Water and Soil Science, Vol.34, NO.1, Spring2024, pp. 217-233.
DOI: 10.22034/ws.2021.48553.2448 ISSN:2717-2365 https://water-soil.tabrizu.ac.ir/

Research Article

Monitoring of Soil Enzyme Activity Changes in a Heavy Naphtha-Contaminated Soil under Different Bioremediation Treatments

M Norozpour[1], M Reza Sarikhani[*2], N Aliasgharzad[3]

Received: November 1, 2021 Accepted January 29, 2023
Revised: June 12, 2022 Published online: March 20, 2024

1-Former MSc. Student of Soil Biology and Biotechnology, Dept. of Soil Science and Engineering, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran.
2-Assoc. Prof. of Soil Biology and Biotechnology, Dept. of Soil Science and Engineering, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran.
3-Prof. of Soil biology and Biotechnology, Dept. of Soil Science and Engineering, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran.
* Corresponding Author, E-mail: rsarikhani@yahoo.com

Abstract

Background and Objectives

Oil contamination can be treated by physical, chemical and biological approaches. The first two methods have limitations such as high costs, inefficacy and altering natural ecosystem. Today, biological treatment is a more interesting process to remove petroleum contamination. Bioremediation is a technique in which biological systems such as microorganisms are applied to degrade or transform harmful chemicals. In recent years, employing hydrocarbon degrading bacteria to cleaning a petroleum contaminated soil has become a prevalent, efficient and cost-effective technique that converts toxic wastes to non-toxic end products. Soil contamination with oil compounds such as heavy naphtha can threaten soil, environmental and human health. In bioremediation process, soil microorganisms use these hydrocarbons as a carbon source and, while making a microbial biomass, play a role in its decomposition and conversion to carbon dioxide. Furthermore, this type of contamination can affect soil microbial population and its enzyme activity. Soil microbiome, in turn, has effect on this contamination using relevant enzymes. Application and comparison of various bioremediation methods such as biostimulation, bioaugmentation and integrated treatment were the main aims of this study to bio-remove heavy naphtha from contaminated soil. Moreover, mmonitoring of soil enzyme activity changes (including dehydrogenase and lipase) in this condition under different bioremediation treatments was another goal of this research. For this purpose, in a heavy naphtha-contaminated sandy loam, a variety of bioremediation treatments, including biostimulation (including supply of nitrogen and phosphorus elements, addition of manure and Tween 80), bioaugmentation treatment (using a consortium of efficient bacteria) and integrated treatment (including all biostimulation and bioaugmentation treatments together) were tested.

Methodology

In this study, a sandy loam soil was used. Heavy naphtha was applied at a rate of 7% V/W to soil samples and various bioremediation treatments were performed as mentioned above. This experiment was carried out in a pot scale (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. During the experiment, the pots were aerated once a week and the soil moisture content was adjusted to 70-80% (W/W) of the soil water holding

©: The Author(S)
Publisher: University of Tabriz

capacity twice a week. For bioaugmentation of bacterial isolates, a bacterial suspension (10^8 cfu mL^{-1}) having a consortium of *Arthrobacter* sp. COD2-3, *Stenotrophomonas nitritireducens* COD5-6 ، *Stenotrophomonas asidamainiphila* COD1-1 with a ratio of 5% V/W were used. In biostimulation treatment, cow manure with 5% W/W was used. In NP treatment, N and P elements from ammonium nitrate and potassium phosphate (K_2HPO_4), were used with a ratio of 20:5:1 (C: N: P), considering soil organic carbon. Tween 80 as surfactant in the relevant treatments, was used at a rate of 0.3% V/W. In the integrated treatment, all the mentioned treatments were used together. 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.

Findings

The results showed that during the experiment, bioremediation treatments reduced heavy naphtha contamination and the highest value for removal rate of this compound was 81% in the integrated treatment. Contamination also affected the enzymatic activity of soil so that the activity of dehydrogenase and lipase in all bioremediation treatments showed a decreasing trend. Dehydrogenase enzyme activity in cow manure treatment decreased from 1.67 to 0.59 (μg TPF g^{-1} h^{-1}) and activity of soil lipase enzyme decreased from 33.82 to 26.24 (mU g^{-1}) in the integrated treatment during the experiment. Among the bioremediation treatments, cow manure and integrated treatment had a greater effect on the elimination of heavy naphtha contamination than other treatments (p <0.01). It seems that the use of the above treatments were able to remove more heavy naphtha by providing optimal nutritional, moisture and aeration conditions while intensifying the activity of soil microorganisms.

Conclusion

In this study, to reduce heavy naphtha contamination in the soil, bioremediation treatments including biostimulation, bioaugmentation and integrated approaches were used. According to the results of changes in dehydrogenase and lipase activity in naphtha-contaminated soil, each treatment was able to reduce contamination individually, while the integrated treatment was both biostimulatory and bioenhancing treatments. However, in the integrated treatment, the efficiency of bioremediation process was higher, due to the simultaneous use of biostimulation and bioaugmentation treatments. The use of integrated treatment in soils contaminated with petroleum compounds, including heavy naphtha, can help to biologically eliminate these contaminants.

Keywords: Bioaugmentation, Bioremediation, Biostimulation, Dehydrogenase**,** Heavy naphtha, Lipase**,** Surfactant.

نشریه دانش آب و خاک / جلد ۳۴ شماره ۱ صفحه‌های ۲۱۷ تا ۲۳۳/ سال ۱۴۰۳

مقاله پژوهشی

پایش تغییرات فعالیت آنزیمی خاک آلوده به نفتای سنگین در تیمارهای مختلف زیست‌پالایی

مریم نوروزپور[1]، محمدرضا ساریخانی*[2]، ناصر علی‌اصغرزاد[3]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۰۹
تاریخ ویرایش:۱۴۰۱/۰۳/۲۲ تاریخ انتشار انلاین :۱۴۰۳/۰۱/۰۱

۱-دانشجوی سابق کارشناسی ارشد 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-استاد بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، گروه علوم و مهندسی خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: rsarikhani@yahoo.com

چکیده

برای آگاهی از وضعیت آلودگی خاک به ترکیبات نفتی و پایش تغییرات آن، استفاده و سنجش فعالیت آنزیمی یکی از روشهای مورد توجه است. برای مدیریت آلودگی به شیوه زیست‌پالایی می‌توان از تیمارهای تحریک زیستی، تلقیح زیستی یا تلفیق این دو استفاده نمود. بدین منظور برای کاهش آلودگی نفتای سنگین (۷٪) در یک خاک لوم‌شنی آلوده، انواع تیمارهای زیست‌پالایی در قالب شیوه‌های فوق (شامل تامین عناصر NP، افزودن کود دامی و سورفاکتانت Tween 80، تلقیح زیستی و تیمار تلفیقی) مورد آزمایش قرار گرفت. بعد از اجرای آزمایش در زمان‌های مختلف (۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ روز)، فعالیت دهیدروژناز (DHA)[1] و لیپاز اندازه‌گیری شد. آزمایش به صورت فاکتوریل اسپلیت پلات (شامل فاکتور آلودگی، زیست‌پالایی و زمان) با در نظر گرفتن ۳ تکرار در گلدان‌های ۳ کیلوگرمی انجام شد. نتایج نشان داد، تیمارهای زیست‌پالایی باعث کاهش آلودگی نفتای سنگین شدند و بیشترین مقدار حذف این ماده به میزان ۸۱٪ در تیمار تلفیقی به دست آمد. همچنین آلودگی، فعالیت آنزیمی خاک را تحت تأثیر قرار داد به طوری که فعالیت دهیدروژناز و لیپاز در همه تیمارهای زیست‌پالایی روند کاهشی داشت. فعالیت دهیدروژناز در تیمار کود گاوی در طول آزمایش از ۱/۶۷ به ۰/۵۹ ($\mu g\ TPF\ g^{-1}\ h^{-1}$) و فعالیت لیپاز در تیمار تلفیقی از ۳۳/۸۲ به ۲۶/۲۴ ($mU\ g^{-1}$) کاهش یافت. از میان تیمارهای زیست‌پالایی، بیشترین تاثیر در حذف آلودگی نفتای سنگین به ترتیب با مقادیر ۸۱ و ۷۲ درصد مربوط به تیمار کود گاوی و تیمار تلفیقی بود. بکارگیری تیمارهای فوق با فراهم‌سازی شرایط بهینه غذائی، رطوبتی و تهویه‌ای ضمن تشدید فعالیت میکروارگانیسم‌های بومی خاک قادر به حذف بیشتر نفتای سنگین بودند.

واژه‌های کلیدی: تحریک‌زیستی، تلقیح‌زیستی، دهیدروژناز، زیست‌پالایی، سورفاکتانت، لیپاز، نفتای سنگین.

[1] Dehydrogenase activity

مقدمه

آلودگی خاک به آلاینده‌های آلی (هیدروکربن‌های نفتی، آفت‌کش‌ها، کلروفنول‌ها) و معدنی (فلزات سنگین) ناشی از فعالیت‌های صنعتی و کشاورزی نگرانی‌های جدی در سال‌های اخیر ایجاد کرده است (یو و همکاران ۲۰۱۱). در این میان، آلودگی ناشی از ترکیبات نفتی مورد توجه هستند. ترکیبات نفتا (نفتای سبک و سنگین) از جمله ترکیبات نفتی است که شیوع آلودگیهای آن می‌تواند مخاطراتی را برای محیط به دنبال داشته باشد. نفتا به گروهی از سوخت‌های مایع هیدروکربنی با فراریت و اشتعال‌پذیری بالا گفته می‌شود که در برج تقطیر پالایش نفت خام بین گازهای سبک و نفت سفید قرار می‌گیرد. این سوخت مایع از قطران زغال سنگ نیز قابل استحصال است. نفتا به طور دقیق شامل هیدروکربن‌های دارای ۵ تا ۱۲ اتم کربن می‌شود که نقطه جوش آنها از ۳۰ تا ۲۰۰ درجه سلسیوس متغیر است (بال و همکاران ۱۹٤۹). این ماده کاربردهای متنوعی در صنایع شیمیایی و پتروشیمی دارد و در تهیه حلال‌ها و رقیق‌کننده‌ها، مواد اولیه انواع پلاستیک، الیاف مصنوعی، الکل‌های صنعتی و برای تولید مواد شوینده و تینرهای رنگرزی استفاده می‌شود (آلتجلت و بودوزینسکی ۱۹۹۳).

برای پاکسازی محل‌های آلوده به ترکیبات نفتی انواع متنوعی از روش‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی ارائه شده‌است (ابراهیمی و همکاران ۲۰۰۹). دو روش اصلی برای زیست‌پالایی آلودگی‌های نفتی وجود دارد که شامل تحریک زیستی و تلقیح زیستی می‌باشد. تحریک زیستی (شامل افزودن رطوبت، بهبود تهویه، افزودن عناصر غذایی، استفاده از کودهای دامی و آلی، افزودن سورفکتانتها و ...) به عنوان بهترین گزینه برای سرعت بخشیدن اصلاح خاک در نظر گرفته شده‌است، در حالی که تلقیح زیستی (با بکارگیری سویه میکروبی کارآمد یا مخلوطی از سویه‌های میکروبی موثر به صورت کنسرسیوم میکروبی) به عنوان مناسب‌ترین راهبرد برای بازیابی خاک‌های فقیر از نظر جوامع میکروبی برای تجزیه هیدروکربنهای نفتی شناخته شده‌است (کوپوسامی و همکاران ۲۰۱۷). زیست‌پالایی موفق بستگی به شرایطی نظیر نوع خاک، جمعیت، تنوع و فعالیت میکروبی، نسبت مناسب عناصر غذایی (به خصوص N و P)، رطوبت، دما، pH و در دسترس بودن اکسیژن دارد (ورجانی و همکاران ۲۰۱۷). به همین خاطر در روش‌های مختلف زیست‌پالایی سعی می‌شود با اتخاذ تدابیری توازنی بین این پارامترها برقرار نمود و حذف آلودگیهای نفتی را به میران بیشتری پیش برد.

آنزیم‌ها نقش مهمی در چرخه عناصر غذایی و تخریب انواع مواد آلی شامل آلاینده‌های آلی بازی می‌کنند و می‌توانند به عنوان شاخص‌های حساس به آلودگی در محیط زیست از جمله خاک استفاده شوند (ویو و همکاران ۲۰۱٦). فعالیت آنزیمی یک شاخص حساس به تغییرات شرایط خاک هست که برای ارزیابی و پایش فرآیند زیست‌پالایی همواره مورد استفاده قرار می‌گیرند. آنزیم‌ها برای تشخیص و تعیین کیفیت محیط زیست قبل، حین و بعد از فرآیند بازسازی استفاده می‌شود. آنزیم‌های خاک هم از آلودگی تاثیر می‌پذیرند و هم بر آلودگی اثرگذارند. به عنوان نمونه غلظت بالای آلاینده می‌تواند باعث مرگ سلولهای حساس میکروبی شود و طبیعتاً فعالیت دِهیدروژنازی اندکی از خاک در این شرایط سنجیده شود. یا پیشامد این آلودگی منجر به بیان ژنهای خاص و تولید آنزیم‌های القایی در گروه میکروبهای مقاوم به این شرایط شود و آنزیمی نظیر لیپاز به منظور حذف بیشتر ترکیبات نفتی تولید و سنجش شود (ویو و همکاران ۲۰۱٦). دهیدروژناز یک آنزیم اختصاصی درون‌سلولی است که به عنوان شاخص برای پایش فعالیت عمومی میکروبی مورد استفاده قرار می‌گیرد (راماداس و همکاران ۲۰۱۵). برای مثال، از بین آنزیم‌های مورد بررسی، دهیدروژناز

بهترین حساسیت را برای کل هیدروکربن‌های نفتی (TPH[1]) نشان داده است و رابطه نزدیکی با عملکرد ترکیبات هیدروکربن‌ها دارد (سیلوا-کاسترو و همکاران ۲۰۱۵). غلظت TPH عمدتاً مسئول تغییر فعالیت آنزیمی است. مکانیسم تجزیه هیدروکربن‌های نفتی شامل واکنش‌های متابولیکی می‌باشد که توسط انواع آنزیم‌ها کاتالیز می‌شود و فعالیت‌های آنزیمی مثل اکسیژناز، ریداکتاز، هیدروکسیلاز و دهیدروژناز نقش مهمی در تجزیه آن دارند (ورجانی و یوپاسانی ۲۰۱۷).

لیپاز آنزیمی است که توانایی هیدرولیز تری‌آسیل گلیسرول را به اسیدهای چرب آزاد و گلیسرول دارد. لیپازها از قارچ‌ها، مخمرها، باکتری‌ها و منابع گیاهی و جانوری جداسازی و خالص‌سازی می‌شود (جوسف و همکاران ۲۰۰۸). بیشتر لیپازهای مورد مطالعه که منشأ میکروبی دارند آنزیم‌های برون‌سلولی القایی هستند که در سلول‌های میکروبی سنتز شده و سپس به محیط اطراف منتقل می‌شود (تان و یان ۲۰۰۳). لیپاز نقش مهمی در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی بازی می‌کند. با توجه به سادگی و سرعت تحلیل آن، فعالیت لیپاز به عنوان یک شاخص عالی برای پایش آلودگی هیدروکربن‌های آلوده خاک نشان داده‌شده‌است (ریفالدی و همکاران ۲۰۰۶).

با توجه به رخداد آلودگیهای نفتی، از جمله آلودگی نفتای سنگین و نبود مطالعاتی در این زمینه، در این پژوهش سعی برآن شد که برای کاهش آلودگی نفتای سنگین از روش‌های مختلف زیست‌پالایی از جمله 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 شود. هدف این تحقیق مقایسه تیمارها با یکدیگر از نظر روند تغییرات فعالیت آنزیمی خاک (لیپاز و دِهیدروژناز) در خاک آلوده و غیرآلوده و همچنین در شرایط اعمال و عدم اعمال تیمارهای زیست‌پالایی می‌باشد. انتظار می‌رود پس از اجرای آزمایش، تیمارها باعث افزایش زیست‌پالایی خاک‌های آلوده به نفتای سنگین شده و مقدار اندکی از آن در خاک باقی‌مانده باشد. انتظار بر آن است که استفاده از Tween 80 به فراهمی زیستی هیدروکربن‌های نفتی و نهایتاً تشدید زیست‌پالایی کمک نماید. به‌کارگیری کود دامی و افزودن عناصر غذایی نیتروژن و فسفر در قالب تیمار (NP) به تحریک زیستی کمک نموده و باعث حذف بیشتر نفتای سنگین شود. همچنین استفاده از باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت در قالب تیمار تلقیح زیستی باعث افزایش زیست‌پالایی خاک‌های آلوده شود و در این میان تیمار تلفیقی که شامل بکارگیری تمام تیمارهای فوق‌الذکر است بیشترین اثر را در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی داشته باشد.

مواد و روش

آماده‌سازی خاک و اعمال تیمارهای زیست‌پالایی

در این آزمایش از یک خاک کشاورزی با بافت لوم‌شنی از ایستگاه تحقیقاتی خلعت‌پوشان دانشگاه تبریز نمونه برداری شده است، که از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شد (جدول ۱). این خاک از نظر رده‌بندی خاک FAO جزو Hypocalcic Calsisols و از نظر تاکسونومی خاک آمریکا Typic Haplocalcids می‌باشد. سپس آلودگی نفتای سنگین به میزان ۷٪ حجمی-وزنی به نمونه خاک‌ها اضافه و تیمارهای مختلف زیست‌پالایی اجرا گردید. این آزمایش در مقیاس گلدانی (گلدانهای ۳ کیلوگرمی) در شرایط دمای معمولی اتاق (۲۵ C°) و به مدت ۱۲۰ روز، بعد از ایجاد آلودگی و اعمال تیمارهای تحریک‌زیستی، تلقیح‌زیستی و تلفیقی انجام شد. در طول آزمایش، هفته‌ای یک بار 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

[1] Total Petroleum Hydrocarbons

هر گلدان نمونه‌برداری به منظور اندازه‌گیری فعالیت دهیدروژناز و لیپاز صورت گرفت.

جدول ۱: نتایج تجزیه فیزیکی و شیمیایی خاک مورد آزمایش (ساریخانی و همکاران ۲۰۱۹).

pH گل اشباع	EC_e ($dS\ m^{-1}$)	فسفر قابل جذب* ($mg\ kg^{-1}$)	پتاسیم قابل جذب** ($mg\ kg^{-1}$)	درصد کربن آلی	رس (درصد)	سیلت (درصد)	شن (درصد)	بافت	آهک (درصد کربنات کلسیم معادل)	رطوبت ظرفیت مزرعه (درصد وزنی)
۷/۵۶	۱/۹	۳	۱۹۸	۰/۱۷	۱۸	۱۳	۶۹	لوم‌شنی	۲/۸۵	۱۲/۵۷

*، **: به ترتیب اندازه‌گیری شده به روش اولسن و استات آمونیوم یک نرمال

تلقیح زیستی و تحریک زیستی و تیمار تلفیقی

برای انجام تلقیح‌زیستی از جدایه‌های باکتریایی تجزیه‌کننده نفت (*Arthrobacter* sp. COD2-3، *Stenotrophomonas nitritireducens* COD5-6، *Stenotrophomonas asidamainiphila* COD1-1) استفاده شد (افشارنیا و همکاران ۲۰۲۲). جدایه‌های مورد استفاده در این آزمایش از بانک میکروبی گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه تبریز تهیه شدند. هر سه جدایه ابتدا به‌طور جداگانه در محیط کشت NB به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور در دمای ۲٦ درجه سلسیوس کشت داده شدند و پس از رسیدن به جمعیت مناسب (cfu mL^{-1} ۱۰^۸) به میزان ٪۵ حجمی-وزنی به خاکهای مورد آزمایش بر اساس چینش آزمایش تلقیح شدند. در تحریک زیستی، بعد از تهیه کود گاوی، کودها به مدت ٤ روز هوا خشک شد و سپس از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شد و با نسبت ۵٪ وزنی مورد استفاده قرار گرفت (افشارنیا و همکاران ۲۰۲۲). کود مورد استفاده به ترتیب دارای ۲٤/۹٦، ۱/۵۲ و ۰/۵ درصد کربن، نیتروژن و فسفر بود. در مورد تیمار NP که مربوط به تامین عناصر نیتروژن و فسفر بود با توجه به نسبت۱:۵:۲۰ (C:N:P)، جهت تامین عناصر نیتروژن و فسفر به ترتیب از منابع نیترات آمونیوم و فسفات پتاسیم استفاده شد (به عنوان نمونه درخاک آلوده با تیمار کود شیمیایی NP به ازای ۳ کیلوگرم خاک گلدان، ۰/۷۹ گرم کود از منبع فسفات پتاسیم و ۳/٤ گرم کود از منبع نیترات پتاسیم استفاده شد). همچنین جهت استفاده از سورفاکتانت Tween 80 در تیمارهای مربوطه از نسبت ۰/۳ درصد حجمی-وزنی استفاده شد (دشتی و همکاران، ۲۰۱۵). در تیمار تلفیقی مخلوطی از کنسرسیوم باکتریایی ۵ درصد حجمی-وزنی، کود گاوی ۵ درصد وزنی-وزنی، سورفاکتانت Tween 80 با ۰/۳ درصد حجمی-وزنی و کود شیمیایی NP استفاده شد.

اندازه‌گیری فعالیت دهیدروژناز

به منظور اندازه‌گیری فعالیت دِهیدروژناز از سوبسترای TTC[1] استفاده شد. بدین منظور ۱۰ گرم خاک به دو قسمت ۵ گرمی تقسیم و هر کدام 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 داده شده و هم‌زده شد. در لوله شاهد بر روی ۵ گرم خاک ۳/۵ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته و همانند لوله نمونه عمل شد. لوله‌ها به مدت ۲٤ 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 در نتیجه فعالیت دهیدروژناز، سوبسترای مورد استفاده تغییر رنگ یافته و قرمز رنگ یا صورتی تشکیل گردید، سپس مقدار جذب عصاره‌ها در طول موج ٤۸۵ نانومتر قرائت شد. میزان جذب

[1] Triphenyl Tetrazolium Chloride

مربوط به تولید تری‌فنیل‌فورمازان (TPF[1]) است که از تبدیل سوبسترای TTC حاصل می‌شود (علی‌اصغرزاد ۲۰۱۰).

اندازه‌گیری فعالیت لیپاز

برای تعیین فعالیت لیپاز در خاک، از Tween 20 به عنوان سوبسترا استفاده شد. بدین منظور، به ۱ گرم خاک در یک لوله آزمایش ۰/۲ میلی‌لیتر تولوئن، ۰/٦ میلی‌لیتر Tween 20، ۱/۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۲ میلی‌لیتر استات‌سدیم (۰/۲ مولار با pH=٦) اضافه و لوله آزمایش در ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۸ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. بعد از ۱۸ ساعت ۸ میلی‌لیتر اتانول اضافه شده، ۱۰ ثانیه ورتکس شده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور (rpm) سانتریفیوژ شد. روشناور به ارلن مایر منتقل شده و پس از افزودن ۲۰µl معرف فنل‌رد ٪۱ 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. اسید لاریک آزاد شده از روشناور با استفاده از منحنی کالیبراسیون محلول‌های استاندارد با غلظت‌های ۰، ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ میلی‌مول اسید لاریک بدست آمد. فعالیت آنزیم خالص از اختلاف بین داده‌های آزمایش با نمونه خاک و نمونه شاهد به دست آمد و به صورت $mU\ g^{-1}$ اسید لاریک آزاد شده در هر گرم خاک در هر دقیقه نشان داده شد. هر واحد آنزیم (U) بیانگر مقدار µmol ۱ اسید لاریک آزاد شده در هر دقیقه در دمای ۳۰ درجه سلسیوس می‌باشد (ساکای و همکاران ۲۰۰۲).

اندازه‌گیری میزان هیدروکربن‌های نفتی قبل و بعد از تیمارهای زیست‌پالایی

تعیین غلظت کل هیدروکربن‌های نفتی (TPH) بر اساس روش UNEP/IOC/IAEA سازمان محیط زیست آمریکا انجام شد. در این روش جهت تعیین غلظت کل هیدروکربن‌های نفتی خاک، ابتدا ۱۰ گرم از نمونه خاک خشک در عصاره‌گیر سوکسله[2] با ۲۵۰ میلی‌لیتر از دی‌کلرومتان به مدت ٤ ساعت مورد استخراج قرار گرفت. سپس ۷۲ ساعت در آون در ٦۰ درجه سلسیوس گذاشته شده و دی کلرومتان آن تبخیر شد و وزن ثانویه یادداشت شد. برای محاسبه درصد تجزیه زیستی TPH از رابطه ۱ استفاده شد (چریستوفر و همکاران ۱۹۸۸):

$$\%B = 100\ (W_1 - W_2)\ /W_1 \qquad [۱]$$

Bدرصد تجزیه زیستی TPH ، W_1 وزن اولیه و W_2 وزن ثانویه می‌باشد.

تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش به صورت طرح فاکتوریل اسپلیت‌پلات بر پایه طرح کاملاً تصادفی به اجرا درآمد، فاکتور زمان فاکتور اصلی و فاکتورهای آلاینده و تیمارهای زیست‌پالایی، فاکتورهای فرعی بودند. که در آن فاکتور زمان در ۱۰ سطح (۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ٤۵، ٦۰، ۹۰ و ۱۲۰ روز)، آلاینده در دو سطح (وجود و عدم وجود نفتای سنگین) و تیمارهای زیست‌پالایی در ٦ سطح (شامل خاک شاهد، کود شیمیایی NP، کود دامی و سورفاکتانت Tween 80، تلقیح زیستی و تیمار تلفیقی)، فاکتورهای سه گانه آزمایش بودند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ٪۱ ($P<0.01$) توسط نرم‌افزار آماری MSTATC و SPSS انجام شد.

نتایج و بحث

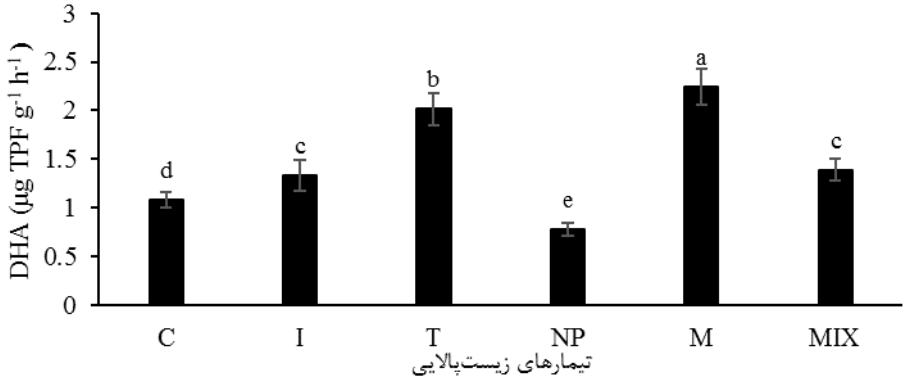
فعالیت دهیدروژناز

بر اساس نتایج تجزیه واریانس برای فعالیت دهیدروژناز، بین فاکتور آلودگی (خاک شاهد و خاک آلوده به نفتای سنگین)، فاکتور تیمارهای زیست پالایی

[1] Triphenyl formazan

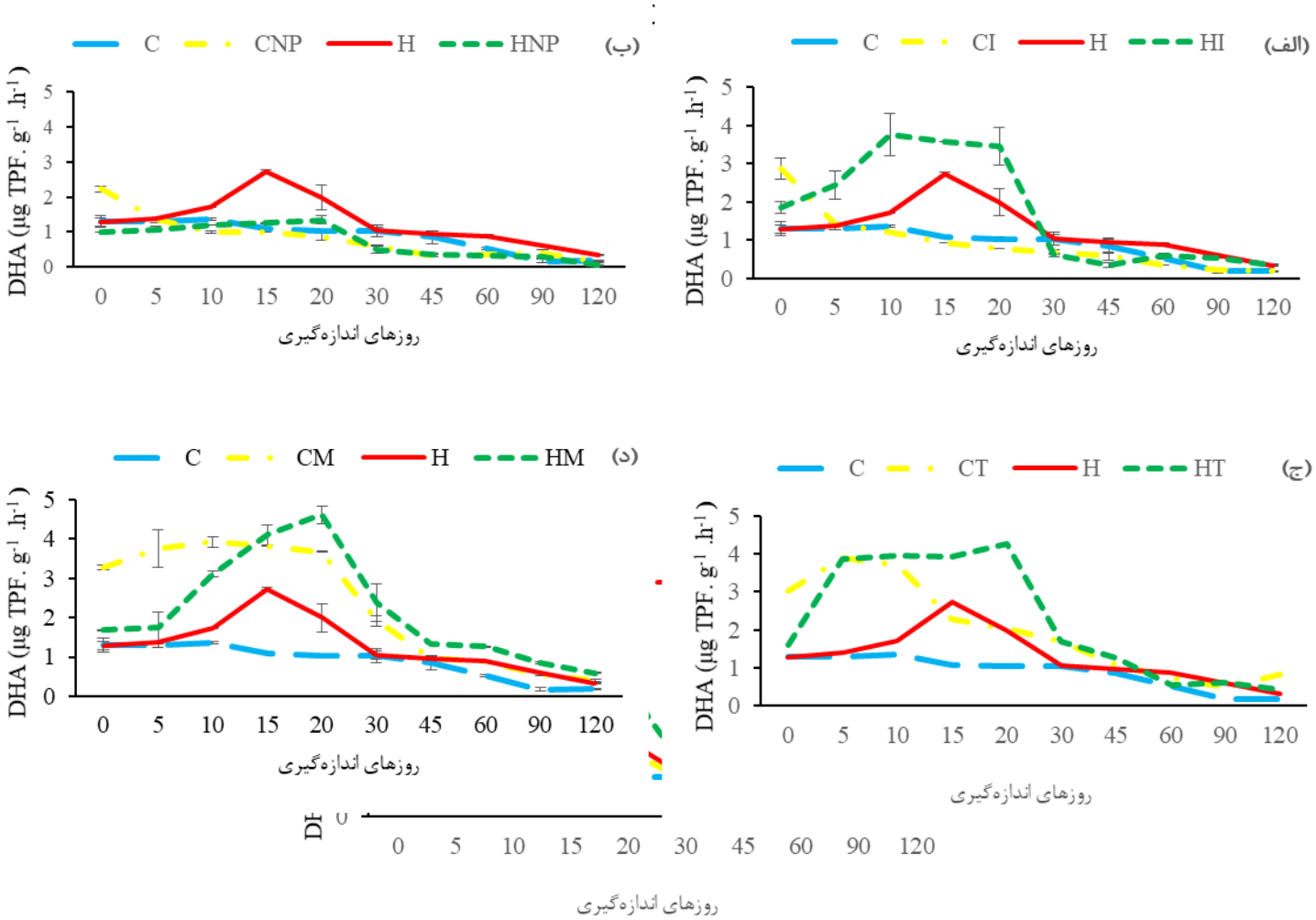
[2] Soxhlet

(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 ۱٪ ($P<0.01$) اختلاف معنی‌دار وجود داشت. فعالیت دهیدروژناز به ترتیب در تیمار کود گاوی (M)، سورفکتانت (T) Tween 80، تیمار تلقیح کنسرسیوم باکتریایی (I) و تیمار تلفیقی (MIX) بیشتر است و کمترین آن در تیمار کود شیمیایی NP (NP) و خاک شاهد (C) به دست آمد (شکل ۱). وجود میکروفلور بومی مستقر در نمونه کود دامی، همچنین مواد غذایی آلی و معدنی موجود در آن، و بهبود شرایط هوادهی خاک عواملی بوده‌اند که باعث شده است بیشترین فعالیت دهیدروژنازی در این تیمار به دست آید. تیمار سورفکتانت توین ۸۰ نیز به دلیل اثردوگانه خود یعنی مورد استفاده قرار گرفتن توسط جامعه میکروبی خاک و همچنین افزایش فراهمی هیدروکربن نفتی باعث تشدید فعالیت این آنزیم شده است. افزودن زادمایه میکروبی شامل کنسرسیوم میکروبی نیز به دلیل دارابودن جمعیت زنده باکتری باعث شده است تا فعالیت دِهیدروژنازی در این تیمار بعد از دو تیمار دیگر از نظر عددی بالا باشد هرچند با تیمار تلفیقی در یک گروه آماری قرار گرفتند. شاید بتوان گفت که افزودن کودهای شیمیایی نیتروژن و فسفر و نوع اعمال آنها به دلیل اثر تنشی باعث افت فعالیت دِهیدروژنازی خاک شده است، هرچند چنین انتظاری از این تیمار نمی‌رفت.



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)).

در بررسی روند تغییرات فعالیت این آنزیم (شکل ۲-الف)، در خاک آلوده تلقیح شده با کنسرسیوم باکتریایی (HI)، افزودن جمعیت زنده میکروبی خود باعث افزایش فعالیت دهیدروژناز شده است، زیرا این آنزیم درون سلولی مرتبط با سلولهای زنده میکروبی است. این افزایش در خاک غیرآلوده نیز فقط در زمانهای نخست دیده می‌شود و به نظر محدودیت غذایی باعث افت جمعیت و کاهش این آنزیم شده است. اما در خاک آلوده چون جدایه باکتریایی این منبع کربن را مورد استفاده 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 کاهش یافته است. از آنجایی که دهیدروژناز جزء آنزیم‌های اکسیدورودکتاز درون سلولی بوده و در زنجیره تنفس سلول میکروبی نقش ایفا می‌کند، شاخص مفیدی برای بیان شدت کل



شکل ۲- (الف): روند تغییرات زمانی فعالیت دهیدروژناز در خاک شاهد بدون آلودگی و بدون تیمار زیستپالایی (C)، خاک بدون آلودگی با تیمار NP (CNP)، خاک آلوده و بدون تیمار زیستپالایی (H)، خاک آلوده با تیمار کود شیمیایی NP (HNP). (ب): روند تغییرات زمانی فعالیت دهیدروژناز در خاک شاهد بدون آلودگی و بدون تیمار زیستپالایی (C)، خاک بدون آلودگی با تیمار NP (CNP)، خاک آلوده و بدون تیمار زیستپالایی (H)، خاک آلوده با تیمار کود شیمیایی NP (HNP). (ج): روند تغییرات زمانی فعالیت دهیدروژناز در خاک شاهد بدون آلودگی و بدون تیمار زیستپالایی (C)، خاک بدون آلودگی با تیمار Tween 80 (CT)، خاک آلوده بدون تیمار زیستپالایی (H)، خاک آلوده با تیمار Tween 80 (HT). (د): روند تغییرات زمانی فعالیت دهیدروژناز در خاک شاهد بدون آلودگی و بدون تیمار زیستپالایی (C)، خاک بدون آلودگی با تیمار کود گاوی (CM)، خاک آلوده بدون تیمار زیستپالایی (H)، خاک آلوده با تیمار کود گاوی (HM). (و): روند تغییرات زمانی فعالیت دهیدروژناز در خاک شاهد بدون آلودگی و بدون تیمار زیستپالایی (C)، خاک بدون آلودگی با تیمار تلفیقی (CMIX)، خاک آلوده بدون تیمار زیستپالایی (H)، خاک آلوده با تیمار تلفیقی (HMIX).

در ۴۰ روز سنجش و دریافتند که فعالیت دهیدروژناز با گذشت زمان افزایش چشمگیری داشت ولی بعد از گذشت ۳۲ روز این فعالیت کاهش یافت. در مطالعه‌ای پولیاک و همکاران (۲۰۱۸) اثرات زیستپالایی در تیماری با تلقیح کنسرسیوم باکتریایی تجاری بعلاوه عناصر غذایی (NPK) و در تیماری دیگر صرفاً تحریک زیستی با افزودن NPK در خاک آلوده به نفت را سه ماه بررسی کردند. آن‌ها در هفته نخست شاهد افزایش ناگهانی فعالیت دهیدروژناز در تیمار تلقیح زیستی و تحریک زیستی نسبت به خاک آلوده شاهد بودند و

تیمار تلقیحی به طور معنی‌دار در زمان نخست بیشتر از تحریک زیستی بود ولی با گذشت سه ماه فعالیت همه تیمارها بجز خاک غیرآلوده شاهد، کاهش شدیدی یافت. روند تغییرات فعالیت دهیدروژناز در تیمار کود شیمیایی NP در خاک آلوده (شکل ۲-ب)، در روزهای ابتدایی بیشتر بود، ولی با گذشت زمان فعالیت دهیدروژناز کاهش یافت. به نظر می‌رسد نسبت انتخابی، یا فرم عناصر افزوده شده و همچنین غلظت و شیوه اعمال تیمار NP در بروز پاسخی دور از انتظار تاثیرگذار بوده است. کمتر بودن فعالیت دهیدروژناز در خاک آلوده (HNP) و شاهد (CNP) را شاید بتوان در دلایل فوق جستجو نمود. مرگسین و همکارن (۲۰۰۰) در خاک آلوده به دیزل (۵۰۰۰ mg kg^{-1}) با استفاده از تیمار کود شیمیایی NPK در ۸۸ روز فعالیت دهیدروژناز را اندازه گیری کردند. نتایج نشان داد فعالیت دهیدروژناز در خاک بلافاصله بعد از آلودگی افزایش یافت اما با کاهش محتوای هیدروکربن‌ها فعالیت نیز کاهش یافت.

با توجه به شکل ۲-ج، افزایش فعالیت دهیدروژناز در خاک آلوده با تیمار Tween 80 (HT) در روزهای ابتدائی نشان‌دهنده این است که سورفکتانت Tween 80 به دلیل فراهمی زیستی که در خاک ایجاد می‌کند، میکروارگانیسم‌ها به راحتی منبع آلودگی را جذب می‌کنند و جمعیت میکروبی و فعالیت میکروبی افزایش می‌یابد. ولی با گذشت زمان به دلیل کاهش منبع آلودگی، جمعیت میکروبی کاهش می‌یابد و فعالیت دهیدروژناز کاهش می‌یابد. سورفکتانت‌ها با افزایش فراهمی هیدروکربن‌های نفتی می‌توانند منبع کربن را در اختیار جامعه میکروبی قرار دهند (چنگ و همکاران ۲۰۰۸). به نظر می‌رسد خود توبین که نوعی منبع کربن می باشد توسط جامعه میکروبی هم مورد استفاده واقع شده و اثرات تشدیدکننده آن در فعالیت دهیدروژناز انعکاس یافته است. تجزیه آلاینده‌های آلی در خاک اغلب به دلیل فراهمی زیستی دشوار است و اضافه کردن سورفکتانت در خاک می‌تواند فراهمی زیستی برخی از آلاینده‌های آلی را افزایش دهد. استفاده از توئین ۸۰ در هر دو غلظت ۰/۲ و ۱٪ به همراه آگروپایرون[1] و کود خوکی نه تنها هیچ تغییری در جمعیت میکروبی خاک وارد نکرده و برای آن‌ها سمی نبود بلکه باعث افزایش دسترسی PAH در مدت ٦٠ روزه گردید (چنگ و همکاران ۲۰۰۸). سورفکتانت غیریونی به ویژه توئین ۸۰ برای سرعت بخشیدن به میزان زیست‌پالایی برای افزایش فراهمی زیستی هیدروکربن‌ها استفاده شده‌است (لیو و همکاران ۲۰۱٦).

با توجه به شکل ۲-د، فعالیت دهیدروژناز در تیمار کود گاوی (HM)، در روزهای ابتدایی افزایش یافت و با گذشت زمان فعالیت دهیدروژناز کاهش یافت. وجود میکروارگانیسم‌های موجود در کود گاوی، همچنین دارا بودن منبع کربن و عناصر غذایی و کمک به بهبود شرایط فیزیکی نیز از جمله عواملی است که می‌تواند باعث افزایش فعالیت دهیدروژناز باشد. مضاف بر اینکه حضور این عوامل در کنار تسهیل استفاده از منبع کربن نفتای سنگین در خاک آلوده به نفتا باعث تشدید اثربخشی آن بر فعالیت دهیدروژناز شده است. لیی و همکاران (۲۰۰۸) در خاک آلوده به مواد نفتی سنگین (۷٤۹۰ mg kg^{-1}) تیمارهای عناصر غذایی (C:N:P) با نسبت ۱:۱۰:۱۰۰)، یونجه خرد شده (۱٪ وزنی-وزنی)، خاک اره (۵٪ وزنی-وزنی) و کمپوست کود خوک (۵٪ وزنی-وزنی) به مدت ۱۰۵ روز مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این محققان نشان داد که فعالیت دهیدروژناز در ۱۵ روز اول در همه تیمارها افزایش یافت و پس از آن به جزء تیمار کود خوک کاهش یافته است. افزایش فعالیت دهیدروژناز در روزهای اول با میزان تجزیه هیدروکربن به خوبی مطابقت دارد. نتایج نشان داد که

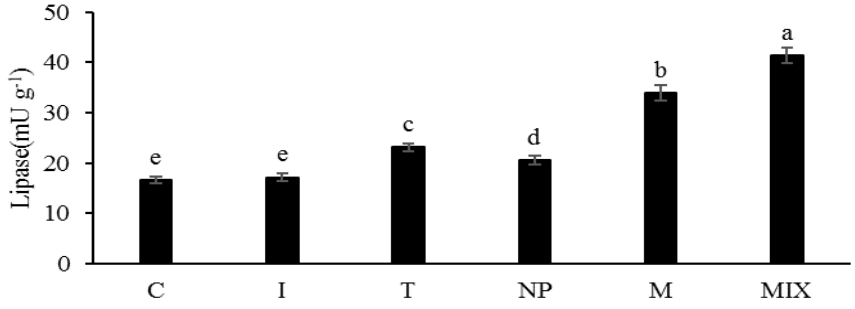
[1]Agropyron

فعالیت دهیدروژناز با تجزیه هیدروکربن‌ها همبستگی دارد (مرگسین و همکاران ۲۰۰۰).

فعالیت دهیدروژناز در تیمار تلفیقی (۲-و)، در روزهای ابتدایی افزایش یافت ولی با گذشت زمان فعالیت دهیدروژناز کاهش یافت. در خاک آلوده با تیمار تلفیقی (HMIX) به دلیل افزودن کنسرسیوم باکتریایی، سورفکتانت Tween 80، کود شیمیایی NP و کود گاوی، افزایش جمعیت میکروبی رخ داده و فعالیت دهیدروژنازی افزایش یافته است. فعالیت دهیدروژناز تابع فعالیت میکروبی می‌باشد، به نظر افزایش فعالیت دهیدروژناز در روزهای ابتدائی مربوط به افزایش جمعیت میکروبی در خاک می‌باشد و کاهش فعالیت دهیدروژناز به دلیل کاهش جمعیت میکروبی می‌باشد. حسن شاهیان و زیدآبادی نژاد (۲۰۱۷) طی بررسی جمعیت میکروبی و فعالیت دهیدروژناز در دو خاک مزرعه‌ای و بیابانی آلوده به نفت در فرایند زیست‌پالایی عنوان کردند فعالیت این آنزیم در تیمارهای زیست-پالایی در خاک مزرعه تا روز ٦٠ روند افزایشی ولی بعد از آن تا ۱۲۰ روز روند کاهشی داشته است و در خاک‌های بیابانی تا روز ۳۰، الگوی افزایشی و پس از آن تا انتهای آزمایش، کاهش در فعالیت دهیدروژناز مشاهده شد. در مطالعه‌ایی که افشارنیا و همکاران (۲۰۱۹) در خاک آلوده به نفت انجام دادند، مشاهده کردند همه تیمارهای زیست‌پالایی در هفته نخست دارای فعالیت دهیدروژناز بالایی اما پس از گذشت ٤ ماه، کاهش فعالیت چشمگیری داشتند.

فعالیت لیپاز

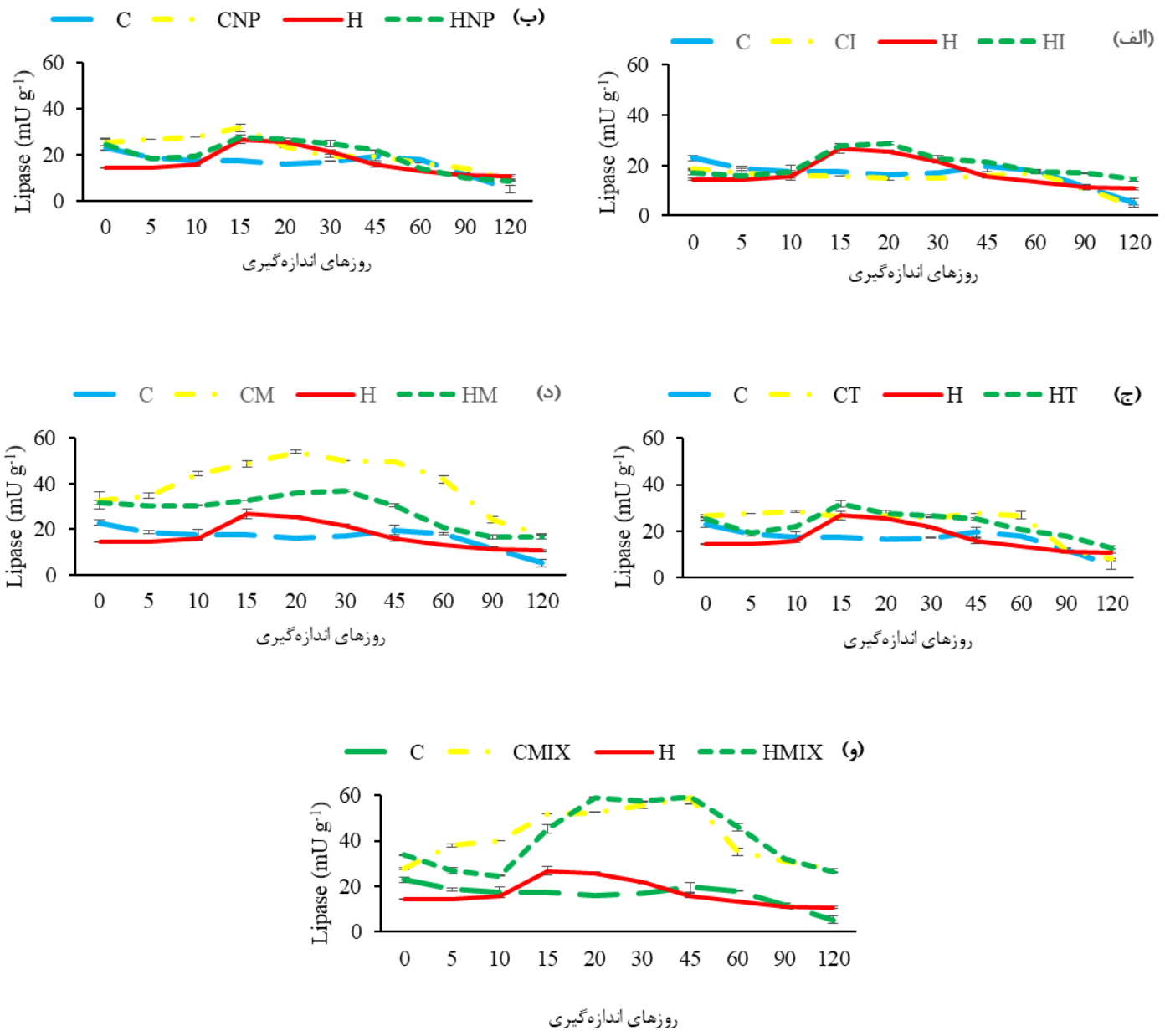
بر اساس نتایج تجزیه واریانس برای فعالیت لیپاز، بین فاکتور آلودگی (خاک شاهد و خاک آلوده به نفتای سنگین)، بین فاکتور تیمارهای زیست‌پالایی (خاک شاهد بدون تیمار زیست‌پالای، تلقیح کنسرسیوم باکتریایی، سورفکتانت Tween 80، کودهای شیمیایی NP، کود گاوی و تمیار تلفیقی) و بین فاکتور زمان (۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ٤٥، ٦٠، ۹۰ و ۱۲۰ روز) در سطح احتمال ۱٪ ($P<0.01$) اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. بالاترین فعالیت لیپازی به ترتیب در تیمار تلفیقی، کود گاوی و سورفکتانت Tween 80 می‌باشد (شکل ۳). آنزیم لیپاز یک آنزیم القایی و از نوع برون سلولی می‌باشد که در حضور هیدروکربنها نفتی، سلولهای میکروبی ترغیب به تولید آن خواهند شد. در این آزمایش مشاهده شد که در تیمارهایی که توین ۸۰ استفاده شده است (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) می‌باشد، فعالیت لیپازی بیشتری قرائت شد. به نظر استفاده از توین ۸۰ به دلیل تحریک تولید این آنزیم سبب افزایش فعالیت آن شده است. همچنین میکروفلور بومی موجود در کود دامی در مقایسه با باکتریهای مورد استفاده در کنسرسیوم میکروبی (تیمار تلقیح میکروبی) به نظر از نظر فعالیت پایه لیپازی شرایط بهتری داشته‌اند، شاید بهینه‌سازی شرایط دیگر نظیر تامین مواد کربنه موجود در کود دامی و همچنین بهبود تهویه در افزایش فعالیت لیپازی این تیمارها دخیل بوده است.



شکل ۳- فعالیت لیپازی 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)).

مقادیر فعالیت لیپازی اندازه‌گیری شده در تیمار کنسرسیوم باکتریایی (شکل ٤-الف)، تیمار کود شیمیایی (شکل ٤-ب)، Tween 80 (T) (شکل ٤-ج)، تیمار کود گاوی (شکل ٤-د) و تلفیقی (شکل ٤-و) در زمان‌های آزمایشی (۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ٤۵، ٦۰، ۹۰ و ۱۲۰ روز) از یک الگوی زنگوله‌ای تبعیت نموده است. فعالیت لیپازی با گذشت زمان افزایش ولی در روزهای پایانی کاهش یافت.

با توجه به شکل ٤-د، فعالیت لیپاز در خاک آلوده با تیمار کود گاوی (HM) از زمان صفر افزایش یافت و در ماه آخر کاهش یافت.در تیمار گود کاوی به دلیل وجود میکروفلور موجود در کود، به نظر حضور آنها باعث افزایش فعالیت لیپازی شده است، همچنین کود گاوی باعث بهبود خواص فیزیکی خاک و افزایش تهویه می‌شود. کود گاوی علاوه بر فراهم کردن مواد مغذی بر میکروارگانیسم‌ها بدلیل بهبود خواص فیزیک و شیمیایی خاک‌های آلوده باعث سازگاری سریع میکروب‌ها به خاک آلوده شده و نهایتاً منجر به افزایش فعالیت میکروبی و تجزیه بالای ترکیبات نفتی در خاک شده است (آگوموتو و همکاران ۲۰۱۳). لیی و همکاران (۲۰۰۸) در خاک آلوده به مواد نفتی سنگین ($mg\ kg^{-1}$) ۷٤۹۰) از تیمارهای عناصر غذایی (C:N:P با نسبت ۱:۱۰:۱۰۰)، یونجه خرد شده (۱٪ وزنی-وزنی)، خاک اره (۵٪ وزنی-وزنی) و کمپوست کود خوک (۵٪ وزنی-وزنی) استفاده کردند و در ۱۰۵ روز فعالیت لیپازی را اندازه‌گیری کردند. نتایج نشان داد که فعالیت لیپاز در طول آزمایش در ۳۰ روز افزایش یافت و بعد از ٤۵ روز در تمامی تیمارها کاهش یافت و بیشترین فعالیت را در یونجه خرد شده گزارش کردند. در خاک شاهد فعالیت لیپاز بدون تغییر در طول آزمایش بود. مرگسین و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کردند که فعالیت لیپازی ممکن است یک شاخص ارزشمند در تجزیه هیدروکربن‌ها باشد و فعالیت لیپاز همبستگی منفی با هیدروکربن‌های باقیمانده در خاک دارد یعنی فعالیت لیپازی بالا منجر به کاهش غلظت هیدروکربن خواهد شد.

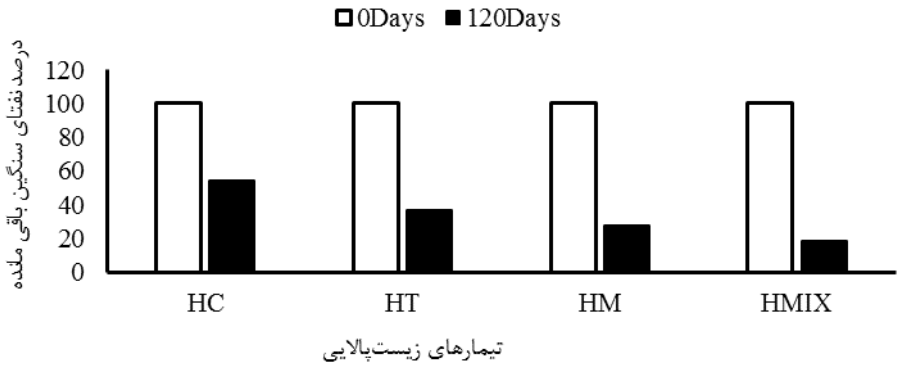


شکل ۴- (الف): روند تغییرات زمانی فعالیت لیپاز در خاک شاهد بدون آلودگی و بدون تیمار زیست‌پالایی (C)، خاک بدون آلودگی با تلقیح کنسرسیوم باکتریایی (CI)، خاک آلوده و بدون تیمار زیست‌پالایی (H)، خاک آلوده با تلقیح کنسرسیوم باکتریایی (HI). (ب): روند تغییرات زمانی فعالیت لیپاز در خاک شاهد بدون آلودگی و بدون تیمار زیست‌پالایی (C)، خاک بدون آلودگی با تیمار NP (CNP)، خاک آلوده و بدون تیمار زیست‌پالایی (H)، خاک آلوده با تیمار کود شیمیایی NP (HNP). (ج): روند تغییرات زمانی فعالیت لیپاز در خاک شاهد بدون آلودگی و بدون تیمار زیست‌پالایی (C)، خاک بدون آلودگی با تیمار Tween 80 (CT)، خاک آلوده بدون تیمار زیست‌پالایی(H)، خاک آلوده با تیمار Tween 80 (HT). (د): روند تغییرات زمانی فعالیت لیپاز پایه در خاک شاهد بدون آلودگی و بدون تیمار زیست‌پالایی (C)، خاک بدون آلودگی با تیمار کود گاوی (CM)، خاک آلوده بدون تیمار زیست‌پالایی (H)، خاک آلوده با تیمار کود گاوی (HM). (و): روند تغییرات زمانی فعالیت لیپاز در خاک شاهد بدون آلودگی و بدون تیمار زیست‌پالایی (C)، خاک بدون آلودگی با تیمار تلفیقی (CMIX)، خاک آلوده بدون تیمار زیست‌پالایی (H)، خاک آلوده با تیمار تلفیقی (HMIX).

با توجه به شکل ٤-و، فعالیت لیپاز در خاک آلوده با تیمار تلفیقی (HMIX) در ۱۰ روز اول کم است، چون در خاک آلوده در روزهای ابتدائی هیدروکربن‌های نفتی زیاد است ولی با گذشت زمان به دلیل کاهش هیدروکربن‌های موجود در خاک، فعالیت لیپازی افزایش یافته است. ریفالدی و همکاران (۲۰۰٦) گزارش کردند که بهترین پارامتر بیولوژیکی و بیوشیمیایی برای تست تجزیه هیدروکربن‌ها فعالیت لیپازی و تنفس میکروبی خاک است که با هیدروکربن‌ها همبستگی منفی دارند. مرگسین و همکاران (۲۰۰۰) فعالیت لیپازی خاک را در سه خاک آلوده به روغن دیزل، خاک آلوده به PAH و خاک شاهد غیرآلوده در طول ۱۰ هفته بررسی کردند و نشان دادند که فعالیت لیپازی در خاک آلوده به روغن دیزل در هفته دوم به سرعت افزایش یافت و به ۹ برابر زمان شروع آزمایش رسید، سپس تا هفته دهم روند آرام کاهشی داشت ولی باز مقدار آن در هفته دهم ٦ برابر مقدار آن در لحظه شروع آزمایش بود. این در حالی بود که فعالیت لیپازی در خاک آلوده به PAH و شاهد غیرآلوده بسیار ناچیز و در طول زمان ثابت بود.

اندازه‌گیری TPH قبل و بعد از تیمارهای زیست‌پالایی

تیمار تلفیقی، تیمار کود گاوی، تیمار Tween 80 و خاک آلوده بدون تیمار زیست‌پالایی به ترتیب با مقادیر ٪۸۱، ٪۷۲، ٪٦۳ و ٪٤٥ از تجزیه نفتای سنگین خاک را داشتند (شکل ٥).



شکل ٥- درصد نفتای سنگین باقیمانده در تیمارهای زیست‌پالایی در روز صفر و ۱۲۰ خاک آلوده بدون تیمار زیست‌پالایی (HC)، تیمار Tween 80 (HT)، تیمار کود گاوی (HM) و تیمار تلفیقی (HMIX).

با توجه به شکل ٥، در خاک آلوده به نفتای سنگین بدون تیمار زیست‌پالایی (HC) در روز صفر با توجه به اینکه با ٪۷ از نفتای سنگین آلوده شده است، مشاهده می‌شود که بعد از گذشت ۱۲۰ روز از مقدار نفتای سنگین کاسته شده است و ٪٥٤ از نفتای سنگین باقی‌مانده است. این کاهش احتمال دارد به این دلیل باشد که در خاک آلوده میکروب‌های بومی خاک در تجزیه نفتای سنگین دخالت داشتند. کاهش میزان نفتای سنگین در تیمار Tween 80 (HT) در روز ۱۲۰ نشان‌دهنده این است که Tween 80 توانسته در طول ۱۲۰ روز باعث حلالیت نفتای سنگین شده و میکروب‌ها به راحتی از نفتای سنگین تغذیه کرده و میزان نفتای سنگین در طول آزمایش کاهش یابد (چنگ و همکاران ۲۰۰۸). در خاک آلوده با تیمار کود گاوی (HM) کاهش نفتای سنگین در ۱۲۰ روز به نظر می‌رسد این میزان کاهش به دلیل وجود میکروفلور موجود در خود کود گاوی یا به عبارتی میکروارگانیسم‌های بومی موجود در کود و وجود عناصر غذایی در کود و تأمین آن برای میکروارگانیسم‌های خاک باشد (آگاموتو و همکاران، ۲۰۱۳). همچنین در خاک آلوده با تیمار تلفیقی (HMIX)

میزان بیشتری از نفتای سنگین در ۱۲۰ روز کاهش یافته است. در خاک آلوده با تیمار تلفیقی به دلیل وجود کود گاوی، توئین ۸۰، NP و کنسرسیوم باکتریایی وجود دارد و این ترکیبات به نوبه خود باعث تجزیه آسان‌تر ترکیبات نفتی موجود در خاک شده و کنسرسیوم باکتریایی به همراه میکروب‌های بومی خاک به راحتی توانسته‌اند از ترکیبات نفتی تغذیه کرده و باعث کاهش میزان نفتای سنگین خاک شده‌اند. افشارنیا و همکاران (۲۰۱۹)، مقدار کل هیدروکربن‌های نفتی را اندازه‌گیری کردند. نتایج نشان داد که در گیاه آگروپایرون، تلقیح با کنسرسیوم باکتریایی ٪٦٦/٥ هیدروکربن‌های نفتی را تجزیه کرده است. این در حالی است که در تیمار بدون تلقیح توانسته بود ٪٥٣ از هیدروکربن‌های نفتی را تجزیه کند. همچنین در تیمار تلفیقی که حاوی قارچ *P. indica* و کاربرد کود دامی و توئین ۸۰ بدون کشت گیاه با ٪۷۲ تجزیه نفتی توانسته بود بیشترین تجزیه نفتی را نسبت به تیمارهای گیاه‌پالایی داشته باشد. اگری و همکاران (۲۰۱۱) زیست‌پالایی خاک آلوده شده به نفت را مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه از کود شیمیایی NPK و غلظت سورفکتانت غیریونی به عنوان متغیرهای مستقل تحریک زیستی با هدف اصلی ارزیابی کاهش TPH که به عنوان متغیر وابسته بود استفاده شد. بعداز ٤٢ روز، ٦٧/٢٠ درصد کاهش در غلظت TPH حاصل شده است. اورجی و همکاران (۲۰۱۲)، استفاده از کود گاوی به عنوان منبع مواد آلی در بهبود زیست‌پالایی نفت خام در مرداب‌های حرا در دلتای نیجریا درکشور نیجریه گزارش شده‌است. در این مطالعه که ۷۰ روز به طول انجامید، با استفاده از کود گاوی، جمعیت باکتریایی به‌طور قابل توجهی به $۲/۸ \times ۱۰^{۷}$ cfu g^{-1} افزایش یافت. در روز ۷۰ام، ٦٢/٠٨ درصد از TPH تجزیه شد و در با تیمار شاهد میزان تجزیه فقط ۲۰ درصد بود. گومز و سرتاج (٢٠١٤) برای خاک مزرعه آلوده به نفت با غلظت ٩٤٠ میکروگرم بر گرم از تلقیح زیستی و تحریک زیستی به عنوان تیمار زیست‌پالایی استفاده کردند. از تلقیح کنسرسیوم میکروبی و کمپوست آلی برای حذف آلودگی استفاده کردند. استفاده از کنسرسیوم میکروبی و کمپوست آلی نشان داد که کارایی حذف به ترتیب ٪٥٥ و ٥٢٪ بود. ولی در خاک آلوده به نفت با غلظت ١٦٦ میکروگرم بر گرم از مخلوط کنسرسیوم میکروبی و کمپوست استفاده شد و در مدت ٤٠ روز، کاهش آلودگی به میزان ٪٨٢ مشاهد شد. آگوموتو و همکاران (۲۰۱۳) با هدف شناسایی پتانسیل ضایعات آلی در حذف زیستی ترکیبات نفتی در خاک آلوده به نفت از لجن فاضلاب و کود گاوی استفاده کردند. بدین ترتیب که به هر ١/٥ کیلوگرم خاک آلوده ١٠٪ (w/w) از لجن فاضلاب یا کود گاوی اضافه کردند و بعد از مدت ٩٨ روز مشاهده کردند که تجزیه زیستی در تیمارهای کود گاوی و لجن فاضلاب به ترتیب ٩٤٪ و ٨٢٪ بوده در حالیکه در این مدت این تجزیه در تیمار شاهد ٥٦٪ بوده است.

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش برای کاهش آلودگی نفتای سنگین در خاک، از تیمارهای مختلف زیست‌پالایی شامل تحریک‌زیستی، تلقیح‌زیستی و تلفیقی استفاده شد. با توجه به نتایج تغییرات فعالیت دهیدروژناز و فعالیت لیپاز در خاک آلوده به نفتای سنگین، هر کدام از تیمارها به تنهایی قادر به کاهش آلودگی بودند و در مدت زمان آزمایش توانستند باعث کاهش آلودگی نفتای سنگین شوند. ولی در تیمار تلفیقی به دلیل استفاده همزمان از تیمارهای تحریک‌زیستی و تلقیح‌زیستی تجزیه آلودگی بهتر انجام شده بود. استفاده از تیمار تلفیقی در

مکانهای آلوده به ترکیبات نفت از جمله نفتای سنگین می‌تواند به حذف زیستی این نوع آلاینده‌ها کمک کند.

منابع مورد استفاده

Afsharnia M, Sarikhani MR and Zarei M, 2019. The use of *Agropyron cristatum* L. and tall fescue plants (*Festuca arundinacea* L.) inoculated with bacterial consortium and mycorrhizal-like fungi in the phytoremediation of oil-contaminated soils. Agricultural Science and Sustainable Production 29: 285-300. (In Persian with English abstract).

Afsharnia M, Sarikhani MR, Zarei M, 2022. Isolation of oil degrading bacteria from oil contaminated soil around the oil refinery and petrochemical plants of Tabriz and identification of the efficient bacteria. Water and Soil Science 10.22034/WS.2021.45023.2408 (In Persian with English abstract).

Agamuthu P, Tan YS and Fauziah SH, 2013. Bioremediation of hydrocarbon contaminated soil using selected organic wastes. Procedia Environmental Sciences 18: 694– 702.

Agarry SE and Owabor CN, 2011. Anaerobic bioremediation of marine sediment artificially contaminated with anthracene and naphthalene. Environment Technology 32: 1375-1381.

Aliasgharzad N, 2010. Laboratory Methods in Soil Biology. Translated to Farsi. Tabriz University Press.

Altgelt KH and Boduszynski M, 1993. Composition and Analysis of Heavy Petroleum Fractions. CRC Press. Boca Raton

Ball JS, Dinneen GU, Smith JR, Bailey CW and Meter RV, 1949. Composition of Colorado Shale-Oil Naphtha. Industerial and Engineering Chemistry 41: 581–587.

Cheng KY, Lai KM and Wong JWC, 2008. Effects of pig manure compost and nonionic-surfactant tween 80 on phenanthrene and pyrene removal from soil vegetated with *Agropyron elongatum*. Chemosphere 73: 791-797.

Christopher S, Hein P, Marsden J and Shurleff AS, 1988. Evaluation of methods 3540 (Soxhlet) and 3550 (Sonication) for evaluation of appendix IX analyses from solid samples. Pp. 523-546. S-CUBED, Report for EPA contract 68-03-33-75. Work assignment No.03SSS.

Dashti N, Ali N, Eliyas M, Khanafer M, Sorkhoh NA and Radwan SS, 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. (In Persian with English abstract)

Ebrahimi S, Ladan Sh and Malakouti MJ, 2009. Feasibility study of monitoring of oil pollutants in soil and presentation algorithm by pollutant type. Pp. 1-10. 11th Soil Science Congress of Iran. 12-14 July, Gorgan, Iran. (In Persian with English abstract)

Gomez F and Sartaj M, 2014. Optimization of field scale biopiles for bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil at low temperature conditions by response surface methodology (RSM). International Biodeterioration and Biodegradation 89: 103–109.

Hassan Shahian M and Zeidabadinejad Z, 2017. Investigation of the effect of kerosene pollution on microbial population of desert soil and farm soil. Journal of Soil and Water Conservation Research 4: 227-241. (In Persian with English abstract)

Joseph B, Ramtekeand PW and Thomas G, 2008. Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. Biotech Advances 26: 457-470.

Kuppusamy S, Thavamani P, Venkateswarlu K, Lee YB, Naidu R and Megharaj M, 2017. Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils: technological constraints, emerging trends and future directions. Chemosphere 168: 944–968.

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.

Liu S, Guo C, Liang X, Wu F and Dang Z, 2016. Nonionic surfactants induced changes in cell characteristics and phenanthrene degradation ability of *Sphingomonas sp*. GY2B. Ecotoxicology and Environmental Safety 129: 210–218.

Margesin R, Walder G and Schinner F, 2000. The impact of hydrocarbon remediation (diesel oil and polycyclic aromatic hydrocarbons) on enzyme activities and microbial properties of soil. Acta Biotechnologica 20: 313-333.

Margesin R, Zimmerbauer A and Schinner F, 2000. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. Chemosphere 40: 339–346.

Orji FA, Abiye AI and Dike EN, 2012. Laboratory scale bioremediation of petroleum hydrocarbon-polluted mangrove swamps in the Niger Delta using cow dung. International Journal of Environmental Bioremediation and Biodegradation 8:219-228.

Polyak YM, Bakina LG, Chugunova MV, Mayachkina NV, Gerasimov AO and Bure VM, 2018. Effect of remediation strategies on biological activity of oil-contaminated soil – a field study. International Biodeterioration and Biodegradation 126: 57–68.

Ramadass K, Megharaj M, Venkateswarlu K and Naidu R, 2015. Ecological implications of motor oil pollution: earthworm survival and soil health. Soil Biologhy and Biochemistry 85: 72–81.

Riffaldi R, Levi-Minzi R, Cardelli R, Palumbo S and Saviozzi A, 2006. Soil biological activities in monitoring the bioremediation of diesel oil-contaminated soil. Water Air and Soil Pollution 170:3-15.

Sakai Y, Hayatsu M and Hayano K, 2002. Use of tween 20 as a substrate for assay of lipase activity in soils. Soil Science and Plant Nutrition 48: 729-734.

Sarikhani MR, Khoshru B, and Greiner R. 2019. Isolation and identification of temperature tolerant phosphate solubilizing bacteria as a potential microbial fertilizer. World Journal of Microbiology and Biotechnology 35:126.

Shen W, Zhu N, Cui J, Wang H, Dang Z, Wu P, Luo Y and Shi C, 2016. Ecotoxicity monitoring and bioindicator screening of oil-contaminated soil during bioremediation. Ecotoxicology and Environmental Safety 124:120–128.

Silva-Castro GA, Uad I, Rodríguez-Calvo A, González-López J and Calvo C, 2015. Response of autochthonous microbiota of diesel polluted soils to land-farming treatments. Environmental Research 137:49–58.

Tan T and Yin C, 2003. The mechanism and kinetic model for glycerolysis by 1, 3 position specific lipase from *Rhizopus arrhizus*. Biochemistry Engineering Journals 25: 39–45.

Varjani SJ and Upasani VN, 2017. A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants. International Biodeterioration and Biodegradation 120: 71–83.

Wu M, Dick WA, Li W, Wang X, Yang Q, Wang T, Xu L, Zhang M and Chen L, 2016. Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil. International Biodeterioration and Biodegradation 107: 158–164.

Wu M, Ye X, Chen K, Li W, Yuan J and Jiang X, 2017. Bacterial community shift and hydrocarbon transformation during bioremediation of short-term petroleum-contaminated soil. Environmental Pollution 223: 657-664.

Yu S, Li S, Tang Y and Wu X, 2011. Succession of bacterial community along with the removal of heavy crude oil pollutants by multiple biostimulation treatments in the Yellow River Delta, China. Journal of Environmental Science 23: 1533–1543.