نشریه دانش آب و خاک / جلد ۳۳ شماره ۲ صفحه‌های ۵۳ تا ۷۲/ سال ۱۴۰۲

مقاله پژوهشی

پایش تغییرات تنفسی خاک لوم‌شنی آلوده به نفتای سنگین در تیمارهای مختلف زیست‌پالایی

مریم نوروزپور[۱]، محمدرضا ساریخانی*[۲]، ناصر علی‌اصغرزاد[۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۰۷

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

چکیده

آلودگی خاک به ترکیبات نفتی مانند نفتای سنگین می‌تواند سلامت خاک، محیط زیست و انسان را تهدید کند. در روش زیست‌پالایی، ریزجانداران خاک از این هیدروکربن‌ها به عنوان منبع کربن استفاده نموده و ضمن ساخت زیتوده میکروبی، در تجزیه آن و تبدیل آن به دی‌اکسیدکربن نقش دارند. بدین منظور در یک خاک لوم‌شنی آلوده به نفتای سنگین (۷٪)، برای کاهش آلودگی، انواع تیمارهای زیست‌پالایی از جمله تحریک زیستی (شامل تأمین عناصر نیتروژن-فسفر، افزودن کود دامی و سورفکتانت توئین ۸۰)، تیمار تلقیح زیستی (استفاده از کنسرسیوم باکتری‌های کارآمد) و تیمار تلفیقی (شامل همه تیمارهای تحریک زیستی و تلقیح زیستی) مورد آزمایش قرار گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل اسپلیت پلات (فاکتور آلودگی، فاکتور زیست‌پالایی و زمان) با در نظر گرفتن ۳ تکرار در گلدان‌های ۳ کیلوگرمی انجام شد. پس از انجام آزمایش در زمان‌های مختلف (۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ روز)، میزان تنفس پایه و برانگیخته اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که تیمارهای زیست‌پالایی باعث کاهش آلودگی نفتای سنگین شدند، همچنین آلودگی فعالیت میکروبی خاک را تحت تأثیر قرار داد، به طوری که تنفس پایه و برانگیخته در همه تیمارهای زیست‌پالایی در روزهای ابتدایی افزایش یافت ولی با گذشت زمان به دلیل کاهش منبع کربن و همچنین کاهش عناصر غذایی خاک، کاهش پیدا کرد. به گونه‌ای که میزان تنفس پایه و تنفس برانگیخته در تیمار تلفیقی در مدت زمان آزمایش به ترتیب از ۰/۶۷ به ۰/۵۳ و از ۳/۳۰ به ۲/۷۳ ($mg\ CO_2\ g^{-1}\ h^{-1}$) کاهش یافت. همچنین اندازه‌گیری میزان ترکیبات نفتی قبل و بعد از تیمارهای زیست‌پالایی نشان داد که ۸۱٪ از نفتای سنگین توسط تیمار تلفیقی تجزیه شد. از میان تیمارهای زیست‌پالایی در سطح احتمال ($p<0.01$) تیمار تلفیقی نسبت به تیمار تحریک‌زیستی و تلقیح‌زیستی تأثیر بیشتری در حذف آلودگی نفتای سنگین داشت. به نظر استفاده از شیوه‌های تلفیقی علاوه بر بالا بردن جمعیت میکروبی فعال درگیر در تجزیه ترکیبات نفتی و تأمین شرایط بهینه برای فعالیت آنها، همچنین تحریک جمعیت میکروبی بومی خاک، روشی مناسب برای حذف ترکیبات نفتی باشد.

واژه‌های کلیدی: تحریک‌زیستی، تلقیح‌زیستی، تنفس برانگیخته، تنفس پایه، زیست‌پالایی، سورفکتانت، نفتای سنگین

Monitoring of Soil Respiration Changes in a Heavy Naphtha-Contaminated Sandy Loam Soil under Different Bioremediation Treatments

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

Received September 8, 2021 Accepted: December 28, 2021

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

Abstract

Background and Objectives

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

Methodology

In this experiment, a sandy loam soil was used. Heavy naphtha was applied at a rate of 7% to soil samples and various bioremediation treatments were performed as mentioned above. This experiment was carried out in a pot scale (containing 3 kg soil) based on split plot factorial design (pollution factor, bioremediation factor and time) with 3 replications, at room temperature for 120 days. During the experiment, the pots were aerated once a week and the soil moisture content was adjusted to 70-80% of the soil water holding capacity twice a week. For bioaugmentation of bacterial isolates, a bacterial suspension having a consortium of *Arthrobacter* sp. COD2-3, *Stenotrophomonas nitritireducens* COD5-6 ،*Stenotrophomonas asidamainiphila* COD1-1 with a ratio of 5% V/W were used. In biostimulation treatment, cow manure with 5% W/W ratio was used. In NP treatment, N and P elements from ammonium nitrate and potassium phosphate, respectively, were used with a ratio of 20:5:1 (C: N: P), considering soil organic carbon. Tween 80 as surfactant in the relevant treatments, was used at a rate of 0.3% V/W. In the integrated treatment, all the mentioned treatments were used together. On days 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 and 120, subsamples were taken from each pot to measure the biological traits including basal respiration (BR) and substrarte-induced respiration (SIR).

Findings

The results showed that the bioremediation treatments reduced heavy naphtha contamination. Contamination also affected soil microbial activity, so that BR and SIR increased in all bioremediation treatments in the early days, but over time they decreased, due to the reduction of carbon source and also the reduction of soil nutrients. The amount of BR and SIR in the combined treatment changed from 0.67 to 0.53 and 3.30 to 2.73 (mg CO_2 g^{-1} h^{-1}), respectively. Also, the amount of petroleum compounds before and after bioremediation treatments showed that 81% of heavy naphtha was decomposed by the integrated treatment. Among the bioremediation treatments, the integrated treatment had a greater effect on the elimination of heavy naphtha contamination than the biostimulation and bioaugmentation treatments (p <0.01). The use of integrated method not only increases the active population of microorganisms involved in the decomposition of petroleum compounds and providing optimal conditions for their activity, but also stimulates the native population of microorganisms and is convenient for removing petroleum compounds.

Conclusion: According to the microbial respiration results in naphtha-contaminated soil, each treatment was able to reduce contamination individually, while the integrated treatment was both biostimulatory and bioenhancing treatments. However, in the integrated treatment, the efficiency of bioremediation process was higher, due to the simultaneous use of biostimulation and bioaugmentation treatments. The use of integrated treatment in soils contaminated with petroleum compounds, including heavy naphtha, can help to biologically eliminate these contaminants.

Keywords: Basal respiration, Bioaugmentation, Bioremediation, Biostimulation, Heavy naphtha, Substrarte-induced respiration, Surfactant.

مقدمه

آلودگی محیط زیست با نفت و محصولات پتروشیمی در دهه‌های اخیر توجه زیادی را به خود جلب کرده‌است. امروزه نشت نفت و گسترش آلودگی‌های نفتی در اثر ناکارآمدی فرآیندهای استخراج، انتقال، پایش و همچنین بروز سوانح در بخش‌های مختلف صنعت نفت اعم‌از مناطق تولید نفت، پالایشگاه‌ها و خطوط حمل و نقل امری اجتناب‌ناپذیر است (گاد ۲۰۰۱). ترکیبات شیمیایی نفت خام از یک مکان به مکان دیگر متفاوت است و شامل گروه متنوعی از ترکیبات هیدروکربنی است (چاندرا و همکاران ۲۰۱۳). در این میان، نفتا به گروهی از سوخت‌های مایع هیدروکربنی با فراریت و اشتعال‌پذیری بالا گفته می‌شود که در برج تقطیر پالایش نفت خام بین گازهای سبک و نفت سفید قرار می‌گیرد. بخش عمده میعانات گازی یعنی نفتی که از چاه گاز برداشت می‌شود نیز حاوی نفتا است. این سوخت مایع از قطران زغال سنگ نیز قابل استحصال است. نفتا به طور دقیق شامل هیدروکربن‌های دارای ۵ تا ۱۲ اتم کربن می‌شود که نقطه جوش آنها از ۳۰ تا ۲۰۰ درجه سلسیوس متغیر است. اگر نفت خام از ۳۰ تا ۲۰۰ درجه سلسیوس حرارت داده شود و بخش جوشیده از آن جدا شود نفتا به دست می‌آید. معمولاً ۱۵ تا ۳۰ درصد نفت خام در این حرارت به جوش می‌آید، در نتیجه همین میزان از نفت خام می‌تواند به طور مستقیم به نفتا تبدیل شود. نفتا در بازار معمولاً در دو نوع نفتای سبک (بخش هیدروکربن‌های ۵ و ٦ کربنی و استخراج شده در دمای بین ۳۰ تا ٦۰ درجه سلسیوس) و نفتای سنگین (بخش هیدروکربن‌های ٦ تا ۱۲ کربنی و استخراج شده در دمای بین ۹۰ تا ۲۰۰ درجه سلسیوس) عرضه می‌شود (بال و همکاران ۱۹٤۹). نفتا کاربردهای متنوعی در صنایع شیمیایی و پتروشیمی دارد و از آن به عنوان خوراک اصلی تولید فراورده‌های مختلف پتروشیمی از جمله حلال‌ها و رقیق‌کننده‌ها، مواد

اولیه انواع پلاستیک، الیاف مصنوعی، الکل‌های صنعتی و برای تولید مواد شوینده استفاده می‌کنند. برای مثال بخش عمده تینرهای رنگرزی از نفتا تشکیل می‌شود و بیشتر ترکیب‌های پلاستیکی اتیلنی با نفتا ساخته می‌شوند (آلتجلت ۲۰۱٦).

برای پاکسازی محل‌های آلوده به نفت انواع متنوعی از روش‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی ارائه شده است (ابراهیمی و همکاران ۲۰۱٤). روش پاکسازی زیستی که به طور معمول شامل تبدیل آلاینده‌ها به مواد غیرسمی با استفاده از فعالیت ریزجانداران است، که روش بسیار امیدوارکننده‌ای برای تیمار آلودگی‌های نفتی به شمار می‌رود (مقاراج و همکاران ۲۰۱۱). کارایی زیست‌پالایی وابسته به پارامترهای زیر است: ۱) افزودن ریزجانداران تجزیه کننده نفت، ۲) حضور عناصر غذایی مانند اکسیژن محلول، نیتروژن و فسفر، ۳) عوامل محیطی (مرگسین و همکاران ۲۰۰٦). تجزیه زیستی هیدروکربن‌ها در خاک توسط عوامل بسیاری از جمله عناصر غذایی، pH، دما، رطوبت، اکسیژن، خواص خاک و حضور آلاینده محدود می‌شود (آتاگانا ۲۰۰۸). زیست‌پالایی موفق بستگی به شرایطی نظیر نوع خاک، فعالیت میکروبی، نسبت مناسب عناصر غذایی (به ویژه N و P)، رطوبت، دما، pH و در دسترس بودن اکسیژن دارد (سوجا و همکاران ۲۰۱٤، ورجانی و همکاران ۲۰۱۷). دو روش اصلی برای زیست‌پالایی آلودگی‌های ناشی از نشت نفت وجود دارد: تلقیح زیستی (افزودن باکتری تجزیه‌کننده نفت) و تحریک زیستی (تحریک‌کننده رشد میکروفلور بومی تجزیه‌کننده نفت از طریق افزودن عناصر غذایی یا سایر سوبستراهای مشترک، هوادهی، تأمین رطوبت و غیره) (داس و چاندران ۲۰۱۱). گوگی و همکاران (۲۰۰۳) در یک مطالعه موردی از زیست‌پالایی خاک‌های آلوده به نفت خام در محل نشت نفت دریافتند که اعمال هوادهی و کاربرد موادآلی دارای نیتروژن و فسفر و تلقیح میکروبی باعث تجزیه ۷۵٪ از آلاینده‌ها می‌شود.

ریزجانداران خاک می‌توانند از هیدروکربن‌ها به عنوان منبع کربن استفاده کنند و ضمن ساخت زیتوده میکروبی، و تبدیل ماده اولیه به مواد حدواسط، بخشی از کربن نیز در نتیجه تنفس میکروبی به شکل دی‌اکسید کربن رهاسازی میشود. به همین خاطر رهاسازی CO_2 نیز شاخصی از تجزیه این‌گونه مواد در خاک می‌باشد. هر یک از ویژگی‌های خاک (رطوبت، تهویه، دسترسی به سایر عناصر غذایی) و ماده آلی افزوده شده به خاک (غلظت و نوع آن) بر شدت تنفس خاک و سرعت تجزیه مواد و آلاینده‌های آلی تأثیر دارد (فریمن و همکاران ۲۰۰۸). از شاخص‌های بیولوژیکی مناسب که جهت بررسی اثر آلاینده در خاک مؤثر هستند می‌توان به جمعیت میکروبی، کربن بیومس میکروبی و تنفس میکروبی اشاره کرد (ماسیاندرو و همکاران ۲۰۱۳). تاوامانی و همکاران (۲۰۱۲) دریافتند که در خاک آلوده به هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (PAH[1] **ها**) و فلزات سنگین، علاوه بر کاهش در جمعیت، تنوع میکروبی و متابولیکی، فعالیت‌های آنزیمی نیز به شدت مهار می‌شوند. تنفس میکروبی به دو صورت تنفس پایه و برانگیخته اندازه‌گیری می‌شود، علاوه براینکه مشخص کننده وضعیت و فعالیت میکروبهای خاک هست، همچنین مشخص‌کننده روند، تعادل و چگونگی تجزیه ماده آلی، فعالیت آنزیمی و چرخه برخی عناصر غذایی خاک نیز خواهد بود (لو و همکاران ۲۰۰٦). لی و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که بالاترین سطح تنفس پایه، یک هفته پس از شروع آزمایش زیست‌پالایی 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 مقدار هیدروکربنها کاهش یافت، تنفس پایه نیز کاهش یافت ولی پس از سال اول و کاهش سطح آلودگی نفتی، تنفس پایه دوباره افزایش یافت. در

[1] Polycyclic aromatic hydrocarbons

پژوهشی که افشارنیا و همکاران (۲۰۱۹) در خاک آلوده به نفت انجام دادند، مشاهده کردند که میزان تنفس پایه و برانگیخته در هفته نخست آزمایش در تیمارهای زیست‌پالایی افزایش یافت. دلیل این افزایش، افزودن جمعیت میکروبی فعال در نتیجه تلقیح میکروبی بود و همچنین در مورد تیمار تلفیقی که حاوی کود دامی تأمین کننده مواد آلی برای جامعه میکروبی بود و به دلیل وجود فلور میکروبی خاص خود، تشدید فعالیت میکروبی رخ داده بود و پس از گذشت چهار ماه تنفس پایه و برانگیخته تیمارها نسبت به شروع آزمایش کاهش چشم‌گیری داشت.

با توجه به وجود آلودگیهای نفتی و ضرورت انجام پژوهش‌های زیست‌پالایی به منظور حذف آنها و نبود گزارشاتی در خصوص آلودگی نفتا و حذف زیستی آن، هدف این پژوهش اجرای روش‌های مختلف زیست‌پالایی از جمله تحریک زیستی (شامل افزودن کود دامی، کود شیمیایی NP، استفاده از Tween 80)، تلقیح زیستی (با استفاده از باکتری‌های جنس *Arthrobacter* و *Stenotrophomonas*) و تیمار تلفیقی (مخلوط کنسرسیوم باکتری‌های کارآمد، کود گاوی، کود شیمیایی NP و سورفاکتانت Tween 80) به منظور حذف زیستی ترکیب نفتی نفتای سنگین می‌باشد. علاوه بر مقایسه این روش‌ها با هم، بررسی روند تغییرات فعالیت تنفسی خاک در تیمارهای مورد استفاده بخش دیگری است که مورد توجه قرا می‌گیرد تا بتوان مقایسه‌ای بین خاک آلوده و غیرآلوده تحت تأثیر تیمارهای بکارگرفته شده انجام داد.

مواد و روش

آماده‌سازی خاک و اعمال تیمارهای زیست‌پالایی

در این آزمایش از خاکی با بافت لوم‌شنی استفاده شد که از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شد (جدول ۱). سپس آلودگی نفتای سنگین به میزان ۷٪ در نمونه خاک‌ها اعمال شد و تیمارهای مختلف زیست‌پالایی در آن به اجرا درآمد. این آزمایش در مقیاس گلدانی (گلدان‌های ۳ کیلوگرمی) در شرایط دمای اتاق به مدت ۱۲۰ روز، بعد از ایجاد آلودگی و اعمال تیمارهای تحریک‌زیستی، تلقیح‌زیستی و تلفیقی انجام شد. در طول آزمایش، هفته‌ای یک بار هوادهی گلدان‌ها انجام شد و هفته‌ای دو بار رطوبت نمونه خاک بر روی ۷۰-۸۰ درصد ظرفیت نگهداری آب خاک تنظیم شد. در روزهای ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۳۰، ٤٥، ٦٠، ۹۰ و ۱۲۰ روز از هر گلدان نمونه‌برداری به منظور اندازه‌گیری فعالیت زیستی تنفس پایه و برانگیخته انجام شد.

جدول ۱- نتایج تجزیه فیزیکی و شیمیایی خاک مورد آزمایش (ساریخانی ۲۰۰۴).

pH گل اشباع	EC_e (dS m^{-1})	فسفر قابل جذب* (mg kg^{-1})	پتاسیم قابل جذب** (mg kg^{-1})	درصد کربن آلی	رس (درصد)	سیلت (درصد)	شن (درصد)	بافت	آهک (درصد کربنات کلسیم معادل)	رطوبت ظرفیت مزرعه (درصد وزنی)
۷/٥٦	۱/۹	۳	۱۹۸	۰/۱۷	۱۸	۱۳	٦۹	لوم‌شنی	۲/۸٥	۱۲/٥۷

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

تلقیح زیستی و تحریک زیستی و تیمار تلفیقی

برای انجام تلقیح‌زیستی از جدایه‌های باکتریایی تجزیه‌کننده نفت (*Arthrobacter* sp. COD2-3، *Stenotrophomonas nitritireducens* COD5-6، *Stenotrophomonas asidamainiphila* COD1-1) استفاده شد (افشارنیا و همکاران ۲۰۱۷). جدایه‌های مورد استفاده در این آزمایش از بانک میکروبی گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه تبریز تهیه شدند. هر سه جدایه

ابتدا به‌طور جداگانه در محیط کشت نوترینت براث به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور در دمای ۲٦ درجه سلسیوس کشت داده شدند و پس از رسیدن به جمعیت مناسب (10^8 cfu mL^{-1}) به میزان ٪۵ حجمی–وزنی به خاک‌های مورد آزمایش بر اساس تیمارهای آزمایش تلقیح شدند. در تحریک زیستی، بعد از تهیه کود گاوی، کودها به مدت ٤ روز هوا خشک شد و سپس از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شد و با نسبت ٪۵ وزنی مورد استفاده قرار گرفت (افشارنیا و همکاران ۲۰۱۷). کود مورد استفاده به ترتیب دارای ۲٤/۹٦، ۱/۵۲ و ۰/۵ درصد کربن، نیتروژن و فسفر بود. در مورد تیمار NP که مربوط به تأمین عناصر نیتروژن و فسفر بود با توجه به نسبت۱:۵:۲۰ (C:N:P)، جهت تأمین عناصر نیتروژن و فسفر به ترتیب از منابع نیترات آمونیوم و فسفات پتاسیم استفاده شد (به عنوان نمونه در خاک آلوده با تیمار کود شیمیایی NP ، ۰/۷۹ گرم کود از منبع فسفات پتاسیم و ۳/٤ گرم کود از منبع نیترات پتاسیم به ازای ۳ کیلوگرم خاک گلدان استفاده شد) (افشارنیا و همکاران ۲۰۱۹). همچنین جهت استفاده از سورفاکتانت Tween 80 در تیمارهای مربوطه از نسبت ۰/۳ درصد حجمی–وزنی استفاده شد (دشتی و همکاران ۲۰۱۵). در تیمار تلفیقی مخلوطی از کنسرسیوم باکتریایی با ٪۵ حجمی– وزنی، کود گاوی با ٪۵ وزنی–وزنی، کود شیمیایی NP و سورفاکتانت Tween 80 با ۰/۳ درصد حجمی– وزنی استفاده شد.

اندازه‌گیری تنفس پایه و تنفس برانگیخته

اندازه‌گیری تنفس پایه به روش تیتراسیون انجام شد (اندرسون ۱۹۸۲). ۱۰ گرم خاک مرطوب به داخل ظرف شیشه‌ای درب‌دار ۱/۵ لیتری با ۱۰ میلی‌لیتر محلول هیدروکسیدسدیم ۰/۱ مولار به مدت ۳ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس انکوبه شد. پس از اتمام انکوباسیون محلول هیدروکسیدسدیم دو مرتبه با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر شستشو داده شد و سپس دو میلی‌لیتر محلول کلریدباریم ۰/۵ مولار اضافه شد و ۳–٤ قطره شناساگر فنل‌فتالئین به محلول اضافه شد و با اسید کلریدریک ۰/۱ مولار تیتر شد. برای نمونه شاهد نیز همین مراحل کار بدون افزودن نمونه خاک انجام شد. در تنفس برانگیخته پس از افزودن ٤۰ میلی‌گرم گلوکز (۰/٤ درصد) به ۱۰ گرم خاک مرطوب همانند روش فوق اندازه‌گیری شد، با این تفاوت که CO_2 متصاعد شده پس از گذشت ۲٤ ساعت به روش تیتراسیون اندازه‌گیری شد. (توجه: در هنگام تیتر، تغییر رنگ از ارغوانی به صورتی کم رنگ است)

اندازه‌گیری میزان هیدروکربن نفتی قبل و بعد از تیمارهای زیست‌پالایی

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

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

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

تعیین نوع و غلظت آلاینده‌ها در برخی از تیمارها با دستگاه GC-Mass

در تیمارهای منتخب پس از انجام زیست‌پالایی به همراه تیمار شاهد قبل و بعد از زیست‌پالایی جهت تعیین نوع و غلظت آلاینده‌ها انتخاب شدند. یک میکرولیتر از عصاره خاک استخراج شده با دستگاه سوکسله با حلال دی‌کلرومتان بوسیله دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC-Mass) مورد سنجش و تعیین مقادیر آلاینده‌ها قرار گرفت (زارعی و همکاران ۲۰۰۹). (توجه: در تعیین نوع

و غلظت آلاینده‌ها با دستگاه (GC-Mass)، فقط غلظت آلاینده تیمار کودگاوی مورد آزمایش قرار گرفت.)

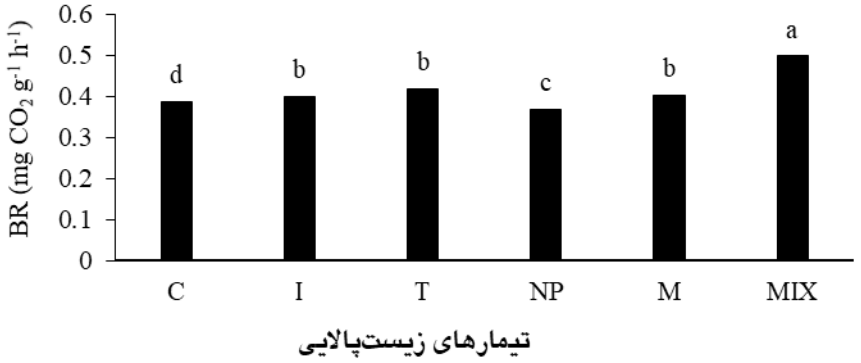
تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش به صورت طرح فاکتوریل اسپلیت‌پلات بر پایه طرح کاملاً تصادفی به اجرا درآمد، که در آن زمان، آلاینده و تیمارهای زیست‌پالایی، فاکتورهای سه گانه آزمایش بودند و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD توسط نرم‌افزار آماری MSTATC انجام شد.

نتایج و بحث

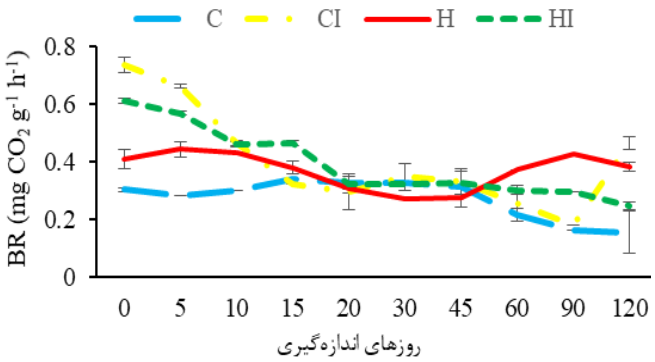
تنفس پایه

طبق نتایج به دست آمده از تنفس پایه، بین فاکتور آلودگی (خاک شاهد و خاک آلوده به نفتای سنگین)، فاکتور تیمارهای زیست‌پالایی (خاک شاهد بدون تیمار زیست‌پالایی، تلقیح کنسرسیوم باکتریایی، سورفکتانت Tween 80، کودهای شیمیایی NP، کود گاوی و تیمار تلفیقی) و فاکتور زمان (۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ روز) در سطح احتمال ۱٪ ($p<0.01$) اختلاف معنی‌دار وجود داشت. با توجه به شکل ۱، میزان تنفس پایه به ترتیب در تیمار تلفیقی (MIX)، سورفکتانت Tween80 (T)، تلقیح کنسرسیوم باکتریایی (I) و کود گاوی (M) بیشترین به دست آمد و پس از آنها کود شیمیایی NP (NP) و خاک شاهد (C) بودند.

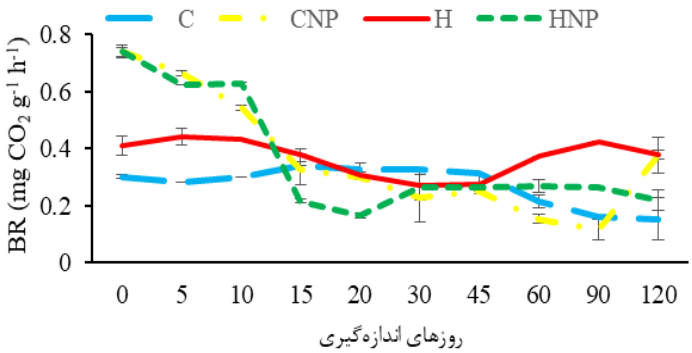


شکل ۱-مقادیر تنفس پایه اندازه‌گیری شده در خاک تحت تیمارهای مختلف زیست‌پالایی (خاک شاهد (C)، کنسرسیوم باکتریایی (I)، سورفکتانت Tween 80 (T)، کود شیمیایی NP (NP)، کود گاوی (M) و تیمار تلفیقی (MIX)).

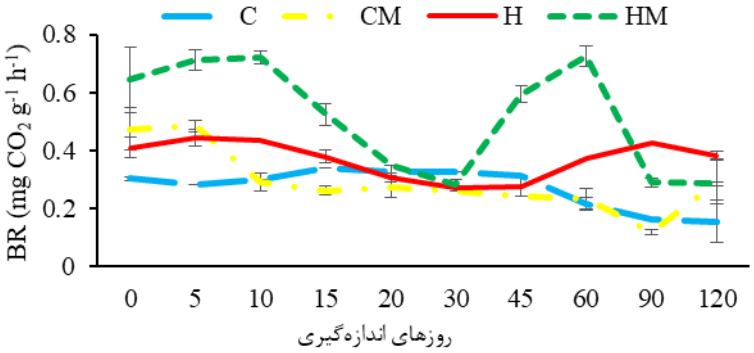
طبق نتایج به دست آمده در تنفس پایه در تیمارهای کنسرسیوم باکتریایی (I) (شکل ۲-الف)، کود شیمیایی NP (NP) (شکل ۲-ب)، تیمار Tween 80 (T) (شکل ۲-ج)، تیمار کود گاوی (M) (شکل ۲-د) و تلفیقی (MIX) (شکل ۲-ه) تنفس پایه از روز صفر تا ۱۰ افزایشی بود و بعد از آن روند کاهشی بود. بیشترین میزان تنفس پایه



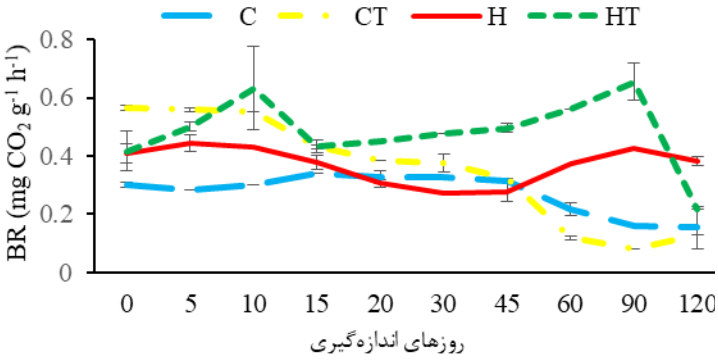
شکل ۲-الف: روند تغییرات زمانی مقادیر تنفس پایه در خاک شاهد بدون آلودگی و بدون تیمار زیست‌پالایی (C)، خاک بدون آلودگی با تلقیح کنسرسیوم باکتریایی (CI)، خاک آلوده و بدون تیمار زیست‌پالایی (H)، خاک آلوده با تلقیح



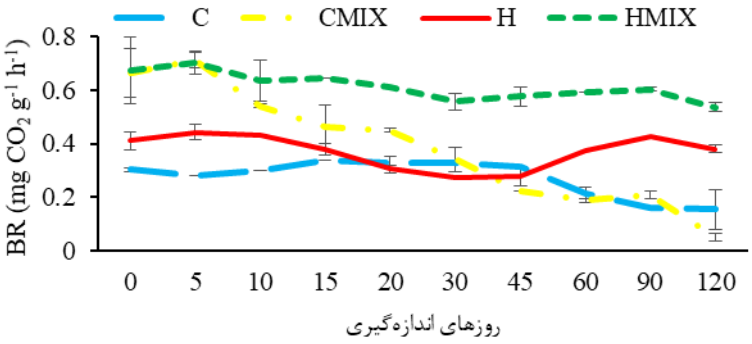
شکل ۲-ب: روند تغییرات زمانی مقادیر تنفس پایه در خاک شاهد بدون آلودگی و بدون تیمار زیست‌پالایی (C)، خاک بدون آلودگی با تیمار NP (CNP)، خاک آلوده و بدون تیمار زیست‌پالایی (H)، خاک آلوده با تیمار کود شیمیایی NP (HNP).



شکل ۲-د- روند تغییرات زمانی مقادیر تنفس پایه در خاک شاهد بدون آلودگی و بدون تیمار زیست‌پالایی (C)، خاک بدون آلودگی با تیمار کود گاوی (CM)، خاک آلوده بدون تیمار زیست‌پالایی (H)، خاک آلوده با تیمار کود گاوی (HM).



شکل ۲-ج: روند تغییرات زمانی مقادیر تنفس پایه در خاک شاهد بدون آلودگی و بدون تیمار زیست‌پالایی (C)، خاک بدون آلودگی با تیمار Tween 80 (CT)، خاک آلوده بدون تیمار زیست‌پالایی(H)، خاک آلوده با تیمار Tween 80 (HT).



شکل ۲-و- روند تغییرات زمانی مقادیر تنفس پایه در خاک شاهد بدون آلودگی و بدون تیمار زیست‌پالایی (C)، خاک بدون آلودگی با تیمار تلفیقی (CMIX)، خاک آلوده بدون تیمار زیست‌پالایی (H)، خاک آلوده با تیمار تلفیقی (HMIX).

مربوط به تیمارهای تلفیقی، کود گاوی و توئین ۸۰ بود.

با توجه به شکل ۲-الف، در خاک آلوده تلقیح شده با کنسرسیوم باکتریایی به نظر می‌رسد که جدایه‌هایی باکتریایی در روزهای ابتدائی هیدروکربن‌های موجود را جذب کرده باشند و تنفس پایه در خاک افزایش یابد ولی با گذشت زمان با کاهش هیدروکربن‌های در دسترس میزان تنفس BR کاسته شده است. با نگاهی به نمودار تنفس برانگیخته مشخص میشود که زادمایه افزوده شده نیاز به منبع کربن دارد و با افزودن گلوکز میزان تنفس SIR در این تیمار افزایشی بوده است (شکل ٤-الف). لی و همکاران (۲۰۰۸) عنوان داشتند که در خاک آلوده، تنفس پایه خاک به سرعت زیاد می‌شود چون بیشتر هیدروکربن‌های در دسترس، فعالیت میکروبی را تحریک می‌کنند. تلقیح زیستی به عنوان مناسب‌ترین استراتژی برای بازیابی خاک‌های فقیر از نظر جوامع میکروبی برای تجزیه هیدروکربن‌های نفتی شناخته شده‌است (کوپوسامی و همکاران ۲۰۱۷). دلیل آن را می‌توان افزایش میزان سوخت و ساز و سازگاری ژنتیکی جمعیت میکروبی در محیط‌زیست خودشان

دانست که نقش به‌سزایی در موفقیت زیست‌پالایی محیط‌های آلوده دارد (بسالت پور و همکاران ۲۰۱۰).

با توجه به شکل ۲-ب، به نظر می‌رسد که در زمان‌های ابتدائی ریزجانداران خاک N و P جذب می‌کنند و تنفس در روزهای ابتدائی زیاد است ولی با گذشت زمان به دلیل کاهش N و P خاک و همچنین کاهش منبع آلودگی، ریزجانداران خاک قادر به جذب نبودند و جمعیت میکروبی خاک کاهش می‌یابد و در نتیجه تنفس خاک کاهش می‌یابد. یکی از مهم‌ترین عواملی که تجزیه هیدروکربن‌ها را محدود می‌کند دسترسی کم آنها برای ریزجانداران است (مهاجری و همکاران ۲۰۱۰). PHCها عمدتاً ترکیبات کربن و هیدروژن هستند. بنابراین آلودگی خاک با یک محصول مشتق یافته از نفت باعث تحریک آن می‌شود و عدم تعادل در نسبت C:N (کربن به نیتروژن) دسترسی به عناصر غذایی برای رشد و فعالیت میکروبی را محدود می‌کند (واندرا و کوککو ۲۰۱۷). عدم تعادل در نسبت C:N:P بیشترین محدودیت در فرآیند زیست‌پالایی ایجاد می‌کند (صفدری و همکاران ۲۰۱۸). در نتیجه استراتژی‌های موجود در تجزیه به روش تحریک زیستی در خاک برپایه افزودن مواد شیمیایی (کودهای شیمیایی N و P) یا مواد آلی مختلف (کودهای دامی، فاضلاب خانگی، بیوچار برنج، باقی‌مانده‌های زراعی و انواع مختلف کمپوست‌ها از نظر ترکیب و درجه تثبیت متفاوت هستند) به منظور افزایش قدرت تجزیه ریزجانداران بومی استوار است (گکورزیس و همکاران ۲۰۱۶). در طول تحریک زیستی یک خاک، افزودن سطوح مناسب عناصر غذایی حائز اهمیت است. از نظر تئوری برای تجزیه ۱ گرم هیدروکربن، ۱۵۰ میلی‌گرم نیتروژن و ۳۰ میلی‌گرم فسفر مورد نیاز است. در نتیجه نسبت C:N:P ، ۱:۵:۱۰۰ برای تحریک زیستی خاک آلوده شده به PHC به عنوان نسبت مطلوب در نظر گرفته شده‌است (شاهی و همکاران ۲۰۱۶a). با این‌حال نسبت مناسب C:N:P برای هر مکان آلوده شده با توجه به محصول مشتق یافته از نفت که دارای خواص مختلفی هستند تحت تأثیر عوامل محیطی مختلف باید شناسایی شود. برای مثال، تورگای و همکاران (۲۰۱۰) موفق شدند برای تحریک زیستی خاک آلوده به نفت خام از نسبت C:N:P ، ۱:۱۵:۱۰۰ استفاده کنند، در حالی که کین و همکاران (۲۰۱۳) در خاک آلوده به نفت با استفاده از بیوچار برنج و با نسبت C:N:P ، ۱:۱۰:۱۰۰ توانستند خاک را پاکسازی کنند.

با توجه به شکل ۲-ج، یکی از دلایل افزایش تنفس پایه خاک در حضور سورفکتانت در هر دو خاک آلوده و غیر آلوده می‌تواند به این موضوع مربوط باشد که خود Tween 80 به عنوان یک منبع کربن مورد استفاده و تجزیه ریزجانداران قرار گرفته است. حال افزایش بیشتر تنفس در خاک آلوده به نفتای سنگین، می‌تواند مربوط به افزایش فراهمی زیستی منابع کربن نفتی در حضور Tween 80 برای جامعه میکروبی خاک باشد. از استراتژی‌های تحریک زیستی به کار بردن ترکیباتی همچون بیوسورفکتانت و پذیرنده‌های الکترون (O_2، کلات Fe^{3+}، نیترات یا سولفات) می‌باشد (شاهی و همکاران b ۲۰۱۶). مولکول سورفکتانت شامل یک سر آبدوست و یک یا دو دم آب‌گریز است که در دم آب گریز خود دارای زنجیره‌های هیدروکربنی بلندی است. بخش آب‌گریز سورفکتانت با هیدروکربنهای غیرقطبی نفتی و PAHها تشکیل کمپلکس داده و سپس سورفکتانت‌ها تشکیل میسل می‌دهند که سر آبدوست میسل در محیط آبی قرار گرفته و دم آب‌گریز آن‌ها در قسمت مرکز و PAH نیز در قسمت مرکزی یا هسته میسل که غیر قطبی است، جای می‌گیرد. بنابراین با این مکانیسم سورفکتانت‌ها آلاینده‌های آب‌گریز را از فاز جامد خاک خارج کرده و به فاز محلول انتقال می‌دهند و ریزجانداران می‌توانند از میسل‌ها و هیدروکربن‌های گیر افتاده در آن‌ها تغذیه کنند (لیی و همکاران ۲۰۰۹). تجزیه آلاینده‌های آلی در خاک اغلب به دلیل فراهمی زیستی دشوار است و اضافه کردن سورفکتانت در

خاک می‌تواند فراهمی زیستی برخی از آلاینده‌های آلی را افزایش دهد (چنگ و همکاران ۲۰۰۸). توئین ۸۰ کمترین هزینه و سمیت را برای ریزجانداران خاک نسبت به بیشتر سورفکتانت‌های غیریونی دیگر دارد (بایوتیستا و همکاران ۲۰۰۹). سورفکتانت غیریونی به ویژه توئین ۸۰ برای سرعت بخشیدن به میزان زیست‌پالایی برای افزایش فراهمی زیستی هیدروکربن‌ها استفاده شده‌است. به عنوان مثال، افزودن توئین ۸۰ برای تجزیه فنانترن توسط تحریک کردن سویه GY2B *Sphingomonas* sp. (لیو و همکاران ۲۰۱۶) و حلالیت و تجزیه هگزان توسط قارچ و باکتری (ویی و همکاران ۲۰۱۶) گزارش شده است. افزایش تجزیه نفت خام و نفت دیزل توسط چندین باکتری تجزیه کننده هیدروکربن در حضور این سورفکتانت گزارش شده‌است (تیان و همکاران ۲۰۱۶).

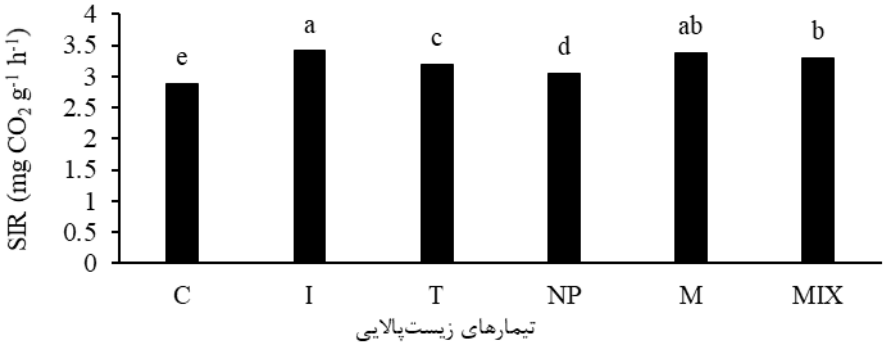
با توجه به شکل ۲-د، افزودن کود گاوی به چند صورت می‌تواند بر تشدید فعالیت تنفس میکروبی خاک مؤثر باشد: الف) وجود میکروفلور موجود در خود کود گاوی یا به عبارتی ریزجانداران بومی موجود در کود، ب) بهبود خواص فیزیکی خاک و افزایش تهویه، ج) وجود عناصر غذایی در کود و تأمین آن برای ریزجانداران خاک از جمله عواملی است که می‌توان در این خصوص برشمرد (آگاموتو و همکاران ۲۰۱۳). کود گاوی علاوه بر فراهم کردن مواد مغذی بر میکروارگانیسم‌ها بدلیل بهبود خواص فیزیک و شیمیایی خاک‌های آلوده باعث سازگاری سریع میکروب‌ها به خاک آلوده شده و نهایتاً منجر به افزایش فعالیت میکروبی و تجزیه بالای ترکیبات نفتی در خاک شده است (آگاموتو و همکاران ۲۰۱۳). کاهش تنفس پایه در روزهای پایانی به دلیل کاهش منبع آلودگی و همچنین کاهش عناصر غذایی می‌باشد. اضافه کردن کودهای حیوانی به دلیل بهبود ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک از جمله بهبود ساختمان خاک، تسهیل ترابری اکسیژن، فراهم کردن انرژی برای ریزجانداران و در نتیجه تشدید فعالیت میکروبی بسیار مؤثر می‌باشد. در تیمارهایی که از کود حیوانی استفاده می‌شود، پدیده گلوله شدن در خاک مرطوب کمتر به چشم می‌خورد و در نتیجه باعث پوک‌تر شدن و غنی‌تر شدن خاک شده و دسترسی ریزجانداران را برای تجزیه ترکیبات نفتی بیشتر می‌کند (دوستکی و همکاران ۲۰۱۳). افشارنیا و همکاران (۲۰۱۹) برای کاهش آلودگی نفت خام در خاک آلوده در پالایشگاه تبریز از کود گاوی با ٪۵ (وزنی-وزنی) استفاده کردند. نتایج نشان داد که در روزهای ابتدائی تنفس پایه خاک افزایش یافته بود و پس از ٤ ماه تنفس پایه خاک کاهش چشمگیری داشت دلیل این امر را هم به کاهش عناصر غذایی برای ریزجانداران خاک و رسیدن به فاز ثابت و مرگ میکروبی عنوان نمودند. استفاده از کود گاوی به عنوان منبع مواد آلی در بهبود زیست‌پالایی نفت خام در مرداب‌های حرا در دلتای نیجریا درکشور نیجریه گزارش شده‌است (اُرجی و همکاران ۲۰۱۲). در این پژوهش که ۷۰ روز به طول انجامید، با استفاده از کود گاوی، جمعیت باکتریایی به‌طور قابل توجهی به $۲/۸\times۱۰^{۷}$ cfu g^{-1} افزایش یافت. در روز ۷۰ام، ٦۲/۰۸ درصد از TPH تجزیه شد در حالیکه در تیمار شاهد میزان تجزیه فقط ۲۰ درصد بود.

با توجه به شکل ۲-و، تنفس پایه در خاک آلوده با تیمار تلفیقی (MIX) نسبت به خاک آلوده بدون تیمار (H) در همه زمان‌های اندازه‌گیری شده دارای میانگین بالاتری بود. به نظر می‌رسد حضور سورفکتانت به فراهمی زیستی هیدروکربن کمک کرده باشد، از طرف دیگر کود NP و کود گاوی به تحریک زیستی کمک نموده باشد و همزمان فعالیت جمعیت میکروبی افزوده شده به خاک (کنسرسیوم باکتریایی) و میکروفلور بومی خاک را افزایش داده باشد که نتیجه آن بهره‌گیری بیشتر از هیدروکربن نفتی و افزایش فعالیت تنفس پایه خاک بوده است. با این حال ترکیبات به راحتی در دسترس هستند و به سرعت مورد استفاده قرار می‌گیرند و تنفس پایه در ابتدا افزایش می‌یابد و کاهش

در روزهای بعد ممکن است همراه با کاهش عناصر غذایی در خاک و کاهش منبع کربن موجود در آلاینده باشد و باعث اختلال در شرایط رشد باکتری‌ها شود (ریفالدی و همکاران ۲۰۰۶). گومز و سرتاج (۲۰۱٤) برای خاک مزرعه آلوده به نفت با غلظت ۹٤۰ میکروگرم بر گرم از تلقیح زیستی (استفاده از کنسرسیوم میکروبی) و تحریک زیستی (استفاده از کمپوست آلی) به عنوان تیمار زیست‌پالایی استفاده کردند. استفاده از کنسرسیوم میکروبی و کمپوست آلی نشان داد که کارایی حذف به ترتیب ۵۵٪ و ۵۲٪ بود. ولی در خاک آلوده به نفت با غلظت ۱٦٦ میکروگرم بر گرم از مخلوط کنسرسیوم میکروبی و کمپوست استفاده شد و در مدت ٤۰ روز، کاهش آلودگی به میزان ۸۲٪ مشاهد شد.

تنفس برانگیخته

طبق نتایج به دست آمده از تنفس برانگیخته، بین فاکتور آلودگی (خاک شاهد و خاک آلوده به نفتای سنگین)، فاکتور تیمارهای زیست‌پالایی (خاک شاهد بدون تیمار زیست‌پالایی، تلقیح کنسرسیوم باکتریایی، سورفاکتانت Tween 80، کودهای شیمیایی کود گاوی NP، کود گاوی و تیمار تلفیقی) و فاکتور زمان (۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ٤۵، ٦۰، ۹۰ و ۱۲۰ روز) در سطح احتمال ۱٪ ($p<0.01$) اختلاف معنی‌دار وجود داشت. با توجه به شکل ۳، بیشترین میزان تنفس برانگیخته مربوط به تیمار کنسرسیوم باکتریایی (I)، کود گاوی (M) و تیمار تلفیقی (MIX) است و پس از آنها تیمار Tween 80 (T)، کود شیمیایی NP (NP) و خاک شاهد (C) در رتبه‌های بعدی هستند. افزودن مایه تلقیح باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت و کود دامی اثر افزایشی بر تنفس برانگیخته داشته است.



شکل۳- مقادیر تنفس برانگیخته اندازه‌گیری شده در خاک تحت تیمارهای مختلف زیست‌پالایی (خاک شاهد (C)، کنسرسیوم باکتریایی (I)، سورفاکتانت Tween 80 (T)، کود شیمیایی NP (NP)، کود گاوی (M) و تیمار تلفیقی (MIX)).

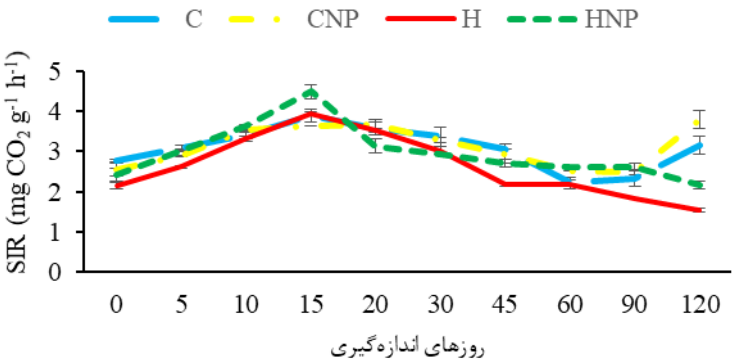
طبق نتایج به دست آمده در تنفس برانگیخته در تیمارهای کنسرسیوم باکتریایی (I) (شکل ٤-الف)، کود شیمیایی NP (NP) (شکل ٤-ب)، تیمار توئین ۸۰ (T) (شکل ٤-ج) ، تیمار کود گاوی (M) (شکل ٤-د) و تیمار تلفیقی (MIX) (شکل ٤-ه) تنفس برانگیخته از روز صفر تا ۲۰ افزایشی بود. از روز ۲۰ به بعد روند کاهشی داشت.

با توجه به شکل ٤-الف، به نظر می‌رسد که در خاک آلوده، کنسرسیوم باکتریایی از نفتای سنگین به عنوان منبع تغذیه استفاده کرده باشد و باعث شده است که در روزهای ابتدائی تنفس افزایش یابد ولی با گذشت زمان به دلیل کاهش آلودگی، کنسرسیوم باکتریایی قادر به استفاده از منبع آلودگی نبوده و هیدروکربن‌ها کاهش یافته و جمعیت باکتریایی کاهش می‌یابد و در نتیجه

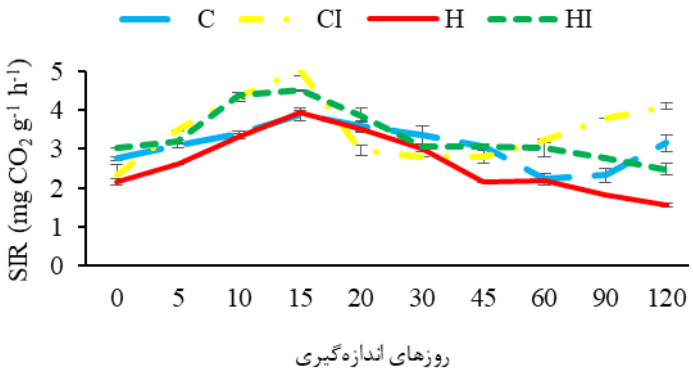
تنفس خاک کاهش یافته است و سویه‌های باکتریایی جدا شده از هیدروکربن‌های نفتی، از نفت خام به عنوان تنها منبع کربن و انرژی استفاده می‌کنند و با کاهش منبع کربن مربوط به منبع آلودگی کاهش می یابد (داس و همکاران ۲۰۰۷). در روش تلقیح میکروبی برای بالا بردن میزان تجزیه نفت از باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت منتخب استفاده میشود که به جمعیت میکروبی موجود اضافه می‌شود. معیار انتخاب میکروب‌ها، توانایی متابولیکی و فیزیولوژیکی میکروب برای تجزیه خاک آلوده شده به نفت است (بوپادی ۲۰۰۰). پژوهش‌های متعددی در دست است که نشان می‌دهد سویه‌های مختلف باکتریایی نه تنها نسبت به آلودگی‌های نفتی مقاوم هستند بلکه برخی از آنها قادرند از این ترکیبات به عنوان منبع کربن و ماده غذایی استفاده کنند، بنابراین وجود این ترکیبات نه تنها مانع رشد باکتری‌ها نمی‌شود بلکه موجب رشد بیشتر و سریعتر باکتری‌های سازگار می‌شوند (امتیازی و همکاران، ۲۰۰۵). امتیازی و همکاران (۲۰۰۵) نیز به منظور بررسی تجزیه ترکیبات مختلف نفتی توسط سویه‌ای از سودوموناس، آزمایشی طراحی کردند که به مدت زمان ۹ روز انجام شد. آنان در مدت آزمایش خود رشد باکتری را به منزله استفاده از هیدروکربن‌ها بررسی نمودند و کارایی آن را در تجزیه ترکیبات نفتی مثبت ارزیابی کردند.

باتوجه به شکل ٤-ب، در خاک آلوده با تیمار کود شیمیایی NP (HNP) به نظر می‌رسد در روزهای ابتدائی باکتری‌های بومی خاک در حضور NP و فراهمی شرایط ایده‌آل برای استفاده از منبع کربن نفتی از آلودگی نفتی استفاده کرده باشند و باعث افزایش تنفس خاک شده است و با گذشت زمان به دلیل کاهش NP و کاهش منبع آلودگی ریزجانداران قادر به استفاده از NP و منبع آلودگی نبودند در نتیجه جمعیت میکروبی کاهش یافته و باعث کاهش تنفس برانگیخته خاک شده‌است. کودهای شیمیایی به عنوان عامل تحریک زیستی در سراسر جهان استفاده می‌شوند. پژوهش‌ها نشان می‌دهند استفاده از کودهای شیمیایی (NPK) برای کاهش اثر منفی خاک آلوده شده به نفت در محیط‌زیست و افزایش تولیدات کشاورزی اهمیت زیادی دارند. گزارش شده است که در ۱۰۰ گرم خاک آلوده شده به نفت، با استفاده از باکتری و افزودن ٤٠ گرم کود کشاورزی NPK افزایش قابل توجه در تجزیه هیدروکربن‌ها مشاهده شده است، به گونه‌ای که حدود ٪۵۰-۳۰٪ از میزان هیدروکربن‌ها کاهش یافته بود. یافته‌های مشابه در مورد زیست‌پالایی هیدروکربن‌ها با به کارگیری کود N-P-K در خاک آلوده شده به نفت گزارش شده‌است (یوبوچی و همکاران ۲۰۰٦). ریزجانداران هیدروکربن‌های سبک را در مقایسه با هیدروکربن‌های سنگین بیشتر مورد حمله و تجزیه قرار می‌دهند (ونوسا و همکاران ۲۰۰۲). سیلوا و همکاران (۲۰۱۵) با به‌کارگیری مصرف فنتون و کود NPK میزان تجزیه دیزل را ۵۸٪ ، ۵۷٪ و ۳۲٪ به ترتیب در لایه‌های سطحی، لایه غیراشباع و لایه اشباع شده از خاک آلوده شده به دیزل با آلودگی اولیه ۲٪ گزارش کردند. آنان نشان دادند که بلافاصله پس از آلودگی خاک، اختصاصی شدن و تمایز جمعیت باکتریایی اتفاق می‌افتد، آنها همچنین گزارش کردند که تحریک میکروب‌های تجزیه‌کننده افزایش می‌یابد و فعالیت تجزیه بیولوژیکی بهبود می‌یابد.

با توجه به شکل ٤-ج، دلیل افزایش فراهمی زیستی ماده

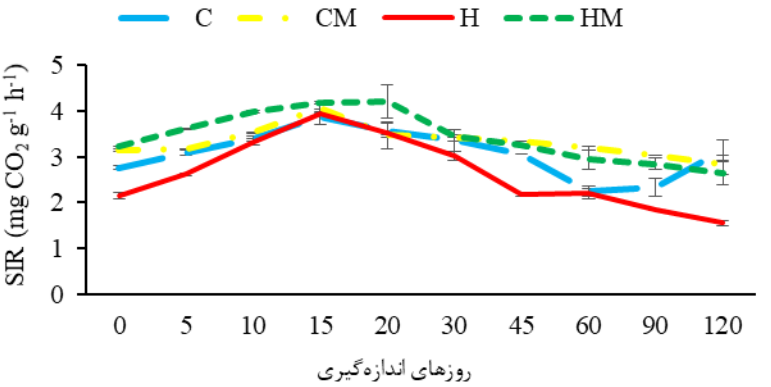


شکل ۴-ب: روند تغییرات زمانی مقادیر تنفس برانگیخته در خاک شاهد بدون آلودگی و بدون تیمار زیست‌پالایی (C)، خاک بدون آلودگی با تیمار NP (CNP)، خاک آلوده و بدون تیمار زیست‌پالایی (H)، خاک آلوده با تیمار کود شیمیایی NP (HNP).

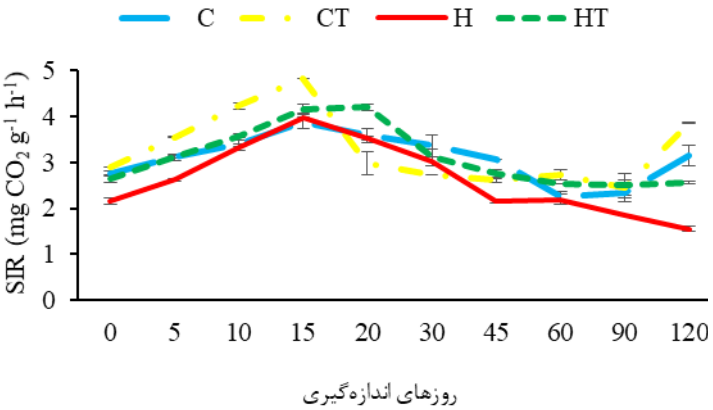


شکل ۴-الف: روند تغییرات زمانی مقادیر تنفس برانگیخته در خاک شاهد بدون آلودگی و بدون تیمار زیست‌پالایی (C)، خاک بدون آلودگی با تلقیح کنسرسیوم باکتریایی (CI)، خاک آلوده و بدون تیمار زیست‌پالایی (H)، خاک آلوده با تلقیح کنسرسیوم باکتریایی (HI).

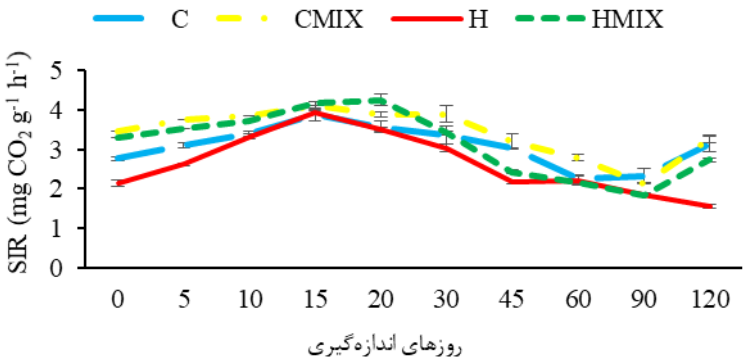
نفتی باعث شده است که هیدروکربن‌های نفتی به راحتی



شکل ۴-د: روند تغییرات زمانی مقادیر تنفس برانگیخته در خاک شاهد بدون آلودگی و بدون تیمار زیست‌پالایی (C)، خاک بدون آلودگی با تیمار کود گاوی (CM)، خاک آلوده بدون تیمار زیست‌پالایی (H)، خاک آلوده با تیمار



شکل ۴-ج: روند تغییرات زمانی مقادیر تنفس برانگیخته در خاک شاهد بدون آلودگی و بدون تیمار زیست‌پالایی (C)، خاک بدون آلودگی با تیمار Tween 80 (CT)، خاک آلوده بدون تیمار زیست‌پالایی(H)، خاک آلوده با تیمار Tween 80 (HT).



شکل ۴-و: روند تغییرات زمانی مقادیر تنفس برانگیخته در خاک شاهد بدون آلودگی و بدون تیمار زیست‌پالایی (C)، خاک بدون آلودگی با تیمار تلفیقی (CMIX)، خاک آلوده بدون تیمار زیست‌پالایی (H)، خاک آلوده با تیمار تلفیقی (HMIX).

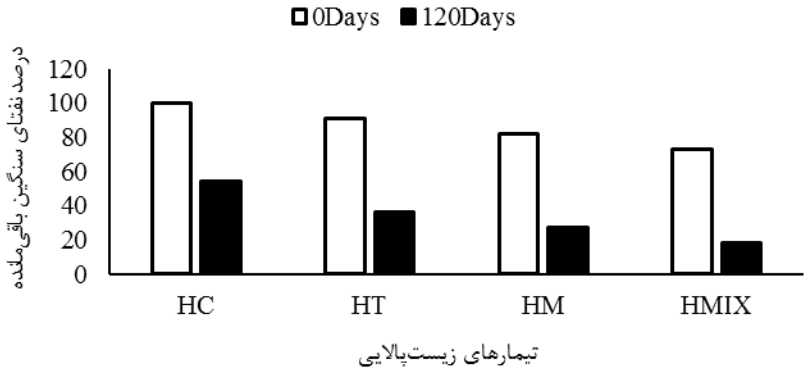
در دسترس جمعیت میکروبی بومی خاک قرار بگیرد و باکتری‌ها به راحتی از منبع آلودگی استفاده بکنند و تنفس برانگیخته خاک در روزهای ابتدائی افزایش می‌یابد. ولی با گذشت زمان به دلیل کاهش منبع آلودگی و کاهش جمعیت ریزجانداران بومی خاک تنفس برانگیخته خاک کاهش یابد. Tween 80 یک سورفکتانت غیریونی و غیرسمی است که در ماتریکس خاک نفوذ می‌کند و می‌تواند به کمک ریزجانداران خاک باعث تجزیه هیدروکربن‌های نفتی می‌شود (آنجلا ۲۰۰۰). Tween 80 می‌تواند به عنوان منبع کربن برای رشد برخی ریزجانداران در خاک آلوده استفاده شود (ابیو و همکاران ۲۰۰۳، زیو و همکاران ۲۰۱۳) همین موضوع می‌تواند دلیل بر افزایش SIR در خاک شاهد دارای Tween 80 باشد.

با توجه به شکل ٤-د، کود گاوی به عنوان یک منبع غنی به راحتی در دسترس ریزجانداران خاک قرار می‌گیرد. افزودن کود گاوی به دو خاک آلوده و غیر آلوده باعث افزایش SIR شد. به نظر هم میکروفلور موجود در کود دامی و هم بهبود شرایط فیزیکی خاک و تهویه و تأمین عناصر غذایی به ویژه کربن و سایر عناصر غذایی سبب تشدید فعالیت میکروبی و افزایش SIR شده است. آگاموتو و همکاران (۲۰۱۳) برای زیست‌پالایی خاک آلوده به نفت با ٪۱۰ (وزنی-وزنی) از ترکیبات آلی مثل لجن فاضلاب و کود گاوی با ٪۱۰ (وزنی-وزنی) به مدت ۹۸ روز استفاده کردند. نتایج حاکی از آن بود که پس از ۹۸ روز درصد تجزیه در خاک آلوده با تیمار کود گاوی ٪۹٤ بود در حالی که در خاک آلوده با تیمار لجن فاضلاب درصد تجزیه ٪۸۲ بود. احتمالاً وجود عناصر غذایی اضافی در کود گاوی باعث افزایش قابلیت‌های تجزیه توسط ریزجانداران خاک شود. میزان تجزیه در مواد آلی کود گاوی و لجن فاضلاب حاوی عناصر غذایی به ویژه N و P بیشتر است. علاوه بر این کود گاوی در خاک آلوده باعث سازگاری سریع میکروب‌ها در خاک آلوده می‌شود. کودهای آلی مانند کود گاوی و همچنین بقایای گیاهی به مرور زمان برای بهبود حاصلخیزی خاک مورد استفاده قرار می‌گیرد. کود گاوی به عنوان یک منبع غنی به راحتی در دسترس ریزجانداران خاک قرار می گیرد و کم هزینه است. استفاده از کود گاوی در خاک آلوده به نفت باعث حفاظت از ساختار خاک و استفاده از عناصر غذایی می‌شود (اوگبوگدو و همکاران ۲۰۰۵).

با توجه به شکل ٤-و، تنفس برانگیخته در خاک آلوده با تیمار تلفیقی (HMIX) در روزهای ابتدائی بیشتر است. چون در تیمار تلفیقی از کنسرسیوم باکتریایی، سورفکتانت Tween 80، کود شیمیایی NP و کود گاوی استفاده شده است، کنسرسیوم باکتریایی و ریزجانداران خاک به کمک سورفکتانت Tween 80 دسترسی بیشتری به منبع کربن ماده نفتی خواهند داشت و با تأمین شدن عناصر غذایی به ویژه NP و بهبود شرایط فیزیکی از جانب کود دامی و تأمین سایر عناصر غذایی از جانب آن در نتیجه تنفس برانگیخته خاک افزایش می‌یابد. ولی با گذشت زمان به دلیل کاهش عناصر غذایی و منبع آلودگی، جمعیت میکروبی کاهش می‌یابد و تنفس برانگیخته خاک نیز کاهش می‌یابد. با این حال، وجود تجزیه در خاک به‌طور عمده در لایه سطحی در شرایط هوازی اتفاق می‌افتد. در طی اکسیداسیون هوازی ریزجانداران از هیدروکربن‌ها به عنوان منبع انرژی و کربن استفاده می‌کنند و به شکل CO_2 به عنوان محصول نهایی آزاد می‌کنند. به دلیل ماهیت شیمیایی پیچیده هیدروکربن‌های نفتی، کنسرسیوم میکروبی در حذف هیدروکربن‌ها مؤثر هستند. از سوی دیگر تحریک کردن باکتری‌های بومی خاک توسط عناصر غذایی برای زیست‌پالایی مؤثر می‌باشد (تیاجی و همکاران ۲۰۱۱).

اندازه‌گیری TPH قبل و بعد از تیمارهای زیست‌پالایی

درصد نفتای باقی‌مانده در نمونه‌ها به روش سوکسله اندازه‌گیری شد. از بین تیمارهای زیست‌پالایی، فقط درصد نفتای سنگین باقی‌مانده در تیمارهای کود گاوی (HM)، تیمار Tween 80 (HT)، تیمار تلفیقی (HMIX) و خاک آلوده به نفتای سنگین بدون تیمار زیست‌پالایی (HC) در روزهای صفر و ۱۲۰ روز به روش سوکسله اندازه‌گیری شد. تیمار تلفیقی، تیمار کود گاوی، تیمار Tween 80 و خاک آلوده بدون تیمار زیست‌پالایی به ترتیب با مقادیر ۸۱، ۷۲، ۶۳ و ٤٥ درصد از تجزیه نفتای سنگین خاک را داشتند (شکل ٥).



شکل۵- درصد نفتای سنگین باقیمانده در تیمارهای زیست‌پالایی در روز صفر و ۱۲۰ خاک آلوده بدون تیمار زیست‌پالایی (HC)، تیمار Tween 80 (HT)، تیمار کود گاوی (HM) و تیمار تلفیقی (HMIX).

با توجه به شکل ٥، در خاک آلوده به نفتای سنگین بدون تیمار زیست‌پالایی (HC) در روز صفر با توجه به اینکه با ۷٪ از نفتای سنگین آلوده شده است، مشاهده می‌شود که پس از گذشت ۱۲۰ روز از میزان نفتای سنگین کاسته شده است و ٥٤٪ از نفتای سنگین باقی‌مانده است. این کاهش احتمال دارد به این دلیل باشد که در خاک آلوده میکروب‌های بومی خاک در تجزیه نفتای سنگین دخالت داشتند. کاهش میزان نفتای سنگین در تیمار Tween 80 (HT) در روز ۱۲۰ نشان‌دهنده این است که Tween 80 توانسته در طول ۱۲۰ روز باعث حلالیت نفتای سنگین شده و میکروب‌ها به راحتی از نفتای سنگین تغذیه کرده و میزان نفتای سنگین در طول آزمایش کاهش یابد. در خاک آلوده با تیمار کود گاوی (HM) کاهش نفتای سنگین در ۱۲۰ روز به نظر می‌رسد این میزان کاهش به دلیل وجود میکروفلور موجود در خود کود گاوی یا به عبارتی ریزجانداران بومی موجود در کود و وجود عناصر غذایی در کود و تأمین آن برای ریزجانداران خاک باشد. همچنین در خاک آلوده با تیمار تلفیقی (HMIX) میزان بیشتری از نفتای سنگین در ۱۲۰ روز کاهش یافته است. در خاک آلوده با تیمار تلفیقی به دلیل وجود کود گاوی، توئین ۸۰، NP و کنسرسیوم باکتریایی وجود دارد و این ترکیبات به نوبه خود باعث تجزیه آسان‌تر ترکیبات نفتی موجود در خاک شده و کنسرسیوم باکتریایی به همراه میکروب‌های بومی خاک به راحتی توانسته‌اند از ترکیبات نفتی تغذیه کرده و باعث کاهش میزان نفتای سنگین خاک شده‌اند. افشارنیا و همکاران (۲۰۱۹)، مقدار کل هیدروکربن‌های نفتی را اندازه‌گیری کردند. نتایج نشان داد که در گیاه آگروپایرون، تلقیح با کنسرسیوم باکتریایی ٦٦/٥

درصد هیدروکربن‌های نفتی را تجزیه کرده است. این در حالی است که تیمار بدون تلقیح توانسته بود ٪۵۳ از هیدروکربن‌های نفتی را تجزیه کند. همچنین در تیمار تلفیقی که حاوی قارچ *P. indica* و کاربرد کود دامی و توئین ۸۰ بدون کشت گیاه با ٪۷۲ تجزیه نفتی توانسته بود بیشترین تجزیه نفتی را نسبت به تیمارهای گیاه‌پالایی داشته باشد. اگری و همکاران (۲۰۱۱) زیست‌پالایی خاک آلوده شده به نفت را مورد بررسی قرار دادند. در این پژوهش از کود شیمیایی NPK و غلظت سورفکتانت غیریونی به عنوان متغیرهای مستقل تحریک زیستی با هدف اصلی ارزیابی کاهش TPH که به عنوان متغیر وابسته بود استفاده شد. بعداز ٤٢ روز، ٦٧/٢٠ درصد کاهش در غلظت TPH حاصل شد. استفاده از کود گاوی به عنوان منبع مواد آلی در بهبود زیست‌پالایی نفت خام در مرداب‌های حرا در دلتای نیجریا درکشور نیجریه گزارش شده‌است (اُرجی و همکاران ۲۰۱۲). در این مطالعه که ۷۰ روز به طول انجامید، با استفاده از کود گاوی، در روز ۷۰ام، ٦٢/٠٨ درصد از TPH تجزیه شد و در تیمار شاهد میزان تجزیه فقط ۲۰ درصد بود.

تعیین نوع و غلظت آلاینده‌ها در برخی از تیمارها با دستگاه GC-Mass

با استفاده از دستگاه GC-MASS نوع و غلظت تمامی مولکول‌ها و ترکیبات تیمار کود گاوی در روز صفر و ۱۲۰ روز آشکار شدند. نتایج حاصل از مقایسات تیمار کود گاوی در لحظه آغاز و پایان آزمایش نشان داد که برخی از ترکیبات بررسی شده در لحظه آغاز آزمایش، پس از گذشت ۱۲۰ روز زیست‌پالایی وجود نداشت و این ترکیبات به‌طور ٪۱۰۰ مورد تجزیه قرار گرفته بودند و یا به ترکیبات کوچکتری تجزیه شده بودند و اثری از آن‌ها در تیمار کود گاوی نبود. به جز ترکیبات 1,6-Dioxaspiro[4.4]non-3-ene,2-(2,4-hexadiynhlidene) که غلظت آن از ٤٣/٨٠ به ٤٠/٢٠ درصد و 2-pentadecanone, 6,10,14- Trimethylpentadecan- 2-one که غلظت آن از ٢/٠٣ به ١/٦٥ درصد کاهش یافت (جدول ۲). روش‌های پایش خاک پس از زیست‌پالایی ضروری است تا بتوان میزان پالایش خاک از آلاینده‌ها و میزان کارا بودن آن روش را در حذف آن آلاینده از خاک بررسی نمود. از روش‌های سنتی پایش خاک پس از زیست‌پالایی اندازه‌گیری غلظت ترکیبات نفتی با استفاده از دستگاه‌های تجزیه و تحلیل شیمیایی مانند GC–MS می‌باشد که این روش‌ها می‌توانند پرهزینه باشند. با توجه به هزینه‌های مرتبط با دستگاه‌های پایش سنتی، در حال حاضر پایش خاک با استفاده از فعالیت‌های زیستی مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است (مایلا و کلوته ۲۰۰۵، شن و همکاران ٢٠١٦). مطالعات متعددی از تجزیه انواع PAHها توسط ریزجانداران متعدد در خاک گزارش شده است که توانستند بیش از ٪۹۰ آن‌ها را تجزیه و تخریب نمایند (مالیک و همکاران ۲۰۱۲). در پژوهشی که افشارنیا و همکاران (۲۰۱۸) انجام دادند، نتایج حاصل از GC-Mass بیانگر آن بود که تیمارهای گاوی و افزودن سورفاکتانت بطور کامل همه PAHها و ترکیبات هیدروکربنه حلقوی را تجزیه کرده و غلظت آن‌ها پس از گذشت چهار ماه به صفر رسیده بود وهمچنین با توجه به نتایج GC-Mass و در نظر گرفتن صرفه اقتصادی کاربرد تیمار گاوی در زیست‌پالایی

نفت و ترکیبات مقاوم نفتی از جمله PAHها و سایر ترکیبات حلقوی هیدروکربنی توصیه می‌گردد.

جدول ۲- نوع و غلظت برخی هیدروکربن‌های شناسایی شده در تیمار کود گاوی (T0) **و** (T120).

نام ترکیب	فرمول شیمیایی	ساختار	Main Fragments (M/Z)*	Retention time*	غلظت اولیه در تیمار کود گاوی (٪)	غلظت نهایی در تیمار کود گاوی (٪)
2-(P-methylstyryl)- thiophen	$CH_3C_4H_3S$	تک حلقوی	115-135-157-181-200	۲۵/٤۲min	۰/۵۳	۰
Trans-caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	سه حلقوی	115-135-161-179-200	۱۳/۵۳min	۰/۱۹	۰
1,6-Dioxaspiro [4.4] non-3-ene, 2-(2,4-hexadiynylidene)	$C_7H_8O_3$	دو حلقوی	95-115-157-181-200	۲۲/٦۳min	٤۳/۸۰	٤۰/۲۰
2-pentadecanone, 6,10,14-Trimethylpentadecan- 2-one	$C1_8H_{36}O$	خطی	55-85-109-137-165	۲۱/٦٤min	۲/۰۳	۱/٦۵
1-(2-Hydroxy-4,6-dimethoxy-3- methylphenyl) ethanone.	$C_{11}H_{14}O_4$	تک حلقوی	115-138-187-181-200	۱۸/۸۵min	./٤۹	۰/۲٤

* M/Z : نسبت جرم مولکولی بر بار مولکولی ماده و Retention time :زمان بازداری یا زمان مانده می‌باشد.

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش برای کاهش آلودگی نفتای سنگین در خاک، از تیمارهای زیست‌پالایی که شامل تحریک‌زیستی، تلقیح‌زیستی و تلفیقی بوده، استفاده شد. با توجه به نتایج تغییرات تنفس پایه و تنفس برانگیخته در خاک آلوده به نفتای سنگین، هر کدام از تیمارها به تنهایی قادر به تجزیه آلودگی بودند و در مدت زمان آزمایش توانستند باعث کاهش آلودگی نفتای سنگین شوند. ولی در تیمار تلفیقی به دلیل استفاده همزمان از تیمارهای تحریک‌زیستی و تلقیح‌زیستی تجزیه آلودگی بهتر انجام شده بود. چون تیمار تلفیقی قادر به کاهش ۸۱٪ از آلودگی نفتای سنگین بود در حالی که خاک آلوده بدون تیمارهای زیست‌پالایی قادر به کاهش ٪ ٤۵ از آلودگی بود. بنابراین استفاده از تیمار تلفیقی در مکانهای آلوده به ترکیبات نفتی از جمله نفتای سنگین می‌تواند به حذف زیستی این نوع آلاینده‌ها کمک کند.

منابع مورد استفاده

Abu B, Farinazleen S, Raja M and Mahiran B, 2003. Bioremediation of petroleum hydrocarbon pollution. Indian Journal of Biotechnology 2: 411–425.

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

Afsharnia M, 2019. Application of different methods for bioremediation of petroleum products in contaminated areas of Tabriz refinery. PhD Thesis. Faculty of Agriculture, University of Tabriz.

Afsharnia M, Sarikhani MR, Zarei M and Lotfollahi A, 2017. Isolation of oil-eating bacteria from contaminated soils of Tabriz Refinery and Petrochemical Co. and evaluation of their oil degradation

efficiency. Pp.1-6. 15th Iranian Soil Science Congress. 6-8 September, Isfahan, Iran. (In Persian with English abstract).

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

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

Altgelt KH, 1993. Composition and Analysis of Heavy Petroleum Fractions. Boca Raton, CRC Press, 512 Pages.

Anderson JPE, 1982. Soil respiration. Pp. 831-871. In: Methods of Soil Analysis, Part 2. Chemical and microbiological properties. American Society of Agronomy, Madison. Wisconsin.

Angela L, 2000. Effect of nonionic surfactants on dissolution of polycyclic aromatic hydrocarbons from coal tar. Journal of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste 2: 78–81.

Atagana H, 2008. Compost bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil inoculated with organic manure. African Journal of Biotechnology 7: 1516-1525.

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

Basaltpour A, Haj Abbasi M, Dorostkar V and Torabi Gh, 2010. Modification of soils contaminated with petroleum hydrocarbons by combined georemediation-phytoremediation method. Journal of Water and Soil Sciences 14: 129-142. (In Persian with English abstract)

Bautista LF, Sanz R and Molina MC, 2009. Effect of different non-ionic surfactants on the biodegradation of PAHs by diverse aerobic bacteria. International Biodeterioration and Biodegradation 63: 913–922.

Boopathy R, 2000. Factors limiting bioremediation technologies. Bioresource Technology 74: 63–67.

Chandra S, Sharma R, Singh K and Sharma A, 2013. Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon. Annals of Microbiology 63: 417–431.

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

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

Das N and Chandran P, 2011. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants – an overview. Biotechnology Research International 11:1–13.

Das P, Pal R and Chowdhury A, 2007. Effect of novaluron on microbial biomass, respiration, and fluorescein diacetate-hydrolyzing activity in tropical soils. Biology and Fertility of Soils 44: 387–391.

Dashti N, Ali N, Eliyas M, Khanafer M, Sorkhoh NA and Radwan SS, 2015. Most hydrocarbonoclastic bacteria in the total environment are diazotrophic, which highlights their value in the bioremediation of hydrocarbon contaminants. Microbes and Environments 30: 70-75. (In Persian with English abstract)

Dostaki M, Ebrahimi S, Movahedi Naeini A and Ulamaei, 2013. Optimization of biodegradation conditions of petroleum hydrocarbons by native and non-native microorganisms. Journal of Soil and Water Conservation Research 20: 165-181. (In Persian with English abstract)

Ebrahimi M, Sarikhani MR and Fallah A, 2014. Biodegradation of petroleum hydrocarbons of gasoline, toluene and phenanthrene by three bacterial species *Pantoea agglomerans* P5, *Pseudomonas putida* P13 and *Pseudomonas fluorescens* CHAO. Water and Soil Science 23:41-29. (In Persian with English abstract)

Emtiazi G, Shakarami H, Nahvi I and Mirdamadian SH, 2005. Utilization of petroleum hydrocarbones by *Pseudomonas sp.* and transformed *Escherichia coli*. African Journal of Biotechnology 4: 172-176.

Freeman JC and Valerie AO, 2008. Relationships between soil respiration and soil moisture. Soil Biology and Biochemistry 40: 1013-1018.

Gadd GM, 2001. Fungi in Bioremediation. Cambridge University Press, Cambridge, p. 481, ISBN: 0-521-78119-1.

Gkorezis P, Daghio M, Franzetti A, Van Hamme JD, Sillen W and Vangronsveld J, 2016. The interaction between plants and bacteria in the remediation of petroleum hydrocarbons. An environmental perspective. Frontiers in Microbiology 7:1836.

Gogoi BK, Dutta NN, Goswami P and Krishna Mohan TR, 2003. A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site. Advances in Environmental Research 7: 767–782.

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

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

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

Li JL and Chen BH, 2009. Surfactant-mediated biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Materials 2: 76-94.

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

Luo YQ and Zhou X, 2006. Soil Respiration and the Environment. London, UK: Academic Press, Elsevier.

Maila MP and Cloete TE, 2005. The use of biological activities to monitor the removal of fuel contaminants-perspectives to monitoring hydrocarbon contamination. International Biodeterioration and Biodegradation 55: 1–8.

Malik Z and Ahmed S, 2012. Degradation of petroleum hydrocarbons by oil field isolated bacterial consortium. African Journal of Biotechnology 11: 650-658.

Masciandaro G, Macci C, Peruzzi E, Ceccanti B and Doni S, 2013. Organic matter–microorganism–plant in soil bioremediation. Reviews in Environmental Science and Biotechnology 12: 399–419.

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

Mohajeri L, Aziz HA, Isa MH and Zahed MA, 2010. A statistical experiment design approach for optimizing biodegradation of weathered crude oil in coastal sediments. Bioresource Technology 101: 893-900. (In Persian with English abstract)

Ogboghodo IA, Azenabor UF and Osemwota IO, 2005. Amelioration of crude oil polluted soil with poultry manure and the effect on growth of maize and some soil properties. Journal of Plant Nutrition 28: 21-32.

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

Qin G, Gong D and Fan MY, 2013. Bioremediation of petroleum-contaminated soil by biostimulation amended with biochar. International Biodeterioration and Biodegradation 85: 150–155.

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.

Safdari MS, Kariminia HR, Rahmati M, Fazlollahi F, Polasko A, Mahendra S, Wilding WV and Fletcher TH, 2018. Development of bioreactors for comparative study of natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil. Journal of Hazardous Materials 342: 270–278.

Sarikhani, MR, 2003. Effects of inoculation of two species of arbuscular mycorrhizal fungi on potassium uptake, starch content and potato yield. Master Thesis in Soil Biology and Biotechnology. Faculty of Agriculture, University of Tabriz.

Shahi A, Aydin S, Ince B and Ince O, 2016a. Evaluation of microbial population and functional genes during the bioremediation of petroleum-contaminated soil as an effective monitoring approach. Ecotoxicology and Environmental Safety 125:153–160.

Shahi A, Aydin S, Ince B and Ince O, 2016b. Reconstruction of bacterial community structure and variation for enhanced petroleum hydrocarbons degradation through biostimulation of oil contaminated soil. Chemical Engineering Journal 306:60–66.

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

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

Suja F, Rahim F, Taha MR, Hambali N, Razali MR, Khalid A and Hamzah A, 2014. Effects of local microbial bioaugmentation and biostimulation on the bioremediation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in crude oil contaminated soil based on laboratory and field observations. International Biodeterioration and Biodegradation 90:115– 122.

Thavamani P, Malik S, Beer M, Megharaj M and Naidu R, 2012. Microbial activity and diversity in long-term mixed contaminated soils with respect to polyaromatic hydrocarbons and heavy metals. Journal of Environmental Management 99:10–17.

Tian W, Yao J, Liu R, Zhu M, Wang F, Wu X and Liu H, 2016. Effect of natural and synthetic surfactants on crude oil biodegradation by indigenous strains. Ecotoxicology and Environmental Safety 129:171–179.

Turgay OC, Erdogan EE and Karaca A, 2010. Effect of humic deposit (leonardite) on degradation of semi-volatile and heavy hydrocarbons and soil quality in crude-oil-contaminated soil. Environmental Monitoring and Assessment 170:45–58.

Tyagi M, da Fonseca MM and de Carvalho CC, 2011. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. Biodegradation 22:231–241.

Ubochi KC, Ibekwe VI and Ezeji EU, 2006. Effect of inorganic fertilizer on microbial utilization of hydrocarbons on oil contaminated soil. African Journal of Biotechnology 5:1584-1587.

Vandera E and Koukkou AI, 2017. Bacterial community response to hydrocarbon contamination in soils and marine sediments: a critical review of case studies. Pp.185-226. In: Cravo-Laureau C, cagnon C, Lauga B, Duran R (eds.) Microbial Ecotoxicology. Springer. Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-61795-4_9

Varjani SJ, Rana DP, Jain AK, Bateja S and Upasani VN, 2017. Synergistic ex-situ biodegradation of crude oil by halotolerant bacterial consortium of indigenous strains isolated from on shore sites of Gujarat, India. International Biodeterioration and Biodegradation 103: 116–124.

Venosa AD, Lee K, Suidan MT, Garcia-Blanco S, Cobanli S, Moteleb M, Haines JR, Tremblay G and Hazelwood M, 2002. Bioremediation and biorestoration of a crude oil contaminated freshwater wetland on the St. Lawrence River. Bioremediation Journal 6: 261-281.

Wei Z, Hessler CM, Sorial G and Seo Y, 2016. Influence of nonionic surfactants on fungal and bacterial degradation of hexane. CLEAN - Soil, Air and Water 44: 745–752.

Xu K. Y, Tang CR, Zhao K and Sun Y, 2013. Diversity and abundance of n-alkane-degrading bacteria in the near-surface soils of a Chinese onshore oil and gas field. Biogeosciences 10: 2041–2048.

Zarei M, Salari S, Niaei A and Khataee A, 2009. Peroxi-coagulation degradation of C.I. Basic Yellow 2 based on carbon-PTFE and carbon nanotube-PTFE electrodes as cathode. Electrochimica Acta 54: 6651–6660. (In Persian with English abstract)