



Research Article

Vol. 37, No. 5, Dec.-Jan., 2023, p. 685-700

Consequence of Natural and Long Term Oil Pollution on Microbial Population and Urease Activity of Soil

Sh. Moradi¹, M.R. Sarikhani^{2*}, A. Beheshti Ale-Agha³, A. Reyhanitabar⁴, S.S. Alavi-kia⁵, A. Bandehagh⁶, R. Sharifi⁷

1, 2 and 4- Ph.D. Student of Soil Biology and Biotechnology, Associate Professor and Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran, respectively.

(*- Corresponding Author Email: rsarikhani@yahoo.com)

3- Associate Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran

5 and 6- Associate Professors, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

7- Assistant Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran

Received: 06-02-2023	How to cite this article: Moradi, Sh., Sarikhani, M.R., Beheshti Ale-Agha, A., Reyhanitabar, A., Alavi-kia, S.S., Bandehagh, A., & Sharifi, R. (2023). Consequence of oil pollution on microbial population and urease activity of soil. <i>Journal of Water and Soil</i> , 37(5), 685-700. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jsw.2023.80896.1250
Revised: 12-07-2023	
Accepted: 26-07-2023	
Available Online: 01-08-2023	

Introduction

Oil contamination affects the biological, physical, and chemical properties of soil. The abundance and diversity of soil microbial communities can significantly be influenced by petroleum hydrocarbons. Soil biological indicators including microbial population and enzyme activity, are highly sensitive to environmental stresses and respond to them quickly. Measuring the microbial population is one of the most common biological indicators which is used to study the quality and health of the soil. Also, measuring the activity of enzymes such as urease is one of the most sensitive indicators of oil-contaminated soils. There are some studies on the effects of oil contamination on microbial population and soil enzyme activity. Most of the studies have tested non-natural and short-term oil pollution and reported the adverse effects of oil hydrocarbons on microbial activities in soil. While the soil sample used in this research had natural and long-term contamination and the microorganisms are compatible with polluted conditions. The aim of this study was to investigate changes in the microbial population and urease activity in the presence of different levels of oil contamination, and how petroleum hydrocarbons can affect them. Petroleum hydrocarbons are toxic and persistent in soil, so it is necessary to study the pattern of changes in soil biological characteristics in effective soil management.

Material and Methods

In this study, 120 samples of oil-contaminated soils were collected from the oil-rich area of Naft-Shahr (located in the west of Kermanshah province) which had natural and long-term oil pollution. A nested design was used to analysis data in this research. The test factors included locations (4 locations) and 3 different levels of oil pollution: low (L), moderate (M), and high (H). Also, 10 replications were considered in the three levels of oil contamination. The collected soils were analyzed for physico-chemical (pH, EC, Θ_m , CCE, OC, soil texture) and biological



©2023 The author(s). This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.

<https://doi.org/10.22067/jsw.2023.80896.1250>

properties (including urease activity, BR and SIR) using standard methods, and the concentration of oil pollutants was determined by the Soxhlet extractor. To determine the abundance of the culturable microbial population, bacterial counting was performed using nutrient agar (NA) and carbon-free minimal medium (CFMM) supplemented with crude oil as the media. Urease activity was measured by the indophenol blue method and finally, the results of measuring chemical, physical and biological properties were analyzed using principal component analysis (PCA).

Results and Discussion

The average percentage of oil measured by Soxhlet method was 4.03%, 9.95% and 22.50% respectively for L, M and H levels. The results showed that the microbial population increased with the increase of contamination intensity. The highest microbial population counted in NA culture medium was 9.54×10^5 CFU/g in H soils and the lowest population was 3.25×10^5 CFU/g in L soils. In the CFMM culture medium, the highest population in H soils was 11.3×10^5 CFU/g and the lowest population in L soils was 11.8×10^4 CFU/g. For both NA and CFMM mediums, location 1 had the highest population and location 4 had the lowest microbial population. Oil contamination of soil samples led to a decrease in urease activity in such a way that the highest enzyme activity in soils was obtained with low contamination ($594.90 \mu\text{gNH}_4/\text{g.h}$) and the lowest activity in heavily contaminated soils ($176.11 \mu\text{gNH}_4/\text{g.h}$). Also, the lowest urease activity was observed in location 1 and the highest in location 4. Principal components analysis (PCA) was also performed and 71% of the variance of the samples could be explained by the first two components (biochemical component and physical component). The results of this research indicated an increase in the microbial population with an increasing of the intensity of oil pollution. It seems that the results obtained from the studies conducted on man-made pollution and natural pollution have differences in terms of the type of biological responses. Aged, long-term and natural oil pollution has caused the selection of oil-resistant microbial community, and therefore we see their positive response to the presence of oil compounds. Conversely, urease enzyme activity was found to be higher in soils with low pollution. This suggests that microbial activity, while influential, is not the sole determinant of urease activity, and various factors contribute to Soil Enzyme Activity (SEA). The type of petroleum pollutant, the direct effect of petroleum compounds on urease-producing microorganisms, as well as the non-microbial origin of urease in soil can be possible reasons for reducing urease activity in contaminated soils.

Conclusion

In areas where petroleum pollutants are naturally and long-term present in the soil, some oil-decomposing microbial groups use petroleum hydrocarbons as a source of carbon for their nutrition, so the abundance of oil-decomposing communities increases. The results showed an increase in the microbial population with an increase in the intensity of oil pollution. On the other hand, the activity of urease enzyme measured in soils with low pollution was higher because non-microbial factors may affect the activity of this enzyme and the increase in the microbial population is not related to the increase in the population of urease-producing microbes.

Keywords: Biological indicators, Enzyme activity, Microbial population, Oil pollution

پیامد آلودگی نفتی طبیعی و طولانی مدت بر جمعیت میکروبی و فعالیت آنزیم اوره‌آز خاک

شکوفه مرادی^۱ - محمدرضا ساریخانی^{۲*} - علی بهشتی آل آقا^۳ - عادل ریحانی تبار^۴ - سیدسیامک علوی کیا^۵ - علی بنده

حق^۶ - روح اله شریفی^۷

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۰۴

چکیده

آلاینده‌های آلی از جمله ترکیبات نفتی، یک مشکل جهانی برای سلامت محیط‌زیست و موجودات زنده محسوب می‌شوند که می‌توانند ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی خاک را تحت تأثیر قرار دهند. در این تحقیق، شاخص‌های زیستی از جمله جمعیت میکروبی و فعالیت آنزیم اوره‌آز در خاک‌های آلوده به نفت-شهر کرمانشاه مورد توجه بود. به‌منظور بررسی اثرات آلودگی نفتی طولانی‌مدت و طبیعی، ۱۲۰ نمونه خاک آلوده با سطوح مختلف نفت؛ آلودگی شدید (H:High)، متوسط (M:Moderate) و کم (L:Low) از عمق ۰-۱۵ سانتی‌متری از ۴ منطقه مختلف تهیه شد. پس از اندازه‌گیری ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک‌ها، شمارش میکروبی و اندازه‌گیری فعالیت اوره‌آز انجام شد. برای تعیین جمعیت میکروبی کل و باکتری‌های درگیر در تجزیه نفت، به‌ترتیب اقدام به شمارش میکروبی در محیط کشت‌های NA (Nutrient Agar) و CFMM (Carbon Free Minimal Medium) شد که رابطه مستقیمی با افزایش میزان نفت داشت. میانگین درصد نفت اندازه‌گیری شده به روش سوکسله، به‌ترتیب ۴/۰۳، ۹/۹۵ و ۲۲/۵۰ درصد به ترتیب برای سطوح L، M و H به‌دست آمد. نتایج نشان داد که با افزایش شدت آلودگی، جمعیت میکروبی افزایش یافت. بالاترین جمعیت میکروبی شمارش شده در محیط کشت NA، در خاک‌های با آلودگی شدید $9/54 \times 10^5$ CFU/g و پایین‌ترین جمعیت در خاک‌های با آلودگی کم CFU/g $3/25 \times 10^5$ به‌دست آمد. در محیط کشت CFMM نیز بیشترین و کمترین جمعیت به‌ترتیب در خاک‌های با آلودگی شدید و کم با مقادیر CFU/g $3/11 \times 10^5$ و $8/11 \times 10^4$ به‌دست آمد. میزان افزایش جمعیت میکروبی در دو محیط NA و CFMM با افزایش آلودگی به‌ترتیب ۲/۹ و ۳/۸ برابر بود. برای هردو محیط کشت، منطقه ۱ دارای بیشترین جمعیت و بیشترین درصد آلودگی نفتی و منطقه ۴ دارای کمترین جمعیت و کمترین درصد آلودگی نفتی بود. پایین‌ترین فعالیت اوره‌آز در منطقه ۱ و بالاترین آن در منطقه ۴ مشاهده شد. آلودگی نفتی نمونه‌های خاک منجر به کاهش فعالیت اوره‌آز شد به گونه‌ای که بیشترین فعالیت آنزیمی در خاک‌های با آلودگی کم ($594/90 \mu gNH_4/g.h$) و کمترین فعالیت در خاک‌های با آلودگی شدید ($\mu gNH_4/g.h$) $176/11$ به‌دست آمد، میزان درصد کاهش فعالیت با افزایش سطح آلودگی $70/5$ درصد بود. آنالیز مؤلفه‌های اصلی نیز انجام شد و ۷۱ درصد از واریانس تراکمی نمونه‌ها توسط دو مؤلفه اول (مؤلفه بیوشیمیایی و مؤلفه فیزیکی) قابل توجیه بود. یافته‌های این تحقیق نشان داد که آلودگی نفتی طولانی‌مدت و طبیعی باعث گزینش جامعه میکروبی مقاوم به نفت شده و بنابراین پاسخ مثبت آنها به حضور ترکیبات نفتی را شاهد بودیم اما فعالیت آنزیم اوره‌آز تحت تأثیر آلودگی نفتی کاهش یافت. به‌نظر اثرات بازدارندگی ترکیبات نفتی بر فعالیت اوره‌آز یا جامعه غالب میکروبی با فعالیت اوره‌آز محدود، سبب شده است تا فعالیت اوره‌آز واکنش منفی به حضور آلاینده نفتی نشان دهد.

واژه‌های کلیدی: آلاینده‌های نفتی، جمعیت میکروبی، شاخص‌های زیستی، فعالیت آنزیمی

۱، ۲ - به‌ترتیب دانشجوی دکتری بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشیار و استاد گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
* - نویسنده مسئول: (Email: rsarikhani@yahoo.com)
۳ - دانشیار بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
۴ و ۵ - دانشیاران به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۷ - استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

مقدمه

به جامعه میکروبی زنده یا مرده خاک (از قبیل باکتری‌ها، قارچ‌ها) ریشه گیاهان یا جانوران خاک مربوط باشند. آنزیم‌ها، کاتالیزورهایی هستند که بدون اینکه دچار تغییر شوند، سرعت واکنش‌های بیوشیمیایی را افزایش می‌دهند و جزء لازم چرخه عناصر غذایی در خاک می‌باشند. فعالیت آنزیمی خاک متأثر از شرایط خاک و مدیریت‌های اعمال شده بر آن می‌باشد و می‌تواند به عنوان معیاری برای ارزیابی فعالیت میکروبی خاک، باروری خاک و اثرات بازدارنده آلاینده‌ها مورد استفاده قرار گیرد (Tabatabai, 1994). آنزیم‌ها به عنوان حسگرهای زیستی، بسیار حساس هستند، که برای تشخیص و اندازه‌گیری مقدار و غلظت آلاینده‌ها مورد استفاده هستند به گونه‌ای که هم برای تشخیص نشانه‌های اولیه آلودگی مورد استفاده قرار می‌گیرند و هم میزان حذف مؤثر آلاینده و به دست آوردن سلامت و کیفیت مجدد خاک را ارزیابی می‌کنند (Rao et al., 2014). آنزیم اوره‌آز مسئول هیدرولیز کود اوره در خاک‌های کشاورزی می‌باشد و انجام این فرایند منجر به افزایش pH خاک می‌شود. این آنزیم دارای منشأ گیاهی، جانوری و میکروبی بوده و به صورت درون سلولی و برون سلولی یافت می‌شود (Tabatabai, 1994). با توجه به نوع پاسخ و نوسانات فعالیت اوره‌آز خاک به آلاینده‌ها از جمله آلاینده‌های نفتی، این موضوع باعث شده است که اندازه‌گیری این آنزیم، یک شاخص بیوشیمیایی حساس برای بررسی وضعیت خاک‌های آلوده به نفت باشد (Lee et al., 2008)، در حالی که پژوهشگران دیگر، سایر آنزیم‌ها را نیز به عنوان شاخص آلودگی خاک با هیدروکربن‌های نفتی مورد توجه قرار داده‌اند (Xu & Johnson, 1995) اما در مقایسه با سایر آنزیم‌های خاک، آنزیم اوره‌آز، نسبت به آلودگی خاک حساس‌تر است (Klamerus-Iwan et al., 2015)؛ Gue et al., 2012).

لیاؤ و همکاران (Liao et al., 2015) تأثیر آلودگی نفتی بر جمعیت میکروبی را بررسی کردند و دریافتند که آلودگی نفتی اثر کاهشی بر جمعیت باکتری‌های هتروتروف و تأثیر فزاینده‌ای بر جمعیت باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت دارد. بسیاری از محققان از جمله دوس سانتوس و همکاران (Dos Santos et al., 2011)؛ مارژسین و همکاران (Margesin et al., 2007) در گزارش‌های مختلف به نتایج مشابهی دست یافتند. نتایج به دست آمده از پژوهش‌های انجام شده در خاک‌های با آلودگی مصنوعی و خاک‌های با آلودگی طبیعی با هم قابل مقایسه نیستند و نوع پاسخ‌های زیستی به دست آمده در آنها نیز تفاوت‌هایی دارند. در این پژوهش منطقه‌ای که برای نمونه‌برداری انتخاب شد، منطقه نفت‌شهر واقع در غرب استان کرمانشاه بود که خاک‌های آن سال‌های زیادی تحت تأثیر آلاینده‌های نفتی بوده است. به گونه‌ای که کشف نفت در این مکان در سال ۱۲۸۰ هجری شمسی صورت گرفته است. در مناطقی که آلاینده‌های نفتی به طور طبیعی و بلندمدت

آلودگی‌های نفتی، در نتیجه اکتشاف نفت، حمل و نقل، ذخیره‌سازی یا کاربرد آن و در پاره‌ای موارد به خاطر حوادث رخ می‌دهد که یک مشکل جهانی برای سلامت محیط‌زیست و موجودات زنده محسوب می‌شود. هیدروکربن‌های نفتی، آلاینده‌های آلی و پایدار هستند و می‌توانند به مدت طولانی در محیط آلوده باقی بمانند. برخی از آلودگی‌ها در محیط‌زیست به صورت طبیعی بوده و برخی از آنها ناشی از فعالیت‌های انسانی است که در مورد مناطق نفتی و اکتشافات نفتی، رخداد چنین آلودگی اغلب به صورت طبیعی است. الگوی تغییر در ویژگی‌های خاک در نتیجه هر کدام از آلودگی‌های طبیعی یا انسانی متفاوت بوده (Liang et al., 2015) و نیاز به مطالعه بیشتری دارد. آلودگی نفتی، پیامدهای مختلفی بر ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی خاک دارد و در نهایت با به خطر انداختن سلامت و کیفیت خاک، تولید محصول را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد (Liang et al., 2015). هیدروکربن‌های نفتی بر فراوانی و تنوع جمعیت میکروبی خاک اثر می‌گذارند و گروه خاصی از ریزجانداران که با چنین شرایطی سازگارند، قادر به استفاده و تجزیه ترکیبات نفتی می‌باشند (Phillips et al., 2009). برای بررسی اثرات یک آلاینده در خاک، شاخص‌های زیستی می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند زیرا ریزجانداران خاک به تنش‌های اکوسیستم بسیار حساس هستند و از طریق تنظیم فعالیت، زیست‌توده و تنوع ساختار جامعه خود به سرعت به عوامل تنش‌زا پاسخ می‌دهند (Moreno et al., 2011). شاخص‌های انتخابی در پاسخ به آلاینده‌ها باید دارای ویژگی‌های زیر باشند: ۱- حساسیت به حضور آلاینده ۲- توانایی واکنش به سطوح مختلف آلودگی ۳- ثبات در نوع پاسخ افزایشی یا کاهشی در حضور آلاینده ۴- تمایز قائل شدن بین اثر آلاینده و اثر سایر عوامل مخرب (Trasar-Cepeda et al., 2000).

اگرچه از شمارش میکروبی نمی‌توان برای آنالیز زیست‌تخریب پذیری هیدروکربن‌ها استفاده کرد، اما تنوع و تعداد ریزجانداران در یک مکان معین می‌تواند به شناسایی آن منطقه باتوجه به اثر سمیت هیدروکربن‌ها روی جوامع میکروبی، سن و غلظت آلاینده کمک کند. علاوه بر این جوامع میکروبی که مدت‌ها در معرض هیدروکربن‌های نفتی بوده‌اند، پتانسیل بالایی برای تجزیه زیستی نفت از خود نشان می‌دهند و همچنین قابل ذکر است که نشت تازه نفت در خاک اغلب بخش بزرگی از ریزجانداران را از بین می‌برد در حالی که در خاک‌هایی با سطوح پایین‌تر آلودگی و به ویژه آلودگی‌های قدیمی‌تر، تعداد و تنوع میکروبی بالاتر است (Saadoun et al., 2008).

یکی از مهم‌ترین شاخص‌های زیستی در خاک‌های آلوده به نفت، فعالیت آنزیمی است. آنزیم‌های موجود در خاک از نظر منشأ می‌توانند

استاندارد خاک‌های استفاده شده در این پژوهش خاک‌های با آلودگی شدید محسوب می‌شوند (Vincent et al., 2011) اما منطقه نمونه برداری به گونه‌ای بود که حتی خاک‌هایی که عاری از نفت به نظر می‌رسیدند نیز دارای درصدی از نفت بودند زیرا طی سالیان متمادی تحت تأثیر آلودگی نفتی قرار گرفته بودند. همچنین خاک دارای آلودگی صفر که بتوان به عنوان شاهد بدون آلودگی در نظر گرفت در آن وجود نداشت و لذا خاک‌های دارای آلودگی کم (Low) به عنوان شاهد برای مقایسه با خاک‌های دارای آلودگی متوسط و شدید مورد استفاده قرار گرفتند. از هر منطقه ۳۰ نمونه خاک برداشت شد 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 سانتی متری برداشته شد و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

شمارش جمعیت میکروبی

فراوانی جمعیت میکروبی قابل کشت، در محیط کشت‌های NA و CFMM شمارش شد. ترکیبات محیط کشت CFMM بر حسب گرم بر لیتر شامل (۳) NH_4NO_3 ، $\frac{2}{2}$ Na_2HPO_4 ، $\frac{1}{8}$ KH_2PO_4 ، $\frac{1}{10}$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، $\frac{5}{1000}$ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ، $\frac{5}{1000}$ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ و بود و در این محیط حداقل، به میزان ۱ درصد نفت خام افزوده شد. تنها منبع کربن در این محیط کشت، نفت بوده لذا کلنی‌های رشد یافته در آن معرف باکتری‌های تجزیه کننده نفت است، اما محیط کشت NA یک محیط عمومی برای رشد اکثر باکتری‌هاست. به دلیل آبریز بودن و عدم اختلاط نفت با سایر اجزای محیط کشت جامد، پس از ریختن محیط کشت در پلیت و جامد شدن آن به میزان تقریبی ۲۰۰ میکرولیتر از نفت خام بر سطح پلیت گسترده شد. برای شمارش و خالص سازی باکتری‌های بومی تجزیه کننده نفت سری‌های رقت تهیه شدند (10^{-5} تا 10^{-8}) و از هر رقت ۱۰۰ میکرولیتر به محیط جامد CFMM انتقال داده شد و در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد گرم‌گذاری شدند (Ebrahimi et al., 2013). برای تهیه سری رقت‌ها ۱۰ گرم از هر نمونه خاک به ۹۰ میلی لیتر آب مقطر استریل افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه شیک شد و سپس سایر سری‌های رقت تهیه شدند و بدین ترتیب سوسپانسیون میکروبی جهت شمارش جمعیت میکروبی آماده شدند. فرض آزمایش بر این بوده است که دانسیته خاک ۱ گرم بر سانتی متر مکعب بوده است (Deaker et al., 2011). کلنی‌های رشد یافته بر روی محیط کشت NA معرف کل باکتری‌های خاک و باکتری‌های رشد یافته بر روی محیط کشت CFMM تنها معرف باکتری‌های تجزیه کننده نفت بود.

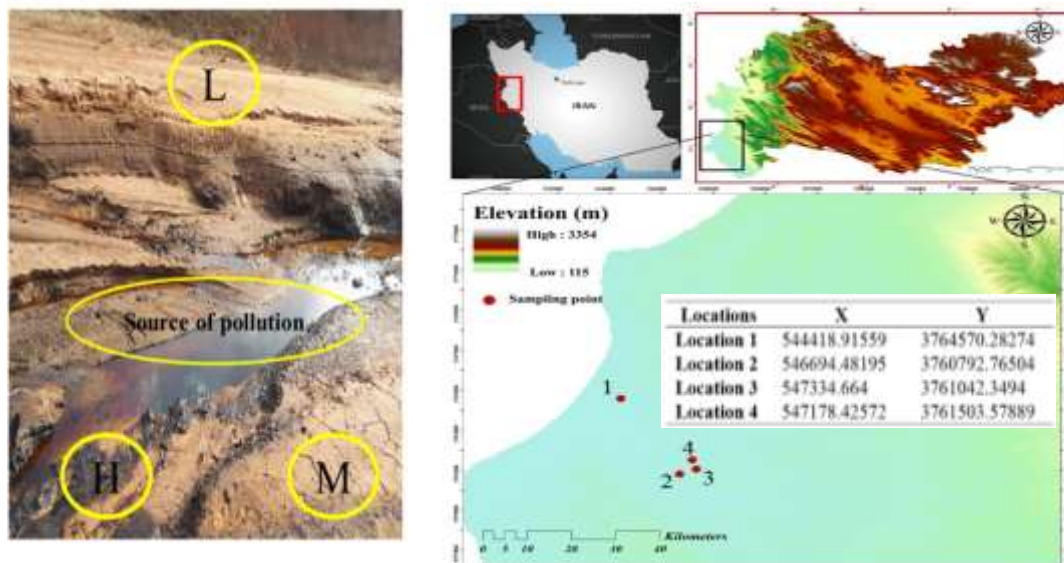
در خاک حضور دارند با گذشت زمان جوامع میکروبی خاک با شرایط آلودگی سازگار می‌شوند، بنابراین شاهد افزایش برخی فعالیت‌های میکروبی و همچنین فراوانی جمعیت میکروبی خواهیم بود. به عبارت دیگر برخی گروه‌های میکروبی که توانایی استفاده از نفت را دارند از هیدروکربن‌های نفتی به عنوان منبع کربن برای تغذیه خود بهره می‌گیرند در نتیجه فراوانی جوامع تجزیه کننده نفت افزایش می‌یابد (Sutton et al., 2013). با توجه به اثرات منفی آلاینده‌های نفتی بر جوامع میکروبی و فعالیت‌های آنزیمی آنها، در این پژوهش تأثیرات آلودگی نفتی طبیعی و درازمدت بر برخی شاخص‌های زیستی مورد توجه قرار گرفت.

در این مطالعه پراکنش جمعیت باکتریایی و فعالیت آنزیم آوره آز به عنوان شاخص‌های زیستی مهم در خاک‌های آلوده به نفت، در ۱۲۰ نمونه خاک جمع‌آوری شده از منطقه نفت شهر استان کرمانشاه، مورد بررسی قرار گرفت. هدف از این پژوهش بررسی چگونگی تغییرات جمعیت میکروبی در حضور آلودگی نفتی در خاک بود و همچنین با توجه به اهمیت آنزیم آوره آز در چرخه نیتروژن، فعالیت آنزیم آوره آز نیز مورد بررسی قرار گرفت. پاسخ به این سوالات که آیا حضور ترکیبات نفتی در خاک به صورت طبیعی و درازمدت موجب اختلال در فراوانی میکروبی و همچنین فعالیت آوره آزی در نمونه خاک‌های دارای غلظت‌های مختلف نفت خواهد شد یا نه؟ آیا تفاوتی بین مناطق نمونه برداری از نظر صفات مورد اندازه گیری وجود دارد؟ آیا روابطی بین جمعیت میکروبی و خصوصیات فیزیوشیمیایی خاک دیده می‌شود؟ از اهداف این پژوهش به شمار می‌رود.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری و آماده سازی خاک

نمونه برداری از خاک‌های آلوده به نفت برای این پژوهش از منطقه نفت خیز نفت شهر واقع در غرب استان کرمانشاه در آبان ماه ۱۳۹۹ انجام شد (شکل ۱). خاک‌های این منطقه مدت زیادی (بیش از ۱۵۰ سال) تحت تأثیر آلودگی نفتی طبیعی بوده‌اند. با توجه به اینکه در این منطقه منابع طبیعی نفتی، میدان‌های نفتی و به ویژه سفره‌های زیرزمینی نفت وجود دارند، آلودگی نفتی در خاک‌های سراسر منطقه فراگیر شده بود. ۴ منطقه برای نمونه برداری گزینش و نمونه‌ها با توجه به نزدیکی و دوری از منبع آلودگی و سطوح غلظت آلاینده نفتی به صورت چشمی 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 اندازه گیری غلظت آلاینده در آزمایشگاه انجام شد. قابل ذکر است که از نظر استاندارد، خاک‌های دارای آلودگی نفتی بیش از ۳ درصد، خاک‌های با آلودگی شدید محسوب می‌شوند. بنابراین طبق این



شکل ۱- موقعیت جغرافیایی مناطق چهارگانه نمونه‌برداری و محل جمع‌آوری خاک‌های H، M و L در هر منطقه بخش‌های سه گانه با سطح آلودگی شدید (H:High)، متوسط (M: Moderate) و کم (L: Low).

Figure 1- Geographical location of the four sampling locations and the collection site of H, M and L soils in each location
Three sections with severe pollution level High (H), Moderate (M) and low (L).

اندازه‌گیری ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی

برخی ویژگی‌های عمومی خاک همچون بافت، pH، قابلیت هدایت الکتریکی (EC)، درصد رطوبت خاک (θ_m) و کربن آلی (OC) (Rowell, 1994)، کربنات کلسیم (CCE) (Martin and Reeve, 1995) و تنفس پایه و برانگیخته (Schinner, 2012) با استفاده از روش کارهای استاندارد، پس از هواخشک کردن و عبور دادن از الک ۲ میلی‌متری، با در نظر گرفتن سه تکرار اندازه‌گیری شدند. برای تعیین غلظت آلاینده‌های نفتی (% Oil) در نمونه‌های خاک برداشته شده از سه سطح آلودگی شدید (H)، متوسط (M) و کم (L)، از دستگاه سوکسله استفاده و براساس روش UNEP/IOC/IAEA سازمان محیط زیست آمریکا انجام شد (Christopher et al., 1988). در این روش برای تعیین غلظت هیدروکربن‌های نفتی خاک، ابتدا ۱۰ گرم از نمونه خاک را روی کاغذ صافی ریخته سپس کاغذ صافی از هر طرف به‌طور کامل بسته و وزن اولیه یادداشت شد (W1) و سپس در دستگاه سوکسله قرار گرفت. برای استخراج مواد نفتی از ۳۰۰-۴۰۰ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان استفاده شد که تقریباً ۴ ساعت به طول انجامید، سپس ۷۲ ساعت در آن در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری و پس از تبخیر دی‌کلرومتان، وزن ثانویه (W2) یادداشت شد و در نهایت با استفاده از رابطه $B = 100 (W1 - W2) / W2$ درصد نفت در هر نمونه خاک محاسبه شد (B درصد نفت، W1 وزن اولیه و W2 وزن ثانویه).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم اوره‌آز

برای اندازه‌گیری فعالیت اوره‌آز از روش ایندوفنل-بلو^۱ استفاده شد (Tabatabai, 1994). ۲/۵ گرم از نمونه خاک (مرطوب) را به درون لوله‌های آزمایش حاوی ۹ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱ میلی‌لیتر محلول اوره (۲۰۰ میلی‌مولار) ریخته و بعد از بهم زدن نمونه، برای فراهم ساختن دمای بهینه فعالیت آنزیم، لوله‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفتند و به مدت ۲ ساعت در این شرایط نگهداری شدند. پس از انکوباسیون و خارج کردن نمونه‌ها از انکوباتور ۲۵ میلی‌لیتر KCl ۲ مولار به آنها اضافه شد و نیم ساعت شیک شده و سپس نمونه‌ها با استفاده از کاغذ صافی، صاف شدند و از عصاره صاف‌شده، ۲۵ میلی‌لیتر برداشته و به آن ۲ میلی‌لیتر محلول فنل-سود و ۳ میلی‌لیتر هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪ اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۹۰ دقیقه به حال خود گذاشته شد تا تشکیل رنگ آبی تکمیل گردد. سپس مقدار جذب محلول‌های رنگی در طول موج ۶۳۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل SU-6100 قرائت شد. با رسم منحنی کالیبراسیون برای محلول‌های استاندارد (تهیه شده از کلرید آمونیوم)، غلظت نمونه‌ها به دست آمد. محلول‌های مورد استفاده در این آزمایش (محلول فنل-سود و هیپوکلریت سدیم) بر اساس روش کار اندازه‌گیری فعالیت اوره‌آز به روش رنگ‌سنجی تهیه شد (Schinner, 2012).

تجزیه و تحلیل آماری

این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی آشیانه‌ای (Nested) در سه تکرار انجام شد و داده‌ها از طریق نرم‌افزار آماری SPSS آنالیز شده و نمودارهای حاصله نیز از طریق نرم‌افزار Excel و SPSS ترسیم شدند. فاکتورهای در نظر گرفته شده در این پژوهش، ۴ منطقه نمونه‌برداری مختلف (Location 1, Location 2, Location 3, Location 4) و ۳ سطح آلودگی (L, M و H) بود. ابتدا استانداردسازی داده‌ها انجام و داده‌های پرت حذف شدند. پیش از انجام هر آنالیز آماری ابتدا نرمال بودن داده‌های به دست آمده با استفاده از شاخص کلموگروف-اسمیرنوف (K-S) بررسی شد و برخی از ویژگی‌های اندازه‌گیری شده که دارای توزیع نرمال نبودند، با استفاده از روش تبدیل داده لگاریتمی نرمال شدند. به منظور بررسی تفاوت بین سطوح مختلف آلودگی (کم، متوسط و زیاد) و همچنین مناطق چهارگانه نمونه‌برداری از نظر تغییرات میزان ویژگی‌های اندازه‌گیری شده، تحلیل واریانس چندمتغیره و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪ انجام شد. تحلیل همبستگی با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام گرفت. به منظور بررسی میزان تأثیرگذاری ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و زیستی اندازه‌گیری شده بر تنوع نمونه‌های خاک، از تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) با به کارگیری نرم‌افزار آماری SPSS استفاده شد.

نتایج و بحث

ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی

میانگین ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی اندازه‌گیری شده در 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). با توجه به درصد‌های نفت اندازه‌گیری شده در نمونه‌های خاک، به منظور تقسیم‌بندی ۱۲۰ نمونه خاک در سه گروه ۴۰ تایی (L، ۴۰ نمونه M و ۴۰ نمونه H)، گروه بندی نمونه‌های خاک به صورت زیر انجام شد: ۷/۱-۰ درصد نفت، خاک‌های L، ۷/۱۲-۱۲/۹۴ درصد نفت، خاک‌های M و درصد نفت بیشتر از ۱۲/۹۴ درصد برای خاک‌های H در نظر گرفته شد. 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)، با اختلاف معنی‌دار بالاتر از خاک‌های L (۵/۵۷ درصد) و خاک‌های M (۱۱/۸۴ درصد) بود (جدول ۱). تجزیه و تحلیل پارامترهای فیزیکوشیمیایی نشان داد که میانگین pH خاک از ۷/۰۵ در خاک‌های L تا ۷/۳۶ در خاک‌های H متغیر بود (جدول ۱). بالاترین pH در منطقه ۳ (۷/۴۴) و پایین‌ترین آن در منطقه ۴ (۷/۰۷) اندازه‌گیری شد (جدول ۲). همانطور که نتایج نشان می‌دهد، EC در نمونه‌های خاک با آلودگی نفتی متفاوت از ۱/۷۱ dS/m (خاک H) تا

۷/۵۹ dS/m (خاک L) متغیر بود. حداکثر مقدار EC در منطقه ۳ و حداقل مقدار آن در منطقه ۲ مشاهده شد (جدول ۲). محتوای کربن آلی (OC) در نمونه‌های خاک از ۵/۰۵ تا ۲۰/۸۴ درصد بسیار متغیر بود (جدول ۱). همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، درصد OC به طور قابل توجهی بین چهار منطقه مورد بررسی از ۸/۸۳ درصد در منطقه ۴ تا ۱۵/۹۶ درصد در منطقه ۱ متفاوت بود.

خاک‌های L دارای بالاترین درصد CCE (۹/۵۶ درصد) و خاک‌های H دارای پایین‌ترین درصد (۸/۷۴ درصد) بودند (جدول ۱). بیشترین میانگین درصد CCE در خاک‌های منطقه ۲ (۹/۹۱ درصد) و کمترین آن در خاک‌های منطقه ۱ (۸/۴۹ درصد) مشاهده شد. در ارزیابی بافت خاک‌های مورد بررسی، توزیع اندازه ذرات نشان داد که بین نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده در شیب آلودگی نفتی (L، M و H) از نظر درصد شن و سیلت تفاوت معنی‌داری وجود نداشت و تنها درصد رس تفاوت معنی‌داری نشان داد (جدول ۱). درصد رس در خاک‌های L، (۲۳/۶۷ درصد) به طور معنی‌داری از خاک‌های H (۲۰/۷۹ درصد) بیشتر بود (جدول ۱).

تنفس پایه (BR) اندازه‌گیری شده نشان داد که منطقه ۳ با $0.052 \text{ mgCO}_2/\text{g.h}$ ، بیشترین و منطقه ۲ با $0.030 \text{ mgCO}_2/\text{g.h}$ کمترین مقادیر را به خود اختصاص دادند (جدول ۱) و همچنین چهار منطقه مختلف با هم اختلاف آماری معنی‌داری نشان دادند ($P < 0.01$) و در کلاس‌های آماری مختلف قرار گرفتند (جدول ۲). همچنین همبستگی مثبت و معنی‌داری بین تنفس پایه خاک و شمار جمعیت میکروبی رشدیافته در محیط کشت عمومی NA ($r = 0.684, P < 0.01$) و محیط کشت حاوی ترکیبات نفتی CFMM ($r = 0.502, P < 0.01$) مشاهده شد (جدول ۵). بالاترین میزان تنفس برانگیخته (SIR) نیز همانند تنفس پایه، متعلق به خاک‌های H بود. میزان تنفس برانگیخته، در خاک‌های با آلودگی زیاد (H)، متوسط (M) و کم (L) به ترتیب 0.234 ، 0.205 و $0.142 \text{ mgCO}_2/\text{g.h}$ بود. میانگین SIR اندازه‌گیری شده در هر سه غلظت آلاینده نفتی اختلاف آماری معنی‌داری ($P < 0.01$) نشان دادند (جدول ۱). مناطق ۱ و ۲ از نظر میزان SIR در یک کلاس آماری قرار گرفتند و بیشترین مقدار مربوط به منطقه ۱ ($0.210 \text{ mgCO}_2/\text{g.h}$) بود و منطقه ۳ با $0.184 \text{ mgCO}_2/\text{g.h}$ ، پایین‌ترین مقدار را به خود اختصاص داد اما به لحاظ آماری با منطقه ۴ اختلاف قابل توجهی نداشت (جدول ۲). نتایج به دست آمده نشان داد که SIR اندازه‌گیری شده با جمعیت میکروبی شمارش شده در محیط کشت عمومی NA ($r = 0.774, P < 0.01$) و همچنین با جمعیت میکروبی شمارش شده در محیط کشت CFMM نیز همبستگی مثبت و معنادار ($r = 0.845, P < 0.01$) وجود دارد (جدول ۵). در پژوهش حاضر نمونه خاک‌های مورد بررسی سال‌های زیادی تحت تأثیر آلاینده نفتی بوده‌اند و به عبارتی می‌توان گفت سازگاری لازم بین جوامع میکروبی و آلاینده نفتی ایجاد شده‌است. نتایج آزمایش

کشت عمومی برای رشد اکثر باکتری‌هاست، تعداد میکروب شمارش شده در آن بیشتر است اما محیط کشت CFMM محیط کشتی با حداقل عناصر غذایی است و تنها منبع کربن برای ریزجانداران خاک، کربن موجود در نفت افزوده شده در آن است و طبیعی است که شمار میکروبی کمتری در آن به دست آید زیرا باتوجه به تفاوت ذکر شده، تنها جوامع میکروبی با قابلیت تجزیه هیدروکربن‌های نفتی می‌توانند در آن رشد کنند. نتایج مطالعه ما نشان داد که جمعیت میکروبی در خاک‌های دارای آلودگی شدید بیشتر بود. تعداد کلنی‌های شمارش شده در خاک‌های با آلودگی شدید (H) با اختلاف آماری معنی‌دار ($P < 0.01$) بالاتر از خاک‌های دارای غلظت متوسط (M) و غلظت پایین نفت (L) بود (جدول ۳).

مربوطه در این پژوهش نشان داد که میزان CO_2 متصاعد شده ناشی از فعالیت تنفسی ریزجانداران (تنفس پایه و برانگیخته)، در حضور ماده نفتی بیشتر بود. همبستگی بالای بین تنفس پایه و میزان درصد نفت ($r = 0.766$ و $P < 0.01$) و همچنین همبستگی مثبت و معنی‌دار تنفس برانگیخته و درصد نفت ($r = 0.847$ و $P < 0.01$) گواهی بر این ادعا است (جدول ۵).

جمعیت میکروبی

نتایج به دست آمده در این پژوهش نشان داد که جمعیت میکروبی شمارش شده در دو محیط کشت NA و CFMM، متفاوت بودند و مشاهده شد که فراوانی میکروبی در محیط کشت NA بیشتر از محیط کشت CFMM بود (جدول ۳). از آنجا که محیط کشت NA یک محیط

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

Table 1- Some physicochemical and biological characteristics obtained from soil samples with three levels of high, moderate and low pollution

غلظت آلاینده نفتی Oil concentration	رطوبت Moisture Θ_m (%)	هدایت الکتریکی pH EC (dS/m)	کربن آلی OC (%)	کربنات-کلسیم معادل CCE (%)	شن Sand (%)	سیلت Silt (%)	رس Clay (%)	غلظت نفت Oil (%)	تنفس پایه BR (mgCO ₂ /g.h)	تنفس برانگیخته SIR (mgCO ₂ /g.h)	
کم Low	5.57 ^c	7.05 ^c	7.59 ^a	5.05 ^c	9.56 ^a	44.96 ^a	28.67 ^a	23.67 ^a	4.03 ^c	0.023 ^c	0.142 ^c
متوسط Moderate	11.84 ^b	7.26 ^b	3.24 ^b	12.31 ^b	9.09 ^b	44.22 ^a	30.17 ^a	24.30 ^a	9.95 ^b	0.041 ^b	0.205 ^b
شدید High	15.79 ^a	7.36 ^a	1.71 ^c	20.84 ^a	8.74 ^b	49.35 ^a	28.2 ^a	20.79 ^b	22.5 ^a	0.053 ^a	0.234 ^a

درصد نفت (Oil)، تنفس پایه (Basal Respiration:BR)، تنفس برانگیخته (Substrate Induced Respiration:SIR)، درصد شن (Sand)، درصد رس (Clay)، درصد سیلت (Silt)، درصد کربنات کلسیم معادل (Carbonate Calcium Equivalent:CCE)، درصد کربن آلی (Organic Carbon:OC).

جدول ۲- برخی خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و زیستی نمونه‌های خاک در چهار منطقه نمونه برداری

Table 2- Some physicochemical and biological characteristics of soil samples in four sampling locations

مناطق نمونه برداری Sampling locations	رطوبت Moisture Θ_m (%)	هدایت الکتریکی pH EC (dS/m)	کربن آلی OC (%)	کربنات-کلسیم معادل CCE (%)	شن Sand (%)	سیلت Silt (%)	رس Clay (%)	غلظت نفت Oil (%)	تنفس پایه BR (mgC O ₂ /g.h)	تنفس برانگیخته SIR (mgCO ₂ /g.h)	
منطقه ۱ Location 1	6.91 ^c	7.22 ^b	2.94 ^b	15.96 ^a	8.49 ^c	59.45 ^a	21.44 ^c	17.73 ^b	15.95 ^a	0.042 ^b	0.210 ^a
منطقه ۲ Location 2	10.31 ^b	7.20 ^b	2.67 ^b	14.63 ^a	9.91 ^a	48.69 ^b	30.29 ^b	16.32 ^b	12.62 ^b	0.030 ^d	0.200 ^a
منطقه ۳ Location 3	13.01 ^{ab}	7.44 ^a	5.43 ^a	12.57 ^b	9.44 ^b	43.92 ^b	27.02 ^{bc}	27.43 ^a	12.37 ^b	0.052 ^a	0.184 ^b
منطقه ۴ Location 4	14.24 ^a	7.07 ^c	5.31 ^a	8.83 ^c	8.69 ^c	33.31 ^c	37.01 ^a	29.68 ^a	8.78 ^c	0.034 ^c	0.186 ^b

درصد نفت (Oil)، تنفس پایه (Basal Respiration:BR)، تنفس برانگیخته (Substrate Induced Respiration:SIR)، درصد شن (Sand)، درصد رس (Clay)، درصد سیلت (Silt)، درصد کربنات کلسیم معادل (Carbonate Calcium Equivalent:CCE)، درصد کربن آلی (Organic Carbon:OC).

جدول ۳- جمعیت میکروبی شمارش شده (CFU/g) در محیط کشت های NA و CFMM در ۴ منطقه نمونه برداری و در سطوح مختلف آلودگی نفتی (High و Moderate ,Low)

Table 3- Microbial population counted in NA and CFMM mediums in 4 sampling locations and at different levels of oil pollution (Low, Moderate and High)

مناطق نمونه برداری Sampling locations	محیط کشت Medium	غلظت آلاینده نفتی Oil concentration			میانگین Mean
		کم Low	متوسط Medium	شدید High	
منطقه ۱ Location 1	NA	5.06×10 ⁵ d	1.13×10 ^{6a}	1.12×10 ⁶ a	9.37×10 ⁵ A
منطقه ۲ Location 2		3.55×10 ⁵ e	8.40×10 ^{5bc}	9.46×10 ⁵ ab	7.22×10 ⁵ B
منطقه ۳ Location 3		2.85×10 ⁵ e	7.07×10 ^{5c}	8.12×10 ⁵ bc	6.25×10 ⁵ C
منطقه ۴ Location 4		1.60×10 ⁵ f	3.67×10 ^{5e}	6.98×10 ⁵ c	3.31×10 ⁵ D
میانگین Mean		3.28×10 ⁵ C	6.48×10 ^{5B}	9.54×10 ⁵ A	
منطقه ۱ Location 1	CFMM	6.06×10 ⁴ f	2.93×10 ⁵ bc	4.54×10 ⁵ bc	2.98×10 ⁵ A
منطقه ۲ Location 2		1.81×10 ⁵ d	6.61×10 ⁵ a	2.52×10 ⁵ c	3.34×10 ⁵ A
منطقه ۳ Location 3		5.62×10 ⁴ f	1.05×10 ⁵ e	1.93×10 ⁵ cd	1.26×10 ⁵ B
منطقه ۴ Location 4		2.97×10 ⁴ g	1.42×10 ⁵ de	2.97×10 ⁵ bc	1.20×10 ⁵ C
میانگین Mean		8.11×10 ⁴ C	2.53×10 ⁵ B	3.11×10 ⁵ A	

که در خاک های آلوده به نفت، تعداد OTU^۱ها به طور قابل توجهی افزایش یافت. نتایج پژوهش آنها گویای این مطلب بود که برخی از گونه های تجزیه کننده هیدروکربن های نفتی در محیط آلوده به نفت، به دلیل انتخاب طبیعی غالب شده اند. محققان زیادی با بررسی تاثیرات آلاینده های نفتی بر جمعیت و فعالیت میکروبی نتایج مشابهی به دست آوردند (Hui et al., 2007; Margesin et al., 2007).

فعالیت آنزیم اوره آز

نتایج اندازه گیری فعالیت اوره آز حاکی از کاهش فعالیت این آنزیم در خاک های آلوده به نفت در مقایسه با خاک های دارای آلودگی کم بود. بالاترین فعالیت اوره آزی در خاک های L (۵۹۴/۹۰ μgNH₄/g.h) و پایین ترین میزان فعالیت در خاک های H (۱۷۶/۱۱ μgNH₄/g.h) به دست آمد (جدول ۴). در مقایسه ۴ منطقه مختلف نمونه برداری مشاهده شد که منطقه ۴ با ۵۹۲/۳۶ μgNH₄/g.h بیشترین و منطقه ۱ با ۲۴۲/۳۶ μgNH₄/g.h کمترین فعالیت اوره آزی را به خود اختصاص

جمعیت کل ریزجانداران خاک در اثر تنش های غیرزیستی نظیر آلاینده های نفتی و فقر غذایی، کاهش می یابند اما باکتری های تجزیه کننده نفت دچار تغییر نمی شوند. به عبارت دیگر آلودگی نفتی، موجب ایجاد شرایط انتخابی در خاک می شود به گونه ای که تنها ریزجاندارانی که قادر به استفاده از هیدروکربن های نفتی هستند از فراوانی بالاتری برخوردار باشند. در گزارشی (Liao et al., 2015) تاثیرات آلودگی نفتی بر ساختار و فعالیت میکروبی و عملکرد متابولیسم کربن توسط ریزجانداران را مورد مطالعه قرار دادند و بیان کردند که آلودگی نفتی طولانی مدت، به شدت ساختار و الگوی جامعه میکروبی خاک را تغییر داده و تغییرات میکروبی به لحاظ فراوانی، غنای باکتریایی، تنوع زیستی باکتریایی و عملکرد آنها به لحاظ آماری معنی دار بود. آنها دریافتند که بالا بودن فراوانی و تنوع میکروبی، رشد ریزجانداران هتروتروف که قابلیت تخریب هیدروکربن ها و استفاده از منابع غنی نفتی را دارند افزایش داده است. در تحقیقی که بر روی متازنوم خاک های متأثر از آلودگی نفتی (Dos Santos et al., 2011) انجام شد، مشاهده کردند

بررسی فعالیت اوره‌آزی جدایه‌های میکروبی نشان داد که تنها ۶/۶ درصد آنها اوره‌آز مثبت بودند.

فعالیت اوره‌آز نسبت به سایر آنزیم‌های خاک، به آلودگی خاک حساس‌تر است و همچنین به‌عنوان حساس‌ترین شاخص بیوشیمیایی به‌منظور ارزیابی خاک‌های آلوده به نفت مورد توجه قرار گرفته‌است (Lee et al., 2012; Klamerus-Iwan et al., 2015; Guo et al., 2012). بنابراین مهار فعالیت اوره‌آز ممکن است نتیجه تأثیر مستقیم هیدروکربن‌های نفتی بر روی ریزجانداران تولیدکننده این آنزیم و یا یک نتیجه غیرمستقیم از خواص فیزیکی خاک باشد (Klamerus-Iwan et al., 2015). به‌عبارت دیگر این اثر منفی هیدروکربن‌های نفتی ممکن است به‌دلیل سرکوب یا کاهش جمعیت ریزجانداران درگیر در هیدرولیز اوره در خاک باشد زیرا هیدروکربن‌ها ممکن است سطوح آلی، معدنی و سلولی را بیوشانند و مانع از فعالیت آنزیم شوند (Guo et al., 2012; Labud et al., 2007). در پژوهش‌های زیادی نتایج مشابهی گزارش شده‌است و نتایج آنها بیانگر این است که آلودگی نفتی اثرات منفی بر فعالیت اوره‌آز خاک دارد (Labud et al., 2007; Guo et al., 2012; Klamerus-Iwan et al., 2015; Lipińska et al., 2012; Wyszowska et al., 2005; Gianfreda et al., 2006).

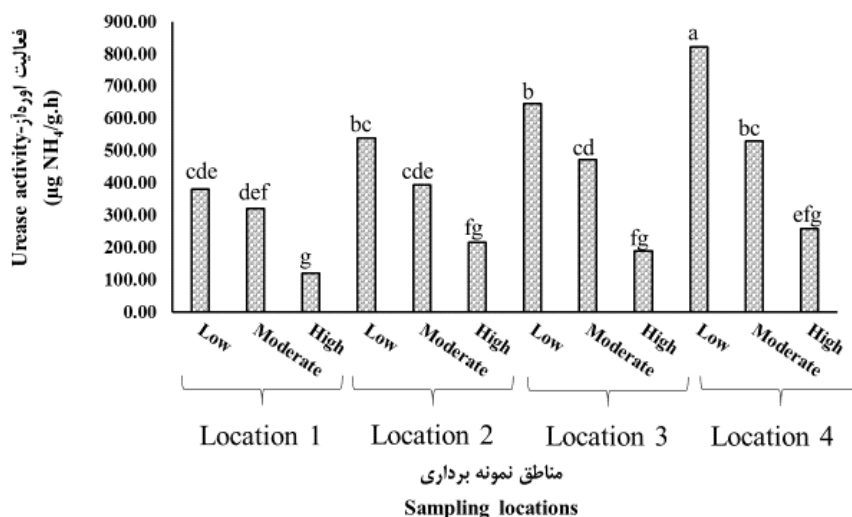
دادند (جدول ۴). در بخش اندازه‌گیری غلظت نفت نمونه خاک‌ها مشاهده شد که بالاترین درصد نفت به‌دست‌آمده متعلق به منطقه ۱ بود (جدول ۱) که پایین‌ترین میزان فعالیت اوره‌آزی را داشت.

همچنین اثرات متقابل غلظت آلودگی نفتی (Moderate, Low) و مناطق ۴ گانه نمونه‌برداری نشان داد که در همه مناطق خاک‌های L بالاترین و خاک‌های H پایین‌ترین فعالیت آنزیم اوره‌آزی را داشتند (شکل ۲). آنزیم اوره‌آز در خاک می‌تواند منشأ گیاهی، حیوانی و میکروبی داشته‌باشد (Andreoni et al., 2004). لذا فعالیت اوره‌آز در مناطقی که دارای پوشش گیاهی کم و یا فاقد پوشش گیاهی هستند کمتر است. نتایج آزمایش ما نشان داد که بین فعالیت اوره‌آز اندازه‌گیری شده و جمعیت میکروبی شمارش شده در هر دو محیط کشت NA و CFMM با تنفس میکروبی پایه (BR) و برانگیخته (SIR)، همبستگی منفی معنی‌داری وجود دارد. این مطلب به وضوح نشان می‌دهد که فعالیت این آنزیم در این خاک‌ها تنها تحت تأثیر جوامع میکروبی خاک نیست و عوامل دیگری ممکن است نقش داشته‌باشند. هرچند در این آزمایش گونه‌های میکروبی رشد یافته در محیط CFMM جهت بررسی فعالیت اوره‌آزی مورد آزمون قرار نگرفتند اما به‌نظر می‌رسد که ریزجانداران غالب در حضور ترکیبات نفتی دارای فعالیت اوره‌آزی محدودی بوده و همین موضوع در نتایج این تحقیق نیز انعکاس یافته است. در مطالعه‌ای که با هدف جداسازی باکتری‌های اندوفیت محرک رشد گیاه از ریشه ذرت (Moradi et al., 2019) انجام شد، نتایج

جدول ۴- میانگین فعالیت آنزیم اوره‌آز در ۴ مکان نمونه‌برداری و سطوح مختلف آلودگی نفتی

Table 4- Average activity of urease in 4 sampling locations and different levels of oil pollution

مناطق نمونه‌برداری Sampling locations	فعالیت اوره‌آز ($\mu\text{gNH}_4/\text{g.h}$) Urease activity
منطقه ۱ Location 1	242.05 ^c
منطقه ۲ Location 2	368.80 ^b
منطقه ۳ Location 3	407.36 ^b
منطقه ۴ Location 4	592.36 ^a
غلظت آلاینده نفتی Oil concentration	
کم Low	594.90 ^A
متوسط Moderate	459.59 ^B
شدید High	176.11 ^C



شکل ۲- اثر متقابل مکان نمونه برداری و سطوح آلودگی نفتی بر فعالیت آنزیم اوره‌آز
Figure 2- Interaction of sampling location and oil pollution levels on urease enzyme activity

دیزل، آنزیم اوره‌آز است. همچنین در تحقیقی (Lipińska *et al.*, 2012) فعالیت اوره‌آز خاک‌های آلوده به PAH را مورد مطالعه قرار دادند که مشاهده کردند حضور PAHها موجب کاهش فعالیت اوره‌آز شده و افزایش غلظت این آلاینده‌ها در خاک، به دلیل نقش بازدارندگی، فعالیت اوره‌آز را کاهش داد.

تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA)

در تحلیل مؤلفه‌های اصلی در این پژوهش، مقادیر ویژه بزرگ‌تر از ۱ در نظر گرفته شد و دو مؤلفه اول دارای مقدار ویژه بالاتر از ۱ بودند (شکل ۳) و نتایج تجزیه PCA نشان داد که ۷۱ درصد از واریانس تراکمی توسط دو مؤلفه اول (F_1 و F_2) قابل توجیه بود (شکل ۳ و جدول ۶). آنالیز PCA یک روش برای تجزیه و تحلیل داده‌های آماری چند متغیره است که در آن مجموعه‌ای از داده‌های خام به تعدادی از مؤلفه‌های اصلی (PCA) کاهش می‌یابد و بیشتر واریانس را در داده‌های اصلی حفظ می‌کند تا الگوها یا خوشه‌های احتمالی بین تیمارها و متغیرها را شناسایی کند (Cox *et al.*, 2003).

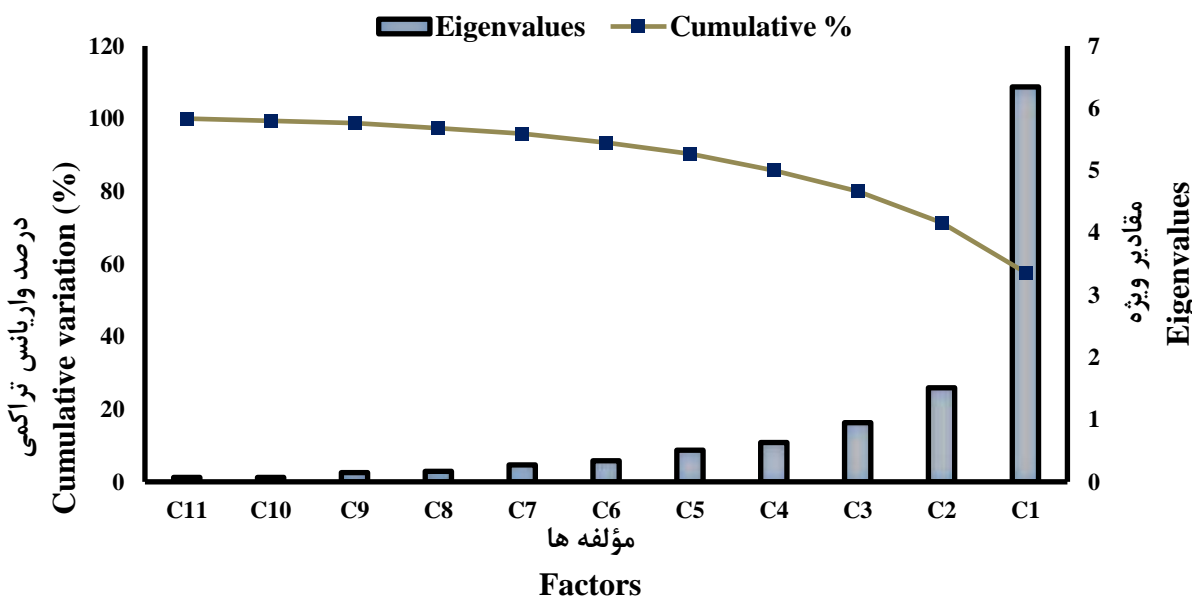
تحلیل PCA انجام شده در این پژوهش نشان داد که واریانس کل نمونه‌های خاک توسط ۱۱ مؤلفه به دست آمده قابل توجیه است به گونه‌ای که مؤلفه اول (F_1) به تنهایی ۵۷/۶۳ درصد از واریانس کل را توجیه کرد (جدول ۶). درصد واریانس تراکمی دو مؤلفه اول ۷۱/۳۲ درصد بود و به همین ترتیب برای سایر مؤلفه‌ها نیز در همین جدول قابل مشاهده است.

فعالیت اوره‌آز توسط عوامل مختلفی از جمله نوع آلاینده، مدت انکوباسیون خاک، pH، محتوای کربن آلی و تعداد حلقه‌های بنزن در هیدروکربن‌های نفتی تحت تأثیر قرار می‌گیرد (Lipińska *et al.*, 2012). نوع آلاینده عامل بسیار مهمی در فعالیت اوره‌آز است. برخی محققان علی‌رغم نتایج به دست آمده در این پژوهش، افزایش فعالیت اوره‌آز را با افزایش غلظت نفت گزارش کرده‌اند. به عبارت دیگر سازگاری ریزجانداران خاک با آلودگی نفتی که طی مدت زیادی در خاک بوده است، منجر به انتخاب طبیعی و افزایش جمعیت میکروبی منتخب و استفاده از نفت به عنوان منبع کربن و انرژی شده است. بنابراین این افزایش جمعیت میکروبی ممکن است افزایش فعالیت اوره‌آز را نیز به دنبال داشته باشد. این نکته قابل ذکر است که افزایش جمعیت در نتیجه تطابق با شرایط آلودگی خاک، کل جمعیت میکروبی را شامل می‌شود در حالی که تنها بخشی از جوامع میکروبی فعالیت اوره‌آز دارند (Lipińska *et al.*, 2012). به نظر می‌رسد گرچه سازگاری جمعیت میکروبی در حضور آلاینده نفتی رخ داده است ولیکن جمعیت غالب از گونه‌های میکروبی غیرمولد اوره‌آز باشند، یا شاید ترکیبات نفتی به عنوان بازدارنده، اثر کاهشی بر فعالیت این آنزیم داشته‌اند. همچنین بسته به جرم مولکولی ترکیبات نفتی، فعالیت آنزیمی ممکن است مهار یا تحریک شود. ترکیباتی که ۲، ۳ یا ۴ حلقه بنزن دارند، به راحتی در دسترس ریزجانداران قرار می‌گیرند که موجب افزایش فعالیت آنها می‌شود (Lipińska *et al.*, 2012). گائو و همکاران (Guo *et al.*, 2012) تأثیرات آلودگی نفتی را بر فعالیت آنزیم اوره‌آز مورد بررسی قرار دادند. آنها به وضوح اثر منفی افزایش غلظت نفت را بر فعالیت اوره‌آز نشان دادند و گزارش کردند که حساس‌ترین شاخص زیستی به آلودگی نفت

جدول ۵- ضرایب همبستگی بین شاخص‌های فیزیوشیمیایی و زیستی اندازه‌گیری شده در نمونه‌های خاک
Table 5- Correlation coefficients between physicochemical and biological indicators measured in soil samples

	غلظت نفت Oil	محیط NA	محیط CFMM	تنفس پایه BR	تنفس برانگیخته SIR	فعالیت اوره‌آز UA	شن %Sand	رس %Clay	سیلت %Silt	کربنات- کلسیم معادل CCE	pH	قابلیت هدایت الکتریکی EC	کربن آلی OC
Oil	1												
NA	0.766	1											
CFMM	0.707**	0.829**	1										
BR	0.766**	0.684**	0.502**	1									
SIR	0.847**	0.774**	0.845**	0.667**	1								
UA	-0.697**	-0.756**	-0.622**	-0.549**	0.562**	1							
Sand	0.041	0.223*	0.124	-0.072	0.104	-0.131	1						
Clay	-0.127	-0.370**	-0.441**	0.163	-0.230*	0.299**	-0.644**	1					
Silt	0.009	-0.146	-0.027	0.013	-0.023	0.094	-0.875**	0.370**	1				
CCE	-0.361**	-0.158	-0.093	-0.257**	-0.254**	0.186*	-0.004	-0.070	0.025	1			
pH	0.418**	0.478**	0.371**	0.615**	0.350**	-0.441**	0.016	-0.032	-	0.150	1		
EC	-0.769**	-0.728**	-0.664	-0.552**	-0.702**	0.718**	-0.167	0.291**	0.097	0.160	-0.502**	1	
OC	0.853	0.750**	0.660	0.611**	0.731**	-0.685**	0.153	-	-	-0.299**	0.374**	-0.740**	1

درصد نفت (Oil)، تنفس پایه (Basal Respiration:BR)، تنفس برانگیخته (Substrate Induced Respiration:SIR)، درصد شن (Sand)، درصد رس (Clay)، درصد سیلت (Silt)، درصد کربنات کلسیم معادل (Carbonate Calcium Equivalent:CCE)، درصد کربن آلی (Organic Carbon:OC)، جمعیت میکروبی در محیط کشت (Microbial population counted in NA: NA) NA، جمعیت میکروبی در محیط کشت (Microbial population counted in CFMM: CFMM) CFMM، فعالیت آنزیم اوره‌آز (Urease activity:UA)، و * به ترتیب معنی‌دار در سطوح ۱ و ۵ درصد.



شکل ۳- نمودار واریانس تراکمی و مقادیر ویژه برای ۱۲۰ نمونه خاک از ۴ منطقه نمونه‌برداری
Figure 3- Cumulative and eigenvalues diagram for 120 soil samples from 4 sampling locations

این متغیر با سایر متغیرهای موجود در مؤلفه است و هرچه مقدار این متغیر افزایش یابد، تأثیرپذیری و اختلاف بین نمونه‌های خاک بر اثر آن متغیر کاهش می‌یابد. در حالی که علامت مثبت نشان‌دهنده رابطه مستقیم با سایر متغیرهاست به عبارت دیگر با افزایش مقدار متغیری که ضریب مثبت دارد، تأثیرپذیری و اختلاف بین نمونه‌های خاک بر اثر آن

همانطور که در جدول ۶ مشاهده می‌شود هر مؤلفه شامل تعدادی متغیر با ضرایب مختلف (بردارهای ویژه) است و هر متغیری که ضریب بالاتر از ۰/۵ داشته باشد در نظر گرفته می‌شود (Cox et al., 2003). در تحلیل PCA برخی از این متغیرها دارای ضریب منفی و برخی دارای ضریب مثبت هستند که علامت منفی نشان‌دهنده رابطه معکوس بین

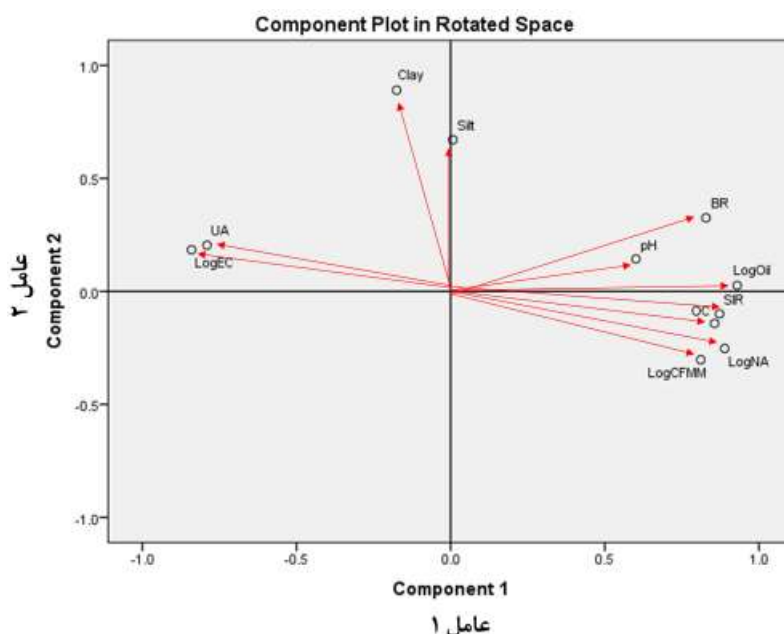
(Clay) و درصد سیلت (Silt) بالاترین تأثیر را به خود اختصاص دادند (جدول ۷). مؤلفه اول را می توان مؤلفه بیوشیمیایی نامید زیرا مقادیر بردارهای ویژه پارامترهای بیولوژیکی و شیمیایی بالا بودند و همچنین باتوجه به بالا بودن مقدار بردار ویژه درصد رس و سیلت، می توان مؤلفه دوم را مؤلفه فیزیکی نامید. همانطور که مشاهده می شود پارامترهای بیوشیمیایی به ویژه درصد نفت و جمعیت میکروبی منبع اصلی تنوع در داده ها هستند (جدول ۷). آنالیز PCA در پژوهش های زیادی در خاک های آلوده به نفت انجام شد که در اغلب آنها درصد نفت قوی ترین عامل تعیین کننده تنوع بین داده ها بود (Xiao et al.; Nie et al., 2009).

متغیر نیز افزایش می یابد. در واقع می توان گفت منظور از تأثیرپذیری زیاد، اختلاف بیشتر بین مقادیر متغیرها در خاک های مختلف است که بیانگر تفاوت بین مناطق مختلف نمونه برداری است (جدول ۷). بر اساس نتایج به دست آمده، درصد نفت (Oil)، تنفس پایه (BR)، تنفس برانگیخته (SIR)، جمعیت میکروبی در محیط کشت NA و CFMM، میزان pH، EC، درصد کربن آلی (OC) و فعالیت اوره آز (UA) دارای بالاترین میزان بردار ویژه بودند و بیشترین تأثیر را در مؤلفه اول داشتند که همه این متغیرها به غیر از EC و UA دارای ضرایب مثبت بودند لذا می توان نتیجه گرفت که با افزایش این متغیرها، اختلاف بین نمونه های خاک نیز افزایش می یابد (جدول ۷). در مؤلفه دوم برخی ویژگی های فیزیکی اندازه گیری شده همچون درصد رس

جدول ۶- تجزیه به مؤلفه اصلی برای نمونه خاک های ۴ منطقه نمونه برداری

Table 6- PCA analysis for soil samples of 4 sampling locations

مؤلفه ها Factors	درصد واریانس تراکمی Cumulative	درصد واریانس Variance (%)
F1	57.63	57.63
F2	71.32	13.69
F3	79.99	8.67
F4	88.71	5.72
F5	90.31	4.60
F6	93.43	3.12
F7	95.86	2.43
F8	97.38	1.51
F9	98.76	1.38
F10	99.40	0.64
F11	100	0.60



شکل ۴- پراکنش پارامترهای مورد بررسی بر اساس دو مؤلفه اول و دوم در تحلیل مولفه های اصلی

Figure 4- Distribution of investigated parameters based on the first and second components in principal components analysis

جدول ۷- مقادیر بردارهای ویژه پارامترهای مورد بررسی در تجزیه مولفه‌های اصلی (PCA)

Table 7- The values of the eigenvectors of the investigated parameters in the analysis of the PCA analysis

متغیرها Parameters	مؤلفه ۱ F1	مؤلفه ۲ F2
غلظت نفت Oil	0.913	0.175
تنفس پایه BR	0.766	0.454
تنفس برانگیخته SIR	0.877	0.042
جمعیت در محیط NA (NA)	0.914	-0.107
جمعیت در محیط CFMM (CFMM)	0.849	-0.169
رس %Clay	-0.316	0.851
سیلت %Silt	-0.100	0.663
pH	0.570	0.238
قابلیت هدایت الکتریکی EC	-0.859	0.047
کربن آلی %OC	0.868	-0.003
فعالیت اوره‌آز UA	-0.813	0.070

غلظت آلاینده روند کاهشی نشان داد و این بر خلاف سازگاری جمعیت میکروبی است، به نظر اثر کاهشی را یا می‌توان به اثر بازدارندگی ترکیبات نفتی بر فعالیت این آنزیم، یا به فقدان فعالیت اوره‌آزی در جمعیت غالب و حاکم در این خاکها نسبت داد. نوع آلاینده نفتی، تأثیر مستقیم ترکیبات نفتی بر ریزجانداران مولد اوره‌آز و همچنین منشأ غیرمیکروبی تولیدکننده اوره‌آز می‌تواند از دلایل احتمالی کاهش فعالیت اوره‌آز در خاک‌های آلوده باشند. نتایج آنالیزهای PCA نیز نشان داد که شاخص‌های بیوشیمیایی به‌ویژه درصد نفت، جمعیت میکروبی و فعالیت اوره‌آز، از مؤثرترین عوامل در تفاوت بین نمونه‌ها می‌باشد.

سیاسگزاری

بدین‌وسیله از حمایت‌های مادی و معنوی دانشگاه تبریز، دانشگاه رازی کرمانشاه و صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور در انجام این پژوهش سپاسگزاری می‌شود.

همچنین (Klamerus-Iwan *et al.*, 2015) اثرات آلودگی نفتی را بر فعالیت آنزیمی و خواص فیزیکی خاک مورد بررسی قرار دادند و در آنالیز مؤلفه‌های اصلی مشاهده کردند که ۷۱ درصد از تغییرات در مطالعه آنها به شدت با فعالیت آنزیم‌های دهیدروژناز و اوره‌آز و جمعیت میکروبی همبستگی داشت. همانطور که در شکل ۴ نیز مشاهده می‌شود، هر چه یک متغیر در نمودار بای‌پلات (Bi-plot)، فاصله بیشتری از مرکز داشته باشد، تأثیرگذاری بیشتری در تنوع داده‌های به‌دست آمده از نمونه‌های مختلف خواهد داشت.

نتیجه‌گیری

نتایج آزمایشات صورت گرفته در این پژوهش که مربوط به یک آلودگی نفتی طبیعی و طولانی مدت بود، افزایش جمعیت باکتریایی را با افزایش شدت آلاینده نفتی نشان داد. به نظر در گذر زمان انتخاب طبیعی حاکم شده است و گونه‌های مقاوم و سازش یافته بر جمعیت حساس پیشی گرفته است. از طرف دیگر فعالیت اوره‌آز خاک با افزایش

منابع

1. Andreoni, V., Cavalca, L., Rao, M. A., Nocerino, G., Bernasconi, S., Dell'Amico, E., ... & Gianfreda, L. (2004). Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. *Chemosphere*, 57(5), 401-412. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.06.013>
2. Christopher, S., Hein, P., Marsden, J., & Shurleff, A.S. (1988). Evaluation of methods 3540 (soxhlet) and 3550 (Sonication) for evaluation of appendix IX analyses from solid samples. S-CUBED, Report for EPA contract 68-03-33-75, work assignment No. 03, Document No (pp. 523-546). SSS.
3. Cox, J.F., Blackstone, J.H., & Schleier, J.G. (2003). *Managing operations: A focus on excellence*. North River Press.
4. Deaker, R., Kecskés, M.L., Rose, M.T., Amprayn, K., Ganisan, K., Tran, T.K.C., Vu, T.N., Phan, T.C., Nguyen, T.H., & Kennedy, I.R. (2011). *Practical methods for the quality control of inoculant biofertilisers*. Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR). Canberra. 101 pp
5. Dos Santos, H. F., Cury, J.C., Do Carmo, F.L., Dos Santos, A.L., Tiedje, J., van Elsas, J.D., ... & Peixoto, R.S. (2011). Mangrove bacterial diversity and the impact of oil contamination revealed by pyrosequencing: bacterial proxies for oil pollution. *PLoS one*, 6(3), e16943. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016943>
6. Ebrahimi, M., Falah, M., & Sarikhani, M.R., (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)
7. Gianfreda, L., Rao, M.A., Piotrowska, A., Palumbo, G., & Colombo, C. (2005). Soil enzyme activities as affected by anthropogenic alterations: intensive agricultural practices and organic pollution. *Science of the Total Environment*, 341(1-3), 265-279. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.10.005>
8. Guo, H., Yao, J., Cai, M., Qian, Y., Guo, Y., Richnow, H.H., ... & Ceccanti, B. (2012). Effects of petroleum contamination on soil microbial numbers, metabolic activity and urease activity. *Chemosphere*, 87(11), 1273-1280. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.01.034>
9. Hui, L.I., Zhang, Y., Kravchenko, I., Hui, X.U., & Zhang, C.G. (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. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(07\)60163-6](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(07)60163-6)
10. Klamerus-Iwan, A., Błońska, E., Lasota, J., Kalandyk, A., & Waligórski, P. (2015). Influence of oil contamination on physical and biological properties of forest soil after chainsaw use. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2649-2>
11. Labud, V., Garcia, C., & Hernandez, T. (2007). Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. *Chemosphere*, 66(10), 1863-1871. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.08.021>
12. Lee, S.H., Oh, B.I., & Kim, J.G. (2008). Effect of various amendments on heavy mineral oil bioremediation and soil microbial activity. *Bioresource Technology*, 99(7), 2578-2587. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.039>
13. Liang, Y., Zhang, X., Zhou, J., & Li, G. (2015). Long-term oil contamination increases deterministic assembly processes in soil microbes. *Ecological Applications*, 25(5), 1235-1243. <https://doi.org/10.1890/14-1672.1>
14. Liao, J., Wang, J., Jiang, D., Wang, M.C., & Huang, Y. (2015). Long-term oil contamination causes similar changes in microbial communities of two distinct soils. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 10299-10310. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6880-y>
15. Lipińska, A., Kucharski, J., & Wyszowska, J. (2013). Urease activity in soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Polish Journal of Environmental Studies*, 22(5), 1393-1400.
16. Margesin, R., Hämmerle, M., & Tschierko, 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. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9136-7>
17. Martin, A.E., & Reeve, R. (1955). A rapid manometric method for determining soil carbonate. *Soil Science*, 79(3), 187-198.
18. Moradi, S. H., Sarikhani, M. R., & Alliasgharzad, N. (2019). Isolation of endophytic bacteria from grasses root and assessing phosphate solubilization, potassium releasing and auxin production abilities of isolated bacteria. *Biological Journal of Microorganism*, 36(2020), 1-13. <https://doi.org/10.22108/bjm.2019.117674.1207>
19. Moreno, B., Nogales, R., Macci, C., Masciandaro, G., & Benitez, E. (2011). Microbial eco-physiological profiles to estimate the biological restoration of a trichloroethylene-contaminated soil. *Ecological Indicators* 11(6), 1563-1571. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2011.03.026>
20. Nie, M., Zhang, X.D., Wang, J.Q., Jiang, L.F., Yang, J., Quan, Z.X., ... & 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. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.09.012>

21. Phillips, L.A., Greer, C.W., Farrell, R.E., & Germida, J.J. (2009). Field-scale assessment of weathered hydrocarbon degradation by mixed and single plant treatments. *Applied Soil Ecology*, 42(1), 9-17. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2009.01.002>
22. Rao, M.A., Scelza, R., Acevedo, F., Diez, M. C., & Gianfreda, L. (2014). Enzymes as useful tools for environmental purposes. *Chemosphere* 107: 145-162. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.12.059>.
23. Rowell, D.L. (1994). *Soil Science: Methods and Applications*. Longman, UK.
24. Saadoun, I., Mohammad, M.J., Hameed, K.M., & Shawaqfah, M.A. (2008). Microbial populations of crude oil spill polluted soils at the Jordan-Iraq desert (the Badia region). *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 453-456.
25. Schinner, F., Öhlinger, R., Kandeler, E., & Margesin, R. (Eds.). (2012). *Methods in soil biology*. Springer Science & Business Media.
26. Sutton, N.B., Maphosa, F., Morillo, J.A., Abu Al-Soud, W., Langenhoff, A.A., Grotenhuis, T., Rijnaarts, H.H., & Smidt, H. (2013). Impact of long-term diesel contamination on soil microbial community structure. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(2): 619–630. <https://doi.org/10.1128/AEM.02747-12>
27. Tabatabai, M.A. (1994). Soil enzymes. *Methods of soil analysis: Part 2 Microbiological and biochemical properties*, 5, 775-833. <https://doi.org/10.2136/sssabookser5.2.c37>
28. Trasar-Cepeda, C., Leiros, M.C., Seoane, S., & Gil-Sotres, F. (2000). Limitations of soil enzymes as indicators of soil pollution. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(13), 1867-1875. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00160-7](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00160-7)
29. Vincent, A.O., Felix, E., Weltime, M.O., Ize-iyamu, O.K., & Daniel, E.E. (2011). Microbial degradation and its kinetics on crude oil polluted soil. *Research Journal of Chemical Sciences*.
30. Wyszowska, J., Kucharski, M., & Kucharski, J. (2006). Application of the activity of soil enzymes in the evaluation of soil contamination by Diesel oil. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(3), 501-506.
31. Xiao, K.Q., Li, L.G., Ma, L.P., Zhang, S.Y., Bao, P., Zhang, T., & Zhu, Y.G. (2016). Metagenomic analysis revealed highly diverse microbial arsenic metabolism genes in paddy soils with low-arsenic contents. *Environmental Pollution*, 211, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.12.023>
32. Xu, J.G., & Johnson, R.L. (1995). Root growth, microbial activity and phosphatase activity in oil-contaminated, remediated and uncontaminated soils planted to barley and field pea. *Plant and Soil*, 173(1), 3-10. <https://doi.org/10.1007/BF00155512>