نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۰، شماره ۴، مهر – آبان ۱۳۹۵، ص. ۱۲۳۱-۱۲۱۹

Journal of Water and Soil
Vol. 30, No. 4, Sept.-Oct. 2016, p. 1219-1231

بررسی مقایسه‌ای اثر آلودگی نفت خام بر روی جمعیت میکروبی خاک جنگل و خاک صنعتی

نسرین انصاری[۱]- مهدی حسن شاهیان[۲*]- سید محمدرضا خوشرو[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۵/۱۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۹/۲۲

چکیده

هیدروکربن‌های نفتی آلاینده‌های گسترده‌ای هستند که از طریق انتقال نفت خام، نگهداری، حوادث نشت نفتی و فرآیندهای تصفیه در پالایشگاه‌ها وارد خاک می‌گردند. آلودگی نفتی دارای اثرات اکولوژیکی بر روی خاک می‌باشد بطوری‌که ترکیب و تنوع جامعه میکروبی را بر هم زده و اثراتی نیز بر روی فعالیت ریزجانداران و آنزیم‌های خاک دارد. در این تحقیق جهت مطالعه اثر نفت خام بر روی جمعیت میکروبی خاک، دو نوع خاک متفاوت شامل خاک‌های صنعتی (مجاور تأسیسات نفتی و پتروشیمی شیراز) و جنگل تهیه و نمونه‌برداری شد و شش نوع میکروکازم طراحی گردید. هر خاک دارای سه میکروکازم با شرایط متفاوت شامل بدون آلودگی، آلوده به نفت و آلوده به نفت همراه با مواد غذایی نیتروژن و فسفر بود. شاخص‌هایی همچون جمعیت باکتری‌های هتروتروف، جمعیت باکتری‌های تجزیه کننده، آنزیم دهیدروژناز و میزان تجزیه نفت در مورد هر میکروکازم در یک دوره زمانی ۱۲۰ روزه بطور جداگانه سنجش گردید. نتایج این تحقیق نشان داد که بالاترین میزان باکتری‌های هتروتروف مربوط به خاک جنگل با ارزش ۸×۱۰^{۸} می‌باشد. بطور کلی تعداد باکتری‌های تجزیه کننده در خاک‌ها بطور قابل توجهی کمتر از تعداد کل باکتری‌های هتروتروف در خاک‌ها بود. کمیت باکتری‌های تجزیه کننده تا روز ۶۰ آزمایش بصورت کاهشی و پس از آن تا انتهای آزمایش افزایش داشت. در بین سه نوع مختلف میکروکازم، میکروکازم آلوده به نفت همراه با افزودن منابع نیتروژن و فسفر بالاترین فعالیت آنزیمی دهیدروژناز را دارد. از لحاظ تجزیه زیستی نفت خام در خاک، بیشترین میزان تجزیه مربوط به خاک در میکروکازم صنعتی (۹۵ ٪) بود. تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که یک ارتباط معنی‌دار بین تعداد کل باکتری‌های هتروتروف که با روش MPN سنجیده شده با سایر شاخص‌های مورد بررسی وجود دارد. با بکارگیری نتایج حاصله از این تحقیق می‌توان بر حسب نوع خاک راهکارهای مناسبی جهت احیای زیستی آن‌ها پیشنهاد نمود.

واژه‌های کلیدی: آلودگی، تجزیه زیستی، خاک، میکروکازم، نفت خام

مقدمه

ایران یکی از کشورهای نفت خیز جهان است که هر سال مقدار زیادی نفت از نقاط جنوبی آن استخراج و در مناطق دیگر پالایش می‌شود. رها شدن نفت در خاک به هنگام استخراج، حمل و پالایش سبب آلودگی خاک و در نتیجه محیط زیست می‌شود. آلودگی نفتی سبب از بین رفتن پوشش و تنوع گیاهی و جانوری خاک می‌شود. از طرف دیگر گسترش آلودگی و انتقال آن از طریق شستشو با آب باران موجب آلوده شدن مناطق کشاورزی وآب‌های زیرزمینی می‌گردد. حذف آلودگی‌های نفتی از خاک همواره از مهمترین مسائل سازمان محیط زیست کشور است. برای کاهش آلودگی‌های نفتی از خاک روش‌های شیمیایی، فیزیکی و زیستی پیشنهاد شده است. روش‌های فیزیکی و شیمیایی از روش‌های پرهزینه و گران بوده که معمولا برای خاک‌هایی که آلودگی شدید دارند پیشنهاد می‌شوند، در حالی‌که روش زیستی از روش‌های ارزان و مناسب برای کاهش آلودگی‌های نفتی خاک است. در میان روش‌های زیستی، استفاده از باکتری‌ها در حذف آلودگی بازدهی بسیار خوبی دارد و مورد مطالعه فراوان قرار گرفته است (۴، ۶، ۷، ۱۲ و ۱۶).

آنزیم‌های خارج سلولی و فعالیت آنها در حذف آلودگی‌ها از محیط زیست نقش مهمی را ایفا می‌کنند تعداد زیادی از باکتری‌ها و قارچ‌ها قادر به تجزیه زیستی آلاینده‌های نفتی هستند. این ارگانیسم‌ها به طور گسترده‌ای در اکوسیستم‌های آبی و خاکی پراکنده‌اند (۵، ۸ و ۱۴). ریزجانداران از مهمترین عوامل تجزیه کننده هیدروکربن‌های نفتی بوده و عملکرد آن‌ها تحت تأثیر عوامل محیطی می‌باشد. آلودگی خاک به مواد نفتی در کشورهایی که تولیدکننده نفت هستند از اهمیت بیشتری برخوردار است. بنابرین با رو به کاهش رفتن منابع پایه

۱- کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرمان، ایران
۲- دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: hasanshahi@gmail.com)
۳- استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرمان، ایران

تلاش‌های تحقیقاتی هماهنگ به منظور کاهش عوارض جانبی اثرات ناشی از آلودگی در حال حاضر بیش از هر زمان دیگری لازم است (۲۲). تاکنون مطالعات زیادی در خصوص اثر آلاینده‌ها بر روی خاک انجام شده است که در اینجا به برخی از آن‌ها اشاره می‌شود. Labud و همکاران در سال ۲۰۰۷ اثرات انواع آلودگی‌های هیدروکربنی از قبیل گازوییل، بنزین و نفت خام را در دو نوع خاک شنی و رسی تعیین کردند. طبق این مطالعات بیشترین اثر منفی در خاک‌های شنی آلوده به بنزین مشاهده شد و بنزین دارای اثر مهاری بیشتری نسبت به گازوییل و نفت خام بر فعالیت هیدرولاز دارد همچنین خاک‌ها با مواد آلی بالاتر و مقدار رس کمتر توسط این نوع آلاینده‌ها تحت تأثیر قرار می‌گیرند . این مطالعه نیز نشان داد میکروبیولوژی خاک و پارامترهای بیوشیمیایی ممکن است ابزار مفیدی باشند برای ارزیابی اثر آلودگی هیدروکربنی بر سلامت خاک هستند (۱۵). در سال ۲۰۱۰ Leahy و Colwell با اندازه‌گیری فعالیت میکروبی در رسوبات آلوده به نفت به وسیله آنزیم دهیدروژناز به این نتیجه رسیدند که روش‌های سنجش آنزیم دهیدروژناز در خاک و فاضلاب آلوده به عنوان شاخص اندازه‌گیری کل از شدت متابولیسم میکروبی بیش از روش‌های کشت ترجیح داده شده است (۱۶). Ramakrishnant و همکاران در سال ۲۰۱۱ اثر مخلوطی از آلودگی‌های زیست محیطی بر روی ریزجانداران و فعالیت آن‌ها را بررسی کردند و نتیجه بدست آمده نشان داد پاسخ بیولوژیکی به آلاینده‌ها متنوع و متفاوت است و حساسیت موجودات زنده نسبت به یک ماده متفاوت است و حساسیت نسبی به مدت زمان و سطح قرار گرفتن در معرض آلاینده بستگی دارد (۲۲).

از آنجائی‌که درک اثرات آلودگی نفتی بر روی جمعیت میکروبی اکوسیستم خاک از لحاظ طراحی استراتژی‌های تجزیه زیستی در مناطق آلوده حایز اهمیت است و با توجه به اینکه در خاک‌های ایران از منابع گوناگون تاکنون بطور دقیق کار مشخصی در خصوص فهم اثرات آلودگی بر روی آنها انجام نشده است بنابراین این کار از این لحاظ دارای نوآوری بوده و جدید است. هدف از این تحقیق مطالعه مقایسه‌ای پاسخ جمعیت میکروبی دو نوع خاک متفاوت به آلودگی با نفت خام می‌باشد. برای رسیدن به این هدف در این تحقیق شاخص‌های میکروبی و بیوشیمیایی جهت درک دقیق اثر سنجیده شدند و از طرفی با آنالیز آماری معنی‌دار بودن اثرات آلودگی نیز مشخص گردید.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

نمونه‌برداری تحت شرایط استریل انجام شد. منطقه جنگل قائم واقع در ۴۰ کیلومتری شیراز جهت نمونه‌برداری خاک جنگل انتخاب شد و خاک مجاور تأسیسات نفتی و پتروشیمی شیراز نیز بعنوان خاک صنعتی جمع‌آوری گردید. عمق نمونه‌برداری ده سانتی‌متر و تعداد نمونه‌ها از هر خاک ۳ نمونه بود بطوری‌که ابتدا ۱۰ سانتی‌متر از سطح خاک برداشته شد و حدود ۳ کیلوگرم از خاک داخل ظروف استریل ریخته شد. نمونه‌های خاک تا انتقال به آزمایشگاه روی یخ نگهداری شدند و سپس در دمای ^{o}C ۴ تا انجام آزمایشات بعدی قرار داده شدند (۱).

طراحی میکروکازم‌ها

میکروکازم به محیط کوچک آزمایشگاهی گفته می‌شود که شرایط مورد آزمایش در آن طراحی می‌شود (۱۶). سه میکروکازم برای هر نوع خاک در ظروف شیشه‌ای با مشخصات cm ۵۰ طول، cm ۱۰ عمق و cm ۲۵ عرض جهت مطالعه تغییرات در جوامع میکروبی طراحی گردید. هر میکروکازم حاوی ۵۰۰ گرم خاک بود. میکروکازم‌ها درسه حالت میکروکازم خاک غیر آلوده[1](با نام اختصاری N)، میکروکازم خاک آلوده به نفت خام[2](با نام اختصاری P) و میکروکازم خاک آلوده به نفت همراه با افزودن مواد غذایی[3](با نام اختصاری NP) طراحی شدند. منظور از مواد غذایی منبع نیتروژن با افزودن نمک $(NH_4)_2SO_4$ با غلظت یک میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک و منبع فسفر با افزودن نمک KH_2PO_4 با غلظت نیم میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک می‌باشد. میکروکازم‌ها در تاریکی و دمای $^{\circ}C$ ۲۵ به مدت ۱۲۰ روز انکوبه شدند. در فواصل زمانی هر دو روز یکبار خاک در میکروکازم‌ها با دست به هم خوردند تا شرایط بی‌هوازی ایجاد نگردد. در زمان‌های صفر، ۳۰ روز، ۶۰ روز، ۹۰ روز و ۱۲۰ روز نمونه‌گیری از میکروکازم‌ها انجام شد (۱۳).

شمارش تعداد کل هتروتروف‌ها و تجزیه کننده‌ها در خاک با روش سریال رقت (CFU[4])

ابتدا ۱۰ گرم از خاک‌های هر میکروکازم در ۱۰۰ میلی‌لیتر از بافر فسفات نمکی (PBS[5]) حل شد. سپس درون لوله‌های آزمایش میزان ۹ میلی لیتر بافر PBS ریخته شد. برای شمارش هتروتروف ها رقت 10^{-5} و 10^{-6} در لوله های آزمایش تهیه گردید و ۱۰۰ میکرولیتر از این رقت در پلیت های نوترینت آگار کشت سفره ای داده شد. برای شمارش تجزیه کننده‌ها رقت 10^{-3} و 10^{-2} تهیه شد و ۱۰۰ میکرولیتر از این رقت در پلیت‌های بوشنل هاس آگار حاوی ۱٪ نفت خام به عنوان تنها منبع کربن کشت سفره‌ای داده شد. پس از

1- Non pollutant
2- Polluted soil
3- Nutrient polluted soil
4- Colony forming unit
5- Phosphate Buffer Saline

انکوباسیون در دمای $30^{o}C$، شمارش کلنی‌ها انجام شد و طبق فرمول زیر تعداد کلنی در هر گرم خاک محاسبه شد (۲۱).

× عکس رقت × میانگین تعداد کلنی‌های شمارش = تعداد باکتری بر هر گرم خاک 100 شده

شمارش تعداد کل هتروتروف‌ها و تجزیه کننده‌ها در خاک با روش MPN[1]

برای شمارش با روش MPN از پروتکل Wrenn و همکاران (۲۶) استفاده شد بدین صورت که ابتدا ۱۰ گرم از خاک‌های آلوده در ۱۰۰ میلی‌لیتر از بافر فسفات نمکی (PBS) حل شد. سپس درون لوله‌های آزمایش میزان ۹ میلی‌لیتر بافر PBS ریخته شد. برای شمارش هتروتروف‌ها رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-5} در لوله‌های آزمایش تهیه گردید و در میکروپلیت‌های ۲۴ خانه میزان ۱۵۰۰ میکرولیتر محیط نوترینت براث تحت شرایط استریل ریخته شد. از رقت‌های 10^{-3} تا 10^{-5} تهیه شده، میزان ۱۰۰ میکرولیتر درون محیط کشت تلقیح گردید. برای شمارش تجزیه کننده‌ها رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-3} در در لوله‌های آزمایش تهیه گردید و در میکروپلیت‌های ۲۴ خانه میزان ۱۵۰۰ میکرولیتر محیط بوشنل هاس براث حاوی ۱٪ نفت خام به عنوان تنها منبع کربن، تحت شرایط استریل ریخته شد. از رقت‌های تهیه شده، میزان ۱۰۰ میکرولیتر درون محیط کشت تلقیح گردید. هر رقت دارای ۳ تکرار بود و MPN به صورت ۳ تایی انجام شد. میکروپلیت‌های جهت شمارش هتروتروف‌ها به مدت ۷ روز و میکروپلیت‌های جهت شمارش تجزیه کننده‌ها به مدت ۲۱ روز در دمای $30^{o}C$ انکوبه شدند و پس از گذشت دوره انکوباسیون، ایجاد کدورت در مقایسه با شاهد به عنوان شاخص مثبت آزمایش MPN به حساب آمد و با استفاده از نرم‌افزار MPN calculator version 23 تعداد باکتری‌ها در هر گرم خاک محاسبه گردید (۲۶).

سنجش میزان نفت باقیمانده در خاک

۵ گرم از هر خاک داخل ارلن ریخته و ۲۰ سی‌سی دی‌کلرو متان به آن اضافه شد. ۲ سی‌سی از محلول رویی برداشته با دستگاه اسپکتروفوتومتر قدرت جذب آن در طول موج ۴۲۰ نانومتر خوانده شد و از رابطه زیر جهت محاسبه درصد حذف نفت خام استفاده شد (۲۱).

۱۰۰ × میزان جذب شاهد / میزان جذب نمونه – میزان جذب شاهد = درصد حذف نفت خام

سنجش آنزیم دهیدروژناز در خاک

روش سنجش آنزیم

۵ گرم خاک با ۵ سی‌سی محلول TTC[2] با غلظت ۱ درصد حل شده در بافر تریس HCl با غلظت ۰/۱ mol/l در درون لوله آزمایش شیشه‌ای دربدار مخلوط نموده و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید سپس به میزان ۴۰ میلی‌لیتر استون سرد به لوله‌ها اضافه نموده به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد پس از عبور مخلوط از کاغذ صافی میزان جذب نمونه در طول موج ۴۸۵ نانومتر تعیین گردید (۳).

روش تحلیل آماری داده‌ها

نتایج حاصله از کلیه شاخص‌های مورد بررسی در میکروکازم‌های مورد مطالعه در طی زمان‌های مختلف انکوباسیون همراه با سه تکرار وارد نرم‌افزار SPSS شد و مورد تجزیه و تحلیل آماری از نظر ارتباط بین شاخص‌های مختلف در هر میکروکازم قرار گرفت. آزمون آماری بکار رفته آزمون دانکن با سطح معنی‌داری ۰/۰۵ درصد می‌باشد.

نتایج و بحث

خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک‌های مورد بررسی

با ارسال نمونه‌های خاک به آزمایشگاه آب و خاک مرکز تحقیقات کشاورزی شیراز برخی از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن‌ها و همین طور بافت خاک مشخص گردید. نتایج حاصله در جدول ۱ آمده است. همانطور که در جدول دیده می‌شود خاک صنعتی مورد مطالعه بالاترین میزان رس را دارد. بیشترین کربن آلی مربوط به خاک جنگل می‌باشد.

نتایج حاصله از شمارش باکتری‌های هتروتروف به روش سریال رقت در خاک‌های مورد بررسی

کلیه خاک‌های مورد تیمار از لحاظ تغییر در جمعیت باکتری‌های هتروتروف با روش سریال رقت مورد بررسی قرار گرفتند. همانطور که در شکل (۱) نشان داده شده است با گذشت زمان تیمار از زمان صفر تا زمان ۱۲۰ روز در خاک جنگل سیر کاهشی در باکتری‌های هتروتروف مشاهده می‌شود اما در خاک صنعتی وضعیت بگونه دیگری است بطوری‌که تعداد باکتری‌های هتروتروف تا تیمار روز شصتم سیر کاهشی و پس از آن سیر افزایشی دیده می‌شود. البته این نکته در اینجا بایستی ذکر شود که این حالت تنها برای خاک صنعتی دارای آلودگی نفتی مشاهده گردید و بقیه حالت‌ها این الگو را نداشتند. بالاترین میزان باکتری‌های هتروتروف مربوط به خاک جنگل با ارزش ۸×۱۰^{۸} می‌باشد.

نتایج حاصله از شمارش باکتری‌های تجزیه کننده به روش سریال رقت در خاک‌های مورد بررسی

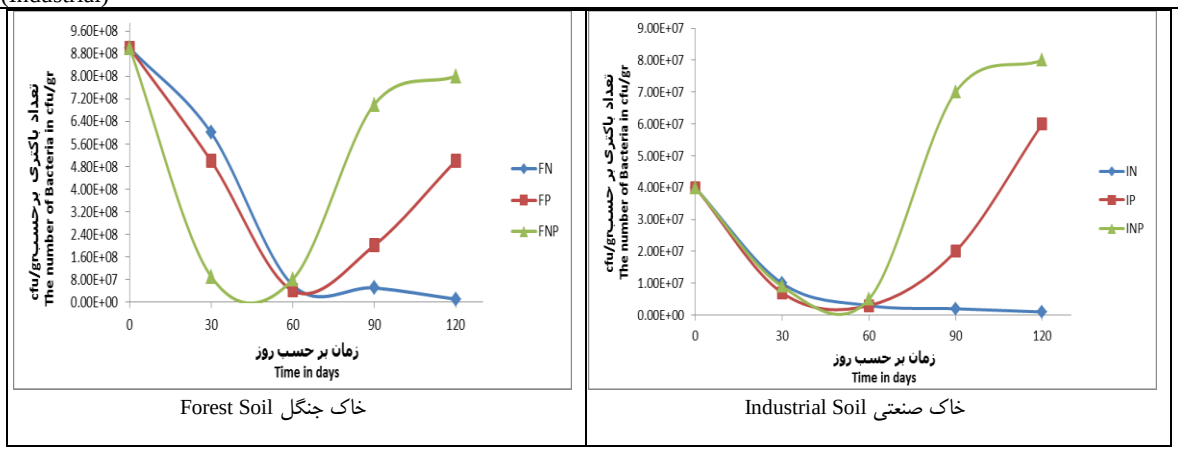
1- Most Probable Number
2- Triphenyl Tetrazolium Choloride

کربن و انرژی شمارش گردیدند. نتایج حاصله از این تعیین کمیت در شکل (۲) آمده است. با توجه به آنچه که در نمودارها دیده می‌شود تعداد باکتری‌های تجزیه کننده در خاک‌ها در حالات آلودگی و مواد غذایی همراه با آلودگی سیر کاهشی تا روز شصتم تیمار داشته است اما بعد از این زمان تعداد باکتری‌های تجزیه کننده سیر افزایشی به خود گرفته است. در مورد خاک‌هایی که بدون آلودگی نفتی بودند سیر کاهشی پس از روز شصتم نیز ادامه یافته است.

جدول ۱- برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک‌های مورد مطالعه

Table 1- Some physicochemical properties of studied soils

نوع خاک Type of Soil	هدایت الکتریکی EC (ohm^{1})	اسیدیته pH	کربن آلی Organic Carbon	فسفر $PO4^{2-}$	پتاسیم K	شن Sand (%)	سیلت Silt (%)	رس Clay (%)
جنگل (Forest)	4.3	7.8	0.58	8	43	66	22	12
صنعتی (Industrial)	1.2	7.9	0.45	6	22	42	36	22

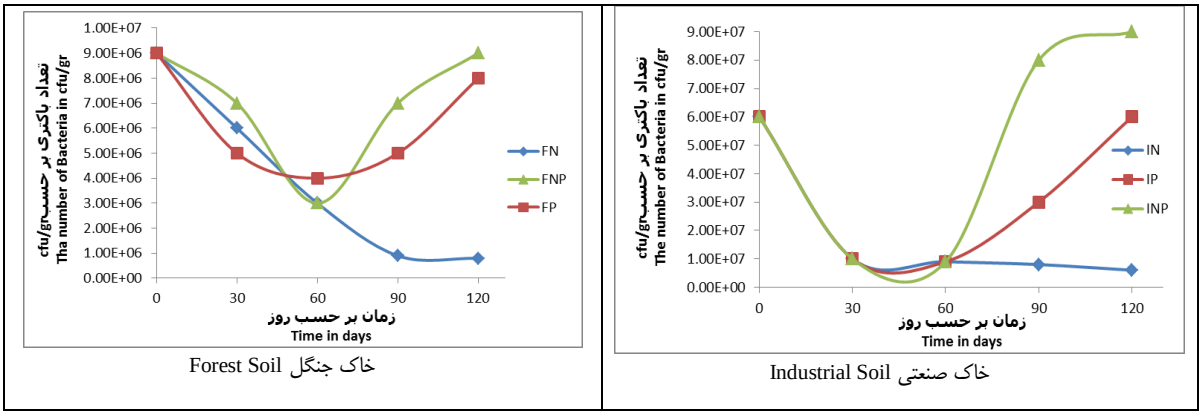


خاک جنگل Forest Soil — خاک صنعتی Industrial Soil

شکل ۱- تعداد باکتری‌های هتروتروف در خاک صنعتی و جنگل در زمان‌های مختلف

Figure 1- Number of heterotrophic bacteria in the soil forest and industries at different time

بالاترین میزان باکتری‌های تجزیه کننده نفت خام مربوط به خاک صنعتی با ارزش ۹×۱۰^{۷} می‌باشد. اما بطور کلی تعداد باکتری‌های تجزیه کننده در کلیه خاک‌ها بطور قابل توجهی کمتر از تعداد کل باکتری‌های هتروتروف می‌باشد. البته این نتیجه نیز قابل انتظار است زیرا باکتری‌های تجزیه کننده تنها از نفت استفاده می‌کنند اما باکتری‌های هتروتروف از منابع کربن دیگری نیز می‌توانند استفاده کنند.



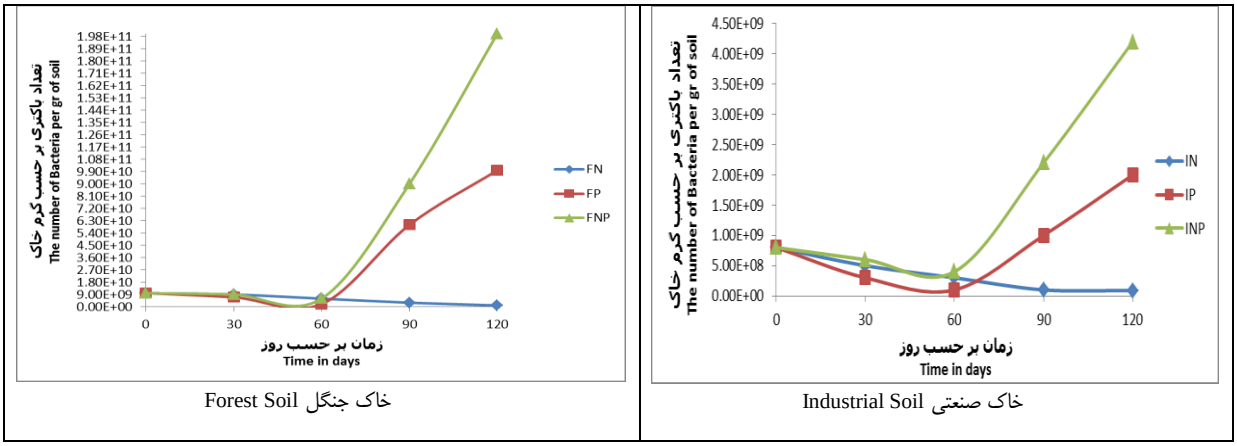
خاک جنگل Forest Soil — خاک صنعتی Industrial Soil

شکل ۲- تعداد باکتری‌های تجزیه کننده در خاک صنعتی و جنگل در زمان‌های مختلف

Figure 2- Number of degrading bacteria in soil forest and industries at different times

کمیت حداکثر احتمالی (MPN) باکتری‌های هتروتروف در میکروکازم‌های مورد مطالعه

تعداد باکتری‌های قابل کشت و غیر قابل کشت خاک را می‌توان با روش MPN مشخص نمود. لذا برای درک بهتر اثر آلودگی بر روی جمعیت میکروبی خاک‌ها این سنجش اجرا گردید. نتایج حاصل از تعیین کمیت باکتری‌های هتروتروف با این روش در شکل (۳) آمده است. از این نمودارها این طور می‌توان نتیجه گرفت که در دو میکروکازم آلوده در خاک‌ها سیر نزولی و کاهشی در تعداد باکتری‌های هتروتروف تا روز شصتم دیده می‌شود اما بعد از این مدت سیر کمیت باکتری‌های هتروتروف بصورت افزایشی است. البته در میکروکازم غیر آلوده این سیر کاهشی پس از روز شصتم ادامه می‌یابد. بالاترین کمیت حداکثر احتمالی باکتری‌های هتروتروف مربوط به خاک جنگل با ارزش $۱,۹ \times ۱۰^{۱۱}$ می‌باشد. چنانچه نتایج MPN باکتری‌های هتروتروف را با نتایج حاصله از روش سریال رقت مقایسه کنیم به این نتیجه خواهیم رسید که ارزش عددی حاصله از MPN بسیار بالاتر از روش سریال رقت می‌باشد. این نتیجه بدیهی است زیرا روش MPN هر دو باکتری قابل کشت و غیر قابل کشت را می‌سنجد ولی روش سریال رقت تنها باکتری‌های قابل کشت را شمارش می‌کند و لذا ارزش عددی آن پایین‌تر است. نتیجه دیگری که از این مقایسه می‌توان بدست آورد این است که در روش سریال رقت سیر بطور کلی در مورد باکتری‌های هتروتروف کاهشی بود (بجز خاک صنعتی) اما در روش کمیت MPN سیر در مورد همه خاک‌ها از روز ۶۰ به بعد افزایشی است. این امر را می‌توان به باکتری‌های غیرقابل کشتی که در روش سریال رقت محاسبه نمی‌شوند ولی در MPN محاسبه می‌گردند نسبت داد (۲۷).

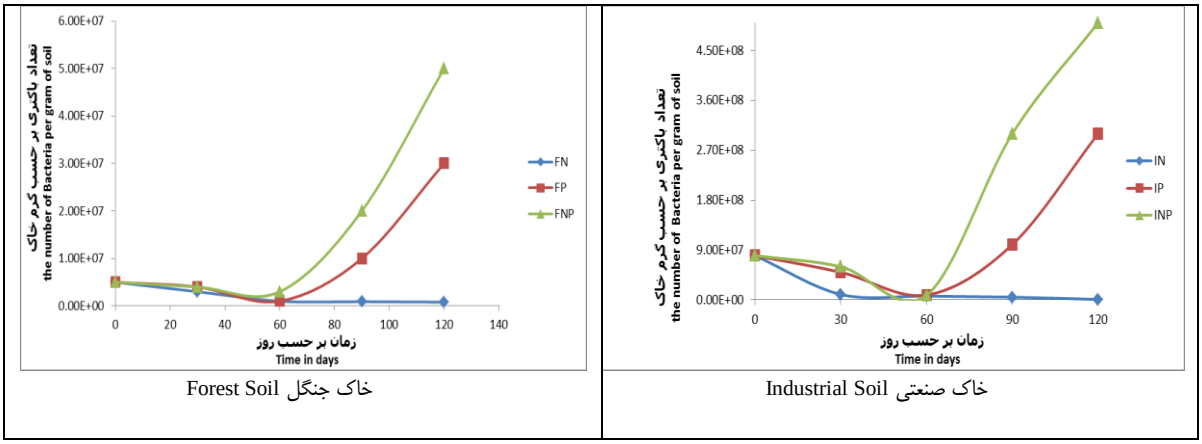


شکل ۳- کمیت MPN باکتری‌های هتروترف در خاک صنعتی و جنگل در زمان‌های مختلف

Figure 3- MPN quantity of heterotrophic bacteria in soil industrial and forest at different times

شمارش بیشترین احتمال (MPN) باکتری‌های تجزیه کننده در میکروکازم‌های مورد مطالعه

با استفاده از نفت خام بعنوان منبع کربن و کدورت بعنوان شاخص مثبت کمیت باکتری‌های تجزیه کننده نفت خام شامل باکتری‌های قابل کشت و غیرقابل کشت در میکروکازم‌های مورد بررسی معین گردید. نتایج حاصله در شکل (۴) آمده است. همانطور که در نمودارها دیده می‌شود تا روز ۶۰ سیر کمیت باکتری‌های تجزیه کننده بصورت کاهشی و پس از آن افزایشی است. این الگو را می‌توان به اثر سمی نفت و تطابق باکتری‌ها پس از گذشت زمان نسبت داد. بطوری‌که ابتدا نفت اثر سمی بر روی جامعه میکروبی خاک وارد می‌کند و باکتری‌ها پس از گذشت ۶۰ روز با نفت خام موجود در خاک تطابق پیدا کرده و توانایی استفاده از آنر پیدا می‌کنند و پس از این روز بر کمیت باکتری‌های تجزیه کننده افزوده می‌شود. اما نکته قابل توجه دیگری که از نمودارها بدست می‌آید بالا بودن تعداد باکتری‌های تجزیه کننده نفت خام در میکروکازم حالت آلوده و همراه با مواد غذایی نسبت به سایر میکروکازم‌ها در خاک‌ها می‌باشد. این امر امکانپذیر است زیرا حضور مواد غذایی استرس نفتی و فقر غذایی را بر روی جامعه میکروبی کاهش داده و کمیت باکتری‌های تجزیه کننده دچار تغییر نمی‌شود. بالاترین کمیت حداکثر احتمالی باکتری‌های تجزیه کننده مربوط به خاک صنعتی با ارزش $۴/۵ \times ۱۰^{۸}$ می‌باشد.



خاک جنگل Forest Soil

خاک صنعتی Industrial Soil

شکل ٤- کمیت MPN باکتری‌های تجزیه کننده در خاک صنعتی و جنگل در زمان‌های مختلف

Figure 4- MPN quantity degrading bacteria in soil forest and industries at different times

فعالیت آنزیم دهیدروژناز در میکروکازم‌های مورد مطالعه

سنجش فعالیت برخی از آنزیم‌ها در میکروکازم‌ها می‌تواند اطلاعات مفیدی در خصوص فعالیت باکتری‌ها و جامعه میکروبی در آن‌ها ارایه کند. به همین منظور فعالیت آنزیم دهیدروژناز که در مطالعات اکولوژیکی تجزیه زیستی واجد اهمیت است، مورد بررسی قرار گرفت. آنزیم دهیدروژناز جزء آنزیم‌های اکسیدو روداکتاز می‌باشد که در بخشی از زنجیره تنفسی سلول‌های میکروبی واقع شده است. این آنزیم ترکیبات آلی را بوسیله انتقال جفت الکترون از سوبسترا به NADP اکسیده می‌کند. این آنزیم یک اندیکاتور مفید برای شدت کلی متابولیسم میکروبی است زیرا آنزیمی درون سلولی بوده که پس از مرگ سلولی سریعا از بین می‌رود. نتایج حاصل از سنجش آنزیمی در شکل (۵) آمده است. همانطور که در شکل دیده می‌شود در میکروکازم غیرآلوده در خاک‌های مورد بررسی، آنزیم دهیدروژناز دارای سطح یکنواختی از فعالیت با یک شیب ملایم رو به افزایش می‌باشد. در دو نوع میکروکازم آلوده الگو به نحو دیگری است بطوری‌که پس از ایجاد آلودگی یک کاهش قابل توجه در فعالیت آنزیمی دیده می‌شود که بصورت سقوط در منحنی در روز ۳۰ آزمایش دیده می‌شود. اما پس از آن فعالیت آنزیم رو به افزایش بوده است که به بالاترین فعالیت خود در روز ۱۲۰ رسیده است. در بین سه نوع مختلف میکروکازم، میکروکازم آلوده به نفت همراه با افزودن منابع نیتروژن و فسفر بالاترین فعالیت آنزیمی دهیدروژناز را دارد. این امر را می‌توان به اثر کمکی مواد غذایی افزودنی بر افزایش عملکرد باکتری‌ها و فعالیت آنزیمی در باکتری‌های فعال نسبت داد. آنزیم دهیدروژناز بیشترین فعالیت خود را در خاک جنگل با ارزش ۰/۵۵ در روز ۱۲۰ داراست.

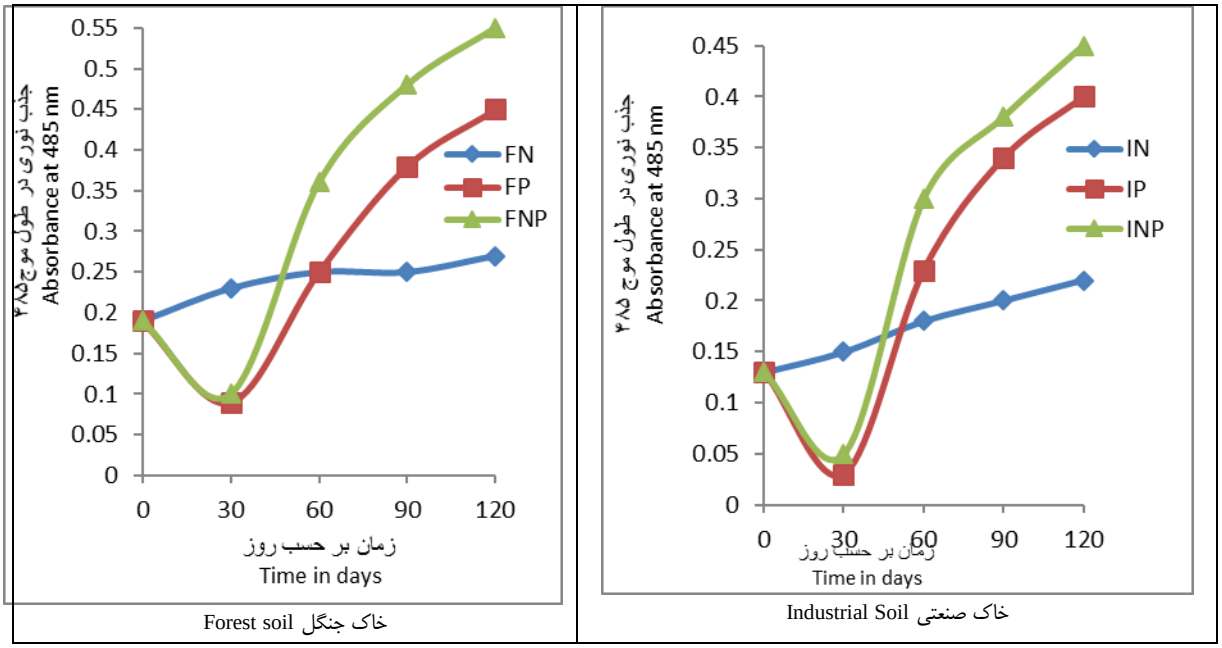
میزان تجزیه نفت خام در میکروکازم‌های مورد مطالعه

یکی از شاخص‌های مهم در مطالعات میکروکازم خاک سنجش میزان حذف نفت خام در طول زمان انکوباسیون می‌باشد. به همین منظور میزان تجزیه نفت خام در طول زمان انکوباسیون با استخراج نفت باقیمانده محاسبه گردید. نتایج حاصله در نمودار شکل (۶) آمده است. همانطور که در این شکل نشان داده شده است، با پیش رفتن زمان انکوباسیون میزان تجزیه نفت در همه میکروکازم‌ها الگوی افزایشی دارد بطوری‌که کمترین میزان تجزیه در روز صفر آزمایش و بیشترین میزان در روز انتهای آزمایش (روز ۱۲۰) دیده می‌شود. اما این الگو و میزان تجزیه در همه میکروکازم‌ها یکسان نیست. بیشترین تجزیه مربوط به خاک در میکروکازم صنعتی (۹۵ ٪) می‌باشد. اما حالات مختلف میکروکازم‌ها نیز با یکدیگر تفاوت دارند بطوری‌که میکروکازم‌ها در حالت غیرآلوده را اگر در نظر نگیریم چون در واقع نفتی وارد این خاک نشده که بخواهد تجزیه شود و به همین علت در نمودارها بالاترین درصد تجزیه را به خود اختصاص داده است. اما بالاترین درصد واقعی تجزیه مربوط به میکروکازم آلوده همراه با مواد غذایی می‌باشد و نوعی تأییدکننده نتایج شرح داده شده در قبل می‌باشد و با فعالیت آنزیمی و تعداد باکتری‌ها همخوانی دارد.

تحلیل آماری داده‌ها

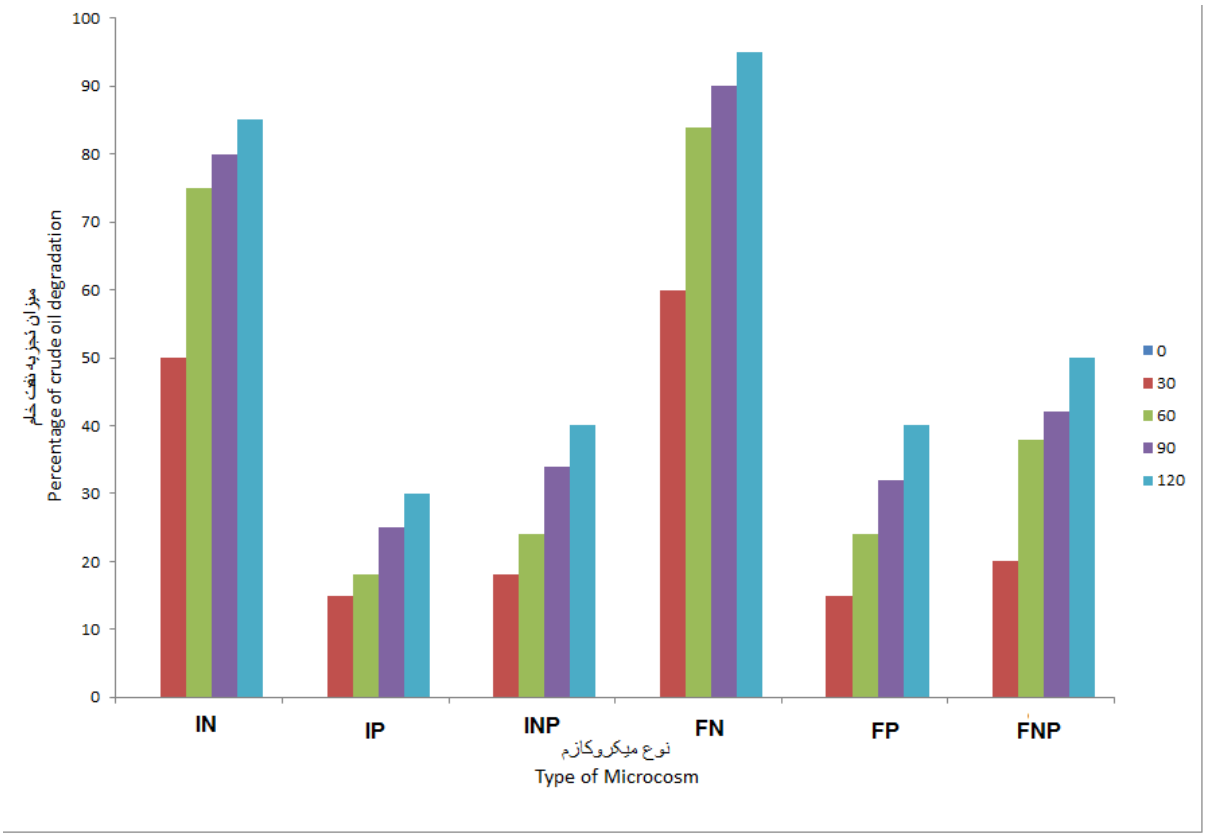
ارتباط بین شاخص‌های سنجش شده در هر میکروکازم

نتایج حاصل از تحلیل آماری ارتباط بین شاخص‌هایی که در هر میکروکازم سنجیده شد از قبیل: تعدادکل هتروتروف‌ها، تعداد کل تجزیه کننده‌ها، آنزیم و میزان تجزیه در جدول (۲) آمده است. همانطور که در جدول نشان داده شده است یک ارتباط معنی‌دار بین تعداد کل باکتری‌های هتروتروف که با روش MPN سنجیده شده با سایر شاخص‌های مورد بررسی وجود دارد. سایر شاخص‌های مورد بررسی با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند.



شکل ۵- فعالیت آنزیم دهیدروژناز در خاک صنعتی و جنگل در زمان‌های مختلف

Figure 5- Dehydrogenase enzyme activity in the soil forest and industries at different times



شکل ٦- میزان تجزیه نفت خام در میکروکازم‌های مورد بررسی

Figure 6- Degradation of crude oil in studied microcosms

جدول ۲- رابطه بین شاخص‌های مختلف در هر میکروکازم

Table 2- The relationship between the various indicators in each Microcosm

Factor Assay Duncan$_{a,b}$	N میانگین	1 سطح معنی‌داری اول	2 سطح معنی‌داری دوم
Enzyme آنزیم	1.80E+02	2.16E-01	
Degradation تجزیه	1.80E+02	4.69E+01	
CFU Degrader تعداد تجزیه کننده‌ها	1.80E+02	1.01E+07	
MPN Degrader حداکثر احتمالی تجزیه کننده‌ها	1.80E+02	2.90E+07	
CFU Heterotroph تعداد هتروترف‌ها	1.80E+02	1.60E+08	
MPN Heterotroph حداکثر احتمالی هتروتروف-ها	1.80E+02		9.91E+09
Sig. سطح معنی‌داری		8.05E-01	1.00E+00

اثر زمان‌های مختلف نمونه‌برداری بر شاخص‌های مورد بررسی

تأثیر زمان‌های مختلف انکوباسیون بر روی شاخص‌های سنجش و بخصوص میزان تجزیه نفت با تحلیل آماری آزمون دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ درصد در جدول (۳) آمده است. این جدول نشان می‌دهد که زمان‌های ۹۰ و ۱۲۰ روز آزمایش با سایر زمان‌ها (۰، ۳۰ و ۶۰) دارای اختلاف معنی‌دار هستند. یعنی اینکه شاخص‌های سنجش شده در این دو زمان با سایر زمان‌های نمونه‌برداری تفاوت معنی‌داری دارند. البته شاخص‌ها در زمان‌های صفر، ۳۰ و ۶۰ تفاوت معنی‌داری ندارند. این امر نشان تغییرات عمده در جمعیت میکروبی پس از گذشت ۶۰ روز از ایجاد آلودگی نفتی صورت می‌گیرد. این نتیجه با اصل تطابق جمعیت میکروبی که در قسمت‌های قبلی شرح داده شد، همخوانی دارد.

جدول ۳- اثر زمان انکوباسیون بر روی شاخص‌های سنجش شده در میکروکازم

Table 3- The effect of incubation time on the measures indicators in Microcosms

Day روز تیمار	N میانگین	Subset سطح معنی‌داری		
		1	2	3
0 Day زمان صفر	2.16E+02	2.44E+08		
30 Day زمان سی	2.16E+02	4.32E+08		
60 Day زمان شصت	2.16E+02	6.40E+08		
90 Day زمان نود	2.16E+02		2.47E+09	
120 Day زمان ۱۲۰	2.16E+02			4.63E+09
Sig.		4.69E-01	1.00E+00	1.00E+00

بحث

میکروکازم‌های حاوی خاک صنعتی

خاک‌های صنعتی بدلیل وجود آلودگی با مشتقات نفتی و فلزات سنگین دارای کربن آلی نسبتا بالایی هستند. اما این میزان کربن آلی بالا برخلاف خاک مزرعه و جنگل منشاء طبیعی ندارد و در واقع منشاء آن پلیمرهای نفتی است و به همین دلیل قابل تجزیه و استفاده برای همه میکروارگانیسم‌های موجود در خاک نیست (۲۷). نتایج حاصل از شمارش باکتری‌های هتروتروف و تجزیه کننده در میکروکازم صنعتی در این تحقیق نشان داد که از لحاظ کمیت باکتری‌های هتروتروف خاک صنعتی در درجه سوم و از لحاظ باکتری‌های تجزیه کننده در درجه اول در بین ۲ میکروکازم مورد مطالعه قرار می‌گیرد. این نتیجه نشان می‌دهد که با وجود بار آلی بالا در این خاک کمیت باکتری‌های هتروتروف پایین است ولی کمیت باکتری تجزیه کننده بالا است. بنابراین مشتقات نفتی موجود در این نوع خاک ها باعث می شوند که باکتری های حساس از بین رفته و باکتری هایی که توانایی تجزیه این تر کیبات را دارند انتخاب شوند و بر کل جمعیت میکروبی غلبه پیدا کنند. (۲۷).

پاسخ میکروکازم خاک صنعتی به آلودگی نفتی بدین صورت بود که آلودگی نفتی روی این میکروکازم در مقایسه با سایر میکروکازم‌ها کمترین اثر را داشت. بطوری‌که در همه میکروکازم‌ها تعداد

باکتری‌های هتروتروف پس از ایجاد آلودگی سیر کاهشی داشت اما در میکروکازم خاک صنعتی پس از روز ۶۰ الگو بصورت افزایشی بود. از طرف دیگر بالاترین کمیت باکتری‌های تجزیه کننده نیز در این خاک گزارش گردید. این نتایج موید این حقیقت است که بدلیل وجود آلاینده‌های قبلی در خاک صنعتی جمعیت میکروبی این خاک به نوعی گزینش یافته است، بعبارت دیگر این آلودگی مزمن در خاک صنعتی باعث از بین رفتن گروه‌های میکروبی حساس و انتخاب شدن باکتری‌های مقاوم به آلاینده شده است. به همین دلیل نیز پس از ایجاد آلودگی نفتی تأثیرپذیری کمتری خواهند داشت (۲۵).

نتایج این تحقیق نشان داد که بالاترین میزان تجزیه نفت خام در این میکروکازم صورت گرفته است. این نتیجه با بالاتر بودن کمیت باکتری‌های تجزیه کننده تطابق و همخوانی دارد. بنابراین بهترین نوع خاک جهت جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده آلاینده‌ها و کاربرد آن‌ها جهت احیای زیستی خاک صنعتی می‌باشد. محققین متعددی نیز اثرات آلاینده‌ها را روی خاک صنعتی بررسی نموده و باکتری‌های بسیار مطلوبی را از آن‌ها جداسازی نمودند در ادامه به چند مورد از آن‌ها اشاره می شود.

Li و همکاران (۲۰۰۷) یک آزمایش ۱۱۰ روزه جهت سنجش پاسخ آنزیم‌های خاک و ساختار جامعه میکروبی خاک صنعتی به مقادیر متفاوت نفت خام طراحی کردند. هدف آن‌ها این بود که آیا می‌توان از خصوصیات بیوشیمیایی و بیولوژیکی مشخصی بعنوان یک اندیکاتور قابل اعتماد جهت ارزیابی اثرات آلودگی نفتی بر روی خاک استفاده نمود؟ نتایج آن‌ها نشان داد که وقتی میزان mg/kg ۱۰۰۰ نفت خام به خاک وارد می‌شود، رشد باکتری‌های هتروتروف هوازی را تحریک کرده و فعالیت آنزیم‌هایی همچون دهیدروژناز، پلی فنل اکسیداز و اوره‌آز را افزایش می‌دهد (۱۸).

Delille و همکاران (۲۰۰۰) با تلقیح آلودگی نفتی بر روی خاک یک ناحیه صنعتی در بلژیک به این نتیجه رسیدند که برخلاف محیط‌های غیرآلوده افزایش قابل توجهی از باکتری‌های تجزیه کننده هیدروکربن در همه مطالعات بدست آمد و وارد کردن نفت بداخل این محیط منجر به افزایش تجزیه کننده‌ها در روزهای کمی می‌شود. پس از ۳ ماه از آلودگی هر دو شاخص نفت باقیمانده و تجزیه زیستی در مکان‌های مختلف خاک با هم فرق داشتند بنابراین پارامترهای بیولوژیکی و شیمیایی بازگو کننده قابلیت‌های تجزیه زیستی در مکان‌های متفاوت هستند (۹).

میکروکازم‌های حاوی خاک جنگل

جنگل‌ها از اکوسیستم‌های بسیار غنی از لحاظ کربن آلی می‌باشند. بالاترین میزان کربن آلی در خاک میکروکازم جنگل در این تحقیق گزارش گردید. مواد هوموس خاک در خاک جنگل به دلیل ورود مواد گیاهی و فعالیت میکروب‌های ریزوسفر در سطح بالایی قرار دارند (۱۷). بالاترین کمیت باکتری‌های هتروتروف که هم با روش MPN و هم با روش سریال رقت شمارش گردید مربوط به این میکروکازم بود. همین نتیجه تایید کننده فراوان بودن مواد کربنی و همچنین قابل استفاده بودن آن برای جمعیت میکروبی خاک است.

پاسخ میکروکازم خاک جنگل پس از ایجاد آلودگی نفتی در این تحقیق جالب توجه بود. کاهش در تعداد باکتری‌های هتروتروف مشابه سایر میکروکازم‌ها در این میکروکازم نیز مشاهده گردید اما شدت کاهش در مرتبه دوم قرار داشت. اما باکتری‌های تجزیه کننده نیز در این خاک پس از ایجاد آلودگی از کمیت مناسبی برخوردار بودند بطوری‌که جایگاه دوم را پس از خاک صنعتی به خود اختصاص دادند. این نتیجه بیانگر تطابق سریع جامعه میکروبی هتروتروف در این خاک نسبت به وجود آلاینده‌های نفتی است. البته وجود ماده کربنی آلی بالا ونقش حمایتی آن برای باکتری‌ها در اینجا قابل توجه است.

بالاترین میزان فعالیت آنزیم دهیدروژناز در این میکروکازم ثبت شد. بنابراین از لحاظ متابولیکی بهترین فعالیت را این خاک دارد و به همین دلیل بالاترین میزان تجزیه نفت پس از خاک صنعتی در این میکروکازم صورت گرفته است. خاک جنگل می تواند از لحاظ بررسی آلودگی واجد اهمیت باشد بطوریکه می توانید در فرایندهای احیای زیستی به روش تحریک زیستی به عنوان تحریک جمعیت میکروبی خاک هایی که شدت آلودگی بالایی دارند از این نوع خاک استفاده نمود زیرا هوموس موجود در این نوع خاک می تواند نقش تقویتی برای جمعیت میکروبی داشته باشد (۲۹).

محققین متعددی اثر آلاینده‌های هیدروکربنی را بر روی خاک جنگل مورد مطالعه قرار داده‌اند که نتایج گزارش شده توسط آنها با نتایج بدست آمده در این تحقیق همخوانی دارد بطور مثال: Amadi و همکاران (۱۹۹۶) شاخص‌های میکروبی و خصوصیات خاک جنگل‌های بارانی در نیجریه را ۱۷ سال پس از وقوع یک حادثه نفتی با روش‌های مولکولی بررسی کردند. آن‌ها در تحقیق خود به این نتیجه رسیدند که کربن آلی خاک پس از گذشت مدتی از آلودگی نفتی کاهش یافته است و میزان فلزات سنگین در آن افزایش پیدا کرده است. گروه‌های فیلوژنتیکی میکروبی که با روش‌های مولکولی تعیین هویت شدند بیشتر متعلق به چند جنس محدود بودند که این امر بیانگر کاهش شدید در تنوع زیستی و تنوع میکروبی پس از مواجهه با آلاینده آلی است (۲).

در مطالعه دیگری Riffaldi و همکاران (۲۰۰۶) یک رابطه مثبت بین غلظت نفت باقیمانده و مقدار کربن آلی، تنفس میکروبی خاک و فعالیت آنزیم‌های لیپاز و دهیدروژناز در خاک جنگل که بطور مصنوعی به نفت آلوده شده بود مشاهده کردند (۲۳).

Mathew و همکاران (۲۰۰۱) با اندازه‌گیری فعالیت دهیدروژناز میکروارگانیسم‌های درونی خاک جنگل آلوده با هیدروکربن‌های نفتی

به این نتیجه رسیدند که این آنزیم می‌تواند اندیکاتور خوبی از فعالیت میکروبی در وقایع نشت نفتی و همچنین بررسی کارایی تیمارهای تصفیه زیستی باشد (۱۹).

اثر مواد غذایی نیتروژن و فسفر بر روی کاهش اثرات آلودگی نفتی و جمعیت میکروبی خاک

افزودن مواد غذایی به مکان‌های آلوده جهت تحریک رشد جامعه میکروبی درونی به عنوان تحریک زیستی خوانده می‌شود. تحریک زیستی و کاربرد مواد غذایی برای اهداف احیای زیستی می‌تواند به سه شکل باشد: (A) اضافه کردن مواد غذایی معدنی محلول از قبیل نیتروژن و فسفر (B) افزودن مواد آلی از قبیل استات و فومارات (C) اضافه کردن کودهای معدنی نیتروژن و فسفر که به آهستگی رها می‌شوند (۲۸).

مطالعات متعددی کارایی استفاده از تحریک زیستی بعنوان روشی جهت احیای محیط‌های دریایی و خشکی آلوده به نفت و دیگر آلاینده‌ها را اثبات نموده‌اند، اما دانش ما در خصوص اثرات این فرایندبر روی اکوسیستم های طبیعی محدود است (۱۰ و ۲۴)

Flavia و همکاران (۲۰۰۴) اثر آلودگی نفتی و تحریک زیستی را روی تنوع زیستی جامعه میکروبی خاک مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها جهت درک این اثر هم از روش‌های وابسته به کشت از قبیل شمارش تعداد هتروتروف‌ها و تجزیه کننده‌ها و هم از روش‌های مولکولی مستقل از کشت PCR-DGGE[1] استفاده نمودند. نتایج آن‌ها نشان داد که آلودگی نفتی باعث افزایش تعداد تجزیه کننده‌های هیدروکربن در خاکی می‌شود که تیمار تحریک زیستی را دریافت کرده بود. الگوی بدست آمده توسط آن‌ها در خاک با آلودگی نفتی و تحریک زیستی نشان داد که تحریک زیستی دارای اثر کاهشی روی تنوع جامعه میکروبی طبیعی است. بدین صورت که پس از گذشت ۱۵ روز از تیمار تحریک زیستی تعداد گروه‌های فیلوژنی و باندها به شدت کاهش داشت اما از روز ۱۵ تا روز ۹۰ الگوی باندی افزایش یافته و تا انتهای دوره انکوباسیون (۳۶۰ روز) ثابت باقی ماند. آن‌ها نتیجه گرفتند که افزودن مواد غذایی معدنی به خاک آلوده به نفت اثر بزرگتری روی جامعه باکتریایی نسبت به خاکی که تنها به نفت آلوده است دارد (۱۱).

در پژوهش حاضر اثر تحریک زیستی با افزودن مواد غذایی نیتروژن و فسفر روی جامعه میکروبی انواع خاک‌های آلوده به نفت در سطح میکروکازم بررسی شد. نتایج نشان داد که تحریک زیستی موجب کاهش اثرات آلودگی نفتی می‌شود. بطوری‌که در همه انواع خاک‌ها بیشترین ارزش‌های ثبت شده مربوط به میکروکازمی بود که دارای ماده غذایی نیتروژن و فسفر بوده است. بعبارت دیگر تیمار تحریک زیستی را دریافت نموده است که با نتایج بدست آمده بوسیله Flavia و همکاران (۲۰۰۴) کاملا تطابق دارد، بطوری‌که ما نیز افزایش تعداد تجزیه کننده‌ها را در میکروکازم تحریک زیستی شاهد بودیم.

نتیجه‌گیری

آلودگی خاک‌ها به آلاینده‌های نفتی امری اجتناب ناپذیر در کره زمین می‌باشد، اما آنچه اهمیت دارد شناخت دقیق این اثرات و تلاش در جهت به حداقل رساندن آن‌ها می‌باشد. در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد خاک نواحی صنعتی کمترین تأثیر را از آلودگی نفتی می‌بینند. تحلیل آماری نتایج این تحقیق نشان داد که زمان لازم برای بازگشت خاک به شرایط طبیعی ۹۰ روز می‌باشد که با سایر زمان‌ها اختلاف معنی‌داری دارد. همچنین خاک جنگل از لحاظ شاخص‌های مورد بررسی اختلاف معنی‌داری دارد. با بکارگیری نتایج حاصله از این تحقیق می‌توان بر حسب نوع خاک راهکارهای مناسبی جهت احیای زیستی آنها پیشنهاد نمود.

منابع

1- Alef K., and Nannipieri P. 1995. Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. Academic press, Londen.

2- Amadi A., Samuel D., and Anthony N. 1996. Chronic effects of oil spill on soil properties and microflora of a rainforest ecosystem in Nigeria, Water, Air, and Soil Pollution, 86: 1- 11.

3- Andreoni V., Cavalca L., Rao M. A., Nocerino G., Bernasconi S., Amico M., and Colombo L. 2004. Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils, Chemosphere, 57: 401- 412.

4- Atlas M. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective, Applied and Environmental Microbiology, 45: 180- 209.

5- Barathi S., and Vasudevan N. 2001. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from petroleum contaminated soil, Environmental International, 26: 413- 416.

6- Bragg J.R., Prince R.C., Harner E.J., and Atlas R.M. 1994. Effectiveness of bioremediation for the Exxon Valdez

1- Denaturating Gradient Gel Electrophoresis

oil spill, Nature, 368: 413- 418.
7- Carl E., and Cerniglia B. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, Biodegradation, 3: 351- 368.
8- Del Arco J.P., and De Franca F.P. 2001. Influence of oil contamination levels on hydrocarbon biodegradation in sandy sediment, Environment Pollution, 110: 515- 519.
9- Delille D., and Delille B. 2000. Field observations on the variability of crude oil impact on indigenous hydrocarbon-degrading bacteria from sub-Antarctic intertidal sediments, Marine Environmental Research, 49: 403- 417.
10- Delille D., and Coulon F. 2008. Comparative mesocosm study of biostimulation efficiency in two different oil-amended sub-Antarctic soils, Microbial Ecology, 56: 243- 252.
11- Flavia F., Evans S., Rosado G. V., Sebasti S., Renata C., Pedro L. O., and Van E. 2004. Impact of oil contamination and biostimulation on the diversity of indigenous bacterial communities in soil microcosms. FEMS Microbiology Ecology, 49: 295– 305.
12- Gianfreda L., Antonietta Rao M., Piotrowska A., Palumbo G., and Colombo C. 2004. Soil enzyme activities as affected by anthrogenicalterations: intensive agricultural practice and organic pollution, Science of the Total Environment, 341: 265- 279.
13- Ives A. R., Foufopoulos J., Klopfer E. D., Klug J. L., and Palmer T. M. 1996. Bottle or big-scale studies: how do we do ecology, Ecology, 77: 681- 685.
14- Kasai Y., Kishira H., Sasaki T., Syutsubo K., Watanabe K., and Harayama S. 2002. Predominant growth of *Alcanivorax* strains in oil-contaminated and nutrient supplemented sea water, Environmental Microbiology, 4: 141- 147.
15- 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- 1810.
16- Leahy A., and Colwell R. 2010. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment, Microbiology and Molecular Biology Review, 54: 305- 315.
17- Lenson P. 1992. Forest Soil Biology: Impossible Challenge or Open Market? Responses of Forest Ecosystems to Environmental Changes, 23: 165- 175.
18- Li Z. Y., Kravchenko I., Xu H., and Zhang C. 2007. Dynamic changes in microbial activity and community structure during biodegradation of petroleum compounds: A laboratory experiment, Journal of Environmental Science, 19: 1003– 1013.
19- Mathew M., and Obbard J. P. 2001. Optimisation of the dehydrogenase assay for measurement of indigenous microbial activity in beach sediments contaminated with petroleum, Biotechnology Letters, 23: 227– 230.
20- Okerentugba P.O., and Ezeronye O.U. 2003. Petroleum degrading potentioals of single and mixed microbial cultures isolatedfrom rivers and refinery effluents in Nigeria, African Journal of Biotechnology, 2(9): 288- 292.
21- Rahman K. S. M., Thahira-Rahman J., Lakshmanaperumalsamy P., and Banat I. M. 2004. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium, Bioresource Technology, 85: 257– 261.
22- Ramakrishnan B., Megharaj M., Venkateswarlu K., Sethunathan N., and Naidu B. 2011. Mixtures of environmental pollutants: Effects on microorganisms and their activities in soils, Environmental Contamination and Toxicology, 10: 978-1007.1, 4419- 8011.
23- Riffaldi R., Levi-minzi R., Cardelli R., Palumbo S., and Saviozzi A. 2006. Soil biological activities in monitoring the bioremediation of diesel oil-contaminated soil, Water, Air and Soil Pollution, 170: 3– 15.
24- Schafer H., Laetitia B., Claude C., Philippe L., Pierre S., Pukall E., and Gerard, M. 2001. Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms: changes in the genetic diversity of bacterial populations, FEMS Microbiology Ecology, 34: 243- 253.
25- Vandergast C. J., Whiteley A. S., and Thompson I. P. 2004. Temporal dynamics and degradation activity of a bacterial inoculums for treating waste metal working fluid, Environmental Microbiology, 6: 254- 263.
26- Wrenn B. A., and Venosa A. D. 1996. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most probable number procedure, Canadian Journal of Microbiology, 42: 252- 258.
27- Weigand, H., Totsche G., and Huwe B. 2001. PAH mobility in contaminated industrial soils: a Markov chain approach to the spatial variability of soil properties and PAH levels, Geoderma, 102: 371– 389.
28- Xu R., and Obbard J. P. 2003. Effect of nutrient amendments on indigenous hydrocarbon biodegradation in oil contaminated beach sediments, Journal of Environmental Quality, 32: 1234- 1243.
29- Zhou J., Bruns M. A., and Tiedje J. M. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition, Applied and Environmental Microbiology, 62: 316– 320.

Journal of Water and Soil
Vol. 30, No. 4, Sept.-Oct. 2016, p. 1219-1231

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۰، شماره ۴، مهر – آبان ۱۳۹۵، ص. ۱۲۳۱-۱۲۱۹

Comparative Study of Crude Oil Contamination Effect on Industrial and Forest Soil Microbial Community

N. Ansari[1]**- M. Hassanshahian***[2]**- S. M. R. Khoshroo**[3]

Received: 08-08-2015
Accepted: 14-10-2015

Introduction: Petroleum hydrocarbons are widespread pollutant that enters to soil by some pathwayssuch as: Transportation of crude oil, conservation of oil compounds, crude oil spill and treatment process on refineries. Oil pollution has some ecological effect on soil that disturbed composition and diversity of microbial community. Also this pollution has some effects on microbial activity and enzymes of soil. Forests ecosystems may be polluted with petroleum hydrocarbons via different ways such as transportation and spill of crude oil from resource of petroleum storage. Industrial soil defined as the soils that located in industrial area such as petrochemical plant, mine, chemical factories and etc. These soils always contaminated to many pollutant such as: oil, diesel and heavy metals. These pollutants have some effects on the texture of the soil and microbial community. The aim of this research is to understand the effect of oil pollution on two different soils.

Material and Methods: In order to evaluate the effect of crude oil on soil microbial community, two different soil samples were collected from industrial and forest soils. Six microcosms were designed in this experiment. Indeed each soil sample examined inthree microcosms asunpolluted microcosm, polluted microcosm, and polluted microcosm with nutrient supply of Nitrogen and PhosphorusSome factors were assayed in each microcosm during 120 days of experiment. The included study factors were: total heterotrophic bacteria, total crude oil degrading bacteria, dehydrogenase enzyme and crude oil biodegradation. For enumeration of heterotrophic bacteria nutrient agar medium was used. In this method serial dilutions were done from each soil and spread on nutrient agar medium then different colonies were counted. For enumeration of degrading bacteria Bushnel-Hass (BH) medium were used. The composition of this medium was (g/lit): 1 gr KH_2PO_4, 1gr K_2HPO_4, 0.2 gr $MgSO_4.7H_2O$, 0.02 gr $CaCl_2$, 1 gr NH_4NO_3, and two drops of $FeCl_3$ 60% , the pH was 7. The carbon source of this medium was crude oil (1%). In MPN method microplates (24 well) were utilized and turbidity was calculated as positive index.

Results and Discussion: The results of this study showed that the highest quantity of heterotrophic bacteria was related to forest soil (8×10^8). The quantities of degradative bacteria significantly were lower than heterotrophic bacteria in all soil microcosms. This result may be expected because heterotrophic bacteria can use other carbon sources instead of crude oil such as organic carbon, suger and some nutrients that exist in the soil, but degrading bacteria have some limit in the use of organic carbons and only capable to use crude oil hydrocarbons. Sothe quantity of these bacteria is lower than heterotrophic bacteria. The quantity of degradative bacteria have decrement pattern until 60^{th} day of experiment but after this day these bacteria have increment pattern. This result can be interpreted as from beginning of experiment until 60^{th} day of experiment the bacteria adapted to toxic effect of crude oil and after this time the quantity of bacteria increased and have ability to use pollutant in the soil. The best deydrogenase activity between different microcosms related to polluted microcosm with nutrient. This result confirms that nitrogen and phosphorus can decrease the damage effect of crude oil on soil microbial community. The mechanism of this attenuation of toxicity effect of crude oil on microbial community can be related to enhance bioavailability of essential elements for bacteria in the soil. So after oil pollution of an area, soil supply upto nitrogen and phosphorus demand must be mentioned as a necessary practice to decrease the toxicity effect of pollutants. The highest biodegradation of crude oil in all studied soils belonged to industrial microcosm (95 %). It can be explained by adaptation theory because the bacteria in the industrial soil were better adapted to different pollutants and these bacteria have more capability for biodegradation of crude oil. By this reasonthe rate of degradation of crude oil in the industrial soil were higher than forest soil. Statistical analysis of the results showed that there was a significant correlation between MPN quantity of heterotrophic bacteria and other assayed factors. Also, forest soil seemed to have significant difference with other soils.

Conclusion: according to the obtained results by this study, it can be possibly proposed appropriate strategies for bioremediation of different studied soil types. The selection of best bioremediation strategies

1- MS.c. Student, Department of Microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran
2- Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
(*- Corresponding Author Email: hasanshahi@gmail.com)
3- Assistant Professor, Department of Biology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran

belong to specific types of soil. Just as this research confirmed that the type of soil plays significant role in the percentage of degradation.

Keywords: Biodegradation, Crude oil, Microcosm, Pollution, Soil