲ تن در هکتار، میزان تجزیه آلودگی نفتی خاک را ۴۵-۶۰ درصد گزارش دادند، همچنین بر اساس نتایج آنها جمعیت باکتری‌های هتروتروفیک تجزیه‌کننده از 6×10^3 کلونی در واحد گرم خاک در نمونه شاهد به حدود $4/1 \times 10^8$ در نمونه‌های تیمار شده با ۲ تن در هکتار کود شیمیایی در مدت ۵ هفته رسید و نسبت C/N در خاک از ۶ به ۳ کاهش یافت. گوگی و همکاران (۲۰۰۳) در مطالعه زیست‌پالایی خاک‌های آلوده به نفت خام در محل نشن نفت مشاهده کردند که هوادهی، کاربرد کودهای دارای نیتروژن و فسفر و تلقیح میکروبی باعث تجزیه ۷۵ درصد از نفت خام می‌شود. مارگزین

نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر برای کاهش آلودگی ناشی از نفتا سبک در خاک بدون آلودگی، مطالعه‌ای بر روی انواع روش‌های زیست‌پالایی صورت گرفته است. بدین منظور در این پژوهش از تیمارهای تحریک زیستی، تلفیح زیستی و تیمار تلفیقی (شامل تیمار توأم تلفیح زیستی و تحریک زیستی) استفاده شد. نتایج حاصل از پایش فعالیت‌های بیولوژیکی (تنفس پایه و برانگیخته) در خاک‌آلوده به نفتا سبک نشان دادند باینکه هرکدام از تیمارهای استفاده‌شده به‌تنهایی باعث کاهش هیدروکربن نفتی شدند، اما در تیمار تلفیقی که شامل کاربرد توأم تحریک زیستی و تلفیح زیستی بود نتیجه مطلوب‌تری نسبت به کاربرد جداگانه تیمارها به‌دست‌آمده. با توجه به نتایج حاصل از پایش زیست‌پالایی به نظر استفاده از تیمار تلفیقی (استفاده مخلوطی از کنسرسیوم باکتریایی با ۵٪ حجمی - وزنی، کود گاوی با ۵٪ وزنی-وزنی، کود شیمیایی نیتروژن و فسفر و سورفاکتانت Tween 80 با ۰/۳٪ حجمی - وزنی) علاوه بر بالا بردن جمعیت میکروبی فعال درگیر در تجزیه ترکیبات نفتی و تأمین شرایط بهینه برای فعالیت آن‌ها، همچنین تحریک جمعیت میکروبی بومی خاک، روشی مناسب برای حذف ترکیبات نفتی باشد.

میکروارگانسیم‌های بومی خاک با کمک سورفاکتانت توئین ۸۰ دسترسی بیشتری به منبع هیدروکربن‌های نفتی خواهند داشت، از طرفی با تأمین عناصر غذایی و بهبود شرایط فیزیکی خاک با استفاده از کود شیمیایی نیتروژن و فسفر و کود گاوی، میزان تنفس برانگیخته افزایش می‌یابد. اما باگذشت زمان و کاهش غلظت آلاینده‌ها تنفس برانگیخته و جمعیت میکروبی نیز کاهش یافته است. رجایی و همکاران (۱۳۹۱) گزارش دادند در خاک‌آلوده به نفت، کمیت کربن عامل محدودکننده فعالیت هتروتروفی خاک نیست بلکه جمعیت فعال یا میزان دسترسی به کربن آلی یعنی کیفیت سوسترا مهم‌ترین عامل به شمار می‌آید. نوروزپور و همکاران (۱۴۰۲) در به‌کارگیری روش‌های مختلف زیست‌پالایی جهت حذف نفتا سنگین، در مطالعه خود عنوان داشتند که میزان تنفس برانگیخته در خاک‌آلوده بیشتر از خاک شاهد بود و از میان روش‌های زیست‌پالایی استفاده‌شده، تلفیح کنسرسیوم باکتریایی و کاربرد کود گاوی بیشترین اثر افزایشی را نسبت به سایر تیمارها در تنفس برانگیخته داشت.

فهرست منابع

۱. افشارنیا، م. ۱۳۹۷. بکارگیری روش‌های مختلف برای زیست‌پالایی مواد نفتی در مکان‌های آلوده پالایشگاه تبریز، پایان‌نامه دکتری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.
۲. افشارنیا، م.، م. ر. ساریخانی، و م. زارعی. ۱۴۰۱. جداسازی باکتریهای تجزیه‌کننده نفت از خاک‌های آلوده پالایشگاه و پتروشیمی تبریز و شناسایی باکتری‌های کارآمد. نشریه دانش آب و خاک. ۳۲(۴): ۹۳-۱۰۶.
۳. جعفری، م.، س. ابراهیمی، و ع. موحدی نائینی. ۱۳۹۲. زیست‌پالایی خاک‌های آلوده به نفت کوره تحت تأثیر همزمان کمپوست زیباله شهری و برخی کودهای شیمیایی. نشریه حفاظت منابع آب و خاک. ۳: ۴۳-۵۶.

۴. رجایی، س.، ف. رئیسی.، و س.م. سیدی. ۱۳۹۱. زیست‌پالایی خاک آلوده به نفت خام مسن به روش‌های افزایش بیولوژیک و گیاه‌پالایی. نشریه آب و خاک (علوم و منابع کشاورزی). ۲۶(۴): ۹۰۸-۹۲۱.
۵. شریفی حسینی، س.، ع. شهبازی.، ع.ال. یزدی‌پور.، و ا. کامران‌فر. ۱۳۸۸. پالایش زیستی خاک‌های آلوده به نفت‌خام با کودشیمیایی. نشریه آب و خاک (علوم و منابع کشاورزی). ۲۳(۳): ۱۴۵-۱۵۵.
۶. طلائی، ا.، ن. ا. جعفرزاده.، م. ر. طلائی.، م. بهشتی. ۱۳۸۹. تجزیه ترکیبات آروماتیک موجود در نفت خام توسط میکروارگانسیم‌های جداشده از محیط. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زنجان ۷۰ (۱۸): ۶۸-۸۰.
۷. مینایی تهرانی، د.، ع. حرفت منش.، و ف. آذری دهکردی. ۱۳۸۴. مطالعه تجزیه زیستی نفت خام سنگین در خاک با مقیاس پایلوت. فصل نامه علوم محیطی. ۱۰(۳): ۷۱-۸۲.
۸. نوروزپور، م. م.، ساریخانی.، و ن. علی‌اصغرزاد. ۱۴۰۲. پایش تغییرات تنفسی خاک لوم‌شنی آلوده به نفتای سنگین در تیمارهای مختلف زیست‌پالایی. نشریه دانش آب و خاک. ۳۳(۲): ۵۳-۷۲.
۹. ورناسری قندعلی، م.، ع. معزی.، و ن. عنایتی ضمیر. ۱۳۹۴. مقایسه روش‌های زیستی و شیمیایی در پالایش یک خاک آلوده به نفت خام. مهندسی زراعی. ۳۸(۲): ۱۱۲-۱۲۴.
10. Anderson, T., and K.H. Domsch. 1985. Maintenance carbon requirements of actively-metabolizing microbial populations under in situ conditions. *Soil Biology and Biochemistry* 17:197-203.
11. ARamsay, M., P.J. Swannell., W.A.Sh. Duke., and T.R. Hill. 2000. Effect of bioremediation on the microbial community in oiled mangrove sediments. *Marine Pollution Bulletin* vol. 7(41):413-419.
12. Chander., K., S. Goya., and K. Kapoor. 2006. Microbial biomass dynamics during the decomposition of leaf litter of Poplar and eucalyptus in a sandy loam. *Appl. Soil Ecol. J.* 35: 10-23.
13. Dashti., N., N. Ali1., M. Eliyas., M. Khanafer., N.A. Sorkhoh., and S. Samir., Radwan. 2015. Most Hydrocarbonoclastic Bacteria in the Total Environment are Diazotrophic, which Highlights Their Value in the Bioremediation of Hydrocarbon Contaminants. *Microbes Environ.* Vol. 30, No. 1: 70-75.
14. Ebrahimi, M., Sarikhani, M.R., Safari Sinangani, A.A., Ahmadi, A., and S., Keesstra. 2019. Estimating the soil respiration under different land uses using artificial neural network and linear regression models. *Catena.* 174: 371-382
15. Gogoi, B.K., N.N Dutta., P. Goswami., and T.R. Krishna Mohan. 2003. A case study of bioremediation of petroleumhydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site. *Advances in Environmental Research*, 7: 767-782.
16. Gomez, F., and M. Sartaj. 2014. Optimization of field scale biopiles for bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil at low temperature conditions by response surface methodology (RSM). *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 89, 103-109.
17. Haritash, A.K., and C.P. Kaushik. 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of hazardous materials*, 169(3):1-15.
18. Kauppi., S., A. Sinkkonen., and M. Romantschuk. 2011. Enhancing bioremediation diesel fuel contaminated soil in a boreal climate: comparison of biostimulation and bioaugmentation. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 65:359-368.
19. Kim., S.J., D.H. Choi., D.S. Sim., and Y.S. Oh. 2005. Evaluation of bioremediation effectiveness on crude oilcontaminated sand. *Chemosphere*, 59:845-852.

20. Lai., C.C., Y.C. Huang., Y.H. Wei., and J.S. Chang. 2009. Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil, *J. Hazard Mater.* Vol. 167, No. 1, pp. 607-614.
21. Maila., M.P., and T.E. Cloete. 2005. The use of biological activities to monitor the removal of fuel contaminants perspectives to monitoring hydrocarbon contamination: a review. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 55: 1-8.
22. Margesin., R. 2000. Potential of cold-adapted microorganisms for bioremediation of oil-polluted Alpine soils. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 46:3-10.
23. Masciandaro., G., C. Macci., E. Peruzzi., B. Ceccanti., and S. Doni. 2013. Organic matter-microorganism-plant in soil bioremediation: a synergic approach *Rev Environ Sci Biotechnol.* 12:399-419.
24. Miao- dong., W., L. Wei., S. Yao., W. Da- hui. 2006. Effects of surfactant on biodesulfurization by *Corynebacterium* sp. Zd-1 in the presence of organic phase. *Zhejiang University Science.* 7: 371- 75.
25. Mnif., I., S. Mnif., R. Sahnoun., S. Maktouf., Y. Ayedi., S. Ellouze-Chaabouni., and D. Ghribi. 2015. Biodegradation of diesel oil by a novel microbial consortium: comparison between co-inoculation with biosurfactant-producing strain and exogenously added biosurfactants, *Sci. Pollut. Res.* 22(19): 14852-14861.
26. Mortazavi., B., A. Horel., M.J. Beazleya., and P.A. Sobecky. 2013. Intrinsic rates of petroleum hydrocarbon biodegradation in Gulf of Mexico intertidal sandy sediments and its enhancement by organic substrates. *Journal of Hazardous Materials.* 244-245: 537-544.
27. Peng., RH., A.S. Xiong., Y. Xeo., X.Y. Fu., F. Gao., W. Zhao., Y.S. Tian., and Q.H. Yao. 2008. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons: a review. *FEMS Microbiol. Rev.* 32: 927-955.
28. Ramadass., K., M. Megharaj., K. Venkateswarlu., R. Naidu. 2015. Ecological implications of motor oil pollution: earthworm survival and soil health. *Soil Biol.Biochem.* 85: 72-81.
29. Souza EC, Vessoni-Penna TC and de Souza Oliveira RP, 2014. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview,” *Int. Biodeter Biodegr.* 89(1):88-94.
30. Walworth., J.L., and C.M. Reynolds. 1995. Bioremediation of a petroleum-contaminated cryic soil: effects of phosphorous, nitrogen, and temperature. *Journal of Soil Contam.* 4:299-310.
31. Wu., M.A., W. Dick., W.Li., X. Wang., Q.Yang., T. Wang., L. Xu., M. Zhang., and L. Chen. 2016. Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil, China, *Biodegradation.* 107: 158-164.
32. Wu., M.L., L.M. Chen., Y.Q. Tian., D. Yi., and W.A. Dick. 2013. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by microbial consortia enriched from three soils using two different culture media. *Environ. Pollut.* 178: 152-158.
33. Zhao., D., C. Liu., L. Liu., Y. Zhang., Q. Liu., W. Wu. 2011. Selection of functional consortium for crude oil-contaminated soil remediation, China, *Biodegradation.* 65:1244-1248.

Monitoring Respiration Changes in a Light Naphtha-Contaminated Sandy Loam Soil under Different Bioremediation Treatments

Z. Afiat, M. Norozpoor, M.R. Sarikhani* and N. Aliasgharzad

MSc Student, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz ; E-mail: zakieh.afiat1994@gmail.com

MSc Student, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz ; E-mail: Maryamnoroopoor72@gmail.com

Associate Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz ; E-mail: rsarikhani@yahoo.com

Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz ; E-mail: aliasghar@tabrizu.ac.ir

Received: June 26, 2023 and Accepted: January 10, 2024

Abstract

Petroleum hydrocarbons are one of the most common groups of organic pollutants in the environment. Bioremediation of soils contaminated with petroleum compounds is an effective process for cleaning petroleum pollutants in the environment. In the present research, to reduce light naphtha (1%) pollutant in a sandy loam soil, different bioremediation methods including biostimulation, bioaugmentation, and integrated treatment (including both bioaugmentation and biostimulation) were used. This experiment was done as a split-plot design with three factors (pollution, bioremediation, and time) with 3 repetitions in 3 kg pots. After running the experiment at time intervals of 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 and 120 days, samples were taken from the test pots and parameters including basal respiration (BR) and substrate-induced respiration (SIR) were measured. The results showed that application of bioremediation treatments had reduced light naphtha pollution. Also, petroleum pollution had affected the activity of soil microorganisms, such that the maximum amount of BR and SIR was obtained in the early days; but with the passing of time, BR had a sharper drop compared to SIR. Seemingly, the microbial community responded to added glucose as a simple and available carbon source, and SIR was less reduced, but, probably, basal respiration encountered lack of carbon sources and decreased more. The results showed that, among the bioremediation treatments, integrated treatment had a greater effect on the reduction of petroleum hydrocarbons than other bioremediation treatments at the probability level of ($P < 0.01$). The use of integrated treatment, in addition to increasing the active microbial population involved in the decomposition of petroleum compounds and providing optimal conditions for their activity, stimulates the indigenous soil microbial population and is a suitable method for removing petroleum compounds.

Keywords: Basal respiration, Bioaugmentation, Biostimulation, Substrate-induced respiration.

* Corresponding author's email: rsarikhani@yahoo.com