Archive of SID

نشریه دانش کشاورزی و تولید پایدار/ جلد ۲۹ شماره ۲ / تابستان ۱۳۹۸

استفاده از گیاهان اگروپایرون (*Agropyron cristatum* L.) و تال فسکیو (*Festuca arundinacea* L.) تلقیح شده با کنسرسیوم باکتریائی و قارچ شبه میکوریز درگیاه‌پالائی خاک‌های آلوده نفتی

مهناز افشارنیا[۱]، محمدرضا ساریخانی[۲*]، محمود زارعی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۷/۵/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۱۱

۱و ۲- به ترتیب دانشجوی دکترا و دانشیار بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، داشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
۳- استادیار دکترای شیمی کاربردی، دانشکده شیمی، دانشگاه تبریز
*مسئول مکاتبه: Email: rsarikhani@yahoo.com

چکیده

آلودگی خاک با نفت خام و مشتقات آن از جمله خطرناک‌ترین انواع آلودگی‌های زیست محیطی محسوب می‌شود. گیاه‌پالایی یکی از انواع روش‌های زیست‌پالایی است. در تحقیق حاضر از خاک آلوده به نفت برداشت شده از پالایشگاه تبریز، مطالعه‌ای بر روی روش‌های گیاه‌پالایی نفت صورت گرفت. بدین منظور بعد از جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های نفتی از خاک آلوده، انواع تیمارهای گیاه‌پالایی مورد آزمایش قرار گرفت. تیمارها شامل استفاده از دو گیاه اگروپایرون و تال‌فسکیو به تنهایی (بدون تلقیح میکروبی)، تلقیح شده با کنسرسیوم پنج گونه باکتریایی ، *Stenotrophomonas* sp. COD 1-1، *Psedochrobactrum* sp. COD 1-4، *Arthrobacter* sp. COD 2-3 ، *Shewanella* sp. COD 2-1و *Stenotrophomonas* sp. COD 5-6 یا قارچ شبه میکوریز *Piriformospora indica* (به صورت مجزا) و تلقیح شده با تیمار تلفیقی (تلقیح توام با باکتریها، قارچ، استفاده از کود دامی و سورفاکتانت توئین) و تیمار تلفیقی بدون کشت گیاه بود. پس از پایان آزمایش، شاخص مقدار کل هیدروکربن‌های نفتی (TPH)، شاخص‌های آنزیمی پایش سلامت خاک (دهیدروژناز، اوره‌آز و کاتالاز) و بیولوژیکی (تنفس پایه و برانگیخته میکروبی خاک) و شاخص‌های رشد گیاه (وزن خشک ساقه، ریشه و تعداد طوقه) سنجش شدند. با توجه به نتایج رشد گیاهی و تطبیق آن با میزان تجزیه هیدروکربن‌های نفتی، مشاهده شد که گیاه تال فسکیو تلقیح شده با قارچ شبه میکوریز به میزان ٦٨٪ توانایی تجزیه ترکیبات نفتی را داشت وتال‌فسکیوی بدون تلقیح قارچی توانسته بود ٤٣٪ از هیدروکربن‌های نفتی را تجزیه کند. گیاه اگروپایرون تلقیح شده با کنسرسیوم باکتریایی پنج گانه توانایی تجزیه ٦٦٪ از ترکیبات نفتی را داشت و اگروپایرون بدون تلقیح باکتری توانسته بود ٥٣٪ از هیدروکربن‌های نفتی را تجزیه کند. فعالیت آنزیم‌های دهیدروژناز و اوره‌آز در هفته نخست آزمایش بالا بوده و پس از گذشت ٤ ماه بطور معنی داری کاهش یافت و برعکس فعالیت کاتالاز در هفته نخست کمتر بوده و در انتهای آزمایش افزایش یافت.

واژه‌های کلیدی: آلودگی نفتی خاک، اگروپایرون، تال‌فسکیو، گیاه‌پالایی، TPH

www.SID.ir

Archive of SID

Using *Agropyron cristatum* L. and *Festuca arundinacea* L. Plants Inoculated by Bacterial Consortium and Mycorrhizal-Like Fungus in Phytoremediation of Oil Contaminated Soils

Mahnaz Afsharnia[1], Mohammad Reza Sarikhani[2*], Mahmoud Zareii[3]

Received: August 11, 2018 Accepted: January 1, 2019
1, 2-PhD Student and Assoc. Prof. of Soil Biology and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran.
3-Assist. Prof. of Applied Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Tabriz, Iran.
*Corresponding Author Email: rsarikhani@yahoo.com

Abstract

Soil contaminations with crude oil and its derivatives are among the most dangerous types of environmental pollution. One of the many types of bioremediation is a phytoremediation. In the present research, first, contaminated soil was collected from Tabriz refinery and then study was conducted on phytoremediation methods of petroleum hydrocarbons. For this purpose, after isolation of hydrocarbon degrading bacteria from contaminated soil, various phytoremidiation treatments were tested. The treatments included the use of two types of plants; *Agropyron* and *Tall fescue* in the both cases of with and without inoculation of five bacterial consortium, *Stenotrophomonas* sp. COD 1-1, *Psedochrobactrum* sp. COD 1-4, *Arthrobacter* sp. COD 2-3, *Shewanella* sp. COD 2-1 and *Stenotrophomonas* sp. COD 5-6 and mycorrhizal-like fungus (*Piriformospora indica*), and combined treatment (including inoculation with bacterial consortium and fungi adding cow manure and Tween 80 as a surfactant), moreover, one combined treatment without culture of plant was added to the test. After the end of the experiment, which prolonged four months, the indicators of total petroleum hydrocarbon (TPH), soil enzymes health indices (dehydrogenase, urease and catalase), soil biological indices (basal respiration and substrate-induced respiration) and plant growth indices (shoot and root dry weight and crown number) were measured. Regarding the results of plant growth and its matching to the rate of degradation of oil hydrocarbons, it was observed that *Tall fescue* plant, inoculated with mycorrhizal-like fungus, had the ability to decompose oil compounds by 68%, and non-inoculated *Tallfescue* was able to degrade the 43% of petroleum hydrocarbons. *Agropyron* inoculated with bacterial consortium had 66% ability of TPH degradation and *Agropyron* without inoculum was able to degrade the 53% of petroleum hydrocarbons. The activity of dehydrogenase and urease enzymes was high in the first week of the experiment and decreased significantly after 4 months, and in contrast to catalase activity was lower in the first week and increased at the end of the experiment.

Keywords: *Agropyron*, Oil Contaminated Soil, Phytoremediation, *Tall fescue*, TPH

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

یکی از مهمترین آلاینده‌های آلی محیطی، هیدروکربن-های نفتی هستند که اغلب از طریق صنایع نفت و گاز وارد محیط زیست می‌شوند. این دسته از ترکیبات TPH[1] ترکیبی از هیدروکربن‌های آلیفاتیک، آروماتیک، هتروسیکلیک و آسفالتن‌ها است، که بخش‌های آلیفاتیک و آروماتیک ترکیبات فرار و نیمه‌فرار هستند در حالی‌که دو بخش دیگر تر کیبات هیدروفوبیک، مقاوم و سرطان‌زا هستند (مقاراج و همکاران ۲۰۱۱). این ترکیبات اثرات سوئی بر محصولات کشاورزی، آب‌های سطحی، آب‌های زیرزمینی، کیفیت خاک اراضی دارند. بنابراین ورود آنها به زنجیره غذایی از طریق آب، هوا و خاک آلوده به شدت سلامت انسان را تهدید می‌کنند و باید ضایعات حاصله از فعالیت‌های مربوط به صنعت نفت، قبل از دفع به محیط مورد تصفیه قرار گیرند. در سه دهۀ اخیر روش‌های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی مختلفی نظیر تصفیه حرارتی، تثبیت و جامدسازی و زیست‌پالایی یا زیست سالم‌سازی، جهت رفع آلودگی از خاک معرفی و مورد استفاده قرار گرفته‌اند (تندی و همکاران ۲۰۰۹؛ دلا فونته و همکاران ۲۰۱۱).

توجه به حفظ بهداشت و سلامت جامعه و نیز توجه به سلامت خاک‌ها در تولید بهینه محصولات کشاورزی، لزوم پاکسازی محیط زیست از آلاینده‌هایی مثل پلی هیدروکربن‌های نفتی را آشکار می‌سازد و در این میان توجه به روش‌های دوستدار محیط زیست در کانون توجه تحقیقات می‌باشد (یو و همکاران ۲۰۱۱؛ سامانتا و همکاران ۲۰۰۲). از این رو بیشتر کشورهای پیشرفته به سمت تکنولوژی‌هایی چون گیاه‌پالایی و زیست‌پالایی روی آورده‌اند. گیاه‌پالایی فن‌آوری جدید و نوظهوری است که در آن از گیاهان مقاوم برای حذف یا کاهش غلظت آلاینده‌های آلی و معدنی و ترکیبات خطرناک از محیط زیست استفاده می‌شود (دانکر و همکاران ۲۰۱۱). در این روش، گیاه با استفاده از مکانیسم‌های پاک‌سازی متنوعی در ناحیه ریشه گیاه نظیر تثبیت گیاهی[2]، استخراج گیاهی[3]، تبخیرگیاهی[4]، تجزیه ریزوسفری[5]، ریزوفیلتراسیون[6]، تجزیه گیاهی[7] و تحریک گیاهی[8] آلاینده‌ها را از آب و خاک حذف می‌کند. مسی و همکاران (۲۰۱۲) فرآیند تحریک گیاهی را روش مؤثری در پالایش بسیاری از آلاینده‌های آلی نظیر هیدروکربن‌های نفتی، هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (PAH[9])، آفت-کش‌ها، حلال‌های کلردار و پلی‌کلرینیت بی‌فنیل‌ها (PCB) معرفی کرده‌اند. زو و همکاران (۲۰۱۳) به فرایند تجزیه ریزوسفری اشاره نمودند که ریزوسفر دارای جمعیت میکروبی بیشتر و فعالتری نسبت به خاک بدون ریشه است. همه گیاهان قادرند از طریق رهاسازی عناصر غذایی و ترشحات خود در خاک و برخی گیاهان نیز از طریق انتقال اکسیژن به ناحیه ریشه خود موجب تحریک و افزایش فعالیت جمعیت میکروبی تخریب‌کننده آلاینده-های نفتی شوند. قابلیت گیاه‌پالایی با توجه به میزان جوانه‌زنی بذر، بقای گیاه و رشد و عملکرد ساقه متفاوت است، گیاهان پاسخ‌های متفاوتی به آلودگی PAH بسته به تحمل خود نشان می‌دهند؛ برخی از گیاهان متحمل در برابر PAHها هستند و برخی دیگر در حذف و تجزیه PAHها موثرند. گیاهان با توجه به تفاوت در ریشه و ترشحات آن (با منبع کربن متفاوت و ترشح آنزیم‌های متفاوت) ویژگی‌های متفاوتی بر تخریب PAH و سم‌زدایی آن در خاک نشان می‌دهند. همچنین گیاهان با توجه به غلظت چربی سطح ریشه‌ای ویژگی‌های متفاوتی برای

[1] Total Petroleum Hydrocarbons
[2] Phytostabilization
[3] Phytoextraction
[4] Phytovolatalization
[5] Rhizodegradation
[6] Rhizofilteration
[7] Phytodegradation
[8] Phytostimulation
[9] Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

www.SID.ir

Archive of SID

جذب و تثبیت PAHها در سطح ریشه خود دارند. در انتخاب گیاهان برای گیاه‌پالایی، گیاهان مقاوم به آلودگی با حداکثر جوانه‌زنی، رشد و توسعه و سطح ویژه بالای ریشه بسیار مهم می‌باشد.

اگروپایرون و تال‌فسکیو از گونه‌های گندمیان علفی [1] می‌باشند که مقاومت بالایی به شرایط تنشی دارند. گندمیان علفی در اکوسیستم‌های سرد، در شرایط خشکی، و حتی به حضور نمک و آتش سوزی مقاوم بوده و با سیستم‌های ریشه‌ای گسترده خود دارای مقاومت بالایی برای زنده ماندن و رشد چندین ساله هستند. این گیاهان با ریشه‌های فیبری چند ساله و ریزوم‌های عمیق خود ایده‌آل برای رشد در مناطق خشک و خاک‌های مشکل‌دار هستند. به دلیل همین قابلیت‌ها از گیاهان فوق در گیاه‌پالائی مواد نفتی و فلزات سنگین به وفور استفاده و اشاره شده است (لیوو و همکاران ۲۰۱۵؛ گااو و همکاران ۲۰۱۳؛ هاریتاش و همکاران ۲۰۰۹).

حضور میکروارگانیسم‌های موجود در خاک که قادرند از ترکیبات نفتی به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده کنند و آنها را به موادی از قبیل آب و دی‌اکسیدکربن تبدیل نمایند، چشم‌انداز روشنی در زمینه زیست‌پالائی ترکیبات نفتی بوجود آورده است. بنابراین زیست‌پالایی و استفاده از افزایش فعالیت‌های بیولوژیکی محیط علاوه بر گیاه‌پالایی روشی مفید و اقتصادی برای پالایش این آلودگی‌هاست (یو و همکاران ۲۰۱۱). دسترسی به این گونه‌های میکروبی کارآمد و تلقیح زیستی روشی است که باعث تشدید حذف مواد نفتی از محیط‌های آلوده می‌شود. ازمیکروارگانیسم‌هایی که توانایی تجزیه بالایی دارند بصورت کنسرسیوم باکتریایی با افزودن مواد غذایی و ایجاد شرایط بهینه برای رشد آنها اقدام می‌شود (وو و همکاران ۲۰۱۳). آفرت و همکارانش (۲۰۱٤) در مطالعه‌ای پس از جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده نفتی از خاک و فاضلاب و استفاده از مخلوطی از ۱۳ گونه باکتریایی موثر در تجزیه آلاینده‌های نفتی در خاک مشاهده کردند که با تلقیح این کنسرسیوم باکتریایی به خاک پس از ۱۱۳ روز آنها توانستند از ۱٦ نوع ترکیب نفتی موجود در خاک ۱۳ نوع از آنرا بطور کامل و ۲ نوع آنرا بطور نسبی از خاک برطرف کنند. همچنین استفاده از میکروارگانیسم‌های محرک رشد گیاه نظیر PGPRها و قارچ‌های مفید همانند *Piriformospora indica* که باعث تحریک رشد گیاه می‌شود می‌تواند در گیاه‌پالائی موثر باشد؛ بصورتیکه زمانی و همکاران (۲۰۱٦) اثر قارچ *P. indica* را بر رشد ذرت و تجزیه ترکیبات نفتی در خاک آلوده به نفت در دو تیمار آلودگی سطحی و عمیق بررسی کردند و نتایج این آزمایش نشان داد که تلقیح قارچ موجب افزایش تجزیه ترکیبات نفتی در خاک، به ویژه در تیمارهای با آلودگی‌های عمیق و گسترده شده و نهایتاً منجر به انباشتگی هیدروکربن‌های نفتی (PAHها) در بافت‌های ریشه و بخش هوایی گیاه شده است.

پژوهشگران عنوان داشتند که اضافه کردن مواد آلی، مصرف آلاینده‌های هیدروکربنی را توسط میکروارگانیسم‌ها افزایش می‌دهد. مواد آلی مثل خاک اره، کودهای حیوانی، کمپوست سبب بهبود ساختمان خاک شده و در نهایت در تامین رطوبت، اکسیژن و مواد مغذی میکروارگانیسم‌ها نقش مهمی دارد (تاپا و همکاران ۲۰۱۲). اثر کوددهی حیوانی و استفاده از کمپوست و هوادهی فعال نیز در افزایش تحریک زیستی میکروارگانیسم‌های نفت‌خوار خاک به اثبات رسیده است (چن و همکاران ۲۰۱۵). محققان در استفاده از کمپوست برای زیست‌پالایی خاک معمولاً کمپوست حاصل از لجن فاضلاب و یا زباله شهری و یا ضایعات کشاورزی و صنعتی را به صورت ترکیب با مایه تلقیح باکتریایی و یا با افزودن سورفاکتانت به آن بکار می‌برند (پدرا و همکاران ۲۰۰۷). لینگلی و هونگچن (۲۰۰۹) بیان داشتند که علاوه بر کودهای حیوانی سورفاکتانت‌های شیمیایی

[1] Wheatgrasses

www.SID.ir

Archive of SID

یا زیستی نیز می‌توانند منجر به افزایش ظرفیت حلالیت هیدروکربن‌های نفتی و دسترسی زیستی آنها برای میکروب‌ها شوند.

در این پژوهش سعی بر آن شد که برای کاهش هیدروکربن‌های نفتی در خاک‌های آلوده واحد بازیافت پالایشگاه تبریز با انجام انواع مختلف روش‌های گیاه-پالایی و مقایسه آنها، بهترین و کاراترین روش بطور کاربردی برای رفع آلودگی این خاک‌ها معرفی گردد. گیاه‌پالایی با بکارگیری دو گیاه متفاوت تال فسکیو و اگروپایرون در تیمارهایی با تلقیح و عدم تلقیح باکتری-های کار آمد تجزیه کننده نفتی (جداسازی شده از خاک پالایشگاه و پتروشیمی تبریز) و در تیمارهای تلفیقی (گیاه‌پالایی، تلقیح باکتریایی و تحریک زیستی توأماً) انجام شد. بعد از بکارگیری انواع تیمارهای گیاه‌پالایی، با روش‌های متفاوتی وضعیت آلودگی و سلامت خاک پایش و بررسی شد که از جمله آن‌ها می‌توان به پایش شاخص-های آنزیمی، فعالیت‌های زیستی و روش سنتی (سنجش غلظت اولیه و نهایی TPH[1]) اشاره کرد که پس از مقایسه نتایج آن پایش‌ها، بهترین و مناسب‌ترین روش برای حذف آلودگی‌های نفتی در خاک آلوده معرفی گردید.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از خاک‌های آلوده به مواد نفتی

محل نمونه‌برداری رسوبات آلوده به نفت از حوضچه‌های تبخیر حاصل از بازیافت تصفیه نفت پالایشگاه تبریز بود که هیچ تیماری روی آنها برای رفع آلودگی صورت نگرفته بود، به جز انباشته کردن رسوبات در این حوضچه‌ها که به مرور زمان هیدروکربن‌های سبک و فرار تبخیر شده و هیدروکربن‌های سنگین در آنها تجمع یافته بودند. از بخش‌های مختلف این حوضچه به مقدار لازم نمونه لجن آلوده برای انجام آزمایش و اعمال تیمارهای مختلف گیاه‌پالایی، نمونه‌برداری شد. جهت رقیق‌سازی این لجن‌های آلوده نفتی مقداری نیز خاک غیر آلوده از پالایشگاه برداشته شد. سپس لجن‌های آلوده مرطوب پهن شده، خشک شده و پس از کوبیدن، از الک ٤/٧ میلی‌متری عبور داده شدند که مانند شن ریزه‌های نفتی بودند و با خاک غیرآلوده و الک شده پالایشگاه با نسبت ٦ به ٤ وزنی (٦ به ٤ به ترتیب نسبت لجن آلوده نفتی به خاک غیرآلوده) برای انجام تیمارهای زیست پالایی با هم آمیخته شد و در انتها جهت ایجاد آلودگی نفتی همگن در خاک مقدار ۲/۵ درصد نفت خام نیز به آن افزوده شد. همچنین برای اینکه بتوان نتایج تغییرات شاخص‌های بیولوژیکی و آنزیمی به دست آمده از اعمال تیمارهای زیستی را در حضور یک خاک فاقد مشکل (غیرآلوده) بررسی نمود و مقایسه‌ای انجام داد، از خاک‌های غیرآلوده اطراف حوضچه نیز چندین نمونه خاک از عمق ۰-۲۰ سانتی‌متری برداشته شد.

تهیه و آماده سازی گونه‌های میکروبی مورد استفاده در آزمایش

در این آزمایش پنج گونه باکتریائی (*Stenotrophomonas* sp. COD 1-1، *Arthrobacter* sp. ،*Psedochrobactrum* sp. COD 1-4 COD 2-3، Shewanella sp. COD 2-1و *Stenotrophomonas* sp. COD 5-6) جداسازی شده از خاک‌های آلوده نفتی (افشارنیا و همکاران ١٣٩٦) به‌صورت کنسرسیوم (مخلوط) جهت تلقیح گیاهان اگروپایرون و تال‌فسکیو استفاده شد. این پنج جدایه در محیط NB به مدت ٢٤ ساعت کشت و با (OD =۰/۷) یا 10^8 CFU/ml تکثیر داده شد و به مقدار ۵٪ V/W در هر گلدان استفاده شد. در نمونه تیمارهای گیاهی بدون تلقیح نیز به همین مقدار NB استریل افزوده شد. همچنین قارچ *Piriformospora indica* در محیط کشت کفیر (هیل و کفیر ۲۰۰۱) تکثیر و برای هر تیمار با جمعیت میکروبی (OD =۰/۷) بطور یکنواخت استفاده شد. مایه تلقیح‌های

[1] Total Petroleum Hydrocarbons

www.SID.ir

Archive of SID

میکروبی قبل از استفاده به حامل پرلیت: باگاس (۱:۱) افزوده شده و مورد استفاده قرار گرفتند.

کشت گیاهان و اعمال تیمارهای گیاه‌پالایی

از دو گیاه تال‌فسکیو (*Festuca arundinacea*) و اگروپایرون (*Agropyron cristatum*) برای گیاه‌پالایی ترکیبات نفتی استفاده شد. لازم به ذکر است که گیاهان مورد استفاده در این تحقیق از نوع گیاهان چمنی بوده که برای کشت و استفاده در تیمارهای زیست‌پالایی نیاز به کشت خزانه این گیاهان می‌باشد. بذرهای گیاه اگروپایرون ژنوتیپ A-۲ و تال‌فسکیو ژنوتیپ Z-4 (رقم‌های اصلاح ژنتیکی شده و تهیه شده از پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمالغرب کشور) با استفاده از سدیم هیپوکلریت ۱ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی سطحی شده و سه بار در آب مقطر شستشو داده شدند. سپس بذرها به گلدان‌های پیش کشت حاوی خاک استریل غیرآلوده منتقل شدند. گیاهان به مدت سه ماه پیش کشت شدند و هر هفته آبیاری و هرس می‌شدند تا پنجه‌زنی کرده و بیومس آنها افزایش یابد. پس از کشت خزانه، ۳ گیاهچه هم اندازه و یکسان به گلدان‌های حاوی سه کیلوگرم خاک آلوده به ترکیبات نفتی منتقل شد. در طول آزمایش که به مدت ٤ ماه طول کشید، رطوبت همه گلدانها در ۷۰٪ رطوبت ظرفیت گلدانی حفظ شد و در طول این مدت بخش هوائی گیاهان جهت رشد بیشتر و افزایش پنجه‌زنی با قیچی هرس شده و در پاکت‌های مجزا نگهداری و خشک می‌شدند. اعمال تیمارهای گیاه‌پالائی نیز به‌صورت زیر انجام گرفت.

الف) کشت دو گیاه اگروپایرون و تال‌فسکیو به‌صورت مجزا با تلقیح کنسرسیومی از پنج باکتری کارآمد تجزیه کننده نفتی (افشارنیا و همکاران ۱۳۹٦)؛

ب) کشت دو گیاه اگروپایرون و تال‌فسکیو به‌صورت مجزا در هر گلدان (از هر گیاه پنج نشا) با تلقیح قارچ شبه میکوریز *P. indica*؛

ج) کشت دو گیاه اگروپایرون و تال‌فسکیو به‌صورت مجزا بدون تلقیح باکتری و قارچ (گیاه‌پالایی به تنهائی)؛

د) کشت دو گیاه اگروپایرون و تال‌فسکیو در قالب تیمار تلفیقی که در آن از تلقیح زیستی و تحریک زیستی نیز استفاده شد. در این تیمار از تلقیح مخلوطی از پنج باکتری کارآمد (V/W)٥ ٪ و قارچ *P. indica*، تحریک زیستی (افزودن ٥٪ وزنی کود گاوی به خاک و ۱٪ حجمی سورفکتانت توئین ۸۰) (مآو و همکاران ۲۰۱۲) استفاده شد. علاوه بر آن همین تیمار تلفیقی بدون حضور گیاه نیز در نظر گرفته شد.

شمارش طوقه و اندازه‌گیری وزن خشک بخش هوائی و ریشه

نهایتاً پس از ٤ ماه بخش هوائی و ریشه گیاهان از هم جدا شدند و ریشه‌ها پس از شستشو همراه با بخش هوائی گیاهان داخل پاکت‌های کاغذی منتقل شده و در آون خشک شدند، سپس وزن خشک بخش هوائی و ریشه هر تیمار اندازه گیری شد. همچنین موقع برداشت تعداد طوقه‌های گیاهان نیز شمرده و ثبت شدند.

اندازه‌گیری TPH قبل و بعد از تیمار گیاه‌پالایی

تعیین غلظت هیدروکربن‌های نفتی کل بر اساس روش UNEP/IOC/IAEA سازمان محیط زیست آمریکا انجام شد. در این روش جهت تعیین غلظت کل هیدروکربن‌های نفتی خاک، ابتدا ۱۰ گرم از نمونه خاک خشک در عصاره‌گیر سوکسله با ۱۵۰ میلی‌لیتر از دی‌کلرومتان به مدت ۲٤ ساعت مورد استخراج قرار گرفت. سپس عصاره نفتی استخراج شده از خاک حاوی دی کلرومتان به داخل فالکون منتقل شده و ۲٤ ساعت در آون در ٦۰ درجه سلسیوس گذاشته شده و دی کلرومتان آن تبخیر شد. هیدروکربن‌های نفتی باقیمانده در ته فالکون وزن شدند (بی‌نام ۱۹۹۸). برای محاسبه درصد تجزیه زیستی TPH از رابطه ۱ استفاده شد:

$$\%B = 100 - (W_1 \times 100 / W_C) \qquad \text{(رابطه ۱)}$$

B درصد تجزیه زیستی TPH ، W_1 وزن نفت باقیمانده در شاهد و W_C وزن نفت باقیمانده در تیمارها می‌باشد.

اندازه‌گیری فعالیت زیستی خاک

www.SID.ir

Archive of SID

فعالیت زیستی خاک شامل فعالیت آنزیمی آنزیم‌های دهیدروژناز، اوره‌آز و کاتالاز و تنفس میکروبی در نمونه خاک‌های تیمار شده در ابتدا و انتهای آزمایش طبق روش‌های ذیل اندازه‌گیری شد. برای این منظور نمونه خاک آلوده مورد استفاده در ابتدای آزمایش و نمونه خاک تیمار شده موجود در گلدان‌ها پس از برداشت بخش گیاهی به مقدار ۳۰۰ گرم برداشته شد تا برای تست‌های آنزیمی و بیولوژیکی مورد استفاده قرار گیرد.

آنزیم دهیدروژناز

۱۰ گرم خاک هوا خشک را از غربال ۲ میلی‌متری عبور داده، خاک به دو قسمت پنج گرمی تقسیم شد و هر کدام در یک لوله آزمایش ریخته شد (یک لوله شاهد و دیگری نمونه)، در لوله نمونه بر روی پنج گرم خاک مقدار یک میلی‌لیتر سوبسترای TTC [1](۰/۲ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر) و ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شده، درپوش لوله قرار داده شده و ورتکس شد. در لوله شاهد بر روی پنج گرم خاک ۳/۵ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته و همانند لوله نمونه عمل شد. لوله‌ها به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. به هر لوله ۱۰ میلی‌لیتر متانول افزوده و یک دقیقه ورتکس شد. سپس با کاغذ صافی مناسب و ریز به داخل ارلن صاف شدند. مجدداً به هر لوله ۱۰ میلی‌لیتر متانول افزوده، ورتکس شد و به همان ارلن صاف شد. در نتیجه فعالیت آنزیم دهیدروژناز، سوبسترای مورد استفاده تغییر رنگ یافته و رنگ قرمز یا صورتی تشکیل گردید، سپس مقدار جذب عصاره‌ها در طول موج ٤۸۵ نانومتر قرائت شد. لازم به توضیح است که جهت حذف کردن اثر تری فنیل فورمازان موجود در سوبسترا لازم است که اسپکتروفتومتر با سوبسترای TTC بلنک گردد. در این روش غلظت تری‌فنیل‌فورمازان (TPF[2]) تولید شده طی فرایند آنزیمی (رنگ قرمز) برحسب میزان جذب نور گزارش شده است (علی‌اصغرزاد ۲۰۰٦).

آنزیم اوره‌آز

اندازه‌گیری فعالیت اوره‌آزی نمونه خاک‌ها به روش ایندوفنل‌بلو انجام گرفت (علی‌اصغرزاد ۲۰۰٦، رامپ و کریست ۱۹۸۸). به این ترتیب که بعد از تهیه بافر هیپوکلریت و معرف‌های فنل- نیتروپروساید و EDTA و سوبسترا (اوره) برای اندازه‌گیری فعالیت اوره‌آز، از روش پایش تولید آمونیم استفاده شد. یک نمونه شاهد نیز در هر سنجش به منظور کسر اثرات زمینه‌ای (NH_4^+) در نظر گرفته شد. در این روش پس از استخراج آمونیوم خاک توسط KCl، میزان آمونیم آزاد شده بعد از دو ساعت انکوباسیون نمونه در حضور سوبسترای اوره و بافر مناسب تعیین شد. بدین ترتیب که پس از استخراج آمونیوم خاک توسط KCl، ۱ میلی‌لیتر از عصاره به داخل بالن ۲۵ میلی‌لیتری ریخته شد و به آن یک میلی‌لیتر محلول EDTA افزوده شد، پس از مخلوط کردن یک دقیقه ثابت ماند و سپس دو میلی‌لیتر معرف فنل- نیتروپروساید به‌همراه ٤ میلی‌لیتر بافر هیپو کلریت بدان افزوده و با آب مقطر به حجم رسانده شد. بالن‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ٤۰ درجه سلسیوس در انکوباتور نگهداری شدند. در این واکنش شاهد تشکیل رنگ آبی بوده و سپس میزان جذب آن با اسپکتروفتومتر در طول موج ٦۳٦ nm قرائت شد.

آنزیم کاتالاز

دو گرم نمونه خاک خشک شده به داخل ارلن مایر ۱۲۵ میلی‌لیتری ریخته، بر روی آن ٤۰ میلی‌لیتر آب مقطر با پنج میلی‌لیتر محلول ۰/۳ درصد پراکسید هیدروژن اضافه شده و مخلوط در شیکر دورانی به مدت ۲۰ دقیقه بهم زده شد. سپس پنج میلی‌لیتر از H_2SO_4 ۱/۵ مولار بدان افزوده شد. محتوای ارلن از کاغذ صافی عبور داده شده و سپس ۲۵ میلی‌لیتر از آن با $KMnO_4$ ۰/۰۲ M تیتر شد، که مقدار $KMnO_4$ واکنش داده (مصرفی) به ازای هر

[1] Tetrazolium chloride
[2] Tri phenyl formazan

www.SID.ir

Archive of SID

گرم از خاک خشک محاسبه شد (جانسون و تمپل ۱۹٦٤).

تنفس پایه و برانگیخته

تنفس پایه خاک به روش اندرسون (۱۹۸۲) اندازه-گیری شد، برای این منظور ۱۰ گرم خاک مرطوب در شیشه‌های دربدار ۱/۵ لیتری با ۲۰ میلی‌لیتر سود ۰/۱ مولار به مدت ۲٤ ساعت نگهداری شده و سپس با اسید کلریدریک ۰/۱ مولار با افزودن چند قطره کلرید باریم ۲۰٪ و فنیل‌فتالین تیتر شد. تنفس برانگیخته (SIR[1])، پس از افزودن ۰/۲ درصد گلوکز به ۱۰ گرم خاک مرطوب همانند روش فوق اندازه‌گیری شد، با این تفاوت که CO_2 متصاعد شده پس از گذشت شش ساعت به روش تیتراسیون اندازه‌گیری شد.

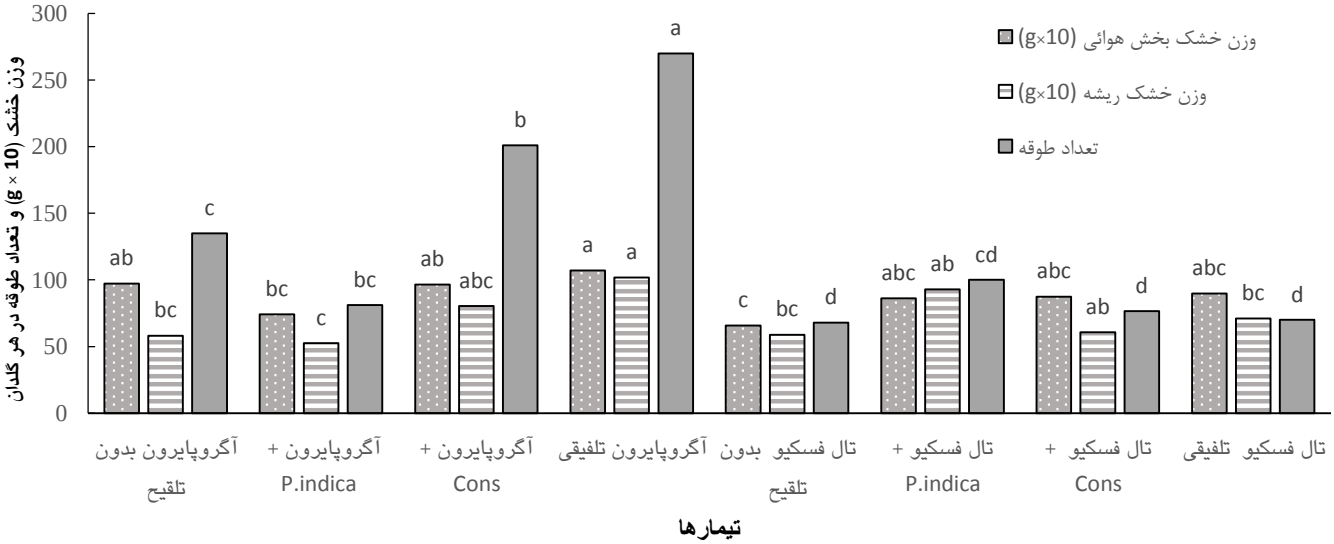
تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با اعمال سه تکرار انجام شد و تجزیه آماری داده‌ها از طریق نرم‌افزار آماری SPSS صورت پذیرفت و نمودارها از طریق نرم افزار Excel ترسیم شد.

نتایج و بحث

تعداد طوقه در گیاه، وزن خشک بخش هوائی و ریشه

وزن خشک بخش هوایی و ریشه در گیاه آگروپایرون با تیمار تلفیقی (تلقیح با کنسرسیوم باکتریائی، قارچ *P. indica* و کاربرد کود دامی و توئین ۸۰) بیشترین مقدار بود. تیمار گیاه اگروپایرون به همراه کنسرسیوم باکتریایی نیز دارای میانگین بالایی از نظر وزن خشک ریشه و بخش هوائی بود و با تیمار تلفیقی تفاوت معنی داری نشان نداد. درحالی‌که در مورد گیاه تال‌فسکیو تیمار تلقیح قارچی و تیمار تلفیقی آن نسبت به سایر تیمارهای این گیاه دارای میانگین بالاتری بودند. از لحاظ تعداد طوقه تیمار اگروپایرون تلفیقی تفاوت معنی‌داری را نسبت به سایر تیمارهای اگروپایرون داشته ولی در میان تیمارهای تال‌فسکیو، تیمار تلقیح قارچی دارای بیشترین مقدار بوده ولی تفاوت چشمگیری در میان سایر تیمارها حاصل نشد (شکل ۱).



شکل ۱- وزن خشک بخش هوائی و ریشه گیاهان تیمارهای گیاه پالائی بر حسب (10 × g) و تعداد طوقه در آنها.

درصد تجزیه TPH

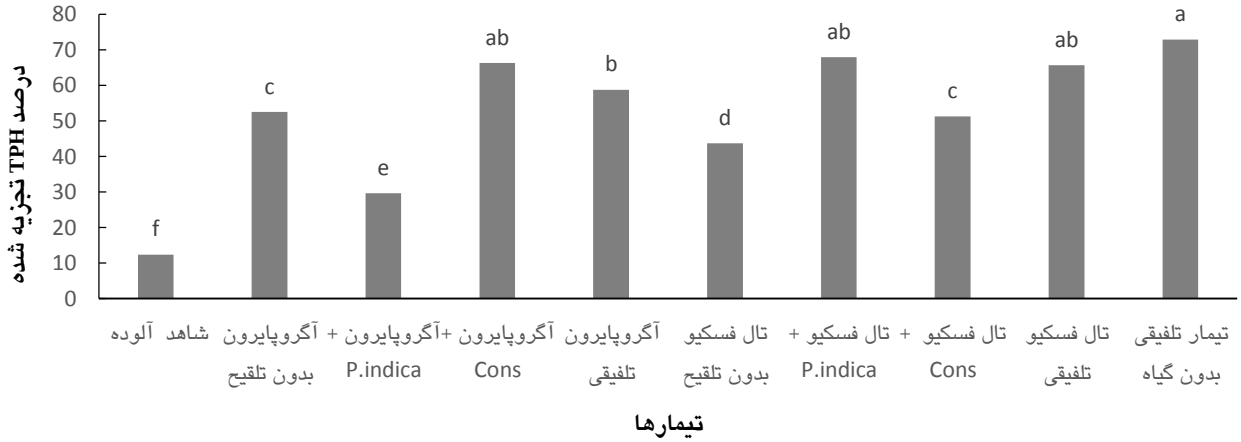
[1] Substrate Induced Respiration

www.SID.ir

Archive of SID

در تیمارهای گیاه‌پالایی بعد از گذشت ٤ ماه از اعمال تیمارها، مقدار کل هیدروکربن‌های نفتی اندازه‌گیری شدند. پس از گذشت ٤ ماه اختلاف معنی‌داری بین همه تیمارها با تیمار شاهد آلوده مشاهده شد (شکل ۲). در میان تیمارهای گیاه پالایی تیمار گیاه تال‌فسکیوی تلقیح با قارچ و تال‌فسکیو تلفیقی، به ترتیب با مقادیر ۳۳٦ و ۳٦۰ میلی‌گرم و تیمار گیاه اگروپایرون تلقیح با کنسرسیوم با مقدار ۳۵۳ میلی‌گرم کمترین مقدار TPH را داشته و بین این سه تیمار اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. به بیان دیگر گیاه تال‌فسکیو در تلقیح با قارچ *P. indica* بهتر عمل کرده و ٦۸٪ هیدروکربن‌های نفتی را تجزیه کرده در حالی‌که تال‌فسکیوی بدون تلقیح قارچی توانسته بود ٤۳٪ از هیدروکربن‌های نفتی را تجزیه کند . اختلاف معنی‌داری بین این دو تیمار مشاهده شد. در گیاه اگروپایرون، تیمار تلقیح با کنسرسیوم باکتریایی بهتر عمل کرده و ٦٦/۵٪ هیدروکربن‌های نفتی را تجزیه کرده است این در حالی‌است که اگروپایرون بدون تلقیح باکتری توانسته بود ۵۳٪ از هیدروکربن‌های نفتی را تجزیه کند ومابین دو تیمار اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. تیمار تلفیقی حاوی تلقیح با کنسرسیوم باکتریائی، قارچ *P. indica* و کاربرد کود دامی و توئین ۸۰ بدون کشت گیاه نیز با ۷۲٪ تجزیه نفتی توانسته بود بیشترین تجزیه نفتی را نسبت به تیمارهای گیاه‌پالایی داشته باشد اما از نظر آماری در یک کلاس با تیمارهای گیاه‌پالایی فوق‌الذکر قرار گرفت. این نتیجه بیانگر این مطلب است که زیست‌پالایی بدون گیاه‌پالایی نیز می‌تواند روش مؤثری در حذف هیدروکربن‌های نفتی در خاک باشد. لازم به ذکر است که گیاه پالایی بدون تلقیح نیز نسبت به شاهد اختلاف معنی‌داری داشته و اگروپایرون ۵۳٪ و تال‌فسکیو ٤۳٪ به تنهایی نیز در کاهش هیدروکربنهای نفتی در خاک روشی موثر می‌باشد. همچنین بین درصد TPH تجزیه شده در تیمارها و وزن خشک ریشه و ساقه همبستگی مثبت و معنی‌داری در سطح ۰/۰۱ درصد وجود داشت که این رابطه بین درصد TPH تجزیه شده و وزن خشک ریشه ۰/۸۲ و در ساقه ۰/۵۲ بود که این نتایج نشاندهنده این امر می‌باشد که هر چه توسعه و گستردگی ریشه بیشتر بوده میزان تجزیه نفتی بیشتر بوده و گیاه‌پالایی بهتر انجام گرفته است.

با توجه به میزان تجزیه هیدروکربن‌های نفتی و تطبیق آن با نتایج رشد گیاهی مشاهده می‌شود که گیاه تال فسکیو با تلقیح قارچ شبه میکوریز *P. indica* با ٦۸٪ توانایی تجزیه ترکیبات نفتی و گیاه اگروپایرون با تلقیح کنسرسیوم باکتریایی پنج گانه ذکر شده با تجزیه ٦٦٪ توانایی تجزیه ترکیبات نفتی را دارد (شکل۲).



شکل ۲- درصد TPH تجزیه شده در تیمارهای گیاه پالایی

www.SID.ir

Archive of SID

هوانگ و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که استفاده از سیستم چندگانه زیست‌پالای (تلقیح زیستی با باکتری‌های نفت‌خوار و تحریک زیستی با باکتری‌های PGPR به همراه گیاه‌پالایی (با استفاده از گیاه تال‌فسکیو) حدود ۵۰٪ بیشتر از کاربرد تنهای باکتری و ٤۵٪ بیشتر از گیاه-پالایی به تنهایی در تجزیه کل هیدروکربن‌های نفتی موثر است. مسی و همکاران (۲۰۱۲) به کاهش ٤۰ درصدی غلظت کل هیدروکربن‌های نفتی در طول سه سال تیمار گیاه‌پالایی در مقیاس واقعی (نه آزمایشگاهی) در مقایسه با تیمار شاهد بدون پوشش گیاهی اشاره کردند.

بسالت‌پور و همکاران (۲۰۰۷) پژوهشی با هدف تعیین مناسب‌ترین گیاه برای پالایش خاک‌های آلوده به مواد نفتی در اطراف پالایشگاه تهران انجام دادند که از میان هفت گیاه مختلف آفتابگردان، گلرنگ، شبدر، اگروپایرون، کلزا، تال‌فسکیو و پوکسنلیا، گیاهان آفتابگردان، گلرنگ، اگروپایرون وتال‌فسکیو را برای مطالعات نهایی گیاه‌پالایی انتخاب نمودند. آنها با توجه به بیشترین میزان کاهش غلظت TPH در رایزوسفر و همچنین افزایش فعالیت و تنفس میکروبی در خاک نسبت به سایر گیاهان، نهایتاً گیاه اگروپایرون را برای گیاه‌پالایی خاک‌های آلوده منطقه توصیه کردند. رجایی و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که کشت توام دو گونه گیاهی (جو زارعی و جو دوسر) به همراه تلقیح باکتریایی موجب تجزیه ٤٤ درصدی TPH در خاک شد در حالی‌که این مقدار با کشت گیاه تلقیح نشده به ۳۳٪ و در تیمار با تلقیح باکتری بدون کشت گیاه به ۲۰٪ رسید که نتایج نشان می‌دهد حضور گیاه در خاک آلوده به نفت خام باعث تشدید فعالیت‌های بیولوژیکی خاک و به دنبال آن افزایش تجزیه زیستی هیدروکربن‌ها گردیده است.

فعالیت دهیدروژناز

همه تیمارهای گیاه‌پالایی در هفته نخست آزمایش دارای فعالیت آنزیم دهیدروژناز بالایی نسبت به تیمارهای شاهد آلوده نفتی و غیرآلوده نفتی بودند که نشانگر وجود بالای جمعیت میکروبی در تیمارهای گیاه‌پالایی نسبت به تیمارهای شاهد می‌باشد. در میان انواع تیمارهای گیاه‌پالایی، تیمار اگروپایرون تلفیقی و اگروپایرون بدون تلقیح به ترتیب دارای بیشترین و کمترین فعالیت دهیدروژناز بودند. بقیه تیمارهای گیاه‌پالایی نیز در هفته نخست آزمایش دارای فعالیت دهیدروژنازی نسبتاً بالایی بودند اما تمامی تیمارها با گذشت زمان در انتهای آزمایش با گذشت ٤ ماه، کاهش فعالیت چشمگیری داشتند. از آنجائیکه آنزیم دهیدروژناز جزء آنزیم‌های اکسیدوردوکتاز درون سلولی بوده و در زنجیره تنفسی سلول‌های میکروبی نقش ایفا می‌کند، یک شاخص مفید برای شدت کلی متابولیسم میکروبی مربوط به میکروبهای زنده می‌باشد که پس از مرگ سلولی سریعاً از بین می‌رود (شن و همکاران ۲۰۱٦). توصیه می‌شود برای این‌که تغییرات این آنزیم در طول زمان بهتر پایش می‌شد، بایستی دوره‌های نمونه‌برداری در فواصل زمانی نزدیک‌تر انتخاب می‌شدند تا روند تغییرات این آنزیم آشکارتر باشد (جدول ۱).

پولیاک و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند که در خاکهای آلوده به نفت خام در تیمارهای زیست‌پالایی با تلقیح کنسرسیوم باکتریایی، تحریک زیستی با افزودن مواد غذایی و در خاک شاهد غیرآلوده در هفته نخست دارای بیشترین فعالیت دهیدروژنازی بودند ولی در مدت کوتاهی پس از آن شروع به کاهش داشت به طوری که این نتایج بعد از گذشت سه ماه نیز تکرار شد. بعد از دو سال که اثر منفی آلودگی نفت تا حدودی کاهش یافت؛ دهیدروژناز نیز کمی افزایش یافت اما دهیدروژنازحتی پس از ۹ سال آزمایش هنوز در خاک آلوده کمتر از کنترل بود؛ این نتایج موید این بود که جمعیت میکروبی زنده خاک در اثر آلودگی نفتی کاهش یافته و به تبع آن آنزیم درون سلولی دهیدروژناز نیز

www.SID.ir

Archive of SID

کاهش یافت. به عبارتی می‌توان بیان کرد که آنزیم دهیدروژناز حساسیت بالایی به آلودگی نفتی داشته است.

حسن شاهیان و زیدآبادی نژاد (۲۰۱۷) طی بررسی جمعیت میکروبی و فعالیت آنزیم دهیدروژناز در دو خاک مزرعه‌ای و بیابانی آلوده به نفت در فرایند زیست‌پالایی عنوان کردند فعالیت این آنزیم در تیمارهای زیست‌پالایی در خاک مزرعه تا روز ٦٠ روند افزایشی ولی بعد از آن تا ۱۲۰ روز روند کاهشی داشته است و در خاک‌های بیابانی تا روز ۳۰ام، الگوی افزایشی و پس از آن تا انتهای آزمایش، کاهش در فعالیت آنزیم دهیدروژناز مشاهده شد.

فعالیت اوره‌آز

فعالیت آنزیم اوره‌آز در همه تیمارهای گیاه پالایی و حتی تیمار شاهد آلوده با افزودن بستره اوره بلافاصله در ابتدای آزمایش در مقایسه با تیمار شاهد غیرآلوده افزایش چشمگیری داشت. با گذشت زمان فعالیت این آنزیم در پایان دوره (پس از گذشت ٤ ماه) روند کاهشی داشت، به‌جز تیمارهای شاهد آلوده و غیرآلوده خاک که در ابتدا و انتهای آزمایش تغییر معنی‌داری را نشان ندادند. در بین تیمارهای گیاه‌پالایی تیمار اگروپایرون بدون تلقیح و تال‌فسکیو تلفیقی نیز کمترین مقدار فعالیت اوره‌آز را در ابتدای آزمایش داشتند. در انتهای آزمایش نیز تیمارهای گیاه تال‌فسکیو + *P. indica* و گیاه تال‌فسکیو تلفیقی دارای کمترین فعالیت اوره‌آزی بودند (جدول ۱). این روند کاهشی در فعالیت اوره‌آز می‌تواند در اثر بازدارندگی‌های احتمالی لجن نفتی مورد آزمایش باشد که با تجزیه لجن نفتی با گذشت زمان و آزاد شدن مقدار مواد شیمیایی ناشی از لجن از جمله فلزات سنگین، هیدروکسیمات‌ها، ترکیبات تیول (SH -)، فسفوآمید، فسفات‌ها و ترکیبات گوگرد، ممکن است به عنوان بازدارنده‌های رقابتی و غیر رقابتی برای آنزیم اوره‌آز باکتریایی یا گیاهی باشند (آپادیای ۲۰۱۲). پولیاک و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند که فعالیت اوره‌آزی خاک آلوده در طی آزمایش، در هفته اول با افزایش همراه بود اما پس از ۳ ماه، کاهش قابل توجهی پیدا کرد. این فعالیت آنزیمی پس از گذشت یک سال، دوباره روند افزایشی به خود گرفت و به مقدار شاهد رسید.

بنابه گزارش شن و همکاران (۲۰۱٦) در مقایسه سه خاک (خاک آلوده نفتی با تلقیح زیستی، خاک آلوده نفتی بدون تلقیح زیستی و خاک غیر آلوده) با گذشت ٤٠ روز فعالیت آنزیم اوره‌آز در تیمار تلقیح زیستی افزایش یافته بود ولی در تیمارهای شاهد آلوده و غیرآلوده در هفته اول کمی افزایش داشته و بعد به تدریج ثابت شد و سپس روند کاهشی داشته است. بنابراین کاهشی بودن روند فعالیت آنزیم اوره‌آز دلیل بر رسیدن میکروبها به فاز ثابت در اثر کمبود مواد غذایی در طول آزمایش نیز می‌تواند باشد (شن و همکاران ۲۰۱٦).

فعالیت کاتالاز

کاتالاز جزء آنزیم‌های درون سلولی هستند که رابطه مستقیمی با فعالیت جمعیت زنده میکروبی خاک دارند و افزایش فعالیت این آنزیم‌ها در خاک آلوده به نفت نشان دهنده افزایش فعالیت میکروب‌های تجزیه کننده نفتی می‌باشد (شن و همکاران ۲۰۱٦). نتایج این آزمایش نشان داد که در هفته نخست فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمارهای گیاه پالایی کم بوده و در سطح ۰/۰۱ بین تیمارها تفاوت معنی‌داری وجود داشت. فعالیت این آنزیم در انتهای آزمایش افزایش یافت ولی بین تیمارها در سطح ۰/۰۱ تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. افزایش کاتالاز در انتهای آزمایش (جدول ۱) نشان از تجزیه شدن نفت توسط میکروبها و افزایش H_2O_2 در اثر فعالیت آنها است. متابولیسم هیدروکربن‌ها در میکروارگانیسم‌ها باعث تولید مقدار زیادی H_2O_2 به عنوان محصول حدواسط درون سلول ها می‌شود که منجر به آسیب سلول‌ها می شود. کاتالاز آنزیم بسیار

www.SID.ir

Archive of SID

فعالی در متابولیزه کردن H_2O_2 است که باعث محافظت از سلول‌ها در مقابل گونه‌های اکسیژنی فعال در تمامی میکروارگانیسم های هوازی می‌باشد (استپنیوسکا و همکاران ۲۰۰۹).

پولیاک و همکاران (۲۰۱۸) گزارش نمودند که آنزیم کاتالاز در تیمارهای زیست‌پالایی با تلقیح باکتریایی در خاک آلوده به نفت در سه ماه اول آزمایش به دلیل افزایش تجزیه هیدروکربن‌های سهل‌الوصول نفتی توسط باکتری‌های تلقیح شده، افزایش یافته بود که می‌تواند به دلیل القای ژن‌های آنزیم تجزیه کننده پراکسید (*katG*) باشد که کاتالاز پراکسیداز را کدگذاری می‌کنند که از باکتری های تخریب کننده PAH گزارش شده است.

بالا بودن فعالیت کاتالازی در تیمار خاک آلوده شاهد را شاید بتوان به سازگاری و افزایش جمعیت میکروبی گونه‌های میکروبی مقاوم به ترکیبات نفتی مربوط دانست که به مرور گرچه جمعیت میکروبی آن در مقایسه با خاک غیرآلوده کمتر می‌باشد اما سهم گونه‌های مقاوم جهت تجزیه هیدروکربنهای نفتی فزونی می‌یابد و می‌توان افزایش فعالیت کاتالازی بعد از گذشت ٤ ماه را به آن نسبت داد.

جدول ۱- فعالیت اوره‌آز بر حسب ($\mu gNH_4\text{-}N\ .g^{-1}\ dm.2h^{-1}$)، کاتالاز بر حسب (ml of 0.02 M $KMnO4^{-1}$) و دهیدروژناز بر حسب میزان جذب (OD_{485}) در تمامی تیمارها در زمان‌های ابتدا (T_0) و انتهای آزمایش (T_4)

تیمارها	فعالیت آنزیم دهیدروژناز		فعالیت آنزیم اوره‌آز		فعالیت آنزیم کاتالاز	
	T_0	T_4	T_0	T_4	T_0	T_4
خاک غیر آلوده (شاهد)	۰/۱۹ ± ۰/۰۰	۰/۲۰ ± ۰/۰۰	۱٤/۲۰ ±۰/۲	۱۱/۳٦ ± ۰/۰۵	۰/۳۵ ± ۰/۰۵	۰/۷ ± ۰/۰۵
خاک آلوده تیمار نشده (شاهد)	۰/۳٤ ± ۰/۰۰	۰/۳۵ ± ۰/۰۱	۲۵۹/۹۷ ± ۳/۰۲	۲٦۹/٦۵ ± ۰/٦٦[a]	۰/۵ ± ۰/۰۰	۱/۰۰ ± ۰/۰۰
آگروپایرون بدون تلقیح	۰/۷۹ ± ۰/۰٦	۰/۲۰ ± ۰/۰۷	۱٤۸/۲۹ ± ۹/۹۲	۱۰٦/۰۲ ± ۷/۰۱	۰/۷۱ ± ۰/۰۱[a]	۰/۷۵ ± ۰/۰۵
آگروپایرون + *P. indica*	۰/۹۹ ± ۰/۰۷	۰/۳٦ ± ۰/۰۷[a]	۱۹۰/۱۲ ± ۹/٤٤	۸۵/۹٦ ± ۵/۵۸	۰/۵۱ ± ۰/۰۱	۱/۱۰ ± ۰/۰۲
آگروپایرون + Cons	۱/۱۷ ± ۰/۰۳	۰/۱۵ ± ۰/۰۷	۲۱۹/۲٦ ± ۳/۵۹	۸۵/۲٤ ± ۷/٤۲	۰/٤۰ ± ۰/۰۰۵	۰/۷۰ ± ۰/۱۰
آگروپایرون تلفیقی	۱/۸۸ ± ۰/۰٦[a]	۰/۱۹ ± ۰/۰۲	۲۷۵/٦۷ ± ۲/۰٦[a]	۲۱۹/۹۹ ± ۱٤/٦۹	۰/۵۰ ± ۰/۰۰۵	۰/۸۵ ± ۰/۱۵
تال فسکیو بدون تلقیح	۰/۸۸ ± ۰/۰۱	۰/۲۱ ± ۰/۰۱	۲۳۹/۳٤ ± ٦/۷۰	۲۰۱/۹٤ ± ۸/٦۹	۰/٤۰ ± ۰/۰۰۵	۰/۸۰ ± ۰/۰۰
تال فسکیو+ *P. indica*	۱/۳۰ ± ۰/۰۳	۰/۱۵ ± ۰/۰٦	۲٤۰/۱۳ ± ٤/۳۱	٦۰/۵٦ ± ۳/٤۸	۰/۳۱ ± ۰/۰۱	۰/۸۰ ± ۰/۱۵
تال فسکیو+ Cons	۱/۱۰ ± ۰/۰۲	۰/۱۷ ± ۰/۰۲	۲٦۰/٦۷ ± ۳/۷۵	۱٤۰/٤۷ ± ۲/۷۷	۰/٤۰ ± ۰/۰۰۵	۰/۸۵ ± ۰/۲۰
تال فسکیو تلفیقی	۰/۹۳ ± ۰/۰۷	۰/۲۹ ± ۰/۰۲	۱٦۳/٦۷ ± ۷/۰۱	۷۳/۱۵ ± ۵/۳۵	۰/٦۱ ± ۰/۰۱	۰/۹۵ ± ۰/۰۵
تیمار تلفیقی بدون گیاه	۱/۰۰ ± ۰/۰٦	۰/۳۰ ± ۰/۱	۱۷۳/۰٤ ± ۷/٦٤	۱۱۲/۹۷ ± ۸/۹۳	۰/٦۱ ± ۰/۰۱	۰/٦۱ ± ۰/۱۵
LSD	۰/۰۸٦۵	۰/۱۳	۱۴/۹۹۱	۴۹/۳۸	۰/۰۹۵	ns

توجه: مقایسات میانگین در سطح احتمال $P<0.01$ بررسی شده‌اند.

تنفس پایه و برانگیخته در ابتدا و انتهای آزمایش

طبق نتایج بدست آمده مقدار تنفس پایه در هفته نخست آزمایش در تیمارهای گیاهی تلقیح شده و همچنین تیمار تلفیقی بدون گیاه بالاترین بود. دلیل این افزایش تنفس پایه در گیاهان تلقیحی را باید در افزودن جمعیت میکروبی فعال در نتیجه تلقیح میکروب و همچنین آزادسازی مواد فتوسنتزی و قندی در ریزوسفر گیاهان جستجو نمود. در مورد تیمار تلفیقی نیز چون کود دامی تامین‌کننده مواد آلی برای جامعه میکروبی است و همچنین به دلیل وجود فلور میکروبی خاص خود، تشدید فعالیت تنفس میکروبی خاک رخ داده است. پس از گذشت

www.SID.ir

Archive of SID

٤ ماه، تنفس پایه و برانگیخته تیمارها نسبت به شروع آزمایش کاهش بسیار چشمگیری داشت که این امر را دلیل بر کاهش مواد غذایی برای میکروب‌ها و رسیدن به فاز ثابت و مرگ میکروبی می‌توان توجیه کرد. بالا بودن تنفس برانگیخته در شروع آزمایش نشان از زنده بودن جمعیت میکروبی افزوده شده به تیمارهای آزمایش دارد و این موضوع را بازتاب می‌کند که هرچند در خاک منابع کربنی به صورت هیدروکربن‌ها وجود دارد اما جامعه میکروبی به مواد قندی افزوده شده (گلوکز) که منبع قابل استفاده و در دسترسی است واکنش نشان داده و فعالیت میکروبی فزونی یافته است. کم بودن تنفس سلولی در خاک شاهد آلوده نسبت به خاک غیر آلوده حاکی از آن است که در اثر آلایندگی نفتی جمعیت زنده میکروبی در آن کم می‌باشد.

لی و همکاران (۲۰۰۸) نیز گزارش کردند که بالاترین سطح تنفس پایه، یک هفته پس از شروع آزمایش زیست-پالایی نفتی مشاهده شد زمانی که غلظت هیدروکربن در آنها بالاترین مقدار بود که باعث افزایش دسترسی میکروبی به هیدروکربن‌های نفتی می‌شود، اما پس از سه ماه، زمانی که TPH کاهش یافت، تنفس پایه نیز کاهش یافت ولی پس از سال اول و کاهش سطح آلودگی نفتی BR دوباره افزایش یافت.

شاخص‌های بیولوژیکی می‌تواند به عنوان یک شاخص خوب برای بررسی اثر آلاینده در خاک باشد. میکروارگانیسم‌های خاک، به کوچکترین تنش‌های اکوسیستمی بسیار حساس هستند و با تنظیم میزان فعالیت، بیومس میکروبی، و ساختار جامعه خود به سرعت در حال پاسخگویی به عوامل استرس‌زا هستند (مورنو و همکاران ۲۰۱۱). خاک‌هایی که به مدت طولانی در معرض آلودگی با هیدروکربن‌های نفتی هستند با چالشی شدید برای حفظ و نگهداری جامعه میکروبی و تنوع ساختاری و عملکردی این جوامع میکروبی مواجه هستند (پساک و همکاران، ۲۰۱۵).

جدول ۲- تنفس پایه و بر انگیخته میکروبی خاک در ابتدا (T_0) و انتهای آزمایش (T_4).

تیمارها	تنفس پایه (mg CO_2/ g.dm. day)		تنفس برانگیخته (mg CO_2/ g.dm. day)	
	T_0	T_4	T_0	T_4
خاک غیر آلوده (شاهد)	۰/۳۰ ± ۰/۰۰	۰/٤٥ ± ۰/۰۰	۱/۱٥ ± ۰/۰۰	۲/۱٦ ± ۰/۰۰
خاک آلوده تیمار نشده (شاهد)	۰/۱٥ ± ۰/۰۰	۰/۳۰ ± ۰/۰۰	۰/٥۷ ± ۰/۰٤	۱/۷۳ ± ۰/۰۰
گیاه آگروپایرون بدون تلقیح	۱/۳۰ ± ۰/۰۰	۰/۳۰ ± ۰/۰۳	٦/۲۰ ± ۰/۰۰	۱/٤۸ ± ۰/۰۲
گیاه آگروپایرون + *P. indica*	۲/۲٥ ± ۰/۰٤	۰/۸٥ ± ۰/۰۷	۱/۱۱ ± ۰/۱۱	۰/۷۷ ± ۰/۰۲
گیاه آگروپایرون + Cons	۲/۹۹ ± ۰/۱٥	۱/۰۰ ± ۰/۰٤ [a]	٥/۳۳ ± ۰/۱۱	۰/۷۲ ± ۰/۰۰
گیاه آگروپایرون تلفیقی	۲/٥۲ ± ۰/۰۷	۰/۸۲ ± ۰/۱۳	۹/۳٥ ± ۰/۰۲	۱/۷۳ ± ۰/۰۸
گیاه تال فسکیو بدون تلقیح	۱/۲٥ ± ۰/۰٤	۰/٥٤ ± ۰/۰۳	٦/۱۹ ± ۰/۰۰	۰/۷۲ ± ۰/۰۰
گیاه تال فسکیو+ *P. indica*	۲/۲۲ ± ۰/۰۷	۰/۷۰ ± ۰/۰٤	۷/۰۰ ± ۰/۱۱	۱/۰۰ ± ۰/۰٤
گیاه تال فسکیو+ Cons	۲/۱٤ ± ۰/۱٥	۰/٤٦ ± ۰/۰۱	٦/٦۷ ± ۰/۰٦	۱/۲۰ ± ۰/۰۲
گیاه تال فسکیو تلفیقی	۲/۷٤ ± ۰/۱٥[a]	۰/۷۳ ± ۰/۰۱	۹/۸٦ ± ۰/۱۱	۰/٦۲ ± ۰/۰۲
تیمار تلفیقی بدون گیاه	۲/۲۷ ± ۰/۰۳	۰/٦٦ ± ۰/۰٦	۹/۰۷ ± ۰/۰۰	۱/۰۰ ± ۰/۰۸
LSD	۰/۰٥۲۳	۰/۱۱۹۷	۱/۳٤٦۹	۰/۲۲٤٥

توجه: مقایسات میانگین در سطح احتمال $P<0.01$ بررسی شده‌اند.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع مورد استفاده

Aliasgharzad N. 2005. Methods in Soil Biology (translation). Published by the University of Tabriz.. (In Persian).

Afsharnia M, Sarikhani MR, Zareii M and Lotfollahi A. 2017. Isolation of oil degrading bacteria from contaminated soils of Tabriz refinery and petrochemical industry and evaluation of their oil degradation efficiency. 15th Iranian Soil Science Congress. Esfahan. (In Persian).

Anderson JPE. 1982. Soil respiration. In: AL Page and AH Miller (Eds), Methods of Soil Analysis, Part 2: Chemical and microbiological properties. American Society of Agronomy, Madison WI: 831-871.

Anonymous. USEPA. 1998. Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical Chemical Methods. Environmental Protection Agency, Washington DC.

Auffret MD, Yergeau E, Labbé D, Fayolle-Guichard F and Greer CHW. 2014. Importance of Rhodococcus strains in a bacterial consortium degrading a mixture of hydrocarbons, gasoline, and diesel oil additives revealed by metatranscriptomic analysis. Applied Microbiology and Biotechnology, 99(5):2419-30.

Basalatpour A, Hajabasi M, Khoshgoftarmanesh A and Afyouni M. 2008. Investigation of Refinement of the hydrocarbons contaminated soils around the Tehran refinery by phytoremediation method. Journal of Agricultural Science and Natural Sources, 15(4): 15-27. (In Persian).

Chen M, Xu P, Zeng G, Huang D and Zhang J. 2015. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting. Biotechnology Advances, 33 (6) 1: 745–755.

Dhankher OP, Pilon-Smits EAH, Meagher RB and Doty SH. 2011. Biotechnological approaches for Phytoremediation. Academic Press, 309-328.

De la Fuente C, Clemente R, Martinez-Alcala I, Tortosa G and Bernal MP. 2011. Impact of fresh and composted solid olive husk and their water-soluble fractions on soil heavy metal fractionation; microbial biomass and plant uptake. Journal of Hazardous Materials, 186:1283–1289.

Gao Y, Zhang Y, Liu J, Kong H. 2013. Metabolism and subcellular distribution of anthracene in tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). Plant Soil, 365, 171–182.

Hasan shahiyan M and Zeydabadinezhad Z. 2017. Investigating the effect of kerosene contaminated soil and desert on microbial population soil. Journal of Soil and Water Protection Research, 24(4). (In Persian).

Haritash AK, Kaushik CP, 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. Journal of Hazardous Materials, 169: 1–15.

Hill TW and Kafer E, 2001. Improved protocols for Aspergillus minimal medium: trace element and minimal medium salt stock solutions. Fungal Genetics Reports, 48: 20-21.

Huang DL, Zeng G, Feng CL, Hu S, Jiang XY and Tang L. 2008. Degradation of lead contaminated lignocellulosic waste by *Phanerochaete chrysosporium* and the reduction of lead toxicity. Environmental Science & Technology, 42: 4946–4951.

Johnson JI and Temple KL. 1964. Some variables affecting the measurement of catalase activity in soil. Soil Science Society of America Processes, 28: 207–216.

Lee S, Oh B, Kim J, 2008. Effect of various amendments on heavy mineral oil bioremediation and soil microbial activity. Bioresource Technology, 99 (7), 2578–2587.

Liangli J and Hungchen B. 2009. Surfactant mediated biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Materials, 2: 76- 94.

Liu R, Dai Y, Sun L. 2015. Effect of Rhizosphere Enzymes on Phytoremediation in PAH-Contaminated Soil Using Five Plant Species**.** Plos One, 10(3):1-14.

www.SID.ir

Archive of SID

Macci C, Doni S, Peruzzi E, Bardella S, Filippis G, Ceccanti B and Masciandaro G. 2012. A real-scale soil phytoremediation. Biodegradation.

Mao J, Luo Y, Teng Y and Li Z. 2012. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil by a bacterial consortium and associated microbial community changes. International Biodeterioration & Biodegradation, 70: 141-147.

Megharaj M, Ramakrishnan B, Venkateswarlu K, Sethunathan N and Naidu R. 2011. Bioremediation approaches for organic pollutants: a critical perspective. Environment International, 37:1362- 1375.

Moreno B, Nogales R, Macci C, Masciandaro G and Benitez E. 2011. Microbial eco-physiological profiles to estimate the biological restoration of a trichloroethylene-contaminated soil. Ecological Indicators, 11:1563–1571.

Pedra F, Polo A, Ribeiro A and Domingues H. 2007. Effects of municipal solid waste compost and sewage sludge on mineralization of soil organic matter. Soil Biology and Biochemistry, 39: 1375–1382.

Pessacq J, Medina R, Terada C, Bianchini FE, Morelli IS and Del Panno MT. 2015. Assessment of the Responsiveness to Different Stresses of the Microbial Community from Long-Term Hydrocarbon-Contaminated Soils. Water Air Soil Pollution, 226: 20- 33.

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

Rajayi S, Raiisi F and seyyedi SM. 2012. Bioremediation of aged crude oil contaminated soil by biological methods and phytoremediation. Water and Soil Journal (Agriculture Sciences and Technology), 26(7): 908-921. (In Persian).

Rump HH, and Krist H. 1988. Laboratory Manual of the Examination of Water and Soil. VCH publishers. Escbborn. Germany.

Samanta SK, Singh OV and Jain RK. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. Trends Biotechnology, 20: 243–248.

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

Stepniewska Z, Wolinska A, Ziomek J. 2009. Response of soil catalase activity to chromium contamination. Journal of Environmental Sciences, 21, 1142–1147.

Tandy S, Healey JR, Nason MA, Williamson JC and Jones DL. 2009. Remediation of metal polluted mine soil with compost: co-composting versus incorporation. Environmental Pollution, 157: 690–697.

Thapa B, Kumar A, and Ghimire A. 2012. A review on bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil. Nepal Journal, 8: 164-170.

Upadhyay, LSB. 2012. Urease inhibitors: a review. Indian Journal Biotechnology, 11, 381-388.

Wu JH, Wu FY, Chuang HP, Chen WY, Huang HJ, Chen SH and Liu WT. 2013. Community and proteomic analysis of methanogenic consortia degrading terephthalate. Applied and Environmental Microbiology, 79(1):105–112.

Yu Z, Zeng GM, Chen YN, Zhang JC, Yu Y, Li H and et al. 2011. Effects of inoculation with Phanerochaete chrysosporium on remediation of pentachlorophenol-contaminated soil waste by composting. Process Biochemistry, 46: 1285–1291.

Zhou X, Zhou J, Xiang X, Cébron A, Béguiristain T and Leyval C. 2013. Impact of Four Plant Species and Arbuscular Mycorrhizal (AM) Fungi on Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Dissipation in Spiked Polish Journal of Environmental Studies, 22(4): 1239-1245.

www.SID.ir

Archive of SID

Zamani J, Hajabbasi MA, Alaie E, Sepehri M, Leuchtmann A and Schulin R. 2016. The effect of Piriformospora indica on the root development of maize (*Zea mays* L.) and remediation of petroleum contaminated soil. International Journal of Phytoremediation. 3; 18(3):278-87.

www.SID.ir