نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۶، شماره ۴، مهر – آبان ۱۳۹۱، ص. ۹۲۱-۹۰۸

Journal of Water and Soil
Vol. 26, No.4, Sept.-Oct. 2012, p. 908-921

# زیست پالایی خاک آلوده به نفت خام مسن به روش‌های افزایش بیولوژیک و گیاه پالایی

سعیده رجایی[1*] – فایز رئیسی[2] – سید مهدی سیدی[3]

تاریخ دریافت:۹۰/۴/۶
تاریخ پذیرش:۹۱/۲/۱۰

## چکیده

آلودگی اجزاء زیست بوم به نفت خام و مشتقات آن، یکی از جدی ترین مشکلات زیست محیطی در کشور، به ویژه در مناطق جنوبی، به شمار می‌آید. زیست‌پالایی همواره یکی از راهکارهای مناسب و عملی برای پاکسازی هیدروکربن‌های نفتی از محیط محسوب می گردد، که در آن از پتانسیل موجودات زنده در حذف و یا کاهش آلاینده‌ها استفاده می‌شود. لذا این تحقیق به منظور بررسی کاربرد تکنیک‌های همزمان افزایش بیولوژیک و گیاه پالایی برای پاکسازی خاک آلوده به نفت خام با آلودگی مسن در شرایط گلخانه انجام گرفت. به این منظور محیط کشت مخلوطی از باکتری‌های تجزیه کننده نفت خام تهیه و خاک آلوده با غلظت آلودگی ۱۰ درصد نفت خام مسن توسط این کشت مخلوط تلقیح گردید. همچنین به منظور بررسی تأثیر کشت گیاه بر افزایش تجزیه کل هیدروکربن‌های نفتی (TPH) و راندمان کاربرد مایه تلقیح کشت دو گونه گیاه (جو دوسر وحشی و جو زراعی) نیز صورت گرفت. میزان کل هیدروکربن‌های نفتی (TPH) تجزیه شده در خاک آلوده مورد مطالعه بعد از گذشت ۴ ماه تنها ۲/۴ درصد بود، در حالی که با کشت گیاه به طور متوسط به ۳۳ درصد رسید و با تلقیح باکتریایی فقط ۲۰ درصد بود. بیشترین میزان تجزیه TPH در کشت توام با تلقیح باکتریایی و بیش از ۴۴ درصد مشاهده شد. به طور کلی افزایش شاخص‌های میکروبیولوژیکی خاک نظیر تنفس و توده زنده میکروبی، جمعیت میکروب‌های تجزیه کننده هیدروکربن‌های نفتی و کاهش ضریب متابولیکی ($qCO_2$) تحت رویش گیاه، نشان داد حضور گیاه در خاک آلوده به نفت خام مسن باعث تشدید فعالیت‌های بیولوژیک خاک و به دنبال آن افزایش تجزیه زیستی هیدروکربن‌ها گردید.

**واژه‌های کلیدی:** باکتری‌های تجزیه کننده هیدروکربن‌های نفتی، جو زراعی، جو دوسر، گیاه پالایی

## مقدمه

آلودگی خاک با نفت خام و مشتقات آن از جمله خطرناک ترین انواع آلودگی‌های زیست محیطی محسوب می‌گردد. رشد روز افزون صنعت نفت و صنایع جانبی در ایران هیدروکربن‌های نفتی را در ردیف اولین آلاینده‌های محیطی به خصوص مناطق جنوبی کشور قرار داده است. با شدت یافتن آلودگی‌های زیست محیطی طی دو دهه گذشته، کنترل و رفع این آلودگی‌ها با کمک علوم زیست فناوری در مرکز توجه محققین قرار گرفته است. به عنوان مثال کاربرد ریزجانداران تجزیه کننده مشتقات نفتی از سازوکارهای اولیه و مهم حذف آلودگی‌های نفتی از محیط‌های مختلف به شمار می‌رود (۵). علاوه بر این کاربرد گیاه یا گیاه پالایی که فن استفاده از گیاهان مقاوم برای پالایش و پاکسازی خاک‌های آلوده به ترکیبات مختلف می‌باشد نیز در کنار تجزیه میکروبی توجه خاصی را به خود معطوف داشته است (۱۳). یکی از اساسی ترین نقش گیاه در فرایند گیاه پالایی پدیده ریزوسفر می‌باشد. این منطقه مکانی است که اثرات متقابل بین خاک، گیاهان و ریزجانداران به وقوع می‌پیوندد و جوامع میکروبی آن از نظر کمی وکیفی با جوامع میکروبی خاک غیر ریزوسفری تفاوت بسیار زیادی دارد (۹ و ۴۰). به عقیده محققین مختلف ترشحات ریشه گیاه می‌تواند کربن، انرژی و نیتروژن لازم را برای رشد و فعالیت طولانی مدت جامعه میکروبی در ناحیه ریزوسفر فراهم نماید (۹). همچنین اعتقاد بر این است که تجزیه اغلب آلاینده‌های آلی در ناحیه ریزوسفر ناشی از این پدیده می‌باشد (۸). اگر چه گیاهان و ریزجانداران

۱و۲- دانش آموخته دکتری و استاد گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد
(*- نویسنده مسئول: Email: rajaee_sd@yahoo.com)
۳- استادیار گروه زیست فناوری گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری ایران

می‌توانند هیدروکربن‌های نفتی را مستقل از یکدیگر تجزیه کنند ولی تحقیقات نشان می‌دهد که تعامل بین گیاهان و ریزجانداران (پدیده ریزوسفر) به عنوان مکانیسم اولیه تجزیه همواره در فرآیند گیاه پالایی مطرح است (۱۹). به عقیده لیست و فلجنتریو (۲۷) گیاه پالایی ابزاری مناسب برای حذف ترکیبات آلی سکوستره مقاوم مانند PAHها[1] می‌باشند. با گذشت زمان سکوستره شدن هیدروکربن‌ها (توسط مواد آلی و یا جذب سطحی توسط سطوح معدنی) قابلیت دسترسی و تجزیه پذیری ترکیبات آلی آب‌گریز را کاهش می‌دهد که این پدیده باعث مسن شدن هیدروکربن‌های خاک می‌گردد (۲۹). اعتقاد بر این است که ریشه گیاهان با اصلاح شرایط فیزیکی و شیمیایی خاک به طور غیر مستقیم بر زیست فراهمی آلاینده و در نتیجه فرآیند تجزیه آن به ویژه در آلودگی مسن نفتی تأثیر می‌گذارند. انتشار ریشه در خاک، ارتباط گیاهان، ریزجانداران، مواد غذایی و آلودگی‌ها را با یکدیگر تسهیل می‌نماید. نتایج مطالعه خان و همکاران (۲۲) نشان داد که بعد از ۱۸ هفته کشت چاودار در خاک آلوده راندمان حذف پیرن در ریزوسفر این گیاه بیش از ۶۰ درصد بود و گیاهان از طریق افزایش جمعیت و فعالیت‌های میکروبی و همچنین تغییر ترکیب جوامع، تجزیه پیرن را در خاک تحریک نمودند. این پژوهشگران اظهار نمودند روابط متقابل بین گیاه و جامعه باکتریایی ریشه روی تجزیه PAH تأثیر خواهد گذاشت. لو و همکاران (۲۹) نیز اثر کشت نوعی گراس را در زیست پالایی خاک آلوده به نفت (۸۲۴۷ میلی گرم TPH بر کیلوگرم خاک) بررسی و گزارش دادند بعد از ۵ ماه غلظت آلاینده تا ۴۷ درصد در خاک حاوی گیاه و تا ۱۱ درصد در خاک فاقد گیاه کاهش نشان داد و جمعیت باکتری‌ها در ریزوسفر ۷۲ برابر بیشتر از خاک فاقد گیاه بود. در این بررسی ۳۲ درصد PAH از خاک حذف گردید در حالی که در خاک فاقد گیاه این میزان فقط ۵ درصد بود. در بررسی دیگر گاسکین و بنتهام (۱۷) نیز افزایش تجزیه TPH و افزایش فعالیت بیولوژیکی خاک را در محیط ریزوسفر گراس‌های بومی استرالیا در یک سایت آلوده گزارش دادند. به طور کلی این مطالعات نشان می‌دهد تخریب هیدروکربن‌های نفتی در ناحیه ریزوسفر نسبت به سایر قسمت‌های خاک بیشتر بوده و گیاهان با سیستم ریشه‌ای گسترده برای تجزیه بیولوژیک این ترکیبات مفید می‌باشند. وجود پوشش گیاهی به علت ارتقاء و بهبود خصوصیات خاک بوسیله ریشه گیاه و افزایش فعالیت میکروبی خاک، ممکن است باعث افزایش فرآیند پالایش گردد (۲۱، ۲۴ و ۴۰). نظریه همکاری متقابل جوامع میکروبی و ریشه گیاه در حذف آلاینده‌های خاکی نسبتاً جدید و به علت وجود طیف وسیعی از ترکیبات و تنوع اکولوژیکی محل‌های آلوده مطالعات اختصاصی‌تری را برای هر سایت آلوده به طور ویژه طلب می‌نماید. از این رو، در تحقیق حاضر تلاش شد تا یک خاک با سابقه طولانی مدت آلودگی نفتی جهت پاکسازی مورد بررسی قرار گیرد. به علت حضور طولانی مدت نفت در این خاک فرصت کافی جهت برهمکنش هیدروکربن‌های نفتی و ذرات خاک وجود داشته و ترکیبات باقی مانده با سهولت کمتری تجزیه می‌شوند و این بر اهمیت و ارزش پاکسازی زیستی می‌افزاید. بر این اساس هدف تحقیق حاضر مطالعه تأثیر کشت گیاه و کاربرد مایه تلقیح به تنهایی و با یکدیگر بر فعالیت میکروبی و به دنبال آن سرعت تجزیه هیدروکربن‌های نفتی در خاکی با آلودگی طولانی مدت نفت خام بود.

## مواد و روش‌ها

### تهیه خاک آلوده

خاک آلوده به نفت خام با سابقه طولانی مدت آلودگی از میدان نفتی مارون واقع در جنوب شرقی شهرستان اهواز (۴۹ درجه و ۱۱ دقیقه طول شرقی تا ۳۱ درجه و۵۰ دقیقه عرض شمالی) تهیه شد که دارای منابع عظیمی از نفت وگاز می‌باشد. نمونه برداری از عمق۲۰-۰ سانتی متری انجام گرفت و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک نظیر بافت، pH، EC و غلظت عناصر N-P-K و درصد TPH اندازه گیری و گزارش گردید.

### تهیه مایه تلقیح

برای تهیه مایه تلقیح از تعدادی جدایه باکتریایی با قابلیت تجزیه کنندگی نفت خام استفاده گردید. این جدایه‌ها شامل *Acinetobacter*، *Pseudomonas*، *Enterobacter*، *Stenotrophomonas*، *Bacillus*، *Achromobacter*، *Paenibacillus*، *Microbacterium* و *Curtobacterium* بودند که هم در سطح ژنوتیپ و هم در سطح فنوتیپ توانایی تجزیه ترکیبات آلیفاتیک و آروماتیک نفت خام را دارا بودند و از بانک ژن پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری ایران تهیه گردیدند. جهت تهیه مایه تلقیح بذر نیز سوسپانسیون میکروبی تعدادی از جدایه‌ها شامل باکتری‌های *Enterobacter*، *Stenotrophomonas*، *Paenibacillus*، *Microbacterium* و *Curtobacterium* تهیه و بذور با آن تلقیح گردید (۱۲).

### کشت گلخانه‌ای

آزمایش گلخانه‌ای به صورت فاکتوریل ۳×۲ در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. تیمارهای اجرا شده روی خاک آلوده شامل کشت گیاه، تیمار تلقیح باکتری و تیمار تلقیح باکتری و کشت گیاه با هم بود. خاک آلوده بدون کشت و بدون تلقیح، نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. گیاهان مورد نظر در این طرح شامل یک گونه جو

1- Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

دوسر وحشی بومی خاک آلوده به نفت و دیگری یک گونه جو زراعی مقاوم به خشکی و شوری بود. در تیمارهای تلقیح باکتریایی، علاوه بر تلقیح بذر، خاک نیز به طور جداگانه توسط مخلوط باکتری تلقیح گردید. در طول مدت رشد گیاه گلدان‌ها در اتاقک رشد نگهداری شدند.

**جدول ۱- برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک آلوده**

| شاخص‌های اندازه گیری شده | خاک آلوده |
|---|---|
| فسفر قابل جذب ($mg\ kg^{-1}$ soil) | ۱۰۳ |
| نیتروژن (٪) | ۰/۱۰ |
| پتاسیم ($mg\ kg^{-1}$ soil) | ۱۲۷ |
| pH در عصاره ۱:۲/۵ | ۷/۰۱ |
| EC ($dSm^{-1}$) در عصاره ۱:۲/۵ | ۱/۴۵ |
| Clay (٪) | ۴۰ |
| Silt (٪) | ۴۲ |
| Sand (٪) | ۱۸ |
| TPH (%w/w) | ۱۰ |

### مطالعات بیولوژیک خاک

پس از گذشت ۴ ماه از استقرار گیاه در خاک، کل توده گیاهی از سطح خاک حذف و به منظور مطالعه اثر کشت گیاه و تلقیح باکتری بر خاک مطالعات بیولوژیک خاک روی نمونه‌های مذکور بلافاصله آغاز گردید. برای اندازه گیری میزان تنفس خاک و معدنی شدن کربن از روش اندرسون (۲) و جهت تعیین سرعت و پتانسیل معدنی شدن کربن مقادیر تجمعی کربن معدنی شده پس از ۴۳ روز محاسبه و پتانسیل معدنی شدن کربن با استفاده از معادله سینتیک مرتبه اول ($C_t=C_0\ (1-e^{-kt})$، با نرم افزار Curve Expert برازش داده شد. برای اندازه گیری تنفس ناشی از سوبسترا (SIR) گلوکز به خاک اضافه و $CO_2$ متصاعد شده پس از ۶ ساعت به روش تیتراسیون اندازه گیری گردید. کربن توده زنده میکروبی خاک به روش تدخین با کلروفرم اندازه گیری شد (۲۰). $qCO_2$ یا تنفس ویژه از تقسیم تنفس پایه به کربن توده زنده میکروبی محاسبه گردید (۴۱). جمعیت باکتری‌ها تجزیه کننده نفت در تیمارهای خاک به روش MPN و با استفاده از محیط کشت معدنی حاوی ۲ درصد وزنی نفت خام تعیین گردید (۲۳). TPH باقی‌مانده در خاک گلدان‌ها به روش پروتوکل شماره ۵۵۲۰ EPA عصاره گیری و میزان آن به روش کروماتوگرافی گازی- اسپکتروفوتومتری جرمی (GC-MS) تعیین گردید.

تجزیه تحلیل داده‌ها در نرم افزار SAS8 صورت پذیرفت. در این آزمون اثر کشت گیاه و تلقیح باکتریایی به عنوان اثرات اصلی و اثر متقابل این دو تیمار بر خصوصیات بیولوژیک خاک و کاهش محتوی TPH بررسی شد. مقایسه میانگین‌ها به روش LSD فیشر در سطح ۵ درصد انجام شد.

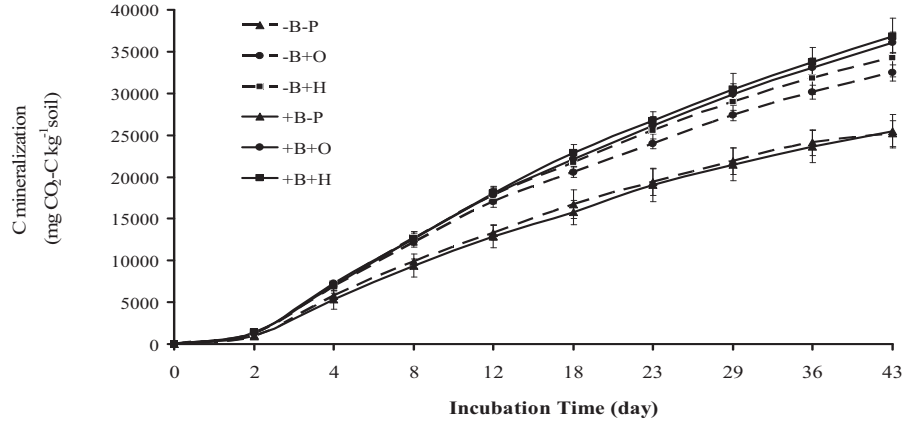
## نتایج و بحث

در جدول ۲ ضرایب معادله سینتیک معدنی شدن کربن ارائه شده است و نتایج تجزیه واریانس، مقایسه میانگین‌ها و همبستگی برخی شاخص‌های میکروبیولوژیکی اندازه گیری شده در خاک گلدان‌ها در پایان فصل رشد به ترتیب در جدول‌های ۳، ۴ و ۵ نشان داده شده است.

### تنفس میکروبی خاک و پتانسیل معدنی شدن کربن

در تعدادی از مطالعات میزان تولید $CO_2$ در خاک آلوده به هیدروکربن‌های نفتی به عنوان ویژگی مناسب برای پی بردن به میزان و یا سرعت تجزیه زیستی معرفی شده‌است (۳۷). تنفس میکروبی خاک (شکل ۱) در حضور گیاه بیشتر از تنفس خاک بدون گیاه بود بین دو گیاه اختلاف محسوس وجود نداشت. تنفس میکروبی خاک آلوده که مایه تلقیح دریافت کرده بود با تنفس میکروبی خاک آلوده بدون گیاه که تلقیح نشده بود، اختلاف نشان نداد. مشابه با این نتایج، لین و مندلسون (۳۳) نیز مشاهده نمودند که تلقیح باکتریایی به تنهایی تأثیری بر افزایش تنفس خاک نخواهد داشت.

در جدول ۲ ضرایب معادلات سینتیک مرتبه اول معدنی شدن کربن ($C_t=C_0(1-e^{-kt})$ که برای این داده‌ها برازش داده شده‌است، ارائه گردیده‌است. بالا بودن ضریب رگرسیون ($R^2$) در حد ۰/۹۸ تا ۰/۹۹ نشان می‌دهد روند معدنی شدن کربن در این تیمارها نیز از معادله مرتبه اول پیروی می‌نماید. پتانسیل معدنی شدن کربن ($C_0$) در تیمارهای زیر کشت جو دوسر وحشی تلقیح نشده ۲۹ درصد، جو زراعی تلقیح نشده ۳۸ درصد، جو دوسر تلقیح شده ۵۰ درصد و جو زراعی تلقیح شده ۵۴ درصد نسبت به خاک آلوده بدون گیاه که تلقیح نشده بود، افزایش پیدا کرد. پتانسیل معدنی شدن کربن در خاکی که فقط مایع تلقیح دریافت کرده بود، فقط ۳/۸ درصد بیشتر از خاک آلوده تلقیح نشده بود. پتانسیل معدنی شدن کربن (حداکثر کربن قابل تجزیه موجود در سوبسترا که در زمان مشخص توانایی معدنی شدن را دارد) تحت تأثیر عوامل مختلف از جمله شرایط خاک و کیفیت و قابلیت دسترسی سوبسترا قرار می‌گیرد (۱). نتایج نشان داد کشت گیاه و همچنین کشت گیاه توأم با تلقیح باکتریایی پتانسیل معدنی شدن کربن را در خاک آلوده با آلودگی مسن افزایش داد. از آنجایی که غلظت آلودگی و نوع خاک در تمامی تیمارها یکسان بود و پتانسیل معدنی شدن کربن تحت تأثیر عوامل مختلف از جمله قابلیت دسترسی به سوبسترا قرار می‌گیرد، می‌توان این گونه استنباط کرد که حضور گیاه هم به تنهایی و هم همراه با تلقیح باکتریایی ممکن است شرایطی را در خاک به وجود آورد که قابلیت دسترسی سوبسترا را افزایش دهد. این افزایش قابلیت دسترسی به سوبسترا می‌تواند هم ناشی از ترشحات و ته نشست‌های ریشه و هم ناشی از افزایش قابلیت دسترسی به هیدروکربن‌های نفتی باشد.




**شکل ۱- تنفس میکروبی تجمعی در تیمارهای مختلف خاک آلوده (n=۵) پس از پایان فصل رشد طی ۴۳ روز انکوباسیون، H: جو زراعی، O: جو دوسر، P-: بدون گیاه، B-: بدون تلقیح، B+: تلقیح باکتریایی**

**جدول ۲- ضرایب معادله سینتیک مرتبه اول ($C_t= C_0(1-e^{-kt})$) معدنی شدن کربن در تیمارهای مختلف خاک**

| تیمار | $C_0$ (g C $kg^{-1}$ soil) | kc ($day^{-1}$) | SE | $R^2$ |
|---|---|---|---|---|
| -B-P | ۲۸/۵ | ۰/۰۵۰ | ۰/۷۰ | ۰/۹۹ |
| -B+O | ۳۶/۸ | ۰/۰۴۷ | ۰/۹۲ | ۰/۹۹ |
| -B+H | ۳۹/۲ | ۰/۰۴۶ | ۰/۹۳ | ۰/۹۹ |
| +B-P | ۲۹/۶ | ۰/۰۴۴ | ۰/۶۶ | ۰/۹۹ |
| +B+O | ۴۲/۸ | ۰/۰۴۱ | ۰/۸۹ | ۰/۹۹ |
| +B+H | ۴۳/۹ | ۰/۰۴۱ | ۰/۸۳ | ۰/۹۹ |

$C_0$: پتانسیل معدنی شدن کربن، $k_C$: ثابت سرعت معدنی شدن کربن، $R^2$: ضریب همبستگی، SE: خطای استاندارد برآورد (n=۵).
O: جو دوسر، H: جو زراعی، P-: بدون گیاه، B-: بدون تلقیح، B+: تلقیح شده.

عموماً ترشحات ریشه به عنوان عامل مهم در افزایش پتانسیل معدنی شدن کربن معرفی شده اند (۱۰).

اثرات اصلی تیمار باکتری و کشت گیاه بر کل کربن معدنی شده ($C_{min}$) طی ۴۳ روز انکوباسیون معنی‌دار بود (جدول ۳). کشت جو دوسر و جو زراعی تقریباً به یک اندازه (به ترتیب ۳۵ و ۴۰ درصد) میزان کل کربن معدنی شده را افزایش دادند درحالی‌که تلقیح باکتریایی فقط ۶ درصد افزایش در تولید $CO_2$ به همراه داشت (جدول ۴). افزایش پتانسیل معدنی شدن کربن بر اثر کشت گیاه و به دنبال آن افزایش کربن معدنی شده نشان دهنده نقش مثبت گیاه در افزایش پویایی کربن خاک مورد مطالعه با آلودگی مسن بود. افزایش معدنی شدن کربن خاک را می‌توان به افزایش فعالیت‌های بیولوژیک ناشی از فعالیت ریشه‌ها نسبت داد اما افزایش پتانسیل معدنی شدن کربن بر اثر کشت گیاه نشان می‌دهد گیاه در افزایش قابلیت زیست فراهمی این ترکیبات از طریق ترشحات ریشه ممکن است مؤثر باشد. نتایج اغلب مطالعات انجام شده در خاک‌های غیر آلوده حاکی است که حضور گیاه سبب افزایش قابل توجه تنفس هتروتروفی و تصاعد $CO_2$ از خاک می‌گردد (۱۵ و ۲۴). این پدیده، که تحت عنوان اثر پرایمینگ ریزوسفری[1] از آن یاد می‌شود، به ورود ترشحات و ترکیبات مختلف ریشه به داخل خاک، بروز تناوب‌های خشک و مرطوب شدن خاک، کاهش پایداری خاکدانه‌ها و وجود رقابت بین گیاه و میکروب‌ها برای جذب عناصر غذایی نسبت داده می‌شود (۱۶ و ۲۵).

### تنفس پایه و تنفس ناشی از سوبسترا

اثرات تیمار باکتری و کشت گیاه بر تنفس پایه معنی‌دار گردید، ولی اثر متقابل این دو معنی‌دار نشد (جدول ۳). تلقیح باکتریایی تنفس پایه را ۱۱ درصد افزایش داد درحالی‌که این افزایش در کشت جو دوسر و جو زراعی به ترتیب ۳۱ و ۳۴ درصد بود ولی بین دو گیاه تفاوت معنی‌دار وجود نداشت (جدول ۴).

اثر اصلی تیمار باکتری بر تنفس ناشی از سوبسترا در سطح ۰/۰۶۶۱ معنی‌دار بود (جدول ۳). کشت جو دوسر و جو زراعی تنفس ناشی از سوبسترا را به ترتیب ۲۷ و ۳۵ درصد نسبت به خاک بدون گیاه افزایش داد (جدول ۴). به طور کلی SIR ارتباط نزدیکی با غلظت

1- Rhizosphere priming effect

ماده آلی سهل‌الوصول و توده زنده میکروبی دارد (۳). با افزودن گلوکز تنفس میکروبی همواره افزایش یافت. افزایش SIR در خاک آلوده ممکن است به دلیل بالا بودن توده زنده میکروبی جوان و فعال باشد. معمولاً SIR نشان دهنده جمعیت فعال میکروبی در خاک می‌باشد (۲۵) و افزایش آن بر فعال بودن جمعیت میکروبی در خاک دلالت دارد. از طرف دیگر، افزایش SIR در خاک آلوده ممکن است به دلیل عدم دسترسی آسان میکروب‌های خاک به سوبسترای نفتی و یا تجزیه پذیری اندک ترکیبات نفتی باقی‌مانده در این خاک‌ها نیز باشد. همچنین به موازات افزایش SIR در خاک آلوده BR نیز فزونی یافت، بنابراین به نظر می‌رسد مقایسه نسبت این دو شاخص از مقایسه آنها به تنهایی در چنین حالتی مفیدتر است. بر اساس نتایج نمازی (۱) نفت خام تازه در غلظت‌های ۵ و ۱۰ درصد تنفس ناشی از سوبسترا را به ترتیب ۴۶ و ۶۹ درصد در خاک شنی افزایش داد اما در خاک رسی تنفس ناشی از سوبسترا در غلظت ۵ درصد بیشتر از غلظت ۱۰ درصد بود. در واقع شاید این بیان‌گر آن است که ترکیبات نفتی اضافه شده توسط کلوئیدهای رسی جذب سطحی و تثبیت می‌شوند و از این رو از دسترس میکروب‌ها خارج می‌شوند. بنابراین چنین می‌توان استنباط نمود که در خاک آلوده به نفت، کمیت کربن عامل محدود کننده فعالیت هتروتروفی خاک نیست، بلکه جمعیت فعال و یا میزان دسترسی به این کربن آلی (یعنی کیفیت سوبسترا) مهمترین عامل به شمار می‌آید. در خاک آلوده میزان تنفس پایه تیمارهای کشت شده بیشتر از تیمارهای بدون گیاه بود. تلقیح باکتریایی نیز در مجموع باعث افزایش تنفس پایه خاک گردید. افزایش همزمان میزان تنفس پایه و SIR در کشت گیاه می‌تواند به علت افزایش توده زنده میکروبی فعال ناشی از فعالیت ریشه‌های گیاه باشد. در مجموع نتایج نشان می‌دهد کشت گیاه در خاک آلوده باعث افزایش جمعیت فعال میکروبی گردید. همان گونه که در بخش نتایج مشاهده گردید میزان کربن توده زنده میکروبی خاک‌های کشت شده و خاک‌های کشت شده که تلقیح شده بودند، از خاک‌های بدون گیاه بیشتر بود. بالاتر بودن کربن معدنی شده در این تیمارها نیز نشان می‌دهد افزایش SIR ناشی از محدودیت کربن نبوده و به علت افزایش توده زنده میکروبی فعال می‌باشد. در این آزمایش همچنین همبستگی بین مقدار SIR و کربن توده زنده میکروبی در انتهای آزمایش مثبت و معنی‌دار بود. همچنین افزایش کل کربن معدنی شده مجدداً نشان می‌دهد عامل محدودیت کربن علت افزایش تنفس ناشی از سوبسترا نیست.

اثرات تیمارهای کشت گیاه و تلقیح باکتری بر نسبت BR/SIR که شاخص قابلیت دستری به کربن (CAI) نیز نامیده می‌شود معنی‌دار نشد (جدول ۳). هر اندازه این شاخص نزدیک به یک باشد، نشان دهنده آن است که میزان BR تقریباً برابر با SIR می‌باشد و افزودن سوبسترای قابل دسترس و آسان تجزیه پذیر سبب تحریک رشد و فعالیت میکروبی خاک نمی‌شود و بنابراین کربن خاک عامل محدود کننده فعالیت میکروبی نمی‌باشد و اگر این شاخص از یک کمتر باشد، نشان دهنده وجود محدودیت دسترسی به کربن خاک برای فعالیت میکروبی می‌باشد (۷). چنگ و همکاران (۷) نشان دادند که CAI در خاک ریزوسفری نزدیک به یک و در خاک معمولی بسیار از یک کوچکتر است. در خاک مورد مطالعه این شاخص از یک بسیار فاصله داشت (۰/۶۶). این محدودیت را می‌توان به مسن بودن آلودگی و کیفیت پایین منبع کربن خاک (هیدروکربن‌های نفتی) نسبت داد. عدم اختلاف در شاخص قابلیت دسترسی به کربن بین تیمارهای خاک آلوده شامل تلقیح باکتریایی و کشت گیاه به این معناست که به موازات افزایش تنفس پایه در تیمارهای مختلف خاک آلوده، تنفس ناشی از سوبسترا نیز افزایش می‌یابد. لذا دسترسی میکروب‌ها به کربن نفت یکسان بود. بر خلاف فرضیه مطرح شده مبنی بر افزایش قابلیت دسترسی به هیدروکربن‌های مسن بر اثر کشت گیاه و فعالیت ریشه‌ها، عدم وجود اختلاف در شاخص CAI بین تیمارهای مختلف خاک آلوده نشان می‌دهد کشت گیاه و تلقیح باکتریایی تأثیری بر افزایش قابلیت دسترسی به کربن در این خاک‌ها نداشت و لذا نقش گیاه در افزایش تجزیه TPH به عوامل دیگری مانند بهبود شرایط محیطی برای تجزیه کننده‌ها معطوف می‌گردد. احتمالاً کاهش رشد گیاه بر اثر آلودگی نفتی باعث کاهش اختصاص ترشحات فتوسنتزی در ناحیه ریشه می‌شود. این مسأله به نوبه خود اثر پرایمینگ ریشه را کاهش داده و به صورت یک پسخور منفی[1] می‌تواند بر کاهش شاخص دسترسی به کربن در خاک تأثیر گذار باشد.

**جدول ۳- تجزیه واریانس (آماره *P*) اثر کشت گیاه و تلقیح باکتریایی بر شاخص‌های میکروبیولوژیکی خاک**

| منابع تغییرات | BR | SIR | BR/SIR | MBC | $C_{min}$ | $qCO_2$ | MP | TPH-deg |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| باکتری | ۰/۰۰۱۴ | ۰/۰۶۶۱ | ۰/۵۸۲۷ | <۰/۰۰۰۱ | ۰/۰۰۲۳ | <۰/۰۰۰۱ | <۰/۰۰۰۱ | <۰/۰۰۰۱ |
| گیاه | <۰/۰۰۰۱ | <۰/۰۰۰۱ | ۰/۷۰۲۸ | <۰/۰۰۰۱ | <۰/۰۰۰۱ | <۰/۰۰۰۱ | <۰/۰۰۰۱ | <۰/۰۰۰۱ |
| گیاه × باکتری | ۰/۵۲۹۷ | ۰/۸۶۷۷ | ۰/۵۲۰۸ | ۰/۰۰۰۶ | ۰/۱۱۰۵ | ۰/۰۰۰۵ | ۰/۰۴۴۰ | ۰/۳۳۲۵ |
| CV (٪) | ۸ | ۱۰/۳ | ۱۱/۴ | ۸/۰ | ۷/۶ | ۸/۰ | ۱۰/۲ | ۱۵/۵ |

1- Negative feedback

جدول ٤- اثر کشت گیاه (جو زراعی و جو دوسر) و تلقیح باکتریایی بر شاخص‌های میکروبیولوژیکی خاک آلوده به نفت خام

| تیمار | BR (mg $CO_2$-C $kg^{-1}$ soil $day^{-1}$) | SIR (mg $CO_2$-C $kg^{-1}$ soil $day^{-1}$) | BR/SIR (CAI) | MBC (mg $CO_2$-C $kg^{-1}$ soil) | $C_{min}$ (g $CO_2$-C $kg^{-1}$ soil) | $qCO_2$ (µg $CO_2$-C $mg^{-1}$ C $day^{-1}$) | MP (Cell $mg^{-1}$ soil) | TPH-deg (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| بدون تلقیح (B-) | | | | | | | | |
| -P | ۲۳۵±۲۷ | ۳۶۱±۳۷ | ۰/۶۶±۰/۱۰ | ۷۸۸±۸۴ C | ۲۵±۱/۵ | ۹۶۷±۱۲۲ A | ۹۵±۹/۳ D | ۲/۴±۰/۰۹ |
| O | ۳۰۹±۶۲۷ | ۴۷۲±۳۵ | ۰/۶۶±۰/۰۶ | ۱۱۶۳±۱۱۵ B | ۳۲±۰/۹۸ | ۸۶۴±۶۲ B | ۱۲۲±۱۱/۷ C | ۳۲/۶±۴/۲ |
| H | ۳۰۷±۲۳ | ۵۰۸±۵۹ | ۰/۶۱±۰/۰۸ | ۱۰۹۹±۸۴ B | ۳۴±۲/۳ | ۹۴۲±۴۵ AB | ۱۱۶±۱۱/۲ C | ۳۳/۷±۵/۹ |
| میانگین | ۲۸۴ | ۴۴۵ | ۰/۶۴ | ۱۰۱۷ | ۳۱ | ۹۲۴/۶ | ۱۱۰ | ۲۳ |
| تلقیح شده (B+) | | | | | | | | |
| -P | ۲۵۶±۲۶ | ۴۰۶±۴۶ | ۰/۶۴±۰/۰۶ | ۸۹۴±۷۰ C | ۲۶±۲/۰ | ۸۷۱±۷۷ AB | ۱۵۴±۱۸/۳ B | ۱۹/۸±۵/۶ |
| O | ۳۳۶±۲۳ | ۵۰۶±۵۱ | ۰/۶۷±۰/۰۸ | ۱۵۹۵±۱۰۸ A | ۳۶±۱/۲ | ۷۱۷±۸۳ C | ۲۱۵±۱۷/۷ A | ۴۴/۴±۴/۴ |
| H | ۳۵۱±۲۴ | ۵۳۰±۵۱ | ۰/۶۶±۰/۰۳ | ۱۵۳۵±۸۵ A | ۳۹±۲/۲ | ۷۱۵±۴۲ C | ۲۰۲±۱۹/۷ A | ۴۳/۱±۴/۰ |
| میانگین | ۳۱۵ | ۴۸۰ | ۰/۶۵ | ۱۳۴۲ | ۳۳ | ۷۶۸/۰ | ۱۹۰ | ۳۶ |
| میانگین P– | ۲۴۶B | ۳۸۴B | ۰/۶۴ | ۸۴۱ | ۲۵/۴B | ۹۲۴ | ۱۲۵ | ۱۱B |
| میانگین O | ۳۲۳A | ۴۸۹A | ۰/۶۶ | ۱۵۲۹ | ۳۴/۳A | ۷۹۱ | ۱۶۹ | ۳۸A |
| میانگین H | ۳۲۹A | ۵۱۹A | ۰/۶۳ | ۱۳۱۷ | ۳۵/۵A | ۸۲۹ | ۱۵۹ | ۳۸A |
| $LSD_{0.05}$ (گیاه) | ۲۱/۶۷ | ۴۳/۸۴ | – | ۸۵/۷۵ | ۱/۶۱۹ | ۷۱/۰۰ | | ۵/۶۸ |
| $LSD_{0.05}$ (باکتری) | ۱۷/۶۷ | ۳۵/۸ | – | ۷۰/۰۰ | ۱/۳۲۲ | ۵۸/۱۴ | – | ۴/۶۳ |
| $LSD_{0.05}$ (باکتری×گیاه) | – | – | – | ۱۲۱/۳ | – | ۱۰۰ | ۲۰ | – |

BR: تنفس پایه، SIR: تنفس ناشی از سوبسترا، CAI: شاخص قابلیت دسترسی به کربن، MBC: کربن توده زنده میکروبی، $C_{min}$: کربن معدنی شده (۴۳ روز)، $qCO_2$: ضریب متابولیکی، TPH-deg: درصد تجزیه هیدروکربن‌های نفتی، MP: جمعیت میکروب‌های تجزیه کننده هیدروکربن‌های نفتی، O: جو دوسر وحشی، H: جو زراعی، P-: بدون گیاه، حروف مشابه در هر ستون به معنی عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون LSD فیشر می‌باشد، اعداد میانگین (n=۵) به همراه انحراف استاندارد (SD) هستند.

**کربن توده زنده میکروبی و ضریب متابولیکی ($qCO_2$)**

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان داد اثرات تیمار باکتری و کشت گیاه و اثر متقابل این دو تیمار بر کربن توده زنده میکروبی معنی‌دار گردید. در عدم حضور تلقیح باکتریایی، کشت جو دوسر و جو زراعی کربن توده زنده میکروبی را به ترتیب ۴۷ و ۳۹ درصد نسبت به خاک بدون گیاه افزایش داد (جدول ۴). در شرایطی که خاک آلوده تلقیح گردید، مقدار کربن توده زنده میکروبی در کشت جو دوسر و جو زراعی به ترتیب ۷۸ و ۷۱ درصد نسبت به خاک بدون گیاه افزایش نشان داد. در خاک بدون گیاه بین میزان کربن توده زنده میکروبی خاک تلقیح شده و تلقیح نشده اختلاف معنی‌دار وجود نداشت درحالی‌که، تلقیح باکتریایی میزان کربن توده زنده میکروبی را در کشت جو دوسر و جو زراعی به ترتیب ۳۷ و ۴۰ درصد نسبت به کشت بدون تلقیح این گیاهان افزایش داد. در این حالت نیز بین دو گیاه تفاوت معنی‌دار به لحاظ تأثیر مایه تلقیح وجود نداشت (جدول ۴). افزایش توده زنده میکروبی در حضور گیاه می‌تواند به علت ترشحات ریشه، بهبود شرایط فیزیکی خاک و تهویه و افزایش قابلیت دسترسی هیدروکربن‌ها برای رشد و تکثیر سلولی باشد.

همانند کربن توده زنده میکروبی، اثرات تیمار باکتری و کشت گیاه و اثر متقابل آنها بر ضریب متابولیکی ($qCO_2$) در خاک آلوده معنی‌دار گردید (جدول ۲). در عدم تلقیح باکتریایی فقط کشت جو دوسر میزان $qCO_2$ را به طور معنی‌دار (۱۱ درصد) نسبت به خاک بدون گیاه کاهش داد و کشت جو زراعی تأثیر معنی‌دار بر این ضریب نداشت (جدول ۴). با این وجود اختلاف ضریب متابولیکی در کشت دو گیاه تحت چنین شرایطی با یکدیگر معنی‌دار نشد. در خاک تلقیح شده کشت جو دوسر و جو زراعی این ضریب را به ترتیب ۱۷ و ۱۸ درصد نسبت به خاک بدون گیاه کاهش داد و این کاهش معنی‌دار بود. در خاکی که گیاهی در آن کشت نشده بود تلقیح باکتریایی به تنهایی تأثیر معنی‌دار بر کاهش $qCO_2$ نداشت. اما میزان این ضریب در کشت جو دوسر و جو زراعی که تلقیح شده بودند نسبت به گیاهان تلقیح نشده به طور معنی‌دار به ترتیب ۱۷ و ۲۴ درصد کاهش یافت (جدول ۴). مقادیر بالای نسبت تنفس ویژه میکروبی نشان دهنده بالا بودن شرایط تنش برای ریزجانداران است و این موجودات تحت این شرایط بایستی کربن و انرژی بیشتری را صرف حفظ و نگهداری توده خود نمایند در صورتی که مقادیر پایین این نسبت حاکی از سهل الوصول بودن منابع غذایی و نیز عدم وجود ترکیبات سمی و بازدارنده برای فعالیت ریزجانداران در محیط می‌باشد (۴۱). در واقع $qCO_2$ راندمان مصرف کربن سوبسترا را منعکس می‌نماید و افزایش $qCO_2$ نشان دهنده پایین بودن راندمان جذب و یا مصرف سوبسترا توسط ریزجانداران ساکن خاک می‌باشد (۴۱). این شاخص مبین آن است که باکتری‌ها جمعیت غالب ریزجانداران را تشکیل می‌دهند، زیرا این گروه عموماً راندمان پایین تری در جذب کربن در مقایسه با جمعیت قارچی خاک دارند. یک اکوسیستم بالغ تنفس کمتری در واحد توده زنده میکروبی دارد، زیرا در آن کربن کمتری صرف تولید انرژی و متابولیسم سلولی خواهد گردید و قسمت اعظم آن به مصرف بیوسنتز سلولی خواهد رسید (۳۲). نتایج نشان داد بیشترین میزان کربن بیوماس میکروبی و کمترین $qCO_2$ در تیمارهای کشت شده که مایه تلقیح دریافت کرده بودند، مشاهده گردید. در بین تیمارهای مختلف خاک آلوده میزان تنفس پایه در تیمارهای جو دوسر و جو زراعی که مایه تلقیح دریافت کرده بودند به ترتیب ۱/۴۳ و ۱/۵ برابر نسبت به تیمار بدون گیاه که تلقیح نشده بود افزایش نشان داد در حالی‌که میزان کربن توده زنده میکروبی در این دو تیمار تقریباً دو برابر گردید. بنابراین کاهش شاخص $qCO_2$ در این دو تیمار می‌تواند ناشی از افزایش کربن توده زنده میکروبی باشد. به عبارت دیگر کشت گیاه به همراه تلقیح میکروبی باعث افزایش کربن توده زنده میکروبی در خاک و به دنبال آن کاهش $qCO_2$ میکروبی گردید. در واقع نتایج تنفس پایه و کربن توده زنده میکروبی نشان می‌دهد که آنچه باعث کاهش $qCO_2$ در تعدادی از تیمارها شده‌است تنفس کمتر نیست بلکه تولید توده زنده میکروبی بیشتر می‌باشد. فرانکو و همکاران (۱۴) گزارش دادند در خاک‌های چمنزار شاخص $qCO_2$ کمتر از انتی‌سول‌ها بود و این خاک‌ها از لحاظ خود اصلاحی از خاک‌های انتی‌سولی قوی‌تر عمل نمایند. نتایج این بررسی و سایر پژوهش‌ها ثابت می‌نماید که به طور کلی خاک تحت کشت گراس‌ها در تجزیه آلودگی نفتی قابلیت خود اصلاحی بیشتری خواهند داشت (۱۴).

بین میزان TPH تجزیه شده و کربن توده زنده میکروبی در انتهای آزمایش همبستگی مثبت و معنی‌دار وجود داشت. قطعاً یکی از شرایط اولیه و لازم برای تجزیه هیدروکربن‌ها کافی بودن توده زنده میکروبی برای تجزیه این ترکیبات می‌باشد (۳۷). مارجزین و همکاران (۳۱) پیشنهاد داده‌اند که شاخص هایی مانند کربن توده زنده میکروبی با تجزیه هیدروکربن‌ها در خاک همبستگی مثبت دارد. به گزارش فرانکو و همکاران (۱۴) مقادیر هیدروکربن‌های نفتی تجزیه شده با توده زنده میکروبی اولیه خاک همبستگی ضعیف اما با توده زنده میکروبی درانتهای آزمایش همبستگی لگاریتمی خوبی نشان داد و شاخص متابولیکی یا $qCO_2$ با تجزیه TPH همبستگی نداشت. اما در تحقیق حاضر همبستگی بین شاخص $qCO_2$ و میزان تجزیه TPH تجزیه شده در پایان آزمایش بالا و معنی‌دار بود ($r=-0/80$، $P<0/001$). بر خلاف این نتایج، برخی از محققین مانند لابود و همکاران (۲۶) نشان دادند نفت خام توده زنده میکروبی را کاهش می‌دهد که به سابقه آلودگی مرتبط خواهد بود. در مجموع می‌توان گفت که کشت گیاه به تنهایی و همراه با تلقیح میکروبی باعث افزایش توده زنده میکروبی و به دنبال آن افزایش بیشتر تجزیه

ترکیبات نفتی و کاهش $qCO_2$ خاک گردید.

### جمعیت باکتری‌های تجزیه کننده نفت در خاک گلدان‌ها

اثرات تلقیح باکتریایی و کشت گیاه و اثر متقابل آنها بر جمعیت میکروبی تجزیه کننده نفت خام در خاک آلوده معنی‌دار بود (جدول ۳). به طور طبیعی جمعیت این دسته از باکتری‌ها در خاک آلوده در حدود ۹۵ سلول در هر میلی‌گرم خاک شمارش شد. در خاک آلوده بدون گیاه اضافه نمودن مایه تلقیح به خاک جمعیت این دسته از باکتری‌ها را حدود ۶۲ درصد افزایش داد (جدول ۴). این یافته می‌تواند تأیید فیزیولوژیکی برای حضور و زنده ماندن باکتری‌های مایه تلقیح در این خاک‌ها پس از گذشت تقریباً ۴ ماه تلقیح اولیه و گویای اهمیت و نقش تلقیح باکتریایی در افزایش جمعیت تجزیه کننده‌ها در خاک‌های آلوده باشد. در این تحقیق تلاش شد با افزودن مایه تلقیح حاوی باکتری‌های بومی تجزیه کننده نفت این جمعیت در خاک افزایش داده شود که مقایسه این جمعیت با جمعیت تجزیه کننده‌ها در خاک تلقیح نشده ظاهراً موفقیت آمیز بودن این افزایش جمعیت را ۴ ماه پس از تلقیح تأیید نمود. در خاک‌های تلقیح نشده کشت جو دوسر و جو زراعی جمعیت این گروه را به ترتیب ۲۸ و ۲۲ درصد نسبت به خاک بدون گیاه افزایش داد که این افزایش معنی‌دار بود ولی بین دو گیاه تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد. در خاک‌های تلقیح شده جمعیت این دسته از باکتری‌ها در کشت جو دوسر و جو زراعی به ترتیب ۳۹/۶ و ۳۱ درصد نسبت به خاک بدون گیاه افزایش نشان داد و این افزایش معنی‌دار بود. در این شرایط نیز بین دو گیاه تفاوت معنی‌دار مشاهده نگردید. جمعیت این گروه از باکتری‌ها در کشت جو دوسر و جو زراعی که تلقیح شده بودند به ترتیب ۷۶ و ۷۴ درصد نسبت به گیاهان تلقیح نشده افزایش نشان داد. البته بیشتر بودن جمعیت تجزیه کننده نفت خام نمی‌تواند دلیلی بر بیشتر بودن کل جمعیت میکروبی خاک یا جمعیت هتروتروفیک خاک باشد. کشت گیاه در خاک آلوده هر چند باعث افزایش جمعیت باکتری‌های تجزیه کننده نفت گردید اما در صورت تلقیح این جمعیت، افزایش بیشتری خواهد یافت. به علاوه سویه‌های کارا در ترکیب مایه تلقیح گونه‌هایی با قابلیت تجزیه کنندگی بالا بودند که می‌توانند در پناه ریشه گیاه تکثیر شوند، لذا به موازات کشت گیاه لزوم تلقیح جدایه‌های کارا در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی احساس می‌گردد. شمار جمعیت تجزیه کننده‌ها در خاک تحت کشت دو گیاه در حالت تلقیح شده و تلقیح نشده با یکدیگر تفاوت نداشت. این پاسخ ممکن است به این علت باشد که هر دو گیاه جزء خانواده پوآسه بوده و احتمالاً دارای ترشحات ریشه با ترکیبات مشابه بوده و از طرف دیگر دارای خصوصیات ریشه‌ای یکسانی هستند. تلقیح میکروبی در کنار کشت گیاه باعث افزایش این دسته از باکتری‌ها نسبت به دیگر تیمارها گردید که این رویداد می‌تواند تأیید کننده این فرضیه باشد که باکتری‌های مایه تلقیح می‌توانند در عدم حضور هر گونه کودهای آلی در پناه ریشه گیاه رشد و تکثیر شوند. قطعاً هوادهی ریشه، ترشحات ریشه و توزیع میکروب‌ها در خاک به همراه ریشه گیاه به استقرار بهتر این باکتری‌ها در خاک کمک نموده به خصوص اینکه گروهی از این باکتری‌ها همیاری با ریشه گیاه و سکونت در ناحیه ریزوسفر را ترجیح می‌دهند. اسکالنت و همکاران (۱۱) نیز گزارش دادند تعداد باکتری‌ها و قارچ‌های ریزوسفری در یک خاک آلوده به نفت در تیمارهای کشت شده بیشتر از خاک بدون گیاه بود. این افزایش جمعیت ناشی از کشت هم در گلدان‌های تلقیح شده و هم در گلدان‌های تلقیح نشده بیشتر از خاک فاقد گیاه بود. جمعیت باکتری‌های تجزیه کننده هیدروکربن‌های نفتی نیز در خاک غیر ریزوسفری تلقیح شده از خاک ریزوسفری تلقیح نشده کمتر بود اما بین گیاهان تلقیح شده و تلقیح نشده تفاوت وجود نداشت. اما به عقیده این پژوهشگران ریشه گیاه جمعیت این دسته از باکتری‌ها را بیش از افزودن مایه تلقیح افزایش خواهد داد. بر خلاف این نتایج در تحقیق حاضر افزودن مایه تلقیح بیش از کشت گیاه جمعیت این گروه را افزایش داد، با این حال میزان تجزیه آلاینده‌ها در حضور گیاه بیشتر بود. نیکولز و همکاران (۳۶) تعداد تجزیه کننده‌های بیشتری را در خاک ناحیه ریزوسفر خاک آلوده نسبت به خاک کشت نشده گزارش نمودند. در تحقیق حاضر نیز جمعیت تجزیه کننده هیدروکربن‌های نفتی تحت کشت جو زراعی و جو دوسر تلقیح نشده به ترتیب ۲۲ و ۲۸ درصد بیشتر از خاک بدون گیاه بود. در حالی که اضافه نمودن مایه تلقیح به تنهایی این جمعیت را ۶۲ درصد افزایش داد و در کشت توام با تلقیح، جمعیت در کشت جو دوسر و جو زراعی به ترتیب ۴۰ و ۳۱ درصد بیشتر از خاک تلقیح شده بدون گیاه بود. چانگ و همکاران (۶) گزارش دادند افزایش جمعیت تجزیه کننده‌های هیدروکربن‌ها با تولید $CO_2$ و تجزیه TPH همبستگی دارد. در بررسی حاضر نیز همبستگی بین جمعیت تجزیه کننده‌ها و تولید $CO_2$ تجمعی معنی‌دار و ضریب همبستگی در حدود ۰/۶۴ ($P$=۰/۰۰۱) بود. همچنین همبستگی معنی‌دار و مثبت ($r$=۰/۷۴، $P$=۰/۰۰۱) بین جمعیت تجزیه کننده‌های هیدروکربن‌های نفتی و میزان TPH تجزیه شده مشاهده شد.

### میزان TPH تجزیه شده

اثرات تیمار باکتری و کشت گیاه بر درصد تجزیه TPH در خاک معنی‌دار گردید (جدول ۳). تلقیح باکتری میزان تجزیه TPH را ۵۶/۵ درصد نسبت به خاک‌های تلقیح نشده افزایش داد. کشت گیاه نیز ۲۴۵ درصد میزان تجزیه را نسبت به خاک‌های بدون گیاه افزایش داد اما بین دو گیاه تفاوت معنی‌دار وجود نداشت (جدول ۴). پس از گذشت ۴ ماه میزان تجزیه TPH خاکی که هیچ تیماری دریافت

نکرده بود به طور طبیعی فقط ۲/۴ درصد بود و افزودن مایه تلقیح به تنهایی میزان تجزیه را به ۱۹/۸ درصد ارتقاء داد (۸/۲۵ برابر). اما به دلیل بالا بودن میزان تغییرات (انحراف استاندارد) داخل تیمارها، در جدول تجزیه واریانس اثرات متقابل معنی‌دار نشد (جدول ۴). در خاک‌های تلقیح نشده، میزان تجزیه TPH بر اثر کشت جو دوسر و جو زراعی به طور متوسط از ۲/۴ به ۳۲ درصد رسید (۱۳/۴ برابر) ولی در خاک تلقیح شده، میزان TPH تجزیه شده بر اثر کشت دو گیاه مذکور از ۱۹/۸ درصد به ترتیب به ۴۴/۴ و ۴۳/۱ درصد افزایش پیدا کرد (۲/۳ برابر). اگر چه جمعیت تجزیه کننده‌های هیدروکربن‌های نفتی در خاک‌های تلقیح شده بیشتر از خاک‌های تلقیح نشده بود و همبستگی مثبت و معنی‌دار بین میزان TPH تجزیه شده و جمعیت تجزیه کننده‌ها وجود داشت (جدول ۵) ولی میزان TPH تجزیه شده در خاکی که فقط گیاه داشت از خاکی که فقط مایه تلقیح دریافت کرده بود، بیشتر بود. با چنین مشاهداتی شاید بتوان پیشنهاد کرد که بالا بودن جمعیت این دسته از باکتری‌ها در خاک با آلودگی مسن شرط لازم، ولی کافی برای تجزیه هیدروکربن‌ها نمی‌باشد (۳۴). عوامل دیگری مانند تهویه، قابلیت دسترسی هیدروکربن‌ها و وجود مواد محرک از جمله ترشحات ریشه برای مسیرهای کومتابولیسمی نیز لازم هستند تا این دسته از باکتری‌ها بتوانند هیدروکربن‌ها را تجزیه نمایند و وجود اکسیژن کافی در این شرایط بسیار ضروری به نظر می‌رسد (۱۲). به عقیده مارجزین و همکاران (۳۰) کمیت یا جمعیت ریزجانداران خاک و حتی تجزیه کننده‌های هیدروکربن‌ها نمی‌تواند تعیین کننده کارایی این جمعیت‌ها باشد. مرکل و همکاران (۳۴) گزارش دادند میزان تجزیه TPH در ریشه نوعی گراس با جمعیت تجزیه کننده‌ها همبستگی نداشت. مشکل اساسی که در خاک‌هایی با آلودگی طولانی مدت و مسن وجود دارد، اتصال پایدار و محکم ترکیبات آب‌گریز هیدروکربن‌های نفتی با ذرات خاک و کلوئیدها می‌باشد که این مواد را از دسترس ریزجانداران خارج می‌سازد و یکی از عوامل محدود کننده تجزیه آلاینده‌های نفتی در خاک محسوب می گردد (۳۷). نتایج به دست آمده از روند تجزیه در خاک شاهد پس از ۴ ماه نشان می‌دهد به دنبال ایجاد وضعیت تعادل نسبی یا به اصطلاح پیر شدن آلاینده در خاک، مقدار آن به یک وضعیت نسبتاً ثابت خواهد رسید به طوری‌که تغییر محسوسی در مقدار آن مشاهده نمی‌شود زیرا آلاینده‌های فرار از خاک تبخیر، مواد سهل الوصول تجزیه و باقی‌مانده‌ها که مواد مقاوم‌تری هستند به سهولت تجزیه نشده، در خاک باقی‌مانده و پیوند محکمی با ذرات خاک برقرار نموده که هر چه بیشتر آنها را از دسترس تجزیه کننده‌ها خارج می‌سازد. به همین دلیل برخی پژوهشگران بر این باور هستند که افزایش جمعیت تجزیه کننده‌ها شرط لازم برای تخریب زیستی آلاینده‌های نفتی است، ولی شرط کافی برای تجزیه زیستی هیدروکربن‌های نفتی نیست (۳۴ و ۳۷). از طرف دیگر غیر قابل دسترس شدن ترکیبات فقط مخصوص ترکیبات مقاوم نیست و ترکیبات غیر مقاوم و آسان تجزیه پذیر نیز با جذب روی سطوح کلوئیدها در خاک و یا حبس شدن درون خاکدانه‌ها به راحتی از دسترس ریزجانداران و آنزیم‌ها خارج و در خاک پایدار می‌شوند. هنگامی که میزان تجزیه در حضور گیاه به تنهایی بیشتر از وقتی بود که خاک فقط تلقیح شده بود، به نظر می‌رسد ریشه گیاه توانسته شرایطی را در خاک فراهم آورد که منجر به تحریک روند تجزیه این ترکیبات گردد. به عقیده لیست و فلجنتریو (۲۷) ریشه گیاهان اسیدهای آروماتیک و سورفکتنت‌های فسفولیپیدی ترشح می‌نماید که مقدار آن نسبت به تولیدات میکروبی قابل توجه بوده و قادر هستند تحرک و قابلیت دسترسی زیستی ترکیبات آلاینده آلی را افزایش دهند. زیست پالایی توسط گیاه یک پیش تیمار محرک[1] مناسب برای این ترکیبات محسوب می‌گردد. هر چند نتایج این محققین توجیه مناسبی برای افزایش میزان تجزیه TPH در خاک آلوده کشت شده می‌باشد با این حال شاخص CAI در این خاک‌ها نشان داد ریشه گیاه تأثیری در افزایش قابلیت دسترسی به کربن در این خاک‌ها نداشت. به عقیده نی و همکاران (۳۵) ریشه گیاه با افزایش تنوع و جمعیت میکروبی کل و همچنین تجزیه کننده‌های هیدروکربن‌های نفتی در ناحیه ریزوسفر باعث تحریک و تشدید تجزیه این آلاینده‌ها می‌گردد. عقیده این محققین می‌تواند افزایش راندمان استفاده از مایه تلقیح در حضور گیاه و همچنین افزایش میزان تجزیه هیدروکربن‌های نفتی را در تیمار کشت و تلقیح همزمان توجیح نماید. افزایش میزان SIR خاک‌های آلوده بر اثر کشت گیاه همچنین نشان دهنده نقش گیاه در افزایش جمعیت جوان و فعال میکروبی در این خاک‌ها می‌باشد. لذا نقش اصلی گیاه در افزایش میزان تجزیه TPH را می‌توان به تأثیر گیاه بر افزایش جمعیت و فعالیت جامعه هتروتروفی خاک نسبت داد. همچنین گیاه با بهبود وضعیت تهویه خاک، تغییر شرایط اکسیداسیون و احیاء و همچنین تغییر شرایط رطوبتی خاک در افزایش راندمان تجزیه آلاینده‌ها توسط جمعیت هتروتروفی خاک نقش مؤثری ایفا می‌نماید (۳۸ و ۳۹). با این وجود لازم است قابلیت دسترسی هیدروکربن‌های نفتی در این خاک‌ها به روش‌های خاص عصاره گیری تعیین گردد تا نقش گیاه در زمینه افزایش قابلیت دسترسی آلاینده‌ها به طور دقیق تر روشن شود. لو و همکاران (۲۹) گزارش دادند بعد از گذشت ۵ ماه ۴۷ درصد کاهش آلودگی در ریزوسفر آلوده به نفت نوعی گراس مشاهده گردید اما در در خاک فاقد گیاه فقط ۱۱ درصد بود و در پایان آزمایش تعداد باکتری‌های هتروتروف در خاک ریزوسفری ۷۲ برابر خاک بدون گیاه بود. در تحقیق حاضر نیز بیشترین میزان حذف TPH مسن در خاک پس از ۴ ماه تقریباً ۴۴ درصد بود که در خاک‌های تحت کشت و تلقیح شده مشاهده گردید

1- Priming effect

درحالی‌که در خاک بدون گیاه تلقیح نشده میزان تجزیه پس از ۴ ماه فقط ۲/۴ درصد بود. هوآنگ و همکاران (۱۸) گزارش کردند افزایش گیاه پالایی آلاینده‌های نفتی با استفاده از گونه‌های گراس که با مخلوطی از باکتری‌های مفید نظیر *Psudomonas putida*، *Enterobacter cloacea* و *Azosprillium* افزایش پیدا کرد. مطابق با یافته‌های پژوهش حاضر نیز راندمان گیاه پالایی در حضور گراس‌های خانواده پوآسه با تلقیح مخلوطی از باکتری‌های بومی به دست آمده از خاک‌های آلوده به نفت، افزایش پیدا کرد. در آزمایشی حمدی و همکاران (۱۷) گزارش دادند اضافه نمودن جمعیت‌های بومی تجزیه کننده به خاک آلوده به PAH باعث کاهش معنی‌دار این آلاینده‌ها گردید. این محققین عنوان نمودند که میکروب‌های تجزیه کننده بومی در مقایسه با گونه‌های غیر بومی در رقابت موفق‌تر عمل می‌نمایند. در یک آزمایش گیاه پالایی اسکالنت و همکاران (۱۱) گزارش دادند بیشترین میزان کاهش TPH در خاک‌های کشت شده که توسط باکتری‌های تجزیه کننده هیدروکربن‌های نفتی تلقیح شده بودند، مشاهده گردید. این میزان تجزیه TPH در حضور گیاه تلقیح شده ۲ برابر گیاه تلقیح نشده بود. در حالی‌که در تحقیق حاضر میزان تجزیه TPH در خاک کشت شده (متوسط ۳۳ درصد) با افزودن مایه تلقیح به طور متوسط به ۴۴ درصد رسید (یا ۱/۳۴ برابر گردید). این محققین همچنین عنوان کردند یک رابطه متقابل مفید بین گیاه *Cyperus laxus* و باکتری‌های تجزیه کننده هیدروکربن‌های نفتی باعث بهبود روند گیاه پالایی گردید. در واقع جامعه میکروبی ریزوسفر از گیاه حمایت می‌کند و متقابلاً گیاه از جامعه میکروبی حمایت می‌کند که یک رابطه دو طرفه مفید به وجود می‌آورد. ریزجانداران از ترشحات گیاه سود برده و در مقابل محیط ریشه را با فعالیت‌های متابولیکی خود سمیت زدایی می‌نمایند (۱۱). علاوه بر این جمعیت‌های میکروبی از طریق چرخه عناصر و انحلال برخی عناصر و همچنین تدارک ویتامین‌ها، اسیدهای آمینه و برخی هورمون‌های محرک رشد، رشد گیاه را تحریک می‌نمایند. این بر همکنش متقابل و مثبت بین گیاه و میکروب‌ها پدیده‌ای کاملاً شناخته شده در روابط خاک–گیاه است.

همان گونه که اشاره گردید میزان تجزیه TPH در خاک کشت نشده، در حضور مایه تلقیح از ۲/۴ درصد به ۱۹/۸ درصد رسید (۸/۳ برابر) و این میزان در حضور گیاه تقریباً ۳۳ درصد بود (۱۳/۷۵ برابر)، درحالی‌که در کشت توأم گیاه و تلقیح باکتریایی این میزان به ۴۴ درصد رسید که از مجموع میزان تجزیه TPH در تیمار فقط تلقیح شده و فقط کشت شده، کمتر بود. به عبارت دیگر در کشت گیاه همزمان با تلقیح باکتریایی سهم هر کدام از اجزای سیستم نسبت به حالت منفرد کاهش پیدا کرد، ولی در مجموع از هر کدام به تنهایی بیشتر بود. این پدیده می‌تواند به دلایل مختلف رخ داده باشد. از جمله می‌توان به محدودیت عناصر غذایی و رقابت بین ریزجانداران و گیاه برای منابع محدود عناصر غذایی و یا اکسیژن اشاره نمود. در این پژوهش مخلوطی از باکتری‌های تجزیه کننده نفت علاوه بر جمعیت هتروتروفیک معمول خود خاک، به خاک اضافه گردید و از هیچ عنصر غذایی در غالب کود استفاده نشد و این نکته ممکن است دلیل کاهش سهم هر یک از اجزاء سیستم در تجزیه ترکیبات باشد. آنتربرنر و همکاران (۴۲) کاهش تجزیه نفت در حضور گیاه را به رقابت بین گیاه و ریزجانداران و محدودیت عناصر به خصوص فسفر متحرک نسبت دادند. هیدروکربن‌های نفتی ترکیبات کربنه‌ای هستند که ورود آنها به خاک نسبت C/N خاک را به شدت افزایش خواهد داد و توقف نیتروژن و فسفر توسط ریزجانداران در این خاک‌ها بدیهی می‌باشد، لذا علاوه بر افزایش زیستی[1] معمولاً روش تحریک بیولوژیک[2] شامل افزایش عناصر غذایی به این خاک‌ها توصیه می‌شود (۴۳). از طرف دیگر میزان تجزیه هیدروکربن‌ها به خصوص هیدروکربن‌های مسن در خاک به قابلیت دسترسی آنها بستگی خواهد داشت. در کوتاه مدت گیاه و باکتری ممکن است به طور محدود بتوانند قابلیت دسترسی این ترکیبات را افزایش داده و محدودیت دسترسی منجر به کاهش نقش هر یک از اجراء گردد. یعنی طی مدت ۴ ماه ممکن است مقدار مشخص و محدودی از ترکیبات نفتی قابل دسترس شده باشند که ممکن است از پتانسیل تجزیه کنندگی جمعیت میکروبی کمتر باشد و تجزیه بیشتر هیدروکربن‌ها در چنین سیستمی نیاز به زمان بیشتری خواهد داشت. از طرف دیگر رقابت برای جذب عناصر غذایی مانند نیتروژن و فسفر ممکن است ادامه تجزیه این ترکیبات را متوقف سازد. به هر حال تمام این دلایل فرضیاتی است که اثبات هر کدام تحقیقات اختصاصی در آن زمینه را طلب می‌نماید.

به طور کلی نتایج به دست آمده از سیستم گیاه پالایی اجرا شده نشان داد هر چند افزودن مایه تلقیح باعث کاهش میزان آلودگی گردید ولی استفاده از مایه تلقیح در این خاک‌ها به تنهایی با توجه به هزینه‌های تهیه و تولید مایه تلقیح و با توجه به راندمان آن چندان به لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه به نظر نمی‌رسد و از آنجایی که بالاترین میزان حذف آلودگی در کشت همزمان با تلقیح مشاهده شده (۴۴ درصد) لذا ترکیب گیاه و باکتری بهترین گزینه در این پژوهش برای زیست پالایی معرفی می‌گردد. در این پژوهش از لحاظ میزان تجزیه TPH و اغلب فعالیت‌های بیولوژیک خاک بین دو گونه گیاهی اختلافی وجود نداشت، لذا انتخاب نوع گیاه به شرایط اقلیمی منطقه هدف منوط خواهد گردید.

1- Bioaugmentation
2- Biostimulation

جدول ۵- ضرایب همبستگی (r) بین پارامترهای میکروبیولوژیکی اندازه گیری شده در خاک آلوده

| پارامتر | BR | SIR | MBC | $qCO_2$ | $C_{min}$ | MP |
|---|---|---|---|---|---|---|
| SIR | ۰/۷۶*** | - | | | | |
| MBC | ۰/۹۳ *** | ۰/۷۰ *** | - | | | |
| $qCO_2$ | −۰/۴۱ * | −۰/۳۶ * | −۰/۶۱ *** | - | | |
| $C_{min}$ | ۰/۹۵ *** | ۰/۶۱ *** | ۰/۹۳ *** | −۰/۴۴* | - | |
| MP | ۰/۷۲ *** | ۰/۷۵ *** | ۰/۸۴ *** | −۰/۶۵ *** | ۰/۶۴*** | - |
| TPH | ۰/۹۴ *** | ۰/۷۹ *** | ۰/۹۱ *** | −۰/۸۰ *** | ۰/۹۳ *** | ۰/۷۴*** |

*** =۱>P<۰/۰۰۱، ** =۰/۰۱>P<۰/۰۰۱، * =۰/۰۵>P، ns = غیر معنی‌دار، n=۳۰.

BR: تنفس پایه، SIR: تنفس ناشی از سوبسترا، MBC: کربن توده زنده میکروبی، $C_{min}$: کربن معدنی شده، $qCO_2$: ضریب متابولیکی
MP: جمعیت میکروب‌های تجزیه کننده هیدروکربن‌های نفتی، TPH: درصد تجزیه هیدروکربن‌های نفتی

## نتیجه گیری

در این پژوهش استفاده از جامعه میکروبی ویژه در کنار ریشه گیاه باعث بهبود شرایط بیولوژیکی خاک برای تجزیه آلاینده‌ها گردید. افزایش تنفس میکروبی خاک، توده زنده میکروبی، کربن معدنی شده، کاهش $qCO_2$ و افزایش جمعیت تجزیه کننده‌ها در حضور ریشه گیاه، نشان دهنده افزایش فعالیت بیولوژیک خاک بر اثر کشت گیاه بود. افزایش تجزیه TPH در حضور ریشه گیاه و نتایج سایر پژوهشگران احتمال این فرضیه که گیاهان قادرند با افزایش فعالیت بیولوژیک خاک زیست پالایی را تحریک و به تجزیه زیستی کمک نمایند، را افزایش می‌دهد. در میان پارامترهای میکروبیولوژیکی خاک تقریباً همه شاخص‌ها با میزان تجزیه TPH همبستگی خوبی نشان دادند و در میان آنها تنفس پایه خاک، کربن توده زنده میکروبی و کربن معدنی شده همبستگی بسیار بالایی (بیش از ۹۰ درصد) با میزان TPH تجزیه شده نشان دادند ولی در مجموع اندازه گیری همه پارامترهای مذکور در پایش تجزیه زیستی در خاک مفید به نظر می‌رسد و لذا توصیه می‌گردد.

در کشت توام با تلقیح باکتریایی سهم اجزاء در تجزیه هیدروکربن‌ها نسبت به حالت منفرد آنها کاهش پیدا کرد که این واکنش را می‌توان به رقابت بین گیاه و باکتری‌های مایه تلقیح برای منابع موجود و آستانه دسترسی خود ترکیبات نسبت داد. افزایش جمعیت گروه‌های کربن دوست مانند گونه های *Acinetobacter* که پتانسیل بالایی در تجزیه ترکیبات نفتی دارند، رقابت برای عناصری مانند نیتروژن را افزایش داده و ممکن است منجر به توقف تجزیه هیدروکربن‌ها گردد. ولی در مجموع میزان کل TPH تجزیه شده در تیمار مخلوط کشت گیاه و تلقیح باکتریایی از میزان تجزیه در تیمارهای منفرد بیشتر بود که تا حدی فرضیه نقش باکتری‌های ریزوسفری در افزایش راندمان گیاه پالایی را ثابت می‌نماید. لیکن این فرضیه که گیاه و باکتری‌های مایه تلقیح در تجزیه نفت خام رابطه (همکاری) متقابل مثبت دارند به علت محدودیت یافته‌ها (از جمله وضعیت عناصر در پایان کشت و قابلیت دسترسی هیدروکربن‌های نفتی) رد نمی‌شود و نیاز به بررسی بیشتر خواهد داشت. به هر حال گیاه و باکتری‌ها هر کدام پتانسیل‌های قابل توجهی در افزایش و یا تحریک تجزیه هیدروکربن‌های نفتی دارند و در شرایط مناسب می‌توانند مکمل مناسبی برای یکدیگر محسوب گردند، بنابراین یک رابطه هم افزایشی بین ریزجانداران ریزوسفری و گیاه منجر به افزایش تجزیه آلودگی نفتی خاک تا بیش از ۴۰ درصد گردید. اهمیت خاص زیست پالایی در محیط ریشه در واقع به مشارکت مهم ریشه و ریزجانداران بر می‌گردد. این روابط متقابل به خصوص برای تجزیه و تخریب ترکیبات مقاوم بیشترین اهمیت را خواهد داشت. تحقیقات بیشتر برای دریافت مکانیزم‌هایی که گیاه تجزیه میکروبی هیدروکربن‌ها را افزایش می‌دهد و پیچیدگی سیستم گیاه-میکروب برای درک بهتر این پدیده ضروری است. بر اساس شواهد حاصل از مطالعات گلخانه‌ای، گیاه پالایی در کنار تجزیه میکروبی می‌تواند روشی کاربردی برای پالایش خاک‌های آلوده به نفت و ترکیبات حاصل از آن باشد.

## منابع


۱- نمازی س. ۱۳۸۹. اثرات متقابل نفت خام و شکل‌های مختلف نیتروژن بر تنفس و بیوماس میکروبی و فعالیت آنزیمی خاکهای رسی و شنی، پایان نامه کارشناسی ارشد، گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهرکرد.

2- Anderson J.P.E. 1982. Soil respiration. In: A.L. Page and R.H. Miller (Eds), Methods of Soil Analysis, Part 2:

Chemical and microbiological properties. American Society of Agronomy, Madison WI, pp.831-871.
3- Anderson T., and Domsch K.H. 1985. Maintenance carbon requirements of actively-metabolizing microbial populations under in situ conditions, Soil Biology and Biochemistry, 17:197-203.
4- Aprill W., and Sims R.C. 1990. Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil, Chemosphere, 20:253-265.
5- Chaillan F., Fleche A.L., Bury E., Phantavong Y., Grimont P., Saliot A., and Oudot J. 2004. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms, Research in Microbiology, 155:121-124.
6- Chang W., Dyen M., Spagnuolo L., Simon P., Whyte L., and Ghoshal S. 2010. Biodegradation of semi- and non-volatile petroleum hydrocarbons in aged, contaminated soils from a sub-Arctic site: Laboratory pilot-scale experiments at site temperatures, Chemosphere, 80:319-326.
7- Cheng W., Zhang Q., Coleman D.C., Carroll C.R.D., and Hoffman C.A. 1996. Is available carbon limiting microbial respiration in the rhizosphere? Soil Biology and Biochemistry, 28:1283-1288.
8- Cunningham S.D., Anderson T.A., Schwab A.P., and Hsu F.C. 1996. Phytoremediation of soil contaminated with organic pollutants, Advanced Agronomy, 56:55-114.
9- Curl E.A., and Truelove B. 1986. The Rhizosphere. Springer-Verlag, Berlin.
10- Dijkstra F.A., and Cheng W. 2007. Moisture modulates rhizosphere effects on C decomposition in two different soil types, Soil Biology and Biochemistry, 39:2264–2274.
11- Escalante E.E., Gallegos-Martınez M.E., Favela-Torres E., and Gutierrez-Rojas M. 2005. Improvement of the hydrocarbon phytoremediation rate by *Cyperus laxus* Lam. inoculated with a microbial consortium in a model system, Chemosphere, 59: 405–413.
12- Fernet J.L. 2008. Plant bacterial inoculants to remediate hydrocarbon polluted soil. Masters of Science Thesis, Department of Soil Science University of Saskatchewan.
13- Fiorenza S., Oubre C., and Ward C.H. (Eds). 2000. Phytoremediation of Hydrocarbon-Contaminated Soil. Boca Raton, Lewis Publishers.
14- Franco I., Contin M., Bragato G., and De Nobili M. 2004. Microbiological resilience of soils contaminated with crude oil, Geoderma, 121:17-30.
15- Fu S., and Cheng W. 2002. Rhizosphere priming effects on the decomposition of soil organic matter in C4 and C3 grassland soils, Plant and Soil, 238:289–294.
16- Gaskin S.E., and Bentham R.H. 2010. Rhizoremediation of hydrocarbon contaminated soil using Australian native grasses, Science of the Total Environment, 408:3683–368.
17- Hamdi H., Benzarti S., Manusadianasc L., Aoyamaa I., and Jedidi N. 2007. Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions, Soil Biology and Biochemistry, 39:1926–1935.
18- Huang X.D., El-Alawi Y., Penrose D.M., Glick B.R., and Greenberg B.M. 2004. Responses of three grass species to creosote during phytoremediation, Environmental Pollution, 130:453-463.
19- Hutchinson S.L., Banks M.K., and Schwab A.P. 2001. Phytoremediotion of aged petrodeum sludge: effect of inorganic fertilizer, Journal Environmental Quality, 30:395-403.
20- Jenkinson D.S., and Ladd J.N. 1981. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. p. 415–471. In: Paul, E.A., Ladd, J.N. (Eds). Soil Biochemistry, vol.5. M. Dekker, New York.
21- Jussila M.M. 2006. Molecular biomonitoring during rhizoremediation of oil-contaminated soil. PhD thesis. Department of applied chemistry and microbiology division of microbiology. Viikki biocenter. University of Helsinki. Finland.
22- Khan S., Hesham A.E., Qing G., Shuang L., and He J. 2009. Biodegradation of pyrene and catabolic genes in contaminated soils cultivated with *Lolium multiflorum* L, Journal of Soils Sediments, 9:482−491.
23- Kirkpatrick W.D., White P.M., Wolf J.D.C., Thoma G.J., and Reynolds C.M. 2008. Petroleum-degrading microbial numbers in rhizosphere and non-rhizosphere crude oil-contaminated soil, International Journal of Phytoremediation, 10:210–221.
24- Kuiper I., Lagendijk E.L., Bloemberg G.V., and Jugtenberg B.J.J. 2004. Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction, Molecular Plant-Microbe Interactions, 17:6-15.
25- Kuzyakov Y. 2002. Factors affecting rhizosphere priming effects, Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 165:382-296.
26- Labud V., Garcia C., and Hernandez T. 2007. Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil, Chemosphere, 66:1863–1871.
27- Liste H.H., and Felgentreu D. 2006. Crop growth, culturable bacteria, and degradation of petrol hydrocarbons (PHCs) in a long-term contaminated field soil, Applied Soil Ecology, 31:43–52.
28- Liste H.H., and Prutz I. 2006. Plant performance dioxygenase–expressing rhizosphere bacteria and biodegradation of weathered hydrocarbons in contaminated soil, Chemosphere, 62:1411–1420.
29- Lu M., Zhang Z., Sun S., Wei X., Wang Q., and Su Y. 2009. The use of goosegrass (*Eleusine indica*) to remediate

soil contaminated with petroleum. Water, Air and Soil Pollution, 209:181-189.
30- Margesin R., Hammerle1 M., and Tscherko D. 2007. Microbial activity and community composition during bioremediation of diesel-oil-contaminated soil: effects of hydrocarbon concentration, fertilizers, and incubation time, Microbial Ecology, 53:259–269.
31- Margesin R., Zimmerbauer A., and Schinner F. 2000. Monitoring of bioremediation by soil biological activities, Chemosphere, 40: 339–346.
32- Marin J.A., Hernandez T., and Garcia C. 2005. Bioremediation of oil refinery sludge by landfarming in semiarid conditions: Influence on soil microbial activity, Environmental Research, 98:185-195.
33- Mendelssohn I.A., and Lin Q. (Ed.). 2003. The development of bioremediation for oil spill cleanup in coastal wetlands. U.S. Dept. of the Interior, Minerals Management Service, Gulf of Mexico OCS Region, New Orleans, LA. OCS Study MMS 2002-048.
34- Merkl N., Schultze-Krafta R., and Arias M. 2006. Effect of the tropical grass *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf on microbial population and activity in petroleum-contaminated soil, Microbiological Research, 161:80-91.
35- Nie M., Zhang X., Wang J., Jiang L., Yang J., Quan Z., Cui Q., Fang C., and Li B. 2009. Rhizosphere effects on soil bacterial abundance and diversity in the Yellow River Deltaic ecosystem as influenced by petroleum contamination and soil salinization, Soil Biology and Biochemistry, 41:2535–2542.
36- Nichols T.D., Wolf D.C., Rogers H.B., Beyrouty C.A., and Reynolds C.M. 1997. Rhizosphere microbial populations in contaminated soils, Water Air and Soil Pollution, 95: 165-178.
37- Ramırez M.E., Zapien B., Zegarra H.G., Rojas N.G., and Fernandez L.C. 2009. Assessment of hydrocarbon biodegradability in clayed and weathered polluted soils, International Biodeterioration and Biodegradation, 63:347-353.
38- Riffaldi R., Cardelli R., Palumbo S., Levi-Minzi R., and Saviozzi A. 2006. Soil biological activities during hydrocarbon degradation of a diesel contaminated soil in the presence of surfactant, Revista Brasileira Ciência do Solo, 50:77-88.
39- Robertson S.J., McGill W.B., Massicotte H.B., and Rutherford P.M. 2007. Petroleum hydrocarbon contamination in boreal forest soils: a mycorrhizal ecosystems perspective, Biology Review, 82:213–240.
40- Smits P.E. 2005. Phytoremediation. Annual Reviews, Plant Biology, 56:15–39.
41- Suman A., Lal M., Singh A.K., and Gaur A. 2006. Microbial biomass turnover in Indian subtropical soils under different sugarvane intercropping systems, Agronomy Journal, 98:698-704.
42- Unterbrunner R., Wieshammer G., Hollender U., Felderer B., Wieshammer-Zivkovic M., Puschenreiter M., and Wenzel W.W. 2007. Plant and fertiliser effects on rhizodegradation of crude oil in two soils with different nutrient status, Plant Soil, 300:117−126.
43- US EPA. 1986. Method 3540C. Non–volatile and semi–volatile organic compounds wwwepagov.

Journal of Water and Soil
Vol. 26, No.4, Sept.-Oct. 2012, p. 908-921

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۶، شماره ۴، مهر – آبان ۱۳۹۱، ص. ۹۲۱-۹۰۸

# The Bioremediation of an Aged Petroleum-Contaminated Soil Using Bioaugmentation and Phytoremediation Thecniques

**S. Rajaei[1*]- F. Raiesi[2]- S.M. Seyedi[3]**

Received: 27-6-2011
Accepted: 29-4-2012

## Abstract

The contamination of ecosystem components with petroleum and its derivatives is considered as one of the most crucial environmental threat in Iran, particularly in southern areas. Bioremediation has frequently been regarded as an appropriate and more practical alternative to clean-up petroleum hydrocarbons in the contaminated environments. Bioremediation optimizes conditions for microbial hydrocarbon degradation and uses the microorganisms and plants potential to metabolize contaminants resulting in their removal or attenuation in situ. This study aims at remedying an aged petroleum-contaminated soil using bioaugmentation and phytoremediation techniques. A consortium has been prepared using oil-degrading bacteria; 10% oil-contaminated soil was then inoculated with the consortium. Additionally, oat and/or barley were planted in certain treatments to separately evaluate the effects of plant-bacteria interaction on Total Petroleum Hydrocarbon (TPH) degradation and inoculum's efficiency. TPH degradation value under unplanted and uninoculated conditions was only 2.4% in the studied petroleum -contaminated soil after 4 months. However, the presence of the two plants elevated TPH degradation up to 30%, and bacterial inoculation resulted in only 20% TPH degradation. The significance of the plants in enhancing TPH degradation could be probably explained by promoting microbial populations, growth and activities. The highest amount of TPH degradation recorded was 44% and was observed with inoculated plants. The presence of plants in petroleum-contaminated soils promoted microbial populations and activities with increased microbial respiration and biomass well developed petroleum-degrading microbial population and decreased microbial metabolic quotient ($qCO_2$), hence, increased biodegrading of hydrocarbons.

**Keywords**: Petroleum degrading bacteria, Wild oat, Barley, Phytoremediation

1,2- PhD Graduate and Professor of Soil Science Department, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Iran
(*-Corresponding Author Email: rajaee_sd@yahoo.com)
3- Assistant Professor, Department of Plant Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, (NIGEB)