

Research Article

Evaluation of the Pattern of Changes in Basal and Substrate-Induced Respiration in Oil-Contaminated Soils (Case study: Naft-Shahr Kermanshah)

Sh Moradi¹, MR Sarikhani^{2*}, A Beheshti Ale-Agha³, K Hassanpur⁴, J Shiri⁵

Received: November 26, 2022

Accepted: April 30, 2023

Revised: January 19, 2023

Published online: March 20, 2024

1-PhD. student Dept. of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran

2- Assoc. Prof., Dept. of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran

3-Assoc. Prof., Dept. of Soil Science, Razi University, Kermanshah, Iran

4-Asist. Prof., Dept. of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran

5-Assoc. Prof., Dept. of Water Engineering, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran

*Corresponding Author, E-mail: rsarikhani@yahoo.com

Abstract

Background and Objectives

One of the most critical environmental pollutions is oil contamination. This pollution affects biological characteristics as well as the physical and chemical properties of soil. Soil is a habitat for microbial communities whose abundance and diversity can be affected by petroleum hydrocarbons. Soil biological indicators including microbial respiration, are highly sensitive to environmental stresses and respond to them quickly. Microbial respiration is one of the most common biological indicators which is used to investigate the quality and health of the soil. Since petroleum hydrocarbons are toxic and persistent in soil, studying the pattern of changes in soil biological characteristics is important in effective soil management. The aim of this study was to investigate changes in the basal respiration (BR) and substrate induced respiration (SIR) of microbial communities in the presence of oil, and how petroleum hydrocarbons can disrupt microbial respiration.

Methodology

For this purpose, a total of 120 samples of crude oil-contaminated soils were collected in the oil-rich area of Naft-Shahr (located in the west of Kermanshah province) which had natural and long-term oil pollution. After measuring the physicochemical properties of soil samples microbial respiration was measured by titration method. In this research a total of 120, oil-contaminated soil samples were used. According to the factors included in this experiment, a nested design was used to analyze the data. The test factors included locations (4 locations) and 3 different levels of oil pollution (L: low, M: moderate, and H: high). It should be mentioned that 10 replications were considered in three levels of oil pollution and a total of 120 soil samples were gathered in this study (4×3×10). The collected soils were analyzed for soil texture, pH, EC and organic carbon (OC), and carbonate calcium equivalent (CCE) using standard methods. The concentration of petroleum pollutants, were determined by the Soxhlet extractor. In order to investigate the abundance of culturable microbial population, bacterial counting was carried out in nutrient agar (NA) and carbon-free minimal medium (CFMM)+crude oil media. Basal and substrate-induced respiration were measured by the titration method. Backward regression coefficients were used in order to identify important independent variables affecting changes in BR and SIR. Finally, the results of measuring chemical, physical and biological parameters were analyzed using principal component analysis (PCA).

Findings

The results showed that the percentage of oil measured by the Soxhlet method for oil pollution levels (L, M, and H) were 4.03%, 9.95%, and 22.50%, respectively. The obtained results showed that basal and substrate-induced respiration increased with the increase in the intensity of pollution. Also, the microbial population



©: The Author(S)

Publisher: University of Tabriz

showed a direct relationship with the increasing of the oil pollution. The highest measured BR and SIR were obtained with values of 0.053 and 0.234 mgCO₂/g.h, respectively, in heavily polluted soils. Multiple regression analysis of independent variables on BR and SIR showed that the most influential variable was oil percentage, which individually explained 59% of BR variance and 72% of SIR variance. Principal components analysis (PCA) was also done and 73% of the density variance of the samples can be justified by the first two components (biochemical component and physical component).

Conclusion

In summary, according to the microbial respiration results in oil-contaminated soil, the microbial population followed by microbial respiration increased with increasing oil concentration. It seems that prolonged oil pollution has caused the selection of resistant microbial communities to the oil compounds, hence we can observe their positive response to the presence of oil compounds, and an increase in microbial respirations (BR and SIR).

Keywords: Basal respiration, Microbial population, Oil pollution, Substrate induce respiration.

مقاله پژوهشی

بررسی الگوی تغییرات تنفس میکروبی پایه و برانگیخته در خاک‌های آلوده به نفت – مطالعه موردی نفت شهر کرمانشاه

شکوفه مرادی^۱، محمدرضا ساریخانی^{۲*}، علی بهشتی آل آقا^۳، کریم حسن پور^۴، جلال شیری^۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۱۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۰۵

تاریخ انتشار آنلاین: ۱۴۰۳/۰۱/۰۱

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۲/۰۱/۲۹

۱- دانشجوی دکتری بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، گروه علوم و مهندسی خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۲- دانشیار بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، گروه علوم و مهندسی خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۳- دانشیار بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، گروه علوم و مهندسی خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی

۴- دانشیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۵- دانشیار گروه مهندسی آب، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Email: rsarikhani@yahoo.com

چکیده

آلودگی نفتی یکی از بحرانی‌ترین آلودگی‌های زیست‌محیطی می‌باشد که بر ویژگی‌های زیستی، فیزیکی و شیمیایی خاک تأثیر می‌گذارد. در این پژوهش، شاخص‌های زیستی تنفس پایه (BR)^۱ و تنفس برانگیخته (SIR)^۲ در خاک‌های آلوده به نفت مورد بررسی قرار گرفت. ۱۲۰ نمونه خاک آلوده به نفت از منطقه نفت‌شهر کرمانشاه با سه سطح آلودگی شدید (H: High)، متوسط (M: Moderate) و کم (L: Low) از عمق ۱۵-۰ سانتی‌متری تهیه شد. پس از اندازه‌گیری ویژگی‌های فیزیوشیمیایی خاک‌ها، BR و SIR اندازه‌گیری شدند. همچنین برای شمارش همه باکتری‌ها و باکتری‌های درگیر در تجزیه نفت، به ترتیب از محیط کشت‌های NA^۳ و CFMM^۴ بهره‌گیری شد که رابطه مستقیمی با افزایش غلظت نفت داشت. میانگین درصد نفت اندازه‌گیری شده به روش سوکسله، به ترتیب ۴/۰۳، ۹/۹۵ و ۲۲/۵۰ درصد برای سطوح L، M و H به دست آمد. نتایج نشان داد که با افزایش شدت آلودگی، BR و SIR افزایش یافتند. بالاترین تنفس BR و SIR به ترتیب با مقادیر ۰/۰۵۳ و ۰/۲۳۴ ($\text{mgCO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) در خاک‌های H به دست آمد. آنالیز رگرسیون چندگانه متغیرهای مستقل روی BR و SIR نشان داد که مؤثرترین متغیر، درصد نفت (Oil) بود که به ترتیب ۵۹ و ۷۲ درصد از واریانس BR و SIR را توجیه کرد. آنالیز مؤلفه‌های اصلی نیز انجام شد و ۷۳ درصد از واریانس تراکمی نمونه‌ها توسط دو مؤلفه اول (مؤلفه بیوشیمیایی و مؤلفه فیزیکی) قابل توجیه بود. آلودگی نفتی طولانی مدت و طبیعی باعث گزینش جامعه میکروبی مقاوم به نفت شده و بنابراین پاسخ مثبت آنها به حضور ترکیبات نفتی و افزایش تنفس میکروبی را شاهد هستیم.

واژه‌های کلیدی: آلودگی نفتی، جمعیت میکروبی، تنفس پایه، تنفس برانگیخته

¹ Basal Respiration

² Substrate-Induced Respiration

³ Nutrient Agar

⁴ Carbon Free Minimal Medium

مقدمه

آلاینده‌های آلی از جمله ترکیبات نفتی، یک مشکل جهانی برای بهداشت محیط زیست و جانداران به شمار می‌آید. اغلب، آلودگی‌های نفتی، در نتیجه اکتشاف نفت، حمل و نقل، ذخیره‌سازی یا کاربرد آن و گاهی به خاطر حوادث رخ می‌دهد. رخداد برخی از آلودگی‌ها به صورت طبیعی بوده و برخی از آنها ناشی از فعالیت‌های انسانی است. بررسی الگوی تغییرات رخ داده در ویژگی‌های خاک در نتیجه هر کدام از این آلودگی‌ها متفاوت بوده و نیاز به بررسی بیشتری دارد. این آلودگی، پیامدهای گوناگونی بر ویژگی‌های زیستی، شیمیایی و فیزیکی خاک خواهد داشت و در نهایت با به مخاطره انداختن بهداشت خاک، بر تولید محصول نیز اثر منفی می‌گذارد (لیانگ و همکاران ۲۰۱۵). خاک زیستگاه بزرگی برای جوامع میکروبی است و هیدروکربن‌های نفتی بر فراوانی و گوناکونی جمعیت میکروبی خاک اثر می‌گذارند، از سوی دیگر، گروه ویژه‌ای از ریزجانداران که با چنین شرایطی سازگارند، قادر به استفاده و تجزیه ترکیبات نفتی می‌باشند (فیلیپس و همکاران ۲۰۰۹). شاخص‌های زیستی در خاک می‌توانند برای بررسی اثرات یک آلاینده در خاک به‌کار روند، زیرا ریزجانداران خاک به تنش‌های اکوسیستم بسیار حساس هستند و از طریق تنظیم فعالیت، زیست‌توده و گوناکونی ساختار جامعه خود به سرعت به عوامل تنش‌زا پاسخ می‌دهند. تنفس میکروبی یکی از متداول‌ترین شاخص‌های زیستی است که برای بررسی کیفیت و بهداشت خاک به‌کار می‌رود و می‌تواند وضعیت و فعالیت میکروب‌های خاک و همچنین روند تعادل و چگونگی تجزیه مواد آلی، فعالیت آنزیمی و چرخه‌های عناصر غذایی را نشان دهد (مورنو و همکاران ۲۰۱۱).

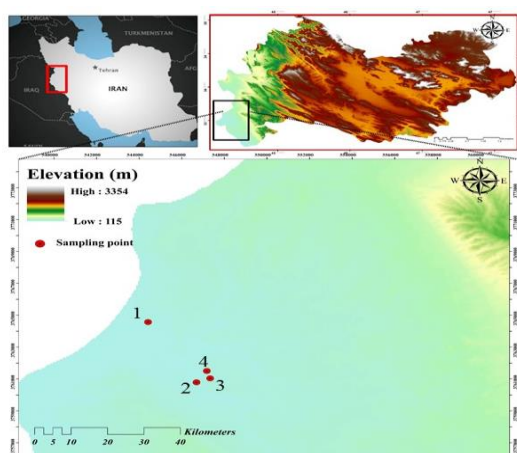
از جمله ترکیبات آلی که ممکن است به خاک افزوده شوند و تعادل اکولوژیک آن را بهم بزنند،

هیدروکربن‌های نفتی هستند. تنفس پایه معیاری از تجزیه کربن آلی خاک را توسط ریزجانداران فعال و توانا فراهم می‌کند در حالی که تنفس برانگیخته می‌تواند استفاده از سوبسترای کربنی خاص توسط جوامع میکروبی خاص در بین کل جمعیت میکروبی خاک را تعیین کند (داوسان و همکاران ۲۰۰۷). تنفس برانگیخته (SIR)، تنفس ناشی از سوبسترای اضافه‌شده به خاک را براساس اندازه‌گیری حداکثر انتشار اولیه CO_2 از خاک-های غنی‌شده با گلوکز (در یک دوره زمانی که بیش از ۶ ساعت نیست) نشان می‌دهد. به عبارت دیگر، SIR بیانگر حداکثر میزان تنفس اولیه ریزجانداران پس از غنی‌سازی خاک با منبع کربن و انرژی اضافی می‌باشد و به طور قابل توجهی به کل زیست‌توده میکروبی خاک مرتبط است. بدیهی است که تنفس برانگیخته خاک از تنفس پایه خاک بیشتر است و این سطح تنفس جدید "حداکثر پاسخ اولیه"^۱ نامیده می‌شود که توسط مقدار گلوکزی که به خاک افزوده شده، القا شده‌است (داوسان و همکاران ۲۰۰۷؛ مارتنز ۱۹۹۵).

کانی شدن کربن آلی خاک به CO_2 یا تنفس میکروبی به عنوان یک شاخص مهم از فعالیت کل میکروفلور خاک به‌شمار می‌رود. تنفس میکروبی نه تنها نشان‌دهنده وضعیت و فعالیت ریزجانداران خاک است، بلکه نشان‌دهنده روند، تعادل و چگونگی تجزیه ماده آلی، فعالیت آنزیمی و چرخه برخی عناصر غذایی خاک نیز خواهد بود. از آنجایی که هیدروکربن‌های نفتی در محیط، سمی و پایدار هستند، مطالعه تأثیر آلودگی نفتی روی جوامع میکروبی به ویژه برای مدیریت مؤثر خاک و کنترل آلودگی، در خاک‌های مختلف ضروری است. در این پژوهش تنفس میکروبی (پایه و برانگیخته) به عنوان یکی از شاخص‌های زیستی مهم در خاک‌های آلوده به نفت، در ۱۲۰ نمونه خاک جمع‌آوری‌شده از منطقه نفت شهر استان کرمانشاه، بررسی شد. هدف از

¹ Maximum Initial Response

صورت بصری از بخش‌های سه گانه با سطح آلودگی شدید (H:High)، متوسط (M:Moderate) و کم (L:Low) گزینش شدند و تفکیک درست آنها پس از اندازه‌گیری غلظت آلاینده در آزمایشگاه انجام شد. ذکر این نکته لازم است که از نظر استاندارد خاک‌های با آلودگی نفتی بیش از ۳ درصد، آلودگی شدید محسوب می‌شوند. بر اساس این استاندارد خاک‌های استفاده‌شده در این پژوهش خاک‌های با آلودگی شدید محسوب می‌شوند (وینسنت و همکاران ۲۰۱۱) اما به این دلیل که منطقه نمونه‌برداری مدت‌های طولانی تحت تأثیر آلودگی نفتی بوده‌است و نمونه‌خاک‌ها با درجات مختلف آلودگی برداشت شده‌اند، نام‌گذاری آنها باتوجه به میزان نفت موجود در آنها به صورت Low (L)، Moderate (M) و High (H) بود. از هر منطقه ۳۰ نمونه خاک تهیه‌شد که از این ۳۰ نمونه، ۱۰ نمونه خاک با آلودگی کم (L)، ۱۰ نمونه خاک با آلودگی متوسط (M) و ۱۰ نمونه خاک با آلودگی شدید (H) بود. در مجموع ۱۲۰ نمونه از لایه ۱۵-۰ سانتیمتری برداشته‌شد و در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند.



شکل ۱- موقعیت جغرافیایی مناطق چهارگانه نمونه‌برداری و GPS این نقاط.

این پژوهش ارزیابی چگونگی تغییرات تنفس میکروبی در حضور آلاینده‌های نفتی بود. پاسخ به این سوالات که آیا حضور ترکیبات نفتی موجب اختلال در فعالیت‌های تنفسی جمعیت میکروبی در نمونه خاک‌های دارای غلظت‌های مختلف نفت خواهدشد یا نه؟ آیا تفاوتی بین مناطق نمونه‌برداری از نظر صفات مورد اندازه‌گیری وجود دارد؟ آیا روابطی بین تنفس میکروبی و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک دیده می‌شود؟ از اهداف این پژوهش به شمار می‌رود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و آماده‌سازی خاک

نمونه خاک‌های به‌کاررفته در این پژوهش از منطقه نفت‌خیز نفت‌شهر واقع در غرب استان کرمانشاه در آبان‌ماه ۱۳۹۹ برداشت شدند (شکل ۱). قابل ذکر است که در این منطقه منابع طبیعی نفتی، میدان‌های نفتی و به ویژه وجود سفره‌های زیرزمینی نفت در خاک موجب شده‌است آلودگی نفتی در خاک‌های منطقه فراگیر شود. با توجه به الگوی توزیع آلودگی، ۴ منطقه برای نمونه‌برداری گزینش و نمونه‌ها با توجه به نزدیکی و دوری از منبع آلودگی و سطوح غلظت آلاینده نفتی به

Locations	X (Altitude)	Y (Latitude)
Location 1	544418.91559	3764570.28274
Location 2	546694.48195	3760792.76504
Location 3	547334.664	3761042.3494
Location 4	547178.42572	3761503.57889

اندازه‌گیری ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی

شاخص‌های عمومی خاک مانند بافت، pH، EC و کربن آلی (OC) (راول، ۱۹۹۴) و کربنات کلسیم (CCE) (مارتین و ریو، ۱۹۹۵) با بهره‌گیری از روش کارهای استاندارد با در نظر گرفتن دو تکرار اندازه‌گیری شد.

شمارش باکتری‌ها

برای بررسی فراوانی جمعیت میکروبی قابل کشت، اقدام به شمارش میکروبی در محیط کشت‌های NA و CFMM+Crude oil شد. اجزاء بکار رفته در محیط کشت CFMM بر حسب گرم بر لیتر شامل (NH_4NO_3) ۲/۲، Na_2HPO_4 ۰/۸، KH_2PO_4 ۰/۱، $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ۰/۰۵، $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ۰/۰۰۵ و $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ۰/۰۰۵ (pH=۷/۲) بود که در این محیط حداقل به میزان ۱ درصد نفت خام افزوده شد. به دلیل عدم اختلاط نفت با محیط کشت جامد در حین ساخت محیط، پس از ریختن محیط کشت در پلیت و جامد شدن آن به میزان تقریبی ۲۰۰ میکرولیتر از نفت خام بر سطح پلیت گسترده شد (ابراهیمی و همکاران ۲۰۱۳). برای شمارش و خالص‌سازی باکتری‌های بومی تجزیه‌کننده مواد نفتی اقدام به تهیه سری‌های رقت شد (10^{-1} تا 10^{-8}) و ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌ها به محیط جامد CFMM همراه با نفت خام انتقال داده‌شد و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس انکوباسیون صورت‌گرفت (ابراهیمی و همکاران ۲۰۱۳). برای آماده کردن سوسپانسیون میکروبی در شمارش باکتری‌ها، ۱۰ گرم از نمونه خاک به ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه شیک شد و سپس سایر سری‌های رقت تهیه شدند. باکتری‌های رشد یافته بر روی NA معرف تمام باکتری‌های خاک و باکتری‌های رشد یافته بر روی محیط حداقل CFMM بر روی نفت خام معرف باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت می‌باشد.

اندازه‌گیری تنفس پایه

اندازه‌گیری تنفس BR به روش تیتراسیون انجام‌شد. ۱۰ گرم خاک مرطوب به درون ظرف شیشه‌ای تیره افزوده شد. ۱۰ میلی‌لیتر محلول هیدروکسید سدیم ۰/۵ نرمال در بالن ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و سپس در درون ظرف شیشه‌ای قرار داده، درپوش ظرف شیشه‌ای را گذاشته و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس انکوبه شد. پس از اتمام انکوباسیون بالن را برداشته و محلول هیدروکسید سدیم درون ارلن مایر ۱۰۰ میلی‌لیتر ریخته‌شد و محتویات بالن دو مرتبه با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر شستشو داده و به ارلن افزوده‌شد. سپس دو میلی‌لیتر محلول کلرید باریم ۰/۵ مولار اضافه‌شد. ۳-۴ قطره شناساگر فنل‌فتالین به محلول افزوده و با اسید کلریدریک ۰/۵ نرمال تیترا شد. برای تهیه شاهد، همان روش بدون خاک اجرا شد (شاینر و همکاران ۲۰۱۲). روش محاسبه:

$$BR = (B-S) N \times 22 \times 100 / (SW \times \%dm) \quad [1]$$

B و S به ترتیب حجم اسید کلریدریک (HCl) مصرفی در شاهد و نمونه خاک (ml)

SW: وزن اولیه نمونه خاک (g)، dm: فاکتور تبدیل خاک خشک،

BR: تنفس پایه ($\text{mg CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)

N: نرمالیه اسید، ۲۲: وزن اکی‌والانی دی‌اکسیدکربن (mg)

اندازه‌گیری تنفس برانگیخته

تنفس ناشی از بستر خاک‌ها SIR (تنفس برانگیخته) با توجه به میزان حداکثر تنفس اولیه ریزجانداران پس از غنی‌سازی خاک با منبع اضافی کربن و انرژی (گلوکز) با روش افزودن گلوکز و تیتراسیون ارزیابی شد. ۱۰ گرم خاک مرطوب با ۴۰ میلی‌گرم گلوکز (۰/۴ درصد) مخلوط شد و به مدت ۵ ساعت انکوبه شد و سپس بقیه مراحل همانند تنفس پایه انجام شد (شاینر و همکاران ۲۰۱۲).

تعیین غلظت آلاینده نفتی

برای اندازه‌گیری غلظت آلاینده‌های نفتی در نمونه‌های خاک برداشته شده از سه سطح آلودگی

واریانس چندمتغیره و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪ انجام شد. برای تشخیص متغیرهای مستقل مهم و مؤثر بر تغییرات تنفس پایه (BR) و تنفس برانگیخته (SIR)، ضرایب رگرسیون به روش Backward مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج و بحث

ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی

نتایج اندازه‌گیری ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نمونه‌های خاک در جداول ۱ و ۲ نشان داده شده است. غلظت نفت در نمونه‌های خاک از ۴/۰۳ درصد در خاک‌های L تا ۲۲/۵ درصد در خاک‌های H متغیر بود (جدول ۱). نیاز به یادآوری است که با توجه به درصد‌های نفت به دست آمده در این پژوهش و برای تقسیم‌بندی ۱۲۰ نمونه خاک در سه گروه ۴۰ تایی (۴۰ نمونه L، ۴۰ نمونه M و ۴۰ نمونه H)، گروه‌بندی نمونه‌های خاک به صورت زیر بود: ۷/۱-درصد نفت، خاک‌های L، ۱۲/۹۴-۷/۱۲ درصد نفت، خاک‌های M و بیشتر از ۱۲/۹۴ درصد خاک‌های H در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل شاخص‌های فیزیکوشیمیایی نشان داد که بیشترین میزان رطوبت (۱۴/۲۴ درصد) در خاک‌های منطقه ۴ و کمترین مقدار آن مربوط به خاک‌های منطقه ۱ (۶/۹۱ درصد) بود (جدول ۲). درصد θ_m در خاک‌های H (۱۵/۷۹ درصد)، به طور معنی‌داری بالاتر از خاک‌های M (۱۱/۸۴ درصد) و خاک‌های L (۵/۵۷ درصد) بود (جدول ۱). میانگین pH خاک از ۷/۰۵ در خاک‌های L تا ۷/۳۶ در خاک‌های H متغیر بود (جدول ۱). حداکثر pH در منطقه ۳ (۷/۴۴) و حداقل آن در منطقه ۴ (۷/۰۷) مشاهده شد (جدول ۲). نتایج نشان می‌دهد که EC در نمونه‌های خاک با آلودگی نفتی متفاوت متغیر بود و از ۱/۷۱ (dS m⁻¹) (خاک H) تا ۷/۵۹ (dS m⁻¹) (خاک L) متغیر بود. بیشترین مقدار EC در منطقه ۳ و کمترین مقدار در منطقه ۲ مشاهده شد (جدول ۲). میزان کربن آلی (OC) در نمونه‌های خاک از ۵/۰۵ تا ۲۰/۸۴ درصد بسیار متغیر بود (جدول ۱). همانطور که در

شدید، متوسط و کم، از دستگاه سوکسله استفاده و تعیین غلظت هیدروکربن‌های نفتی کل بر اساس روش UNEP/IOC/IAEA سازمان محیط زیست آمریکا انجام شد (کریستوفر و همکاران ۱۹۸۸). در این روش برای اندازه‌گیری غلظت کل هیدروکربن‌های نفتی خاک، ابتدا ۱۰ گرم از نمونه خاک خشک را روی کاغذ صافی ریخته سپس کاغذ صافی از هر طرف به‌طور کامل بسته و وزن اولیه یادداشت شد و سپس در دستگاه سوکسله قرار گرفت. مواد نفتی با بهره‌گیری از ۴۰۰-۳۰۰ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان به مدت ۴ ساعت استخراج شدند، سپس ۷۲ ساعت در آون در ۶۰ درجه سلسیوس نگهداری و پس از تبخیر دی‌کلرومتان، وزن ثانویه یادداشت شد و با بهره‌گیری از رابطه ۲ که در آن B درصد نفت، W₁ وزن اولیه و W₂ وزن ثانویه می‌باشد، محاسبه شد.

$$B = 100 (W_1 - W_2) / W_2 \quad [2]$$

تجزیه و تحلیل آماری

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی آشیانه‌ای (Nested) در سه تکرار انجام شد. داده‌ها از طریق نرم افزار آماری SPSS آنالیز شده و نمودارهای حاصله از طریق نرم افزار Excel و SPSS ترسیم گردید. تحلیل همبستگی، آنالیز رگرسیون و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام گرفت. در ابتدا استانداردسازی داده‌ها انجام گرفت و اقدام به حذف داده‌های پرت شد. پیش از انجام آنالیزهای آماری، نرمال بودن داده‌های بدست آمده از آزمایش با بهره‌گیری از شاخص کلموگروف-اسمیرنوف (K-S) بررسی شد. برخی از شاخص‌ها که دارای توزیع نرمال نبودند، با استفاده از روش تبدیل داده لگاریتمی نرمال شدند. در پایان پس از اطمینان از توزیع نرمال داده‌ها، اقدام به تحلیل‌های آماری یادشده گردید. برای بررسی تفاوت بین غلظت‌های مختلف آلودگی (کم، متوسط و زیاد) و همچنین مناطق چهارگانه نمونه‌برداری از نظر تغییرات میزان شاخص‌های اندازه‌گیری شده، تحلیل

جدول ۲ نشان داده شده است، درصد OC در خاک جایگاه‌های نمونه‌برداری شده به طور قابل توجهی ناهمبند بود و ۸/۸۳ درصد در منطقه ۴ تا ۱۵/۹۶ درصد در منطقه ۱ بود. بیشترین درصد CCE در خاک-های L (۹/۵۶ درصد) و کمترین آن در خاک‌های H (۸/۷۴ درصد) مشاهده شد. بیشترین میانگین درصد CCE در منطقه ۲ (۹/۹۱ درصد) و کمترین آن در منطقه ۱ (۸/۴۹ درصد) به دست آمد. توزیع اندازه ذرات

(درصد شن و سیلت) نشان داد که بین نمونه‌های خاک جمع‌آوری‌شده در شیب آلودگی نفتی (L، M و H) از نظر درصد شن و سیلت تفاوت معناداری وجود ندارد و تنها درصد رس تفاوت معناداری نشان داد. میزان درصد رس در خاک‌های L (۲۳/۶۷ درصد) به طور معنی‌داری از خاک‌های H (۲۰/۷۹ درصد) بالاتر بود (جدول ۱).

جدول ۱- برخی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی به دست آمده از نمونه‌های خاک با سه سطح آلودگی شدید (High)، متوسط (Moderate) و کم (Low).

آلودگی نفتی	Θ_m (%)	pH	EC (dS m ⁻¹)	OC (%)	CCE (%)	Sand (%)	Silt (%)	Clay (%)	%Oil
Low	۵/۵۷ ^c	۷/۰۵ ^c	۷/۵۹ ^a	۵/۰۵ ^c	۹/۵۶ ^a	۴۴/۹۶ ^a	۲۸/۶۷ ^a	۲۳/۶۷ ^a	۴/۰۳ ^c
Moderate	۱۱/۸۴ ^b	۷/۲۶ ^b	۳/۲۴ ^b	۱۲/۳۱ ^b	۹/۰۹ ^b	۴۴/۲۲ ^a	۳۰/۱۷ ^a	۲۴/۳۰ ^a	۹/۹۵ ^b
High	۱۵/۷۹ ^a	۷/۳۶ ^a	۱/۷۱ ^c	۲۰/۸۴ ^a	۸/۷۴ ^b	۴۹/۳۵ ^a	۲۸/۲۲ ^a	۲۰/۷۹ ^b	۲۲/۵۰ ^a

درصد نفت (Oil)، درصد شن (Sand)، درصد رس (Clay)، درصد سیلت (Silt)، درصد کربنات کلسیم معادل (CCE)، درصد کربن آلی (OC)، هدایت الکتریکی (EC)، درصد رطوبت (Θ_m)

جدول ۲- برخی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نمونه‌های خاک در چهار منطقه نمونه‌برداری.

مناطق نمونه‌برداری	Θ_m (%)	pH	EC (dS m ⁻¹)	OC (%)	CCE (%)	Sand (%)	Silt (%)	Clay (%)	%Oil
Location 1	۶/۹۱ ^c	۷/۲۲ ^b	۲/۹۴ ^b	۱۵/۹۶ ^a	۸/۴۹ ^c	۵۹/۴۵ ^a	۲۱/۴۴ ^c	۱۷/۷۳ ^b	۱۵/۹۵ ^a
Location 2	۱۰/۳۱ ^b	۷/۲۰ ^b	۲/۶۷ ^b	۱۴/۶۳ ^a	۹/۹۱ ^a	۴۸/۶۹ ^b	۳۰/۲۹ ^b	۱۶/۳۲ ^b	۱۲/۶۲ ^b
Location 3	۱۳/۰۱ ^{ab}	۷/۴۴ ^a	۵/۴۳ ^a	۱۲/۵۷ ^b	۹/۴۴ ^b	۴۳/۹۲ ^b	۲۷/۰۲ ^{bc}	۲۷/۴۳ ^a	۱۲/۳۷ ^b
Location 4	۱۴/۲۴ ^a	۷/۰۷ ^c	۵/۳۱ ^a	۸/۸۳ ^c	۸/۶۹ ^c	۳۳/۳۱ ^c	۳۷/۰۹ ^a	۲۹/۶۸ ^a	۸/۷۸ ^c

فراوانی باکتری‌ها

در این پژوهش، در شمارش باکتری‌ها در دو محیط‌کشت NA و CFMM، دیده شد که فراوانی باکتری‌ها در محیط کشت NA بیشتر از محیط‌کشت CFMM بود (جدول ۳). محیط‌کشت NA یک محیط عمومی برای رشد بیشتر باکتری‌ها است و آشکار است که شمار باکتری‌ها در آن بیشتر باشد ولی محیط‌کشت CFMM محیطی با کمترین ترکیبات آلی است و تنها کربن نفت افزوده شده در آن، منبع کربن و انرژی برای

باکتری‌ها است و باید شمار میکروبی کمتری به دست آید، زیرا تنها گروه‌های با توان تجزیه هیدروکربن‌های نفتی می‌توانند در آن رشد کنند. در نمونه‌های بررسی‌شده با افزایش غلظت نفت، فراوانی باکتری‌ها بیشتر بود. همان‌گونه که در جدول ۳ دیده می‌شود، فراوانی کلنی‌های شمارش‌شده در حضور غلظت شدید نفتی (H) با اختلاف آماری معنی‌دار ($P < 0.01$) بالاتر از خاک‌های دارای غلظت متوسط نفت (M) و غلظت پایین (L) بود.

جدول ۳- فراوانی باکتری ها (CFU g^{-1}) در خاک ۴ جایگاه نمونه برداری شده و در ۳ غلظت نفت (High و Moderate و Low) در کشتگاه های NA و CFMM.

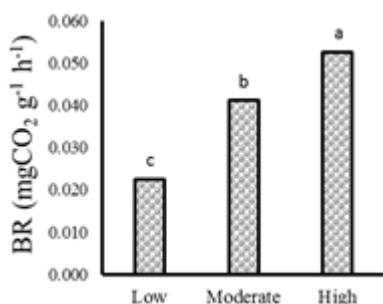
مناطق نمونه برداری	کشتگاه	غلظت آلاینده نفتی			
		Low	Medium	High	Mean
Location 1	NA	5.06×10^4 d	1.13×10^6 a	1.12×10^6 a	9.37×10^4 A
Location 2	NA	3.55×10^4 e	8.40×10^4 bc	9.46×10^4 ab	7.22×10^4 B
Location 3	NA	2.85×10^4 e	7.07×10^4 c	8.12×10^4 bc	6.25×10^4 C
Location 4	NA	1.60×10^4 f	3.67×10^4 e	6.98×10^4 c	3.31×10^4 D
Mean	NA	3.28×10^4 C	6.48×10^4 B	9.54×10^4 A	
Location 1	CFMM	6.06×10^4 f	2.93×10^4 bc	4.54×10^4 bc	2.98×10^4 A
Location 2	CFMM	1.81×10^4 d	6.61×10^4 a	2.52×10^4 c	3.34×10^4 A
Location 3	CFMM	5.62×10^4 f	1.05×10^4 e	1.93×10^4 cd	1.26×10^4 B
Location 4	CFMM	2.97×10^4 g	1.42×10^4 de	2.97×10^4 bc	1.20×10^4 C
Mean	CFMM	8.11×10^4 C	2.53×10^4 B	3.11×10^4 A	

ستون Mean: میانگین جمعیت میکروبی در محیط NA و CFMM برای هر منطقه نمونه برداری (Location1، Location2، Location3 و Location4). ردیف Mean: میانگین جمعیت میکروبی در محیط NA و CFMM برای هر سه سطح غلظت آلاینده نفتی (High و Moderate و Low).

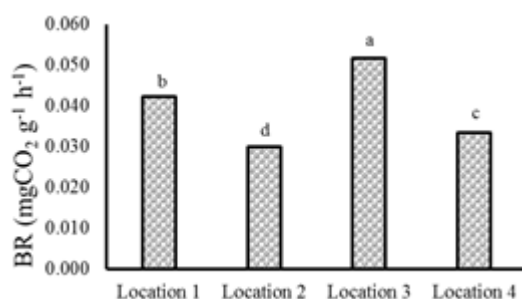
استرس نفتی و فقر غذایی، جمعیت کل میکروب- های خاک را کاهش می دهد اما باکتری های تجزیه کننده نفت دچار تغییر نمی شوند. به عبارت دیگر آلودگی نفتی، شرایط انتخابی در خاک ایجاد می کند طوری که تنها گروه های باکتریایی که قادر به بهره گیری از هیدروکربن ها هستند از جمعیت بالاتری برخوردار می- باشند. در گزارشی مشابه، انسباسی و همکاران (۲۰۱۲) اثر آلودگی نفتی را بر جمعیت میکروبی بررسی کردند و یافتند که آلودگی نفتی اثرات کاهشی بر جمعیت باکتری های هتروتروف و اثر افزایشی در جمعیت باکتری های تجزیه کننده نفت دارند. لئو و همکاران (۲۰۱۵) تأثیرات آلودگی نفتی را بر ساختار و فعالیت میکروبی و عملکرد متابولیسم کربن توسط ریزجانداران را مورد بررسی قرار دادند. آنها دیدند که آلودگی طولانی مدت نفت، به شدت الگوهای جامعه میکروبی خاک را تغییر می دهد و تغییرات جوامع میکروبی به لحاظ فراوانی، غنای باکتریایی، گوناکونی زیستی

باکتریایی و عملکرد قابل توجه بود. لذا گوناکونی و فراوانی میکروبی بالا منجر به رشد بیشتر ریزجانداران هتروتروف شده که ظرفیت بالایی برای تخریب هیدروکربن ها و قابلیت بهره گیری از منابع غنی نفتی دارند. در پژوهشی داس سنتوس و همکاران (۲۰۱۱) دیدند که تعداد OTU^1 ها در خاک های آلوده به نفت به گونه چشمگیری افزایش یافت. آنها گزارش کردند که برخی از گونه های تجزیه کننده هیدروکربن های نفتی در محیط آلوده به نفت، به دلیل گزینش طبیعی غالب شده- اند. علاوه براین در پژوهشی دیگر مارگزین و همکاران (۲۰۰۷) دریافتند که جمعیت ریزجانداران گرم منفی به گونه چشمگیری تحت تأثیر ترکیبات نفتی کل قرار گرفت. پژوهشگران زیادی در گزارشات مختلف نتایج مشابهی به دست آوردند از جمله هیو و همکاران (۲۰۰۷)، واندرگست و همکاران (۲۰۰۴).

¹ Operational Taxonomic Unit



شکل ۲- تنفس پایه (BR) اندازه‌گیری شده در ۳ سطح آلودگی زیاد (High)، متوسط (Moderate) و کم (Low).



شکل ۳- تنفس پایه اندازه‌گیری شده در ۴ منطقه نمونه- برداری.

تنفس پایه

نتایج به‌دست آمده در اندازه‌گیری تنفس پایه نشان داد که، با افزایش شدت آلودگی، میزان تنفس افزایش یافت. میانگین CO₂ رها شده در اثر تنفس پایه در خاک‌های L، در خاک‌های M و در خاک‌های H به ترتیب ۰/۰۲۳، ۰/۰۴۱ و ۰/۰۵۳ mgCO₂ g⁻¹ h⁻¹ بود. تنفس پایه اندازه‌گیری شده در هر سه غلظت آلاینده نفتی اختلاف آماری معنی‌داری (P<۰/۰۱) نشان دادند (شکل ۲). میانگین تنفس پایه اندازه‌گیری شده در ۴ منطقه مورد بررسی نشان داد که منطقه ۳ با ۰/۰۵۲ mgCO₂ g⁻¹ h⁻¹ بالاترین و منطقه ۲ با ۰/۰۳۰ mgCO₂ g⁻¹ h⁻¹ پایین‌ترین مقادیر را به خود اختصاص دادند. چهار منطقه مختلف با هم اختلاف آماری معنی‌داری نشان دادند (P<۰/۰۱) و در کلاس‌های آماری مختلف قرار گرفتند (شکل ۳).

(SIR) در خاک آلوده در ابتدای آزمایش بالا بود زیرا جوامع باکتریایی از هیدروکربن‌ها به عنوان منبع کربن استفاده کرده بودند اما با گذشت زمان تقریباً ۱۵ روز روند کاهشی بود زیرا هیدروکربن‌های در دسترس کاهش یافته و تنفس حتی از نمونه شاهد بدون آلودگی نیز کمتر شده بود. اما در پژوهش حاضر نمونه‌خاک‌های مورد بررسی سال‌های متمادی تحت تأثیر آلاینده نفتی بوده‌اند و به عبارتی می‌توان گفت سازگاری لازم بین جوامع میکروبی و آلاینده نفتی ایجاد شده‌است. نتایج آزمایش مربوطه در این پژوهش نشان داد که میزان CO₂ متصاعدشده ناشی از فعالیت تنفسی میکروارگانیسم‌ها، در حضور ماده نفتی بیشتر بود. همبستگی بالای بین تنفس پایه و میزان درصد نفت (r= ۰/۷۶۵ و P<۰/۰۱) گواهی بر این ادعاست (جدول ۴).

در پژوهش‌هایی که شاخص‌های زیستی خاک از جمله تنفس و جمعیت میکروبی را مورد بررسی قرار می‌دهند، غالباً انتظار می‌رود که سمیت آلاینده‌های نفتی روی جوامع میکروبی اثر گذاشته و شمار میکروبی و میزان تنفس میکروبی نیز کاهش یابد زیرا ریزجانداران خاک به هرگونه آشفستگی اکوسیستم بسیار حساس هستند و لذا گوناکونی و فعالیت آنها به سرعت توسط چنین آشفستگی‌هایی تغییر می‌کند. اکثر پژوهش‌های این چنینی خاک‌های آلوده‌ای را مورد ارزیابی قرار داده‌اند که به صورت مصنوعی، آلاینده به آنها افزوده شده‌است. نوروزپور و همکاران (۲۰۲۳) تغییرات تنفس میکروبی را در خاک آلوده به نفتای سنگین که به میزان ۷ درصد به صورت دستی به خاک افزوده بودند، مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج آنها نشان داد که تنفس (BR) از

بدیهی است که جمعیت میکروبی بالا در این خاک‌ها، میزان تنفس بیشتری خواهد داشت. جمعیت بالای میکروبی در خاک‌های آلوده در این آزمایش (جدول ۳) بیانگر این موضوع است که میکروارگانیسم-های خاک طی مدت طولانی، به حضور آلاینده سازگار شده و حتی از هیدروکربن‌های نفتی به عنوان منبع کربن برای رشد و تغذیه خود استفاده کرده‌اند. در تأیید صحت مطالب گفته‌شده، نتایج این پژوهش نشان داد که همبستگی مثبت و معنی‌داری بین تنفس پایه خاک و شمار جمعیت میکروبی رشدیافته در محیط کشت عمومی NA ($r = 0.687$, $P < 0.01$) و محیط کشت حاوی ترکیبات نفتی CFMM ($r = 0.508$, $P < 0.01$) وجود داشت (جدول ۴). خاک‌هایی که به مدت طولانی در معرض آلودگی با هیدروکربن‌های نفتی هستند با چالش شدیدی برای حفظ و نگهداری جامعه میکروبی و تنوع ساختاری و عملکردی این جوامع میکروبی مواجه هستند (پساک و همکاران ۲۰۱۵). همچنین لی و همکاران (۲۰۰۸) عنوان داشتند که در خاک آلوده، تنفس پایه خاک به سرعت زیاد می‌شود چون بیشتر هیدروکربن‌های در دسترس، فعالیت میکروبی را تحریک می‌کنند.

طبیعتاً جوامع میکروبی مقاوم به آلودگی نفتی و تجزیه‌کننده‌های نفت می‌توانند با افزایش مقدار هیدروکربن‌ها در خاک، جمعیت و فعالیت خود را افزایش دهند. کرونینگ و گرین فیلد (۲۰۰۳) برای ارزیابی تأثیرات آلاینده‌های نفتی همچون نفت دیزل بر کیفیت خاک، فعالیت میکروبی را از طریق اندازه‌گیری تنفس میکروبی بررسی کردند. آنها مشاهده کردند که پس از ۱۶ هفته، به طور معنی‌داری جمعیت میکروبی خاک نسبت به سطوح اولیه که میزان آلودگی کمتر بود، افزایش یافت. نتایج آنها نشان داد که تا دو سال پس از آلودگی، نوسان قابل توجهی در جمعیت میکروبی

مشاهده نشد. اما با بررسی الگوهای تولید CO_2 به دست آمده از تنفس و فعالیت میکروبی خاک دریافتند که دوره‌های طولانی‌تر می‌تواند موجب سازگاری بیشتر جوامع میکروبی خاک با هیدروکربن‌های نفتی شود. آبد و الکیدی (۲۰۱۷)، تأثیر اختلال ناشی از آلودگی نفتی را بر گوناکونی و فعالیت جوامع میکروبی خاک بررسی کردند و نشان دادند که افزایش غلظت نفت منجر به افزایش CO_2 متصاعدشده از تنفس شد. نتایج به دست آمده از پژوهش آنها گویای این مطلب بود که افزودن نفت می‌تواند موجب تحریک فعالیت باکتری‌های هتروتروف باشد که انرژی و منبع کربن خود را از بیرون تأمین می‌کنند. باکتری‌های هتروتروف در مقابل آلودگی نفتی مقاومت بالاتری نشان می‌دهند و در حضور نفت، نسبت به باکتری‌های اتوتروف رشد بهتری خواهند داشت. آنها در مقایسه بین سیانوباکترها به عنوان باکتری‌های اتوتروف و فیرمیکوت‌ها (باسیلوس-ها و کلسترییدیوم‌ها) به عنوان باکتری‌های هتروتروف، مشاهده کردند که سطح CO_2 تولیدی ناشی از تنفس، با افزایش نفت افزایش یافت. باسیلوس‌ها توانایی تجزیه ترکیبات نفتی را در شرایط هوازی دارند و با تولید بیوسورفاکتانت می‌توانند نفت را به شکل امولسیون تبدیل کنند و امکان دسترسی و تخریب آن را افزایش دهند. لذا می‌توان نتیجه گرفت که افزایش جمعیت میکروبی در این پژوهش، که منجر به افزایش تنفس می‌شود، ممکن است ناشی از افزایش شمار باکتری‌های هتروتروف باشد که از منابع نفتی برای تأمین کربن، انرژی و زنده‌مانی خود استفاده می‌کنند.

جدول ۴- ضرایب همبستگی بین شاخص‌های فیزیکوشیمیایی و زیستی اندازه‌گیری شده در ۱۲۰ نمونه خاک.

متغیرها	Oil	BR	SIR	NA	CFMM	Sand	Clay	Silt	CCE	pH	EC	OC
Oil	۱											
BR	۰/۷۶۵**	۱										
SIR	۰/۸۴۷**	۰/۶۶۹**	۱									
NA	۰/۷۶۱**	۰/۶۸۷**	۰/۷۷۲**	۱								
CFMM	۰/۷۰۶**	۰/۵۰۸**	۰/۸۴۴**	۰/۸۳۳**	۱							
Sand	۰/۰۴۲	-۰/۰۶۸	۰/۱۰۵	۰/۲۲۴*	۰/۱۲۷	۱						
Clay	-۰/۱۳۱	۰/۱۴۷	-۰/۲۳۷*	-۰/۳۸۵**	-۰/۴۵۱**	-۰/۶۴۱**	۱					
Silt	۰/۰۱۰	۰/۰۱۶	-۰/۰۲۱	-۰/۱۳۸	-۰/۰۲۲	-۰/۸۷۴**	۰/۳۶۲**	۱				
CCE	-۰/۳۵۴**	-۰/۲۴۳**	-۰/۲۴۴**	-۰/۱۳۶	-۰/۰۷۷	-۰/۰۰۱	-۰/۰۸۵	۰/۰۲۹	۱			
pH	۰/۴۱۷**	۰/۶۱۹**	۰/۳۵۵**	۰/۴۹۵**	۰/۳۸۷**	۰/۰۲۰	-۰/۰۵۹	-۰/۰۶۶	۰/۱۶۸	۱		
EC	-۰/۷۶۶**	-۰/۵۵۸**	-۰/۷۰۳**	-۰/۷۳۴**	-۰/۶۷۰**	-۰/۱۶۹	۰/۳۰۵**	۰/۰۹۲	۰/۱۴۲	-۰/۵۱۵**	۱	
OC	۰/۸۵۲**	۰/۶۱۴**	۰/۷۳۲**	۰/۷۵۰**	۰/۶۶۳**	۰/۱۵۵	-۰/۲۷۳**	-۰/۰۶۵	-۰/۲۸۸**	۰/۳۸۱**	-۰/۷۴۲**	۱

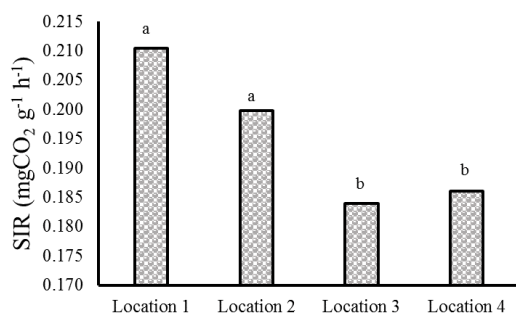
** و * به ترتیب معنی‌دار در در سطوح ۱ و ۵ درصد. درصد نفت (Oil)، تنفس پایه (BR)، تنفس برانگیخته (SIR)، جمعیت میکروبی در محیط کشت NA (NA)، جمعیت میکروبی در محیط کشت CFMM (CFMM)، درصد شن (Sand)، درصد رس (Clay)، درصد سیلت (Silt)، درصد کربنات کلسیم معادل (CCE)، درصد کربن آلی (OC)

توان گفت با افزایش درصد نفت، جمعیت میکروبی (NA)، درصد شن و رس، میزان pH و EC، تنفس پایه نیز افزایش یافته‌است. رابطه ۳ نشان می‌دهد که به ازای یک واحد افزایش درصد نفت، تنفس پایه ۰/۰۲۸ میلی-گرم CO₂ بر گرم خاک در ساعت افزایش می‌یابد. قابل ذکر است در حالتی که تنها درصد نفت به عنوان ورودی مدل تعریف شد ضریب تبیین به‌دست آمده از ۰/۸۲ به میزان ۰/۵۹ کاهش یافت اما نشانگر آن است که ۵۹ درصد از واریانس تنفس پایه توسط درصد نفت در نمونه خاک‌ها توجیه می‌شود و این حاکی از اثربخشی ترکیبات نفتی و اندازه آن بر ویژگی‌های زیستی خاک است.

$$BR = 0.028 \text{ Oil} + 0.029 \text{ NA} - 0.006 \text{ CFMM} + 0.001 \text{ Clay} + 0.020 \text{ pH} + 0.011 \text{ EC} - 0.290 \quad r^2 = 0.82^{**} \quad [3]$$

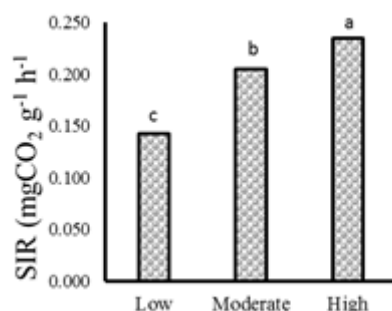
آلودگی نفتی در خاک ممکن است اندازه و ترکیب جوامع میکروبی بومی را تغییر دهد و جمعیت ریزجانداران خاک به لحاظ شمار میکروبی‌های

رگرسیون چندگانه متغیرهای مستقل روی BR انجام شد و ضریب تبیین ۸۲ درصد به دست آمد که خود نشان از اعتبار مدل رگرسیونی بود (رابطه ۳). کل مدل رگرسیونی در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود و آماره دوربین واتسون در حد مطلوب ۱/۵۱ به معنی عدم همبستگی بین باقی‌مانده‌ها بود. به منظور دستیابی به متغیرهای مهم مؤثر، رگرسیون به صورت نزولی (Backward) انجام گرفت. ضریب تبیین به‌دست آمده در رگرسیون نزولی ($r^2 = ۰/۸۲$ ، $P < ۰/۰۱$) نشان داد که متغیرهای حذف شده تأثیر چندانی در r^2 مدل نداشتند. همچنین ضریب تبیین ۸۲ درصد نیز در رابطه ۳ به معنای توجیه ۸۲ درصدی واریانس تنفس پایه توسط شاخص‌های مستقل ذکرشده است. آنالیز رگرسیون به روش Backward نشان داد که متغیرهای مستقل مهم و تأثیرگذار بر تنفس پایه (BR) شامل درصد نفت (Oil)، جمعیت میکروبی در محیط کشت NA، جمعیت میکروبی در محیط کشت CFMM، درصد رس (Clay)، میزان pH و EC بود (رابطه ۲). طبق رابطه خطی به‌دست آمده می-



شکل ۴- تنفس برانگیخته اندازه‌گیری شده در سه سطح آلودگی زیاد (High)، متوسط (Moderate) و کم (Low).

به ترتیب ۰/۲۳۴، ۰/۲۰۵ و ۰/۱۴۲ $\text{mgCO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ بود. میانگین تنفس برانگیخته اندازه‌گیری شده در هر سه غلظت آلاینده نفتی اختلاف آماری معنی داری ($P < 0/01$) نشان دادند (شکل ۴).



شکل ۵- تنفس برانگیخته اندازه‌گیری شده در چهار منطقه نمونه‌برداری.

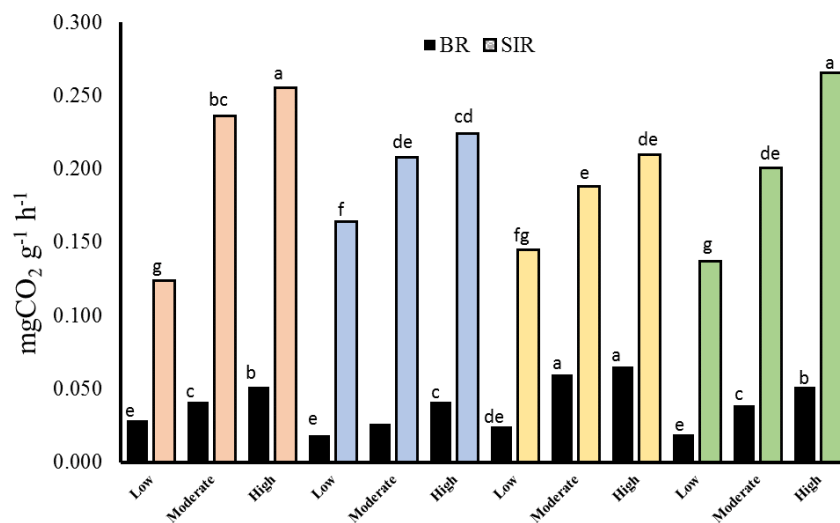
در اندازه‌گیری تنفس برانگیخته در ۴ منطقه مورد بررسی مشاهده شد که مناطق ۱ و ۲ در یک کلاس آماری قرار گرفتند و بیشترین مقدار مربوط به منطقه ۱ ($0/210 \text{ mgCO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) بود. منطقه ۳ با $0/142 \text{ mgCO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ پایین‌ترین مقدار را به خود اختصاص داد اما به لحاظ آماری با منطقه ۴ اختلاف قابل توجهی نداشت. (شکل ۵).

تجزیه‌کننده هیدروکربن‌ها، غنی‌تر شود. به عبارت دیگر سمیت آلاینده‌های نفتی می‌تواند جمعیت سایر ریزجانداران که قابلیت بهره‌گیری از هیدروکربن‌های نفتی ندارند را کاهش دهد. لندستروم و همکاران (۱۹۹۹) تنفس میکروبی دو سری خاک آلوده به نفت و غیرآلوده به نفت را مقایسه کردند. نتایج پژوهش آنها نیز حاکی از سازگاری جامعه میکروبی به سوخت و ساز نفتی بود. به عبارت دیگر ریزجانداران خاک‌های آلوده به نفت، از هیدروکربن‌ها به عنوان سوبسترای برای رشد و تأمین کربن و انرژی استفاده کرده‌بودند.

در پژوهشی که توسط ابراهیمی و همکاران (۲۰۱۹) بر روی تنفس میکروبی خاک انجام گرفت در مورد خاک‌های زراعی نرمال و معمولی رابطه رگرسیونی تنفس پایه خاک متأثر از شاخص‌های فیزیکوشیمیایی و زیستی وارد شده به مدل بود و تنها ۴۰ درصد از تنوع در میزان BR توسط شاخص‌های وارد شده از جمله pH، EC، درصد شن، سیلت و رس، CCE و جمعیت باکتریایی توجیه‌شد.

تنفس برانگیخته

اندازه‌گیری تنفس ناشی از سوبسترای گلوکز نیز همانند تنفس پایه، در خاک‌های H بالاتر بود. میزان CO_2 متصاعد شده در اثر افزودن گلوکز به نمونه‌های خاک، در خاک‌های با آلودگی زیاد (H)، متوسط (M) و کم (L)



شکل ۶- مقایسه تنفس پایه و تنفس برانگیخته اندازه‌گیری شده در چهار منطقه نمونه‌برداری.

جمعیت میکروبی شمارش شده در محیط کشت عمومی NA ($r = 0.77$, $P < 0.01$) و همچنین با جمعیت میکروبی شمارش شده در محیط کشت CFMM نیز همبستگی مثبت و معنادار ($r = 0.84$, $P < 0.01$) وجود دارد (جدول ۳). ابراهیمی و همکاران (۲۰۱۹) در پژوهش خود که به تخمین تنفس میکروبی در کاربری‌های مختلف پرداختند به همبستگی مثبت بین SIR و جمعیت میکروبی (جمعیت باکتریایی شمارش شده) اشاره داشتند. اندرسون و دامش (۱۹۷۳) با بررسی نقش زیست توده قارچی و باکتریایی در تنفس کل خاک، مشاهده کردند که پس از افزودن گلوکز به نمونه های خاک، تنفس به مدت چند ساعت (۲ تا ۸ ساعت) به سطح بالاتری افزایش یافت. آنها گزارش کردند که آزادسازی CO₂ به دلیل تکثیر جمعیت خاک افزایش یافت.

در اندازه‌گیری تنفس برانگیخته نیز آنالیز رگرسیون به روش Backward انجام گرفت و نتایج آن نشان داد که که متغیرهای مستقل مهم و مؤثر بر تنفس برانگیخته (SIR) شامل درصد نفت (Oil) و جمعیت میکروبی در محیط کشت CFMM بود (رابطه ۴). رابطه

تنفس SIR یکی از ساده‌ترین روش‌های تخمین مقدار زیست‌توده میکروبی در خاک می‌باشد. بیشتر ریزجانداران در خاک خفته هستند، بنابراین تنفس آنها در خاک کم است. با این حال تنفس آنها می‌تواند با افزوده شدن سوپسترا به راحتی تحریک شود. گلوکز عموماً به عنوان سوپسترا استفاده می‌شود؛ چون بیشتر ریزجانداران می‌توانند از آن به عنوان منبع کربن استفاده کنند (داوسان و همکاران ۲۰۰۷). در این پژوهش نیز میزان تنفس برانگیخته با افزودن گلوکز و برانگیختن فعالیت میکروبی نسبت به تنفس پایه بالاتر بود (شکل ۶). هرچند در خاک منابع کربنی به صورت هیدروکربن‌ها وجود دارد اما جامعه میکروبی به مواد قندی افزوده شده (گلوکز) که منبع قابل استفاده و در دسترس است واکنش نشان داده و فعالیت میکروبی فزونی یافته است.

نتایج پژوهش حاضر در این بخش نیز نشان داد که با افزایش میزان آلودگی در نمونه‌خاک‌ها، میزان CO₂ آزادشده در اثر تنفس تحریک شده با سوپسترای گلوکز بیشتر است. نتایج نشان داد که SIR اندازه‌گیری شده با

آشفته میکروفلور را به خوبی نشان می‌دهد و می‌تواند به عنوان یک شاخص حساس‌تر نسبت به BR در خاک-های آلوده، به‌کاررفته قرارگیرد زیرا BR اتلاف قابل توجهی از زیست‌توده در اثر آلودگی نفتی را نشان نمی‌دهد (برون و همکاران ۲۰۰۱). به طور کلی نتایج مطالعات آلودگی‌های نفتی کوتاه‌مدت، قابل مقایسه با اثرات بلندمدت آلودگی نفتی روی ویژگی‌های خاک به ویژه فعالیت‌های میکروبی نیست. علاوه بر این، ترکیب و گوناکونی جوامع میکروبی خاک بستگی به نوع خاک دارد و اطلاعات محدودی در خصوص شباهت نتایج اثرات کوتاه‌مدت و بلندمدت وجود دارد.

تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA)

نتایج اندازه‌گیری شاخص‌های شیمیایی، فیزیکی و زیستی با بهره‌گیری از آنالیز مؤلفه‌های اصلی (PCA)^۲ مورد بررسی قرار گرفت. PCA یک روش تجزیه و تحلیل داده‌های آماری چند متغیره است که مجموعه‌ای از داده‌های خام را به تعدادی از مؤلفه‌های اصلی (PCA) کاهش می‌دهد و بیشتر واریانس را در داده‌های اصلی حفظ می‌کند تا الگوها یا خوشه‌های احتمالی بین تیمارها و متغیرها را شناسایی کند (کاکس و همکاران ۲۰۰۳). در آنالیز PCA داده‌ها به مجموعه‌هایی جداگانه از امتیازات و بارگذاری‌ها برای تیمارها و متغیرها تجزیه می‌شوند و کل تنوع داده‌ها برای ارائه یک تصویر واضح و قابل تفسیر از ساختار داده‌ها توضیح داده می‌شوند. علاوه بر این، آنالیز PCA اطلاعات واضحی را به گونه گرافیکی ارائه می‌دهد. در این پژوهش برای بررسی میزان تأثیرگذاری شاخص-های اندازه‌گیری‌شده فیزیکی و شیمیایی و زیستی، از تحلیل مؤلفه‌های اصلی با به کارگیری نرم‌افزار آماری SPSS استفاده شد که نتایج بدست آمده از آنها شامل بردارهای ویژه، میزان واریانس نسبی و تجمعی مؤلفه-های اصلی شاخص‌های مورد بررسی به صورت

خطی به‌دست‌آمده حاکی از آن است که با افزایش درصد نفت و جمعیت میکروبی، تنفس برانگیخته نیز افزایش یافته‌است. رابطه ۴ نشان می‌دهد که ۸۴ درصد از واریانس تنفس برانگیخته توسط درصد نفت و جمعیت میکروبی در نمونه خاک‌ها توجیه می‌شود. همچنین زمانی‌که هر یک از این متغیرها به تنهایی در مدل قرار گرفتند ضرایب تبیین ۰/۷۲ و ۰/۷۱ به دست آمد که نشانگر آن است که ۷۲ درصد از واریانس تنفس برانگیخته توسط درصد نفت و ۷۱ درصد توسط جمعیت میکروبی قابل توجیه می‌باشد. بر اساس رابطه ۴، به ازای یک واحد افزایش درصد نفت، تنفس برانگیخته $0.501 \text{ mgCO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ و به ازای یک واحد افزایش جمعیت، $0.491 \text{ mgCO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ افزایش می‌یابد.

$$\text{SIR} = 0.501 \text{ Oil} + 0.491 \text{ CFMM} \quad r^2 = 0.84^{**} \quad [4]$$

ابراهیمی و همکاران (۲۰۱۹) SIR را به عنوان متغیر وابسته در مدل رگرسیونی معرفی کردند و آنها گزارش کردند که با افزایش اسیدیته تنفس برانگیخته کاهش می‌یابد. مدل رگرسیونی آنها نشان داد ۵۰ درصد از تنوع SIR توسط متغیرهای وارد شده به مدل از جمله pH، EC، درصد شن، سیلت و رس، CCE و جمعیت باکتریایی توجیه‌شد.

اندازه‌گیری تنفس BR و SIR مستقل از هم هستند زیرا تنفس پایه منعکس‌کننده فعالیت میکروفلور خاک است که ترکیبات آلی خاک را تجزیه می‌کنند اما SIR تنفس خاص ناشی از تجزیه گلوکز را نشان می‌دهد که نشان‌دهنده پتانسیل ریزجانداران خاک برای تخریب یک سوبسترای ساده است. SIR می‌تواند منجر به تخمین بیش از حد زیست‌توده میکروبی در یک خاک آلوده شود زیرا بخشی از میکروفلور خاک در فاز خواب^۱ است و در صورت حضور سوبسترای همچون گلوکز مجدداً فعال می‌شوند. تنفس SIR، وضعیت فیزیولوژیکی

^۲ Principal Component Analysis

^۱ Dormant State

نمودار و جدول در زیر گزارش شده است. براساس نتایج PCA تقریباً ۷۳ درصد از واریانس تراکمی توسط دو مؤلفه اول (F_1 و F_2) توجیه می‌شود (جدول ۵). در این پژوهش مقادیر ویژه بزرگ‌تر از ۱ در نظر گرفته شد و دو مؤلفه اول دارای مقدار ویژه بالاتر از ۱ بودند. نتایج تحلیل مؤلفه‌های اصلی نشان داد که ۱۰ مؤلفه می‌توانند واریانس کل نمونه‌های خاک مورد بررسی را توجیه کنند و همان‌طور که در جدول ۵ مشاهده می‌شود، مؤلفه اول (F_1) ۵۷/۴۳۹ درصد از واریانس کل را توجیه کرد. درصد واریانس تراکمی دو مؤلفه اول ۷۲/۲۷۴ درصد بود و به همین ترتیب برای سایر مؤلفه‌ها نیز در همین جدول قابل مشاهده است.

در جدول ۶ متغیرهای مؤثر بر هر مؤلفه و مقادیر بردارهای ویژه هر متغیر نشان داده شده است و مشاهده می‌شود که هر مؤلفه شامل تعدادی متغیر با

ضرایب مختلف است و هر متغیری که دارای ضریب بالاتر از ۰/۵ باشد گزینش می‌شود (کاکس و همکاران ۲۰۰۳). برخی از این متغیرها دارای ضریب منفی و برخی دارای ضریب مثبت هستند. علامت منفی به معنی رابطه معکوس بین این متغیر با سایر متغیرهای مؤلفه است و هرچه مقدار متغیری که ضریب منفی دارد افزایش یابد، تأثیرپذیری و اختلاف بین نمونه‌های خاک از مناطق مختلف نمونه‌برداری بر اثر آن متغیر کاهش می‌یابد. علامت مثبت نشان می‌دهد که با افزایش مقدار متغیری که ضریب مثبت دارد، تأثیرپذیری و اختلاف بین نمونه‌های خاک از مناطق مختلف نمونه‌برداری بر اثر آن متغیر بیشتر می‌شود. تأثیرپذیری زیاد یعنی اختلاف بیشتر بین مقادیر متغیرها در خاک‌های مختلف که بیانگر تفاوت بین مناطق مختلف نمونه‌برداری است (شکل ۷).

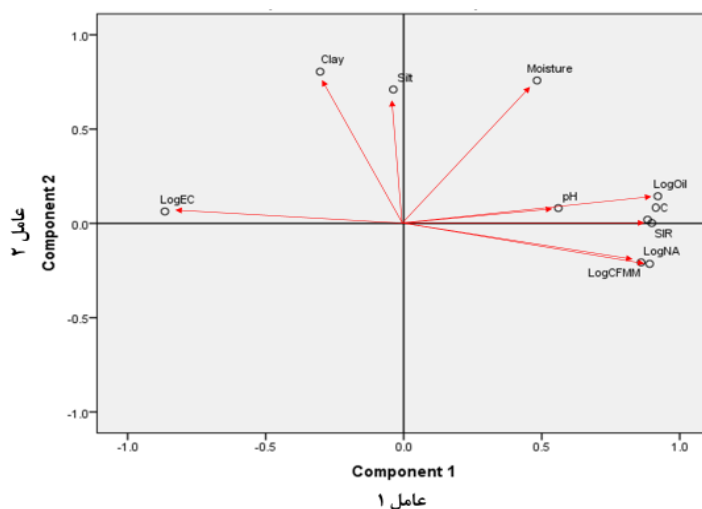
جدول ۵- تجزیه به مؤلفه اصلی برای نمونه خاک‌های ۴ منطقه نمونه‌برداری.

مؤلفه‌ها	درصد واریانس تراکمی	درصد واریانس
F1	۵۷/۴۳۹	۵۷/۴۳۹
F2	۷۲/۲۷۴	۱۴/۸۳۵
F3	۸۱/۶۵۴	۹/۳۸۰
F4	۸۸/۰۸۳	۶/۴۲۹
F5	۹۲/۲۸۶	۴/۲۰۳
F6	۹۴/۹۹۱	۲/۷۰۵
F7	۹۶/۹۲۷	۱/۹۳۶
F8	۹۸/۵۷۱	۱/۶۴۴
F9	۹۹/۳۴۹	۰/۷۷۹
F10	۱۰۰	۰/۶۵۱

با حذف متغیرهای دارای ضریب کمتر از ۰/۵ (جدول ۶) ترکیبات خطی به دست آمده به صورت زیر بود (روابط ۵ و ۶):

$$PC2 = 0.846 \text{ Clay} + 0.674 \text{ Silt} + 0.775 \text{ } \Theta_m \text{ [۶]}$$

$$PC1 = 0.913 \text{ Oil} + 0.777 \text{ BR} + 0.895 \text{ SIR} + 0.914 \text{ NA} + 0.859 \text{ CFMM} + 0.581 \text{ pH} - 0.855 \text{ EC} + 0.867 \text{ OC [۵]}$$



شکل ۷- پراکنش پارامترهای مورد بررسی بر اساس دو مؤلفه اول و دوم در تحلیل مؤلفه‌های اصلی.

لذا می‌توان گفت با افزایش این متغیرها، اختلاف بین نمونه‌های خاک از ۴ منطقه مختلف نمونه‌برداری نیز افزایش می‌یابد. متغیرهای درصد رس (Clay)، درصد سیلت (Silt) و درصد رطوبت (Moisture, θ_m) نیز بالاترین تأثیر را در مؤلفه دوم داشتند (جدول ۶).

متغیرهایی که بیشترین تأثیر را در مؤلفه اول داشتند عبارتند از درصد نفت (Oil)، تنفس پایه (BR)، تنفس برانگیخته (SIR)، جمعیت میکروبی در محیط کشت NA و CFMM، میزان pH و EC و درصد کربن آلی (OC) که همه آنها به غیر از EC دارای ضرایب مثبت بوده و

جدول ۶- مقادیر بردارهای ویژه پارامترهای مورد بررسی در تجزیه مؤلفه‌های اصلی.

متغیرها	F1	F2
%Oil	۰/۹۱۳	۰/۱۷۰
BR	۰/۷۷۷	۰/۴۳۷
SIR	۰/۸۹۵	۰/۰۳۰
جمعیت میکروبی (NA)	۰/۹۱۴	-۰/۱۱۵
جمعیت میکروبی (CFMM)	۰/۸۵۹	-۰/۱۷۷
%Clay	-۰/۳۲۱	۰/۸۴۶
%Silt	-۰/۰۹۱	۰/۶۷۴
رطوبت (%)	۰/۴۵۴	۰/۷۷۵
pH	۰/۵۸۱	۰/۲۱۰
EC	-۰/۸۵۵	۰/۰۵۴
OC	۰/۸۶۷	۰/۰۰۸

ویژه رس و سیلت، می‌توان مؤلفه دوم را مؤلفه فیزیکی نامید. به عبارتی می‌توان گفت شاخص‌های بیوشیمیایی به ویژه درصد نفت و جمعیت میکروبی منبع اصلی تنوع

باتوجه به بالا بودن مقادیر بردارهای ویژه شاخص‌های زیستی و شیمیایی، می‌توان مؤلفه اول را مؤلفه بیوشیمیایی و همچنین با مشاهده مقدار بردار

در داده‌ها هستند. براون و همکاران (۲۰۰۱) برای تعیین روابط بین ویژگی‌های بیوشیمیایی در خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی، آنالیز مؤلفه‌های اصلی (PCA) را انجام دادند و نتایج آنها نشان داد که تنفس میکروبی به عنوان یکی از متغیرهای مهم و تأثیرگذار با بیشترین مقدار بردار ویژه بود. هرچه یک متغیر در نمودار بای

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش نمونه‌برداری از منطقه نفت‌شهر واقع در غرب استان کرمانشاه انجام شد. منطقه‌ای که از زمان‌های بسیار دور تحت تأثیر آلاینده‌های نفتی بوده است. به گونه‌ای که وجود نفت در این منطقه در سال ۱۲۸۰ هجری شمسی کشف شد. یعنی جوامع میکروبی سال‌های متمادی فرصت سازگاری با شرایط موجود را داشته‌اند. نتایج آزمایشات صورت گرفته در این پژوهش حاکی از افزایش جمعیت و تنفس میکروبی با افزایش شدت آلاینده نفتی بود. به نظر می‌رسد نتایج به دست آمده از مطالعات انجام شده در آلودگی‌های مصنوعی و آلودگی‌های طبیعی از نظر نوع پاسخ‌های زیستی تفاوت‌هایی داشته باشد. اغلب پژوهش‌های انجام شده در این زمینه، شرایط آلودگی مصنوعی و تأثیرات آلاینده‌های مختلف در طی زمان‌های مشخص و کوتاه مدت را مورد بررسی قرار داده‌اند. اما پژوهش حاضر تأثیرات آلاینده‌های نفتی در مکانی را ارزیابی می‌کند که مدت‌های طولانی تحت تأثیر نفت بوده‌است. در مطالعات

پلات (Bi-plot)، فاصله بیشتری از مرکز داشته باشد، تأثیرگذاری بیشتری در تحلیل دارد (شکل ۷). آنالیز مؤلفه‌های اصلی در مطالعات زیادی در خاک‌های آلوده به نفت انجام شد که در اغلب آنها درصد نفت به عنوان قوی‌ترین عامل تعیین‌کننده تنوع بین داده‌ها بود (ژیو و همکاران ۲۰۱۶؛ نای و همکاران ۲۰۰۹).

انجام شده در روزهای ابتدایی افزودن آلاینده، اغلب به جوامع میکروبی استرس نفتی وارد شده و ممکن است کمیت میکروبی، تنفس میکروبی، فعالیت‌های آنزیمی و سایر شاخص‌های زیستی کاهش یابد اما با گذشت زمان جوامع میکروبی خاک با شرایط آلودگی به تطابق رسیده و سازگار شده، بنابراین برخی فعالیت‌های میکروبی به ویژه تنفس میکروبی افزایش می‌یابد. به عبارت دیگر جوامع میکروبی خاک توانایی بهره‌گیری از نفت را به عنوان منبع کربن به دست آورده و بر کمیت تجزیه‌کننده‌های نفت افزوده می‌شود. نتایج آنالیزهای PCA نشان داد که شاخص‌های بیوشیمیایی به ویژه درصد نفت و جمعیت میکروبی، مؤثرترین عوامل در تفاوت بین نمونه‌ها بود. همانطور که می‌دانیم، ریزجانداران از عوامل مهم تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های نفتی در محیط‌های آلوده هستند که عملکرد آنها تحت تأثیر شرایط محیطی است.

منابع مورد استفاده

- Abed RM and Al-Kindi S, 2017. Effect of disturbance by oil pollution on the diversity and activity of bacterial communities in biological soil crusts from the Sultanate of Oman. *Applied Soil Ecology* 110: 88-96.
- Anderson JP and Domsch KH, 1973. Quantification of bacterial and fungal contributions to soil respiration. *Archives of Microbiology* 93: 113-127.
- Brohon B, Delolme C and Gourdon R, 2001. Complementarity of bioassays and microbial activity measurements for the evaluation of hydrocarbon-contaminated soils quality. *Soil Biology and Biochemistry* 33(7-8): 883-891.

- Christopher SH, Marsden PJ and Sharleff AS, 1988. Evaluation of methods 3540 (Soxhlet) and 3550 (Sonication) for evaluation of appendix IX analyses from solid samples. S-CUBED, Report for EPA contract: 68-03.
- Cox JF, Blackstone JH and Schleier JG, 2003. Managing Operations: A Focus on Excellence. North River Press, Great Barrington, MA.
- Dawson JJC, Godsiffe EJ, Thompson IP, Ralebitso-Senior TK, Killham KS and Paton GI, 2007. Application of biological indicators to assess recovery of hydrocarbon impacted soils. *Soil Biology and Biochemistry* 39(1): 164-177.
- Dos Santos HF, Cury JC, Do Carmo FL, Dos Santos AL, Tiedje J, Van Elsas JD, Rosado AS and Peixoto RS, 2011. Mangrove bacterial diversity and the impact of oil contamination revealed by pyrosequencing: bacterial proxies for oil pollution. *PLoS One* 6:e16943.
- Ebrahimi M, Falah M and Sarikhani MR, 2013. Isolation and identification of some bacteria that decompose petroleum substances from soil contaminated with petroleum substances and checking their growth ability in the presence of gasoline. *Water and Soil Science* 3(1): 109-121. (In Persian with English abstract).
- Ebrahimi M, Sarikhani MR, Safari Sinegani AA, Ahmadi A and Keesstra S, 2019. Estimating the soil respiration under different land uses using artificial neural network and linear regression models. *Catena* 174: 371-382.
- Hui LI, Zhang Y, Kravchenko I, Hui XU and Zhang CG, 2007. Dynamic changes in microbial activity and community structure during biodegradation of petroleum compounds: a laboratory experiment. *Journal of Environmental Sciences* 19(8): 1003-1013.
- Jiao S, Liu Z, Lin Y, Yang J, Chen W and Wei G, 2016. Bacterial communities in oil contaminated soils: Biogeography and co-occurrence patterns. *Soil Biology and Biochemistry* 98: 64-73.
- Kroening SJ and Greenfield LG, 2002. Effects of diesel oil contamination on soil microorganisms. *New Zealand Natural Sciences* 27: 59-67.
- Lee S, Oh B and Kim J, 2008. Effect of various amendments on heavy mineral oil bioremediation and soil microbial activity. *Bioresource Technology* 99: 2578-2587.
- Liang Y, Zhang X, Zhou J and Li G, 2015. Long-term oil contamination increases deterministic assembly processes in soil microbes. *Ecological Applications* 25(5): 1235-1243.
- Liao J, Wang J, Jiang D, Wang MC and Huang Y, 2015. Long-term oil contamination causes similar changes in microbial communities of two distinct soils. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99(23): 10299-10310.
- Lindstrom JE, Barry RP and Braddock JF, 1999. Long-term effects on microbial communities after a subarctic oil spill. *Soil Biology and Biochemistry* 31(12): 1677-1689.
- Margesin R, Hammerle M and Tscherko D, 2007. Microbial activity and community composition during bioremediation of diesel-oil contaminated soil: effects of hydrocarbon concentration, fertilizers, and incubation time. *Microbial Ecology* 53:259-269
- Martens R, 1995. Current methods for measuring microbial biomass C in soil: potentials and limitations. *Biology and Fertility of Soils* 19(2): 87-99.
- Martin AE and Reeve R, 1955. A rapid manometric method for determining soil carbonate. *Soil Science* 79: 187-197.
- Moreno B, Nogales R, Macci C, Masciandaro G and Benitez E, 2011. Microbial eco-physiological profiles to estimate the biological restoration of a trichloroethylene-contaminated soil. *Ecological Indicators* 11(6): 1563-1571.
- Nie M, Zhang XD, Wang JQ, Jiang LF, Yang J, Quan ZX., Cui XH, Fang CM and Li B, 2009. Rhizosphere effects on soil bacterial abundance and diversity in the Yellow River Deltaic ecosystem as influenced by petroleum contamination and soil salinization. *Soil Biology and Biochemistry* 41(12): 2535-2542.
- Norouzpour M, Sarikhani MR and Aliasgharzad N, 2023. Monitoring of soil respiration changes in a heavy naphtha-contaminated sandy loam soil under different bioremediation treatments. *Water and Soil Science*. (In Persian with English abstract).
- Nseabasi NO and Antai SP, 2012. Effects of long-term kerosene spillage on heterotrophic microorganisms in soil from Niger Delta, Southern Nigeria. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management* 16(2): 195-199.

- Pessacq J, Medina R, Terada C, Bianchini FE, Morelli IS and Del Panno MT, 2015. Assessment of the responsiveness to different stresses of the microbial community from long-term hydrocarbon-contaminated soils. *Water, Air, & Soil Pollution* 226(2): 1-13.
- Phillips LA, Greer CW, Farrell RE and Germida JJ, 2009. Field-scale assessment of weathered hydrocarbon degradation by mixed and single plant treatments. *Applied Soil Ecology* 42(1): 9-17.
- Rowell DL, 1994. *Soil Science: Methods and Applications*. Longman, UK.
- Schinner F, Öhlinger R, Kandeler E and Margesin R, 2012. *Methods in Soil Biology*. Springer Science & Business Media.
- Van Der Gast CJ, Whiteley AS and Thompson IP, 2004. Temporal dynamics and degradation activity of an bacterial inoculum for treating waste metal-working fluid. *Environmental Microbiology* 6(3): 254-263.
- Vincent AO, Felix E, Weltime MO, Ize-iyamu OK and Daniel EE, 2011. Microbial degradation and its kinetics on crude oil polluted soil. *Research Journal of Chemical Sciences* 1(6): 8-14.