پژوهش‌های خاک / الف / جلد ۳۸ / شماره۱ بهار/ ۱۴۰۳/ص۴۳-۵۹
https://doi.org/10.22092/ijsr.2024.362387.706

بررسی فعالیت آنزیم‌های دهیدروژناز و لیپاز در خاک لوم‌شنی آلوده به نفتای 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.afiat1994@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:۱۴۰۳/۵/۲۴

چکیده

سنجش فعالیت‌های آنزیمی، یکی از روش‌های قابل‌توجه در زیست‌پالایی خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی است، تحریک زیستی، تلقیح زیستی و تلفیق این دو باهم از انواع روش‌های زیست پالایی مورداستفاده در این آزمایش است. به این منظور، برای کاهش آلودگی نفتای سبک (۱٪)، در یک خاک لوم شنی، از انواع تیمارهای زیست‌پالایی شامل تأمین عناصر N، P، افزودن کود دامی و سورفاکتانت Tween 80، تلقیح زیستی و تیمار تلفیقی در طی ۱۲۰ روز استفاده شد، و در زمان‌های مختلف (۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ روز) فعالیت آنزیم‌های دهیدروژناز (DHA) و لیپاز اندازه‌گیری شد. این آزمایش به‌صورت طرح فاکتوریل اسپلیت پلات (شامل فاکتور آلودگی، زیست‌پالایی و زمان) با در نظر گرفتن سه تکرار در گلدان‌های سه کیلوگرمی انجام شد. نتایج به‌دست‌آمده از آزمایش نشان داد که تیمارهای زیست‌پالایی منجر به کاهش آلاینده‌های نفتی شد، همین‌طور فعالیت دهیدروژناز از ابتدای آزمایش روند کاملاً نزولی داشت، و تغییرات فعالیت لیپاز در خاک‌آلوده، تا روز ۱۰ افزایش یافت، از روز ۱۰ تا ۱۵ اندکی کم شد و سپس تا روز ۶۰ با نوسانات جزئی پیش رفت و دوباره از روز ۶۰ کاهش یافت. فعالیت دهیدروژناز در تیمار کود گاوی در طول آزمایش از ۳/۳۹ به ۰/۳۵ ($\mu g\ TPF\ g^{-1}\ h^{-1}$) و فعالیت لیپاز در تیمار تلفیقی، از ($mU\ g^{-1}$) ۵۷ در روز ۱۰ام به ($mU\ g^{-1}$) ۳۳/۵۶ در روز ۱۲۰ رسید. به نظر، استفاده از تیمارهای تلفیقی و کود گاوی علاوه برافزایش جمعیت میکروبی مؤثر در تجزیه ترکیبات نفتی و تأمین شرایط بهینه برای فعالیت آن‌ها، روشی مناسب برای کاهش آلودگی ناشی از نفتای سبک باشد.

واژه‌های کلیدی: آلودگی نفتی، تحریک زیستی، تلقیح زیستی، زیست پالایی، فعالیت آنزیمی

* -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). 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 درنتیجه همین میزان از نفت خام را می‌توان به‌طور مستقیم به نفتا تبدیل کرد. اما نفتا در بازار معمولاً در دو نوع نفتای سبک (هیدروکربن‌های ۵ و ۶ کربنی) و نفتای سنگین (هیدروکربن‌های ۶ تا ۱۲ کربنی) عرضه می‌شود. نفتا به‌عنوان یکی از مهم‌ترین مواد اولیه مورداستفاده در صنعت پتروشیمی است (بال و همکاران، ۱۹۴۹). به‌طورمعمول فناوری‌هایی که برای اصلاح خاک‌ها استفاده می‌شوند شامل موارد زیر هستند: روش‌های فیزیکی، روش‌های شیمیایی، و روش زیستی. در این میان بیشترین توجه به روش زیستی (تهویه زیستی، افزایش زیست‌توده میکروبی و غیره) برای حذف آلاینده‌های آلی در خاک معطوف است (شکوهیان و همکاران، ۲۰۱۶). زیست پالایی به‌عنوان یک روش کارآمد، مقرون‌به‌صرفه و سازگار با محیط‌زیست برای کاهش هیدروکربن‌ها در خاک‌های آلوده به نفت موردتوجه قرارگرفته است (سوگیورا و همکاران، ۱۹۹۷). روش‌های زیست‌پالایی خاک به دو دسته اصلی تقسیم می‌شوند: تلقیح‌زیستی و تحریک زیستی، که روش تلقیح زیستی به معرفی ریز جانداران بومی و غیربومی تخریب‌کننده نفت می‌پردازد که پس از جداسازی و شناسایی گونه‌های کارآمد تجزیه‌کننده نفت امکان تلقیح آن‌ها به خاک‌آلوده فراهم می‌شود (مادینو و همکاران، ۲۰۱۱). 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). بااین‌حال زیست پالایی خاک‌های آلوده به نفت می‌تواند به‌شدت تحت تأثیر ماهیت هیدروکربن‌ها و مدت‌زمان آلودگی قرار بگیرد (لوئر و همکاران، ۲۰۰۱). بدین منظور، در روش‌های مختلف زیست پالایی سعی می‌شود با اتخاذ تدابیری توازنی میان پارامترهای دخیل برقرار نمود و حذف آلودگی‌های نفتی را به میزان بیشتری پیش برد.

با اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های مختلف می‌توان به تشخیص و تعیین کیفیت محیط‌زیست قبل، حین و بعد از فرآیند بازسازی اقدام نمود. از این میان آنزیم دهیدروژناز، نشانگر و مقیاس مناسبی برای فعالیت میکروبی و اندازه‌گیری شدت سوخت‌وساز میکروبی در خاک محسوب می‌شود (نانی‌پیری و همکاران، ۲۰۰۲). دهیدروژناز علاوه بر اینکه به‌عنوان یک شاخص آلودگی محسوب می‌شود، به دلیل عدم توانایی تجمع آن‌ها در محیط خارج سلولی نیز حائز اهمیت است. این آنزیم نشانگر فعالیت‌های اکسیداتیو میکروبی خاک است و به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان یک روش ساده برای بررسی اثر مهارکنندگی آلاینده‌ها بر فعالیت‌های میکروبی در خاک مورداستفاده قرار می‌گیرد (ژانگ و همکاران، ۲۰۱۰؛ ماسیاندرو و همکاران، ۲۰۱۳).

لیپازها می‌توانند هیدرولیز استرهای مختلف را در محیط واکنش انجام دهند. این آنزیم توسط بسیاری از باکتری‌ها و قارچ‌ها تولید می‌شود (گادورا و همکاران، ۲۰۰۶). تری گلیسرول‌ها سوبسترای اصلی لیپازها هستند. اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه، کمی در آب محلول است ولی اسیدهای چرب با زنجیره بلند آلیفاتیک در آب نامحلول هستند. آنزیم لیپاز ظرفیت بالایی در بررسی و

پایش زیست‌پالایی هیدروکربن‌ها دارد از محصولات حاصل از تجزیه زیستی هیدروکربن‌های نفتی به‌عنوان سوبسترایی برای این آنزیم بشمار می‌روند (ماسیاندرو و همکاران، ۲۰۱۳). بیشتر لیپازهای موردمطالعه که منشأ میکروبی دارند آنزیم‌های برون‌سلولی القایی هستند که در سلول‌های میکروبی سنتز شده و سپس به محیط اطراف منتقل می‌شود (تان و یین، ۲۰۰۳). لیپاز نقش مهمی در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی بازی می‌کند. با توجه به‌سادگی و سرعت تحلیل آن، فعالیت لیپاز به‌عنوان یک شاخص عالی برای پایش آلودگی هیدروکربن‌های نفتی خاک مطرح‌شده است (ریفالدی و همکاران، ۲۰۰۶).

با توجه به وجود آلودگی‌های نفتی در محیط‌زیست، ازجمله آلودگی نفتای سبک و نبود مطالعات زیادی در این زمینه، در تحقیق حاضر به‌منظور کاهش آلودگی نفتای سبک، از روش‌های مختلف زیست‌پالایی ازجمله تحریک زیستی (شامل افزودن کود دامی، کود شیمیایی NP، استفاده از سورفکتانت Tween 80)، تلقیح زیستی (به‌کارگیری باکتری‌های جنس *Arthrobacter*، *Stenotrophomonas*) و تیمار تلفیقی (شامل تحریک زیستی و تلقیح زیستی) استفاده شد. هدف از این مطالعه، مقایسه تیمارها با یکدیگر از نظر روند تغییرات فعالیت آنزیمی خاک (لیپاز و دهیدروژناز) در خاک‌آلوده و غیر آلوده و همچنین در شرایط اعمال و عدم اعمال تیمارهای زیست پالایی است.

مواد و روش

آماده‌سازی خاک و اعمال تیمارهای زیست پالایی

در این آزمایش از یک خاک با بافت لوم‌شنی از ایستگاه تحقیقاتی خلعت‌پوشان دانشگاه تبریز نمونه‌برداری شد. مشخصات این خاک به شرح زیر بود: رطوبت ۱۲/۵۷ درصد (وزنی/حجمی)، شن ۶۹ درصد، سیلت ۱۳ درصد، رس ۱۸ درصد، کربن آلی ۰/۱۷ درصد، پتاسیم قابل‌جذب (استات آمونیوم ۱ نرمال) (mg/kg) ۱۹۸/۰۷، فسفر قابل‌جذب اولسون (mg/kg)۳، EC (dS/m) ۱/۹ و PH گل اشباع ۷/۵۶. خاک ازنظر رده‌بندی خاک FAO جزو Hypocalcic Calsisols و ازنظر تاکسونومی خاک آمریکا Typic Haplocalcids است. پس از عبور خاک از الک ۲ میلی‌متری، آلودگی نفتای سبک به میزان ۱ درصد حجمی- وزنی به نمونه خاک‌ها اضافه و تیمارهای مختلف زیست پالایی اجرا گردید. این آزمایش در مقیاس گلدانی (گلدانهای ۳ کیلوگرمی) در شرایط دمای معمولی اتاق (۲۵ $^{\circ}C$) و به مدت ۱۲۰ روز، بعد از ایجاد آلودگی و اعمال تیمارهای تحریک زیستی، تلقیح زیستی و تلفیقی انجام شد. در طول آزمایش، هفته‌ای یک‌بار هوادهی گلدان‌ها انجام و هفته‌ای دو بار رطوبت نمونه خاک بر روی ۷۰-۸۰ درصد ظرفیت نگهداری آب خاک تنظیم گردید. در روزهای ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ روز از هر گلدان نمونه‌برداری به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت دهیدروژناز و لیپاز صورت گرفت.

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، *Stenotrophomonas asidamainiphila* COD1-1) استفاده شد (افشارنیا و همکاران، ۱۳۹۶). جدایه‌های مورداستفاده در این آزمایش از بانک میکروبی گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه تبریز تهیه شدند. هر سه جدایه ابتدا به‌طور جداگانه در محیط کشت NB به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۲۶ درجه سلسیوس کشت داده شدند و پس از رسیدن به جمعیت مناسب (CFU mL^{-1} ۱۰^{۸}) به میزان ۵ درصد (حجمی/وزنی) در تیمارهای موردنظر به خاک‌های مورد آزمایش تلقیح شدند. در تحریک زیستی، بعد از تهیه کود گاوی، کودها به مدت ۴ روز هوا خشک شد و سپس از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شد و با نسبت ۵ درصد وزنی مورداستفاده قرار گرفت (افشارنیا و همکاران، ۱۳۹۶). کود مورداستفاده به ترتیب دارای ۲۴/۹۶، ۱/۵۲ و ۰/۵ درصد

کربن، نیتروژن و فسفر بود. در مورد تیمار NP که مربوط به تأمین عناصر نیتروژن و فسفر بود با توجه به نسبت ۲۰:۵:۱ (C:N:P)، به‌منظور تأمین عناصر نیتروژن و فسفر به ترتیب از منابع نیترات آمونیوم و فسفات پتاسیم استفاده شد (به‌عنوان نمونه در خاک‌آلوده با تیمار کود شیمیایی NP به ازای سه کیلوگرم خاک گلدان، ۰/۷۹ گرم کود از منبع فسفات پتاسیم و ۳/۴ گرم کود از منبع نیترات پتاسیم استفاده شد). همچنین به‌منظور 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 مجموعه باکتریایی ۵ درصد حجمی-وزنی (۵ میلی‌لیتر زادمایه باکتریایی در ۱۰۰ گرم خاک)، کود گاوی ۵ درصد وزنی-وزنی، سورفاکتانت Tween 80 با ۰/۳ درصد حجمی- وزنی و کود شیمیایی NP استفاده شد.

اندازه‌گیری فعالیت دهیدروژناز

به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت دِهیدروژناز از سوبسترای TTC[1] استفاده شد. بدین منظور ۱۰ گرم خاک به دو قسمت ۵ گرمی تقسیم و هرکدام در یک لوله آزمایش ریخته شد (یک لوله شاهد و دیگری نمونه)، در لوله نمونه روی ۵ گرم خاک مقدار یک میلی‌لیتر سوبسترای TTC (۰/۱ گرم در ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر) و ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه، درپوش لوله قرار داده‌شده و هم زده شد. در لوله شاهد بر روی ۵ گرم خاک ۳/۵ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته و همانند لوله نمونه عمل شد. لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. به هر لوله ۱۰ میلی‌لیتر متانول افزوده و یک دقیقه ورتکس شد. سپس از کاغذ صافی عبور داده شدند درنتیجه فعالیت دهیدروژناز، سوبسترای مورداستفاده تغییر رنگ یافته و قرمز رنگ یا صورتی تشکیل گردید، سپس مقدار جذب عصاره‌ها در طول‌موج ۴۸۵ نانومتر قرائت شد. میزان جذب مربوط به تولید تری‌فنیل‌فورمازان (TPF[2]) است که از تبدیل سوبسترای TTC حاصل می‌شود (علی‌اصغرزاد، ۱۳۸۵).

اندازه‌گیری فعالیت لیپاز

برای تعیین فعالیت لیپاز در خاک، از Tween 20 به‌عنوان سوبسترا استفاده شد. بدین منظور، به یک گرم خاک در یک لوله‌آزمایش ۰/۲ میلی‌لیتر تولوئن، ۰/۶ میلی‌لیتر Tween 20، ۱/۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۲ میلی‌لیتر استات‌سدیم (۰/۲ مولار با pH=۶) اضافه و لوله آزمایش در ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۸ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. بعد از ۱۸ ساعت ۸ میلی‌لیتر اتانول اضافه شد، ۱۰ ثانیه ورتکس شد و سپس در g ۱۱۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع رویی به ارلن مایر منتقل‌شده و پس از افزودن ۲۰µl معرف فنل‌رد یک درصد با استفاده از NaOH ۰/۰۲ مولار تیتر شد. تغییر رنگ تیتراسیون از رنگ زرد به صورتی خواهد بود. در نمونه شاهد همه موارد به جزء نمونه خاک و Tween 20 در لوله آزمایش اضافه شد و به مدت ۱۸ ساعت در انکوباتور قرار گرفت و پس از ۱۸ ساعت، نمونه خاک و Tween 20 هم‌زمان ریخته شد و بقیه مراحل طبق روش کار انجام گرفت. اسیدلاریک آزاد شده از روشناور با استفاده از منحنی کالیبراسیون محلول‌های استاندارد با غلظت‌های ۰، ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ میلی‌مول اسیدلاریک به دست آمد. فعالیت آنزیم خالص از اختلاف بین داده‌های آزمایش با نمونه خاک و نمونه شاهد به دست آمد و به‌صورت mU g^{-1} اسید لاریک آزادشده در هر گرم خاک در هر دقیقه نشان داده شد. هر واحد آنزیم (U) بیانگر مقدار ۱ µmol اسید لاریک آزادشده در هر دقیقه در دمای ۳۰ درجه سلسیوس است (ساکای و همکاران، ۲۰۰۲).

[1] Triphenyl Tetrazolium Chloride

[2] Triphenyl formazan

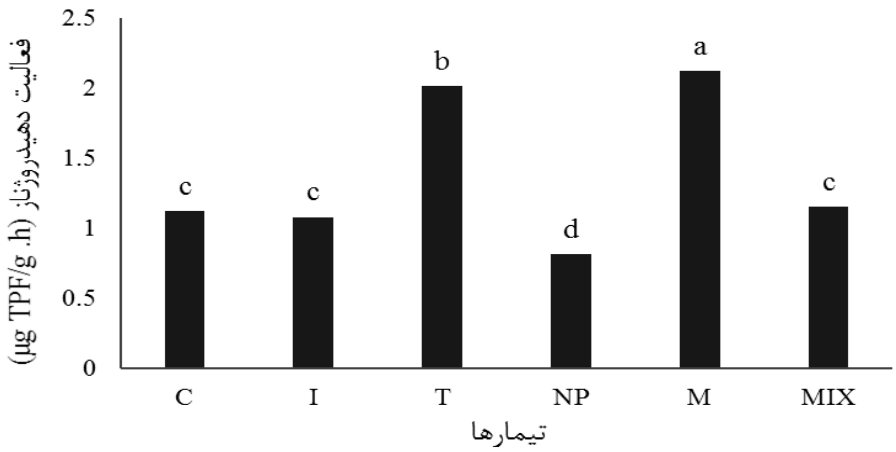
تجزیه‌و تحلیل آماری

آزمایش به‌صورت طرح فاکتوریل اسپلیت‌پلات، 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 نفتای سبک) و تیمارهای زیست‌پالایی (شامل تیمار شاهد، تلقیح باکتری، تأمین نیتروژن و فسفر، استفاده از سورفکتانت، افزودن کود دامی و تیمار تلفیقی)، فاکتورهای سه گانه آزمایش بودند. قابل‌ذکر است که فاکتور زمان به‌عنوان پلات اصلی و فاکتورهای آلاینده و تیمارهای زیست پالایی به‌عنوان پلات فرعی بودند. مقایسه‌های میانگین در سطح احتمال ۱ درصد با آزمون LSD توسط نرم‌افزار آماری SPSS-24 انجام گرفت. نمودارها نیز توسط نرم‌افزار Excel ترسیم شدند.

نتایج و بحث

فعالیت دهیدروژناز

طبق نتایج به‌دست‌آمده از فعالیت دهیدروژناز (جدول ۱)، بین فاکتور آلودگی (خاک شاهد و خاک‌آلوده به نفتای سبک)، فاکتور تیمارهای زیست پالایی (خاک شاهد بدون تیمار زیست‌پالای، تلقیح مخلوط باکتریایی، سورفکتانت Tween 80، کودهای شیمیایی NP، کود گاوی و تلفیقی) و فاکتور زمان (۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ روز) در سطح احتمال ۱ درصد ($P<0.01$) اختلاف معنی‌دار بود. مقایسه میانگین فعالیت دهیدروژناز اندازه‌گیری شده در خاک تحت تأثیر فاکتور تیمارهای زیست پالایی در شکل ۱ نشان داده‌شده است. طبق این شکل بیشترین میزان فعالیت دهیدروژناز به ترتیب مربوط به تیمارهای کود گاوی و سورفکتانت Tween 80 (T) و کمترین مقدار مربوط به تیمار کود شیمیایی NP است. حضور ریزجانداران بومی و وجود عناصر غذایی در کود گاوی و تأمین منبع غذایی برای ریزجانداران و همچنین بهبود خواص فیزیکی و شیمیایی ازجمله عواملی بودند که باعث شده بیشترین فعالیت دهیدروژنازی در این تیمار به دست آید. احتمالاً سورفکتانت توین ۸۰، هم به‌عنوان منبع کربن مورداستفاده ریز جانداران قرارگرفته و هم با افزایش فراهمی زیستی باعث شده که ریز جانداران به‌راحتی بتوانند منبع هیدروکربن‌ها را جذب کنند و میزان فعالیت میکروبی و درنتیجه فعالیت دهیدروژنازی افزایش یابد. تیمار تلقیح کنسرسیوم باکتریایی به علت وجود گروه‌های میکروبی زنده و رابطه مستقیم آن با فعالیت دهیدروژناز باعث افزایش فعالیت این آنزیم شده است، اما در مورد تیمار تلفیقی احتمالاً به علت افزودن کود شیمیایی نیتروژن و فسفر از تأثیر زیاد این تیمار در فعالیت دهیدروژناز کاسته است.

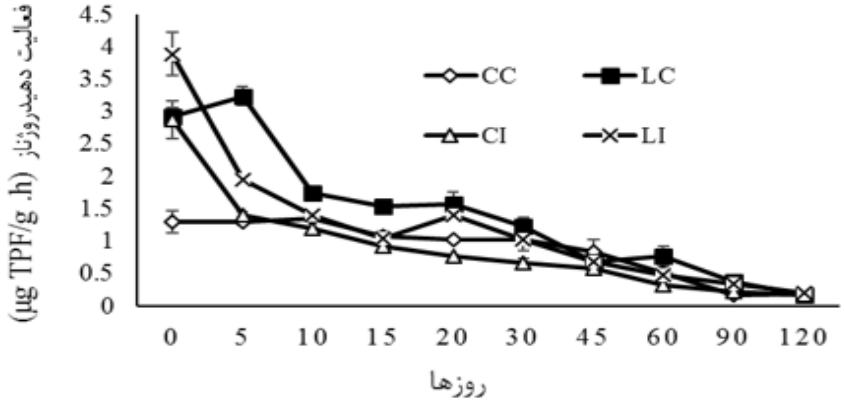


شکل ۱- فعالیت دهیدروژناز اندازه‌گیری شده در خاک تحت تیمارهای مختلف زیست‌پالایی (خاک شاهد (C)، کنسرسیوم باکتریایی (I)، سورفکتانت Tween 80(T)، کود شیمیایی NP (NP)، کود گاوی (M) و تیمار تلفیقی (MIX))

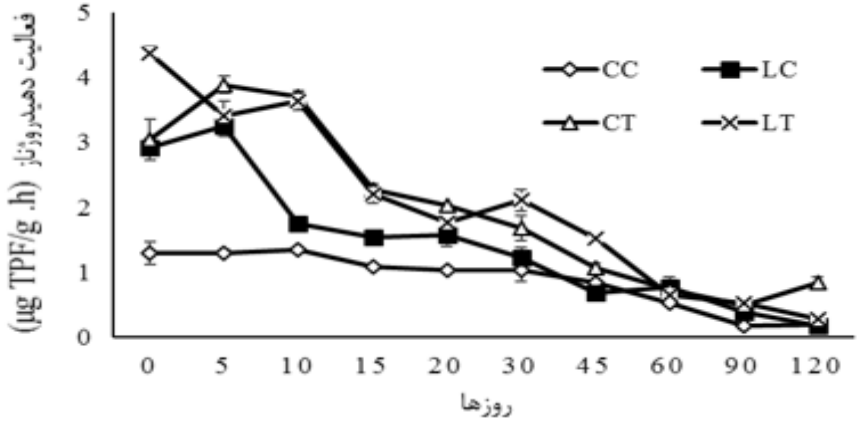
جدول ۱- تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده

صفات / منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		آنزیم دهیدروژناز	آنزیم لیپاز
فاکتور زمان (A)	۹	۲۸/۸۷۵**	۱۲۶۵/۸۴۱**
خطا	۲۰	۰/۰۹۳	۲/۷۵۹
فاکتور تیمار زیست‌پالایی (B)	۵	۱۷/۷۲۹**	۷۲۰۰/۰۹۰**
اثر متقابل A×B	۴۵	۱/۲۶۴**	۱۳۰/۷۶۲**
فاکتور آلودگی (C)	۱	۱/۳۰۰**	۰/۰۷۴
اثر متقابل A×C	۹	۰/۸۵۹**	۱۸۵/۰۷۵**
اثر متقابل B×C	۵	۱/۴۳۷**	۱۲۸/۳۴۸**
اثر متقابل A×B×C	۴۵	۰/۵۹۴**	۱۱۴/۳۰۵**
خطا	۲۲۰	۰/۰۳۵	۲/۹۱۳
ضریب تغییرات (درصد)	----	۱۳/۴۳	۶/۵۲

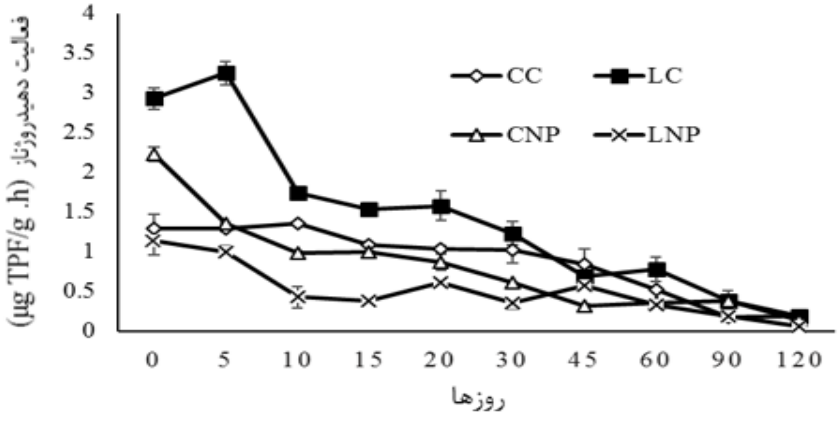
** معنادار بودن در سطح احتمال ۱ درصد ($P<0.01$)



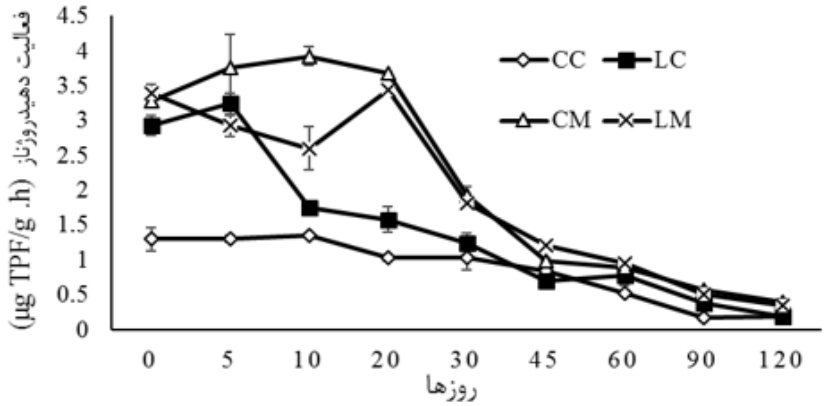
شکل ۲-الف) روند تغییرات زمانی فعالیت آنزیم دهیدروژناز در خاک شاهد بدون تیمار زیست‌پالایی (CC)، خاک شاهد تیمار شده با کنسرسیوم باکتریایی (CI)، خاک آلوده به نفتای سبک بدون کنسرسیوم باکتریایی (LC) و خاک‌آلوده تلقیح شده با کنسرسیوم باکتریایی (LI)



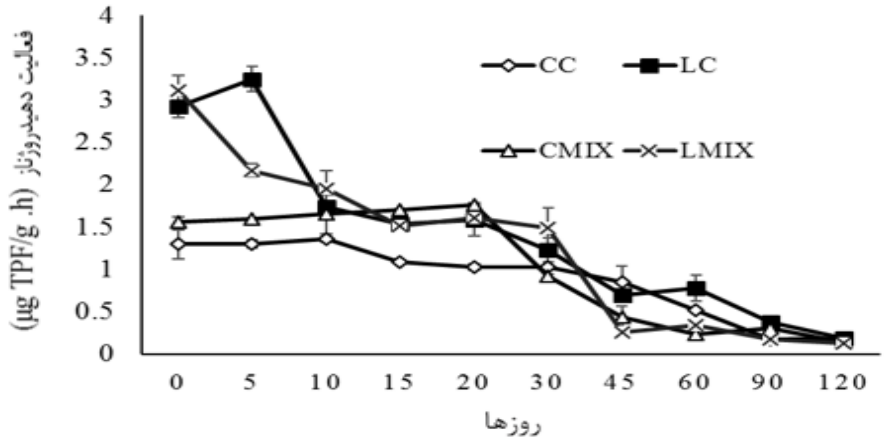
شکل ۲-ب) روند تغییرات زمانی فعالیت آنزیم دهیدروژناز در خاک شاهد بدون تیمار زیست پالایی (CC)، خاک شاهد تیمار شده با سورفکتانت Tween 80 (CT)، خاک‌آلوده به نفتای سبک بدون تیمار Tween 80 (LC) و خاک‌آلوده تیمار شده با Tween 80 (LT)



شکل ۲-ج)روند تغییرات زمانی فعالیت آنزیم دهیدروژناز در خاک شاهد بدون تیمار زیست پالایی (CC)، خاک شاهد تیمار شده با کود شیمیایی NP (CNP)، خاک‌آلوده به نفتای سبک بدون تیمار کود شیمیایی NP (CNP) و خاک‌آلوده به نفتای سبک تیمار شده با کود شیمیایی NP (LNP)



شکل ۲-د) روند تغییرات فعالیت آنزیم دهیدروژناز در خاک شاهد بدون تیمار زیست پالایی (CC) ، خاک شاهد تیمار شده با کود گاوی (CM)، خاک‌آلوده به نفتای سبک بدون تیمار کود گاوی (LC) و خاک‌آلوده تیمار شده با کود گاوی (LM)



شکل ۲-ه) روند تغییرات زمانی فعالیت آنزیم دهیدروژناز در خاک شاهد بدون تیمار زیست پالایی (CC) ، خاک شاهد تحت تیمار تلفیقی (CMIX)، خاک‌آلوده به نفتای سبک بدون تیمار تلفیقی (LC) و خاک‌آلوده با تیمار تلفیقی (LMIX)

با توجه به (شکل ۲-الف)، میزان فعالیت دهیدروژناز به ترتیب در نمونه خاک‌آلوده تحت تیمار تلقیح کنسرسیوم باکتریایی (LI)، خاک شاهد تحت تیمار تلقیح کنسرسیوم باکتریایی (CI)، خاک‌آلوده بدون تیمار تلقیح کنسرسیوم باکتریایی (LC) بیشتر است و کمترین آن در خاک شاهد بدون تیمار تلقیح کنسرسیوم باکتریایی (CC) به‌دست‌آمده است. همچنین در هر چهار نمونه در ابتدا میزان فعالیت زیاد است و باگذشت زمان به‌تدریج کاهش‌یافته است. با توجه به نتایج تجزیه واریانس داده‌ها، کاهش فعالیت دهیدروژناز در نمونه خاک‌های شاهد تلقیح شده با کنسرسیوم باکتریایی و خاک‌آلوده تلقیح شده با کنسرسیوم باکتریایی معنی‌دار بود، به نظر می‌رسد جدایه‌های باکتریایی موجود در خاک‌آلوده و خاک شاهد تلقیح شده با کنسرسیوم باکتریایی هیدروکربن‌های موجود را به‌عنوان منبع غذایی جذب کرده‌اند. بدین ترتیب میزان فعالیت میکروبی و دهیدروژنازی نیز افزایش‌یافته اما با گذشت زمان و کاهش منبع آلودگی، ریزجانداران حساس از بین می‌روند و به دنبال آن فعالیت دهیدروژنازی نیز کاهش می‌یابد. نوروزپور و همکاران (۱۴۰۲) در تحقیقی مشابه برای کاهش آلاینده نفتای سنگین نیز به این نتیجه رسیدند که افزودن جمعیت زنده میکروبی خود باعث افزایش فعالیت دهیدروژنازی شده است، زیرا این آنزیم

درون‌سلولی مرتبط با سلول‌های زنده میکروبی است. این افزایش در خاک شاهد نیز فقط در زمان‌های نخست دیده‌شده و به نظر محدودیت غذایی باعث افت جمعیت و کاهش فعالیت این آنزیم شده است. اما در خاک‌آلوده چون جدایه باکتریایی این منبع کربن را مورداستفاده قرار داده، فعالیت میکروبی افزایش می‌یابد به دنبال آن فعالیت دهیدروژنازی نیز فزونی یافته ولی با گذشت زمان به دلیل کاهش غلظت نفتای سنگین و در نتیجه کاهش جمعیت میکروبی، فعالیت دهیدروژناز نیز کاهش‌یافته است. افشارنیا و همکاران (۱۳۹۸)، طی تحقیقی، برای کاهش هیدروکربن‌های نفتی در خاک‌آلوده پالایشگاه تبریز از تیمارهای زیست پالایی (تلقیح کنسرسیوم باکتریایی، Tween 80، NPK، کود گاوی) استفاده کردند. همه تیمارهای زیست پالایی در لحظه شروع آزمایش دارای فعالیت آنزیم دهیدروژناز بالایی نسبت به تیمارهای شاهد آلوده نفتی و غیرآلوده نفتی بودند. همچنین در طول آزمایش در تمامی تیمارها اختلاف معنی‌دار فعالیت دهیدروژنازی با نمونه شاهد حفظ شد که نشانگر وجود بالای جمعیت میکروبی در تیمارهای زیست‌پالایی نسبت به تیمارهای شاهد است. تیمارهای زیست پالایی نیز در لحظه شروع آزمایش دارای فعالیت دهیدروژنازی نسبتاً بالایی بودند اما تمامی تیمارها با گذشت زمان و در انتهای آزمایش، کاهش فعالیت چشمگیری داشتند، احتمالاً طولانی بودن دوره آزمایش و رسیدن میکروب‌ها به فاز مرگ سبب این امر شده است. شن و همکاران (۲۰۱۶) طی تحقیقی فعالیت آنزیم دهیدروژناز را در خاک آلوده به نفت تلقیح شده با کنسرسیوم باکتریایی و خاک آلوده به نفت بدون تلقیح کنسرسیوم باکتریایی و خاک غیرآلوده به نفت در بازه‌های زمانی ۰، ۸، ۱۶، ۲۴، ۳۲ و ۴۰ روز آزمایش کردند و نتیجه گرفتند که در خاک آلوده به نفت تلقیح شده با کنسرسیوم میزان دهیدروژناز با گذشت زمان افزایش چشمگیری نسبت به دو خاک دیگر داشت ولی بعد از گذشت ۳۲ روز این فعالیت رو به کاهش بود. حسن شاهیان و زیدآبادی نژاد (۱۳۹۶) طی بررسی جمعیت میکروبی و فعالیت آنزیم دهیدروژناز در دو خاک مزرعه‌ای و بیابانی آلوده به نفت در فرایند زیست‌پالایی عنوان کردند فعالیت این آنزیم در تیمارهای زیست‌پالایی در خاک مزرعه تا روز ۶۰ روند افزایشی ولی بعد از آن تا ۱۲۰ روز روند کاهشی داشته است و در خاک‌های بیابانی تا روز سی‌ام، الگوی افزایشی و پس از آن تا انتهای آزمایش، کاهش در فعالیت آنزیم دهیدروژناز مشاهده شد. با توجه به شکل ۲-ب، میزان فعالیت آنزیم دهیدروژناز در خاک آلوده تحت تیمار Tween 80 (LT) در ابتدای آزمایش زیاد بود و سپس با گذشت زمان با شیب تند کاهش یافت به‌طوری‌که این کاهش در روز آخر آزمایش در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود، البته مقدار فعالیت آنزیم دهیدروژناز در خاک آلوده تحت تیمار Tween 80 (LT) از بقیه نمونه‌ها در این نمودار بیشتر است. به نظر می‌رسد سورفکتانت توئین۸۰ هم به‌عنوان منبع کربن مورداستفاده ریزجانداران قرار گرفته و هم با افزایش فراهمی زیستی باعث می‌شود که ریزجانداران به‌راحتی بتوانند منبع هیدروکربن‌ها را جذب کنند و میزان فعالیت میکروبی و درنتیجه فعالیت دهیدروژنازی در روزهای ابتدائی افزایش یابد. فعالیت آنزیم دهیدروژناز در نمونه خاک‌های آلوده بدون تیمار Tween 80 (LC) و شاهد تحت تیمار Tween 80 (CT) در روز ۵ دچار افزایش کمی شده و سپس با گذشت زمان با شیب ملایم رو به کاهش است. دلیل بیشتر بودن میزان فعالیت آنزیم دهیدروژناز در خاک شاهد تحت تیمار Tween 80 می‌تواند به اثر تحریکی توئین۸۰ بر رشد ریز جانداران مربوط باشد، که ریز جانداران از توئین ۸۰ به‌عنوان منبع کربن استفاده کرده‌اند و سپس با کاهش منبع آلودگی و سورفکتانت فعالیت میکروبی و دهیدروژنازی نیز کاهش‌یافته است.

با توجه به (شکل ۲-ج)، میزان فعالیت آنزیم دهیدروژناز در خاک آلوده تحت تیمار کود شیمیایی NP (LNP)، کمتر از خاک شاهد تحت تیمار کود شیمیایی NP (CNP) است. میزان فعالیت آنزیم

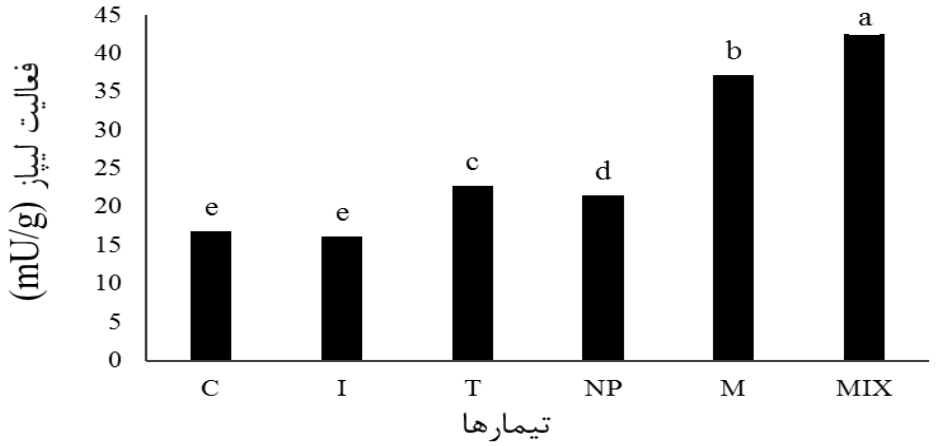
دهیدروژناز در این دو نمونه در روزهای ابتدائی با شیب تند و سپس با گذشت زمان، با شیب ملایم کاهش‌یافته است اما کاهش فعالیت دهیدروژناز در خاک آلوده تحت تیمار کود شیمیایی NP در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار نبود. به نظر می‌رسد ریز جانداران قادر به استفاده از منبع غذایی نبوده‌اند و جمعیت و فعالیت میکروبی از ابتدا کم بود و سپس با گذشت زمان نیز کاهش بیشتری داشته است. با توجه به اینکه میزان فعالیت آنزیم دهیدروژناز در خاک آلوده بدون تیمار کود شیمیایی NP از بقیه بیشتر است به نظر مقادیر نیتروژن و فسفر استفاده‌شده نه‌تنها باعث ایجاد انگیزش مثبت برای افزایش فعالیت ریزجانداران نشده بلکه پیامد منفی هم داشته است.

با توجه به (شکل ۲-د)، فعالیت آنزیم دهیدروژناز در خاک شاهد تحت تیمار کود گاوی (CM) و خاک آلوده تحت تیمار کود گاوی (LM) بیشتر از نمونه‌های بدون تیمار کود گاوی است، همچنین میزان فعالیت آنزیم دهیدروژناز در نمونه خاک شاهد تحت تیمار کود گاوی (CM)، از روز صفر تا ۲۰ افزایش معنی-دار داشت و از روز ۲۰ تا ۴۵ با شیب تند و معنی‌دار کاهش‌یافته و سپس از روز ۴۵ تا ۱۲۰ با شیب ملایم کاهش‌یافته است. فعالیت دهیدروژناز در خاک آلوده تحت تیمار کود گاوی نیز تا روز ۱۰ کاهش اندکی داشته و دوباره از روز ۱۰ تا ۲۰ افزایش‌یافته. کاهش فعالیت دهیدروژناز در این تیمار از روز ۴۵ به بعد زیاد و معنی‌دار بود. حضور میکروفلور بومی موجود در کود دامی و همچنین درنتیجه افزوده شدن مواد آلی به واسطه استفاده از کود دامی و پیامدهایی نظیر بهبود ساختمان خاک، تأمین رطوبت، اکسیژن و عناصر غذایی موردنیاز جامعه میکروبی خاک، افزایش فعالیت آنزیم دهیدروژناز در روزهای ابتدائی مشاهده می‌شود. اما باگذشت زمان و کاهش منابع هیدروکربنی و منبع غذایی، فعالیت ریز جانداران و درنتیجه فعالیت آنزیم دهیدروژناز نیز کاهش می‌یابد. به عقیده رز و همکاران (۲۰۰۳) رابطه فعالیت آنزیم دهیدروژناز با مقدار ماده آلی بسیار مرتبط بود.

با توجه به (شکل ۲-ه)، فعالیت دهیدروژناز در خاک آلوده تحت تیمار تلفیقی (LMIX)، از روز اول تا ۱۵ با شیب تند کاهش‌یافته از روز ۱۵ تا ۳۰ تغییر اندکی کرده و دوباره از روز ۳۰ به بعد دوباره کاهش‌یافته است. فعالیت آنزیم دهیدروژناز در خاک شاهد تحت تیمار تلفیقی (CMIX) از روز صفر تا ۲۰ افزایش‌یافته و سپس از روز ۲۰ تا ۱۲۰ کاهش‌یافته و این کاهش فعالیت در روز پایانی معنی‌دار بود. فعالیت آنزیم دهیدروژناز در خاک آلوده تحت تیمار تلفیقی (LMIX) نسبت به خاک شاهد بدون تیمار تلفیقی (CC) و خاک شاهد تحت تیمار تلفیقی (CMIX) بیشتر و معنی‌دار است. به نظر می‌رسد در خاک آلوده تحت تیمار تلفیقی که شامل کنسرسیوم باکتریایی، سورفکتانت توین ۸۰، کود شیمیایی NP و کود گاوی بود جمعیت و فعالیت ریزجانداران افزایش‌یافته و به دنبال آن نیز فعالیت آنزیم دهیدروژناز هم افزایش نشان داده است. نتایج (وو و همکاران (۲۰۱۷))، نشان داد در تیمار تلفیقی که در آن مواد غذایی (NP) به همراه تلقیح زیستی در خاک آلوده نفتی به غلظت ۶ درصد به مدت ۱۲۶ روز زیست‌پالایی استفاده شد، آنزیم دهیدروژناز از لحظه شروع تا هفته سوم به‌شدت افزایش یافت و از روز ۲۱ تا ۱۲۶ روز کاهش شدیدی در فعالیت این آنزیم مشاهده گردید. در تیمار شاهد آلوده آنزیم دهیدروژناز کمتر از تیمار زیست‌پالایی بود و تا ۷۰ روز میزان آن ثابت بود و بعد از ۷۰ روز تا ۱۲۶ روز کاهش ملایمی داشت. در مطالعه‌ایی که افشارنیا و همکاران (۱۳۹۸) در خاک آلوده به نفت انجام دادند، مشاهده کردند همه تیمارهای زیست پالایی در هفته نخست دارای فعالیت دهیدروژناز بالایی اما پس از گذشت چهار ماه، کاهش فعالیت چشمگیری داشتند.

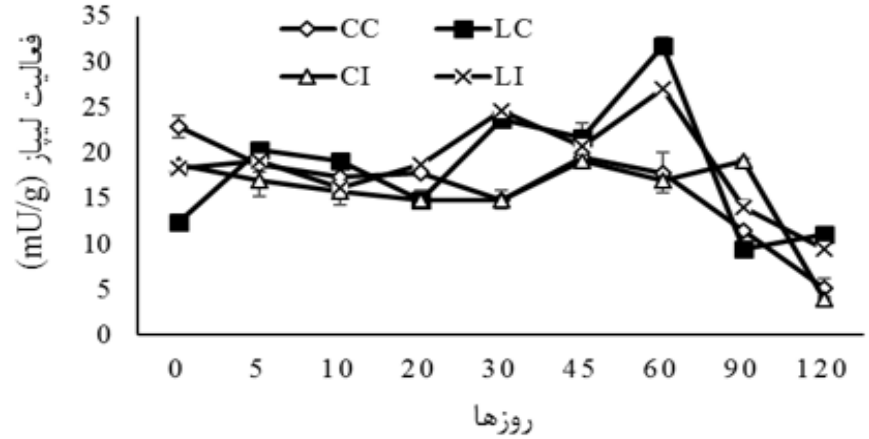
فعالیت لیپاز

بر اساس جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) ازنظر فعالیت لیپازی بین فاکتور آلودگی (خاک شاهد و خاک آلوده به نفتای سبک)، فاکتور تیمارهای زیست پالایی (خاک شاهد بدون تیمار زیست‌پالایی، تلقیح کنسرسیوم باکتریایی، سورفکتانت Tween 80، کودهای شیمیایی NP، کود گاوی و تیمار تلفیقی) و فاکتور زمان (۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ روز) در سطح احتمال یک درصد ($P<0.01$) اختلاف معنی‌دار وجود دارد. با توجه به شکل ۳، بیشترین مقدار فعالیت لیپازی به ترتیب مربوط به تیمارهای تلفیقی، کود گاوی، سورفکتانت Tween 80 و تیمار کود شیمیایی NP است.

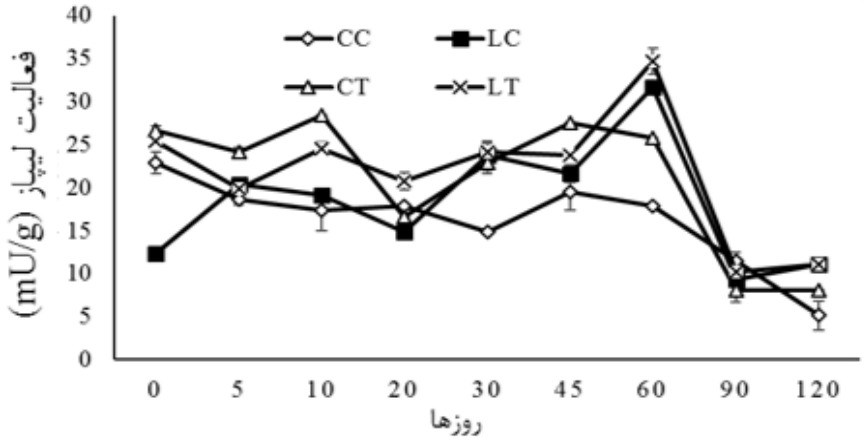


شکل ۳- فعالیت لیپاز اندازه‌گیری شده در خاک تحت تیمارهای مختلف زیست‌پالایی (خاک شاهد (C)، کنسرسیوم باکتریایی (I)، سورفکتانت T (Tween 80)، کود شیمیایی NP (NP)، کود گاوی (M) و تیمار تلفیقی (MIX)

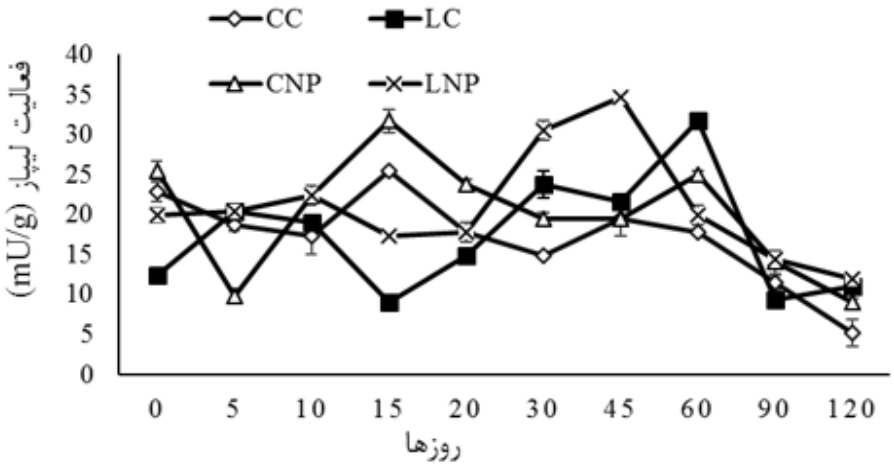
لیپازها جز آنزیم‌های برون سلولی هستند، که می‌تواند هیدرولیز استرهای مختلف را انجام دهد. این آنزیم توسط بسیاری از باکتری‌ها و قارچ‌ها تولید می‌شود (گادورا و همکاران، ۲۰۰۶). تری گلیسریدها سوبسترای اصلی لیپازها هستند. اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه کمی در آب محلول است ولی اسیدهای چرب با زنجیره بلند آلیفاتیک در آب نامحلول هستند. ماسیاندرو و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که آنزیم لیپاز پتانسیل قوی در بررسی زیست پالایی هیدروکربن‌ها دارد از محصولات حاصل از تجزیه زیستی هیدروکربن‌های نفتی به‌عنوان سوبسترایی برای این آنزیم بشمار می‌روند. فعالیت بالای لیپازی خاک به علت حضور نفت یا روغن یا گریس در خاک تحریک می‌شود و کاهش فعالیت لیپاز در خاک می‌تواند به دلیل مواد سمی حد واسط مربوط گردد (شن و همکاران، ۲۰۱۶).



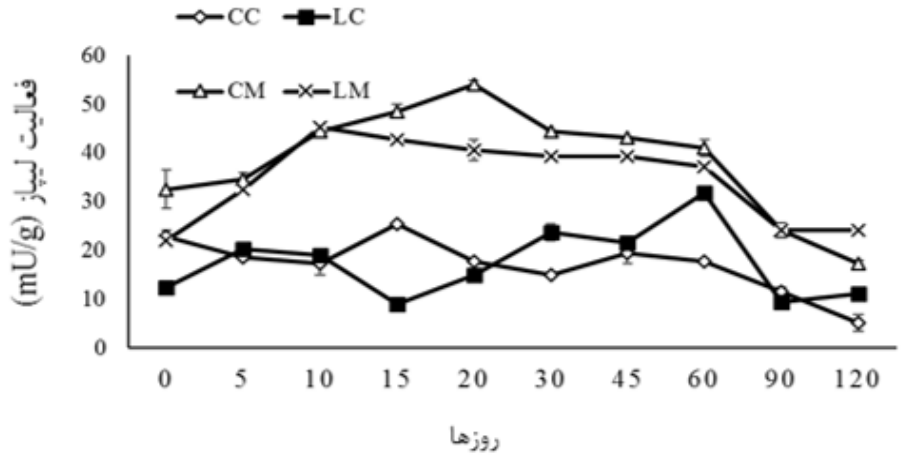
شکل ۴-الف)روند تغییرات زمانی فعالیت آنزیم لیپاز در خاک شاهد بدون تیمار زیست پالایی (CC)، خاک شاهد تیمار شده با کنسرسیوم باکتریایی (CI)، خاک آلوده به نفتای سبک بدون کنسرسیوم باکتریایی (LC) و خاک آلوده تلقیح شده با کنسرسیوم باکتریایی (LI)



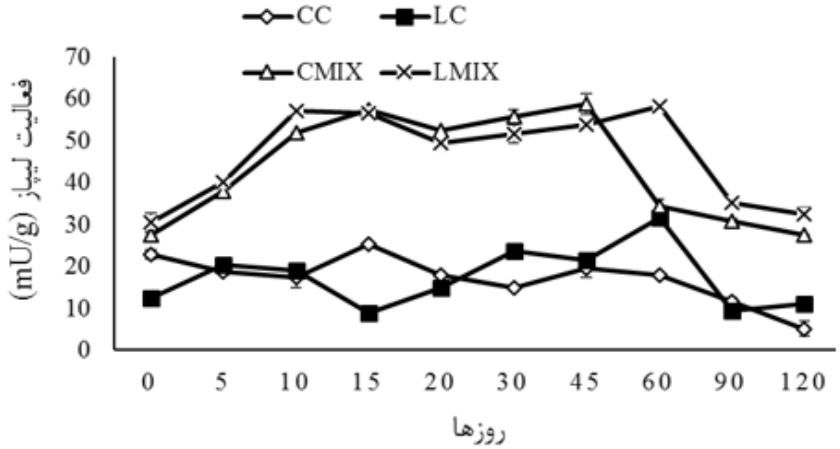
شکل ۴-ب)روند تغییرات زمانی فعالیت آنزیم لیپاز در خاک شاهد بدون تیمار زیست‌پالایی (CC)، خاک شاهد تیمار شده با سورفکتانت Tween 80 (CT)، خاک آلوده به نفتای سبک بدون تیمار Tween 80 (LC) و خاک آلوده تیمار شده با Tween 80 (LT)



شکل ۴-ج)روند تغییرات زمانی فعالیت آنزیم لیپاز در خاک شاهد بدون تیمار زیست‌پالایی (CC)، خاک شاهد تیمار شده با کود شیمیایی NP (CNP)، خاک آلوده به نفتای سبک بدون تیمار کود شیمیایی NP (CNP) و خاک آلوده به نفتای سبک تیمار شده با کود شیمیایی NP (LNP)



شکل ۴-د) روند تغییرات فعالیت آنزیم لیپاز در خاک شاهد بدون تیمار زیست‌پالایی (CC)، خاک شاهد تیمار شده با کودگاوی (CM)، خاک آلوده به نفتای سبک بدون تیمار کود گاوی (LC) و خاک آلوده تیمار شده با کود گاوی



شکل ۴-ه) روند تغییرات زمانی فعالیت آنزیم لیپاز در خاک شاهد بدون تیمار زیست‌پالایی (CC)، خاک شاهد تحت تیمار تلفیقی (CMIX)، خاک آلوده به نفتای سبک بدون تیمار تلفیقی (LC) و خاک آلوده با تیمار تلفیقی (LMIX)

فعالیت لیپاز در خاک آلوده تحت تیمار کنسرسیوم باکتریایی (LI) و خاک آلوده بدون کنسرسیوم باکتریایی (LC)، تا روز ۱۵ کاهش یافته و از روز ۱۵ تا ۶۰ با نوسان افزایش‌یافته است سپس از روز ۶۰ تا ۱۲۰ با شیب تند کاهش‌یافته است (شکل ۴-الف). با توجه به نتایج، تغییرات فعالیت لیپاز در خاک آلوده تحت تیمار کنسرسیوم باکتریایی و شاهد تحت کنسرسیوم باکتری معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد بود. فعالیت آنزیم لیپاز در خاک آلوده تلقیح شده با کنسرسیوم باکتریایی تا روز ۱۵ نزولی بود و بعدازآن تا روز ۶۰ افزایش غیر معنی‌دار داشت. به نظر می‌رسد با توجه به اینکه لیپاز نقش مستقیم در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی دارد با افزایش میزان فعالیت آن هیدروکربن‌های نفتی کاهش می‌یابند، دلیل افزایش فعالیت لیپاز تا روز ۶۰ این است که احتمالاً ریزجانداران برای سازش با آلاینده به زمان طولانی‌تری نیاز دارند. فعالیت لیپازی خاک شاخص مهمی از ریزجانداران تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های آلیفاتیک می‌باشد (افشارنیا و همکاران، ۱۳۹۸). حضور نفت خام تازه در خاک باعث افزایش فعالیت لیپازی و حضور PAH در خاک باعث افزایش فعالیت لاکازی می‌شود. القای ژن آنزیم لیپازی باکتریایی در خاک‌های آلوده به نفت تازه و روغنی در خاک نشان‌دهنده آن است که این آنزیم یک شاخص ارزشمند در تجزیه زیستی نفت در خاک است (پولیاک و همکاران، ۲۰۱۸). سروی مغانلو و همکاران (۱۳۹۰) برای زیست بهسازی خاک‌های آلوده به نفت خام با استفاده از تلقیح‌زیستی باکتریایی و مایه‌زنی قارچی

مشاهده کردند فعالیت آنزیم لیپاز در سطوح بالای آلودگی با کاهش فعالیت همراه بود و با افزایش تجزیه ترکیبات نفتی و کاهش میزان آن‌ها فعالیت لیپاز افزایش می‌یابد. شن و همکاران (۲۰۱۶) در زیست‌پالایی کوتاه‌مدت خاک‌های آلوده به نفت از طریق تلقیح زیستی کنسرسیوم باکتریایی مشاهده کردند فعالیت این آنزیم تا روز شانزدهم به‌طور سریع افزایش‌یافته و به حداکثر میزان خود یعنی دو برابر می‌رسد و پس از شانزده روز تا چهل روز کاهش آرامی را طی می‌کند بطوریکه باز میزان فعالیت لیپازی در روز چهلم حدود ۵۰ درصد از لحظه شروع زیست پالایی بیشتر بود؛ این در حالی است که فعالیت لیپازی در خاک شاهد آلوده به نفت با روند کندی رو به افزایش بوده و در خاک شاهد غیرآلوده نفتی فعالیت لیپازی بسیار پایین و در طول زمان ثابت بود.

فعالیت لیپاز در خاک آلوده تحت تیمار Tween 80 (LT) نسبت به خاک آلوده بدون تیمار Tween 80 (LC) بیشتر است. میزان فعالیت لیپاز در خاک آلوده تیماره شده با Tween 80 در ابتدا کمی کاهش‌یافته سپس از روز ۵ تا ۶۰ افزایش‌یافته است که نشان‌دهنده تأثیر Tween 80 در افزایش تجزیه ترکیبات نفتی است. از روز ۶۰ تا ۱۲۰ کاهش نشان می‌دهد (تغییرات فعالیت لیپاز در طول زمان حالت زنگوله‌ای دارد). همچنین میزان فعالیت لیپاز در خاک شاهد تیمار شده با Tween 80 (CT)، تا روز ۲۰ همراه با نوسان در سطح احتمال ۱ درصد کاهش معنی‌دار داشت سپس از روز ۲۰ تا ۴۵ افزایش معنی‌دار داشته است، از روز ۴۵ تا ۱۲۰ نیز مجدداً کاهش نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد توین ۸۰ با افزایش فراهمی زیستی باعث افزایش فعالیت لیپاز و تجزیه هیدروکربن-های نفتی شده است (شکل ۴–ب). نوروزپور و همکاران (۱۴۰۲) برای کاهش آلودگی هیدروکربن‌های نفتی، بعد از ایجاد ۷ درصد آلودگی نفتای سنگین با استفاده از انواع تیمارهای زیست پالایی، بالاترین فعالیت لیپازی را به ترتیب در تیمارهای تلفیقی، کود گاوی و سورفکتانت Tween 80 بیان کردند و همچنین آن‌ها به این نتیجه رسیدند در تیمارهایی که از توین ۸۰ استفاده‌شده بود (تیمار تلفیقی و تیمار توین ۸۰)، به دلیل استفاده از این ترکیب که ماده‌ای با قرابت مولکولی به توین ۲۰ (سوبسترای مورد استفاده در سنجش فعالیت لیپازی خاک) است، فعالیت لیپازی بیشتری به‌دست‌آمده آمد. به نظر استفاده از توین ۸۰ به دلیل تحریک تولید این آنزیم سبب افزایش فعالیت آن شده است.

با توجه به(شکل ۴–ج)، میزان فعالیت لیپاز در خاک آلوده تیمار شده با کود شیمیایی NP (LNP)، نسبت به خاک آلوده بدون تیمار کود شیمیایی NP (LC)، بیشتر است. میزان فعالیت آنزیم لیپاز در خاک آلوده تیمار شده با کود شیمیایی NP تا روز ۴۵ افزایش یافت در روز ۴۵ به بیشترین مقدار خود در سطح احتمال ۱ درصد رسیده است یعنی با گذشت زمان و کاهش مقدار هیدروکربن‌ها فعالیت لیپاز نیز افزایش‌یافته است. فعالیت لیپاز در خاک شاهد تحت تیمار NP (CNP) نسبت به خاک شاهد بدون تیمار NP (CC) بیشتر است. همچنین میزان فعالیت لیپاز در خاک شاهد تحت تیمار NP تا روز ۱۵ افزایش معنی‌دار داشت و سپس از روز ۱۵ تا ۱۲۰ با نوسانات اندک کاهش یافت. افشارنیا و همکاران (1398)، برای کاهش هیدروکربن‌های نفتی در خاک آلوده در پالایشگاه تبریز از تیمارهای زیست پالایی (تلقیح کنسرسیوم باکتریایی، Tween 80، NPK، کودگاوی، کود مرغی و کمپوست) استفاده کردند. نتایج آن‌ها نشان داد؛ که فعالیت لیپازی بین همه تیمارهای تلقیح زیستی با گذشت زمان دارای روند افزایشی بوده ولی در تیمارهای تحریک زیستی فقط تیمارهای NPK، توئین ۸۰ و آبدهی روند افزایشی داشتند. همچنین میزان فعالیت لیپاز در همه تیمارهای زیست پالایی نسبت به شاهد آلوده و غیر آلوده بالاتر بوده و نیز در همه تیمارها به جز کود مرغی، کود گاوی و شاهد آلوده، روند افزایشی در فعالیت لیپازی باگذشت زمان مشاهده شد این در حالی بود که در تیمارهای کمپوست و هوادهی، روند برعکس مشاهده گردید.

با توجه به (شکل ۴-د)، فعالیت لیپاز در خاک شاهد تحت تیمار کود گاوی (CM) نسبت به خاک شاهد بدون تیمار کود گاوی (CC) بیشتر است. فعالیت لیپاز در خاک آلوده تیمار شده با کود گاوی (LM) نسبت به خاک آلوده بدون تیمار کود گاوی (LC) بیشتر است. فعالیت لیپاز در خاک آلوده تیمار شده با کود گاوی از روز صفر تا ۱۰ افزایش‌یافته و از روز ۱۰ تا ۱۲۰ با شیب ملایم کاهش داشته است و در روزهای پایانی نسبت به قبل کاهش معنی‌دار بود. همچنین میزان فعالیت لیپاز در خاک شاهد تیمار شده با کود گاوی تا روز ۲۰ افزایش، و از روز ۳۰ تا ۴۵ کاهش معنی‌دار نشان داده است. به نظر میکروفلور بومی موجود در کود گاوی در مقایسه با باکتری‌های مورد استفاده در کنسرسیوم میکروبی (تیمار تلقیح میکروبی) ازنظر فعالیت لیپازی شرایط بهتری داشته‌اند، شاید بهینه‌سازی شرایط دیگر نظیر تأمین مواد کربنه موجود در کود گاوی و همچنین بهبود تهویه در افزایش فعالیت لیپازی در این تیمار دخیل بوده است. مارگسین و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کردند که در خاک آلوده به نفت در تیمار تحریک زیستی با کاربرد کود، در دو هفته اول فعالیت لیپاز ۷۳ درصد افزایش یافت در حالی‌که در خاک‌های آلوده به PAH فعالیت لیپازی کاهش یافته بود. حضور نفت خام و مواد روغنی تازه فعالیت لیپاز خاک را افزایش می‌دهد در حالیکه حضور PAHها در خاک فعالیت لاکازی خاک را بالا می‌برد به‌عبارتی‌دیگر آنزیم لیپاز هیدرولیز زنجیره‌های آلیفاتیک را انجام می‌دهد و آنزیم لاکاز اکسید حلقه‌های آروماتیک و حلقه فنلی را برعهده دارد (پتل و همکاران، ۲۰۱۸).

فعالیت لیپاز در خاک شاهد تحت تیمار تلفیقی (CMIX) بیشتر از خاک شاهد بدون تیمار تلفیقی (CC) بود. فعالیت لیپاز در خاک شاهد تحت تیمار تلفیقی از روز صفر تا ۴۵ افزایش‌یافته است و از روز ۴۵ تا ۱۲۰ در سطح احتمال یک درصد کاهش معنی‌دار داشت. میزان فعالیت لیپازی در خاک آلوده تحت تیمار تلفیقی (LMIX) نسبت به خاک شاهد تحت تیمار تلفیقی (CMIX) بیشتر و معنی‌دار است. به طوریکه فعالیت لیپاز در خاک‌آلوده تحت تیمار تلفیقی تا روز ۶۰ افزایش‌یافته و بعد از آن روند کاهشی داشت و طبق نتایج این تغییرات معنی‌دار نبودند (شکل۴-ه). افزایش فعالیت لیپازی تا روز ۶۰ در خاک آلوده تحت تیمار تلفیقی نشان می‌دهد که میزان هیدروکربن‌های نفتی در این بازه رو به کاهش هستند یعنی ترکیبات نفتی بیشتر تجزیه شده‌اند. مطالعات مارگسین و همکاران (۲۰۰۰)، نشان‌دهنده‌ی کاهش فعالیت لیپاز در تمام سطح آلودگی موردبررسی بود به‌عبارت‌دیگر یک رابطه معکوس بین فعالیت لیپازی و غلظت آلاینده وجود دارد به نظر افزایش فعالیت این آنزیم در کاهش میزان هیدروکربن‌ها نقش دارد. مارگسین و همکاران (۱۹۹۹)، گزارش کردند فعالیت لیپاز بر خلاف فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و دهیدروژناز است. نتایج مطالعات مارگسین و اسکینر (۱۹۹۹)، نشان داد که فعالیت آنزیم لیپاز از افزایش ترکیبات سنگین، پیچیده و با قابلیت دسترسی پایین کمتر تأثیر می‌پذیرد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از تغییرات فعالیت دهیدروژناز و فعالیت لیپاز در خاک آلوده به نفتای سبک نشان می‌دهند که کارایی تیمارهای مورد استفاده یکسان نیست. اما با توجه به اینکه بیشترین تغییرات فعالیت آنزیم‌های دهیدروژناز و لیپاز در تیمارهای کود گاوی، تیمار تلفیقی و کنسرسیوم باکتریایی مشاهده شد می‌توان گفت این تیمارها علاوه بر افزایش جمعیت فعال مؤثر در تجزیه ترکیبات نفتی و تأمین شرایط بهینه برای فعالیت آن‌ها می‌توانند روش مناسبی برای حذف ترکیبات نفتای سبک باشند.

فهرست منابع

۱. افشارنیا، م.، م، ر، ساریخانی.، م، زارعی.، و ع، لطف الهی. ۱۳۹۶. جداسازی باکتری‌های نفت-خوار از خاک‌های آلوده پالایشگاه و پتروشیمی تبریز و ارزیابی کارایی تجزیه نفتی آن‌ها. پانزدهمین کنگره علوم خاک ایران. اصفهان.

۲. افشارنیا، م.، م،ر، ساریخانی.، و م، زارعی. ۱۳۹۸. استفاده از گیاهان اگروپایرون (*Agropyron cristatum* L.) و تال فسکیو (*Festuca arundinacea* L.) در گیاه‌پالائی خاک‌های آلوده نفتی. نشریه دانش کشاورزی و تولید پایدار. ۲۹(۲): ۳۰۰-۲۸۶.

۳. حسن‌شاهیان، م.، و ز، زیدآبادی نژاد. ۱۳۹۶. بررسی اثر آلودگی نفت سفید بر روی جمعیت میکروبی خاک بیابان و خاک مزرعه. نشریه پژوهش‌های حفاظت آب و خاک. ۲۴(۴): ۲۴۱-۲۲۷.

۴. سروی مغانلو، و.، چ، مصطفی.، ح، معتمدی.، ب، علیزاده.، و ش، اوستان. ۱۳۹۰. بررسی فروزینگی زیستی ترکیبات نفتی، فعالیت برخی از آنزیم‌ها و عملکرد گیاه شبدر در خاک آلوده به نفت خام. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی. ۱۵(۵۶): ۱۱۵-۱۰۳.

۵. علی‌اصغرزاد، ن. ۱۳۸۵. روش‌های آزمایشگاهی در بیولوژی خاک (ترجمه). انتشارات دانشگاه تبریز.

۶. نوروزپور، م.، م،ر، ساریخانی.، و ن، علی‌اصغرزاد. ۱۴۰۳. پایش تغییرات فعالیت آنزیمی خاک آلوده به نفتای سنگین در تیمارهای مختلف زیست‌پالایی. مجله دانش آب و خاک. ۳۴(۱): ۲۱۷-۲۳۳.

7. Ball, J.S., G. U. Dinneen., J. R. Smith., C. W. Bailey., and R. V. Meter. 1949. Composition of Colorado Shale-Oil Naphtha. Ind. Eng. Chem., 41 (3): 581–587.
8. Dashti, N., N. Ali., M. Eliyas., M. Khanafer., N.A. Sorkhoh., and S.S. Radwan. 2015. Most hydrocarbonoclastic bacteria in the total environment are diazotrophic, which highlights their value in the bioremediation of hydrocarbon contaminants. Microbes and Environments 30: 70-75.
9. Gathora, S.K., S.B. Chadha., H.S. Saini., M.K. Bhat., C.B. Faulds. 2006. Diversity of plant cell wall esterases in themophilic and thermotomerant fungi. J. Biotechnol.125: 434-445.
10. Loehr, R.C., S.J. McMillen., and M.T. Webster. 2001. Predictions of biotreatability and actual results: soils with petroleum hydrocarbons. Pract. Period. Hazard. Toxic Radioact. Waste Manage, 5:78–87.
11. Madueño, L., B.M. Coppotelli., H.M. Alvarez., and I.S. Morelli. 2011. Isolation and characterization of indigenous soil bacteria for bioaugmentation of PAH contaminated soil of semiarid Patagonia, Argentina. Int. Biodeterior. Biodegrad, 65 (2): 345–351.
12. Margesin, R., F. Schiner. 1998. Biodegradation of the anionic surfactant sodium dodecyl sulphate at low temperatures. International Biodeterioration and Biodegradation .41: 139–143.
13. Margesin, R., G. Walder., and F. Schinner., 2000. The impact of hydrocarbon remediation (diesel oil and polycyclic aromatic hydrocarbons) on enzyme activities and microbial properties of soil. Acta Biotechnologica, 20(4):313-333.

14. Margesin, R., A. Zimmerbauer., and F. Schinner., 1999. Soil lipase activity A useful indicator of oil biodegradation. Biotechnology Techniques,. 13(12): 859–863.
15. 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.
16. Nannipieri, P., E. Kandeler., and P. Ruggiero. 2002. Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. In: Burns, R.G., Dick, R.P.(Eds.), Enzymes in the Environment: Activity, Ecology and Applications. Marcel Dekker, New York, pp. 1–33.
17. Peng, R.H., 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.
18. Polyak, Y.M., L.G. Bakina., M.V. Chugunova., N.V. Mayachkina., A.O. Gerasimov., and V.M. Bure. 2018. Effect of remediation strategies on biological activity of oil-contaminated soil - A field study. International Biodeterioration & Biodegradation, 126: 57–68.
19. Riffaldi, R., R. Levi-Minzi., R. Cardelli., S. Palumbo., and A. Saviozzi. 2006. Soil biological activities in monitoring the bioremediation of diesel oil-contaminated soil. Water, air, and soil pollution, 170(4): 3-15.
20. Ross, M., M.T. Hernandez., and C. Garcia. 2003. Soil microbial activity after restoration of a semiarid soil by organic amendments. Soil Biology and Biochemistry. 35: 463-469.
21. Sakai, Y., M. Hayatsu., and K. Hayano., 2002. Use of tween 20 as a substrate for assay of lipase activity in soils. Soil Science and Plant Nutrition, 48(5): 729-734.
22. Shekoohiyan, S., G. Moussavi., and K. Naddafi. 2016. The peroxidase-mediated biodegradation of petroleum hydrocarbons in a H2O2-induced SBR using in-situ production of peroxidase: biodegradation experiments and bacterial identification. Journal of Hazardous Materials, 313: 170–178.
23. Shen, W., N. Zhu., J. Cui., H. Wang., Z. Dang., P. Wu., Y. Luo., and C. Shi. 2016. Ecotoxicity monitoring and bioindicator screening of oil-contaminated soil during bioremediation Ecotoxicology and Environmental Safety., 124:120–128.
24. Tan, T., and C. Yin. 2003. The mechanism and kinetic model for glycerolysis by 1, 3 position specific lipase from Rhizopus arrhizus. Biochemistry Engineering Journals 25: 39–45.
25. 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.
26. Wu, M., X.Ye K. Chen., W. Li., J. Yuan., and X. Jiang., 2017. Bacterial community shift and hydrocarbon transformation during bioremediation of short-term petroleum-contaminated soil. Environmental pollution, 223: 657-664.
27. Zhang, N., X. He., Y. Gao., Y. Li., H. Wang., D. Ma., R. Zhang., and S. Yang. 2010. Pedogenic carbonate and soil dehydrogenase activity in response to soil organic matter in Artemisia ordosica community. Pedosphere, 20:229–235.

Monitoring of Dehydrogenase and Lipase Activity Changes in a Light Naphtha-Contaminated 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: Maryamnorozpoor72@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: n-aliasghar@tabrizu.ac.ir

Received: June 26, 2023 and Accepted: August 13, 2024

Abstract

Enzyme activity measurement is one of the significant methods in the bioremediation of soils contaminated with petroleum compounds. Biostimulation, bioaugmentation and their integration are among the types of bioremediation methods used in this experiment. For this purpose, to reduce light naphtha pollution (1%) in a sandy loam soil, a variety of bioremediation treatments, including providing NP elements, adding cow manure and Tween 80 surfactant, bioaugmentation, and integrated treatment were used. This experiment was carried out in a pot (containing 3 kg soil) based on split plot factorial design (pollution factor, bioremediation factor and time) with 3 replications, at room temperature, for 120 days. On days 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 and 120, subsamples were taken from each pot to measure the activity of dehydrogenase and lipase enzymes. The results of the experiment showed that bioremediation treatments led to the reduction of oil pollutants. Likewise, dehydrogenase activity had a completely downward trend from the beginning of the experiment, and the changes of lipase activity in contaminated soil increased until day 10, decreased slightly from day 10 to 15, then, progressed with slight fluctuations until day 60 and decreased again from day 60 onward. Dehydrogenase activity changes in cow manure treatment during the experiment was from 3.39 to 0.35 (µg TPF g^{-1} h^{-1}), and lipase activity in integrated treatment dropped from 57 to 33.56 (mU g^{-1}). In addition to increasing the active microbial population involved in the decomposition of petroleum compounds and providing optimal conditions for their activity, the use of integrated treatments and cow manure is a suitable method to reduce the concentration of light naphtha.

Keywords: Bioaugmentation, Bioremediation, Biostimulation, Enzyme activity, Petroleum pollution

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