نشریه علمی زیست‌شناسی خاک / جلد ۱۱ / شماره ۲ / ۱۴۰۲/ص۲۱۳-۲۳۰
dx.doi.org/10.22092/sbj.2024.362697.254

اثرات آلودگی نفتی طولانی مدت بر تنفس میکروبی و فعالیت آنزیم بتاگلوکوزیداز خاک

شکوفه مرادی، محمدرضا ساریخانی*، علی بهشتی آل آقا، عادل ریحانی‌تبار، سیدسیامک علوی‌کیا و روحا... شریفی

دانشجوی دکتری بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز **moradishokufeh@gmail.com**
دانشیار بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز **rsarikhani@yahoo.com**
دانشیار بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی کرمانشاه **beheshtiali97@gmail.com**
استاد حاصلخیزی خاک، گروه علوم و مهندسی خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز **areyhanitabar@yahoo.com**
دانشیار به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز **ss.alavikia@tabrizu.ac.ir**
استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی کرمانشاه **rsharifi@ut.ac.ir**

«مقاله پژوهشی»
دریافت:۱۴۰۲/۴/۶ و پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۲۱

چکیده

آلودگی به مواد نفتی یکی از بحرانی‌ترین آلودگی‌های زیست‌محیطی است که می‌تواند ویژگی‌های زیستی، فیزیکی و شیمیایی خاک را تحت تأثیر قرار دهد. به‌منظور بررسی اثرات آلودگی نفتی طولانی‌مدت و طبیعی بر تنفس میکروبی شامل تنفس پایه (BR) و تنفس برانگیخته (SIR) و فعالیت آنزیم بتاگلوکوزیداز خاک، تعداد ۱۲۰ نمونه خاک‌آلوده به نفت از عمق ۱۵-۰ سانتی‌متری از منطقه نفت‌خیز نفت‌شهر واقع در استان کرمانشاه با سه سطح آلودگی شدید (H: High)، متوسط (M: Moderate) و کم (L: Low) نمونه‌برداری شد. پس از اندازه‌گیری ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک‌ها، اقدام به شمارش همه باکتری‌ها و باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت به ترتیب در محیط کشت‌های NA و CFMM شد که همبستگی مثبت و معنی‌داری بین جمعیت میکروبی و غلظت نفت به دست آمد. میانگین درصد نفت اندازه‌گیری شده به روش سوکسله، به ترتیب ۴/۰۳، ۹/۹۵ و ۲۲/۵۰ درصد برای سطوح L، M و H بود. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نفت در نمونه‌های خاک، BR و SIR افزایش یافتند و بیشترین تنفس BR و SIR به ترتیب با مقادیر ۰/۰۵۳ و ۰/۲۳۴ ($mgCO_2.g^{-1}.h^{-1}$) درخاک‌های H به دست آمد. فعالیت بتاگلوکوزیداز اندازه‌گیری شده نیز در حضور آلاینده‌های نفتی بیشتر بود به گونه‌ای که در خاک‌های H بالاترین فعالیت ($\mu gPNP.g^{-1}.h^{-1}$ ۲۴/۷۸) و در خاک‌های L پایین‌ترین فعالیت ($\mu gPNP.g^{-1}.h^{-1}$ ۶/۰۹) مشاهده شد. در پایان، آنالیز مؤلفه‌های اصلی (PCA) نیز انجام شد و نتایج نشان داد که ۷۲ درصد از تنوع بین نمونه‌ها توسط دو مؤلفه اول (مؤلفه بیوشیمیایی و مؤلفه فیزیکی) قابل توجیه بود. آلاینده‌های نفتی که به صورت طبیعی و به مدت طولانی در خاک حضور دارند، با گذشت زمان منجر به سازگاری جوامع میکروبی مقاوم به آلودگی شده و لذا شاهد افزایش فراوانی آنها، تنفس میکروبی و فعالیت آنزیم‌هایی همچون بتاگلوکوزیداز خواهیم بود.

کلمات کلیدی: آلودگی نفتی، بتاگلوکوزیداز، تنفس پایه، تنفس برانگیخته

* آدرس ایمیل نویسنده مسئول: **rsarikhani@yahoo.com**

مقدمه

هیدروکربن‌های نفتی، آلاینده‌های آلی و پایدار هستند و می‌توانند به مدت طولانی در محیط آلوده باقی بمانند. آلودگی‌های نفتی ممکن است به صورت طبیعی و یا در اثر فعالیت‌های انسانی در محیط زیست رخ دهند. خاک یک منبع زنده، پویا و تجدیدناپذیر است و شرایط آن بر تولید غذا، کارایی محیطی و تعادل جهانی تأثیر می‌گذارد (دوران و زایس، ۲۰۰۰). این آلودگی، پیامدهای گوناگونی بر ویژگی‌های زیستی، شیمیایی و فیزیکی خاک خواهدداشت و در نهایت با به مخاطره انداختن بهداشت خاک، بر تولید محصول نیز اثر منفی می‌گذارد (لیانگ و همکاران، ۲۰۱۵). تعیین شاخص‌های میکروبی مانند تنفس خاک، کربن زیست توده میکروبی و فعالیت‌های آنزیمی می‌توانند اطلاعاتی را در مورد حضور و فعالیت میکروارگانیسم‌های زنده و مدت زمان اثرات آلودگی هیدروکربنی بر فعالیت متابولیک خاک ارائه دهند. میکروارگانیسم‌های خاک به آشفتگی اکوسیستم بسیار حساس هستند و به همین دلیل به عنوان شاخص‌های آلودگی خاک در نظر گرفته می‌شوند (لابود و همکاران، ۲۰۰۷).

فعالیت آنزیمی خاک، نیروی محرکه تمام تحولات بیوشیمیایی در خاک است و می‌تواند به عنوان شاخص اولیه و حساس برای ارزیابی تأثیر آلودگی بر کیفیت خاک مورد استفاده قرار گیرد (لابود و همکاران، ۲۰۰۷). در حال حاضر استفاده از آنزیم‌های خارج سلولی به عنوان شاخص‌های زیستی کیفیت خاک به دلیل اندازه-گیری نسبتاً آسان، اهمیت اکولوژیکی میکروبی، حساسیت به استرس محیطی و واکنش سریع به تغییرات در مدیریت اراضی، موردتوجه بسیاری از محققان قرار گرفته است. تحقیقات نشان داده است که بتاگلوکوزیدازها از جمله فراوان‌ترین آنزیم‌ها در خاک هستند که به راحتی از سه آنزیم دخیل در تخریب سلولز خاک قابل تشخیص هستند. همچنین این آنزیم‌ها به ندرت محدودیت سوبسترا دارند لذا می‌توانند نشانه‌های اولیه تغییرات در وضعیت موادآلی خاک را فراهم سازند. آنزیم بتاگلوکوزیداز یک آنزیم خارج سلولی است که به دلیل نقش اصلی آن در چرخه موادآلی خاک، به عنوان یک جز مهم کیفیت خاک در نظر گرفته می‌شود (تورنر و همکاران، ۲۰۰۲).

خاک زیستگاه بزرگی برای جوامع میکروبی است و هیدروکربن‌های نفتی بر فراوانی و گوناگونی جمعیت میکروبی خاک اثر می‌گذارند، از سوی دیگر، گروه ویژه‌ای از ریزجانداران که با چنین شرایطی سازگارند، قادر به استفاده و تجزیه ترکیبات نفتی می‌باشند (لیانگ و همکاران، ۲۰۱۵). تنفس میکروبی یکی از متداول‌ترین شاخص‌های زیستی است که برای بررسی کیفیت و بهداشت خاک به‌کار می‌رود و می‌تواند وضعیت و فعالیت میکروب‌های خاک و همچنین روند، تعادل و چگونگی تجزیه موادآلی، فعالیت آنزیمی و چرخه‌های عناصر غذایی را نشان دهد (مورنو و همکاران، ۲۰۱۱). تنفس پایه (BR[1]) معیاری از تجزیه کربن آلی خاک را توسط ریزجانداران فعال و توانا فراهم می‌کند در حالی که تنفس برانگیخته می‌تواند استفاده از سوبسترای کربنی خاص توسط جوامع میکروبی ویژه در بین کل جمعیت میکروبی خاک را تعیین کند (داوسان و همکاران، ۲۰۰۷). تنفس برانگیخته (SIR[2])، تنفس ناشی از سوبسترای اضافه‌شده به خاک را براساس اندازه‌گیری حداکثر انتشار اولیه CO_2 از خاک‌های غنی‌شده با گلوکز (در یک دوره زمانی که بیش از ۶ ساعت نیست) نشان می‌دهد. به عبارت دیگر، SIR بیانگر حداکثر میزان تنفس اولیه ریزجانداران پس از غنی‌سازی خاک با منبع کربن و انرژی اضافی می-باشد و به طور قابل توجهی به کل زیست‌توده میکروبی خاک مرتبط است. بدیهی است که تنفس برانگیخته خاک از تنفس پایه خاک بیشتر است و این سطح تنفس جدید "حداکثر پاسخ اولیه" نامیده می‌شود که توسط مقدار گلوکزی که به خاک افزوده شده، القا شده‌است (داوسان و

[1] Bsal Respiration

[2] Substrate Induced Respiration

همکاران، ۲۰۰۷). کانی شدن کربن آلی خاک به CO_2 یا تنفس میکروبی به عنوان یک شاخص مهم از فعالیت کل میکروفلور خاک به‌شمار می‌رود. تنفس میکروبی نه تنها نشان‌دهنده وضعیت و فعالیت ریزجانداران خاک است، بلکه نشان‌دهنده روند، تعادل و چگونگی تجزیه ماده آلی، فعالیت آنزیمی و چرخه برخی عناصر غذایی خاک نیز خواهد بود.

تعدادی از مطالعات نشان داده‌اند که عوامل مختلفی ترکیب و فعالیت میکروب‌ها را در مکان‌های غیرآلوده تعیین می‌کنند، از جمله منطقه جغرافیایی، نوع خاک، pH خاک و کاربری زمین. علاوه بر این، در خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی نشان داده شده است که نوع خاک بر ترکیب جمعیت‌های تجزیه‌کننده زیستی تأثیر می‌گذارد. مطالعات انجام شده در این بخش به دو صورتِ ایجاد آلودگی‌های دست‌ساز و یا آلودگی‌های طبیعی و طولانی مدت بوده است که نتایج این دو می‌تواند متفاوت از هم باشد. قابل ذکر است که نتایج حاصل از مطالعات در مورد افزایش کوتاه مدت آلودگی نفتی در خاک به سختی قابل مقایسه با نوع آلودگی‌های طولانی مدت و در محل[3] است. علاوه بر این، ترکیب و تنوع جوامع میکروبی خاک به نوع خاک نیز بستگی دارد (سوتون و همکاران، ۲۰۱۳). با توجه به اثرات منفی آلاینده‌های نفتی بر جوامع میکروبی و فعالیت‌های آنزیمی آنها، در این پژوهش تأثیرات آلودگی نفتی طبیعی و درازمدت بر برخی شاخص‌های زیستی مورد توجه قرارگرفت. در این پژوهش، فعالیت آنزیم بتاگلوکوزیداز و فعالیت تنفسی میکروارگانیسم‌ها، به عنوان شاخصی مهم در ارزیابی کیفیت و سلامت خاک‌های آلوده به نفت در ۱۲۰ نمونه خاک جمع‌آوری‌شده از منطقه نفت‌خیز نفت شهر (غرب استان کرمانشاه)، بررسی شد. هدف از این پژوهش بررسی اثرات آلودگی نفتی بر فعالیت آنزیمی و تنفس میکروبی، وجود یا عدم وجود تفاوت بین مکان‌های نمونه‌برداری از نظر صفات مورد سنجش و تفاوت بین سطوح مختلف آلودگی نفتی بود.

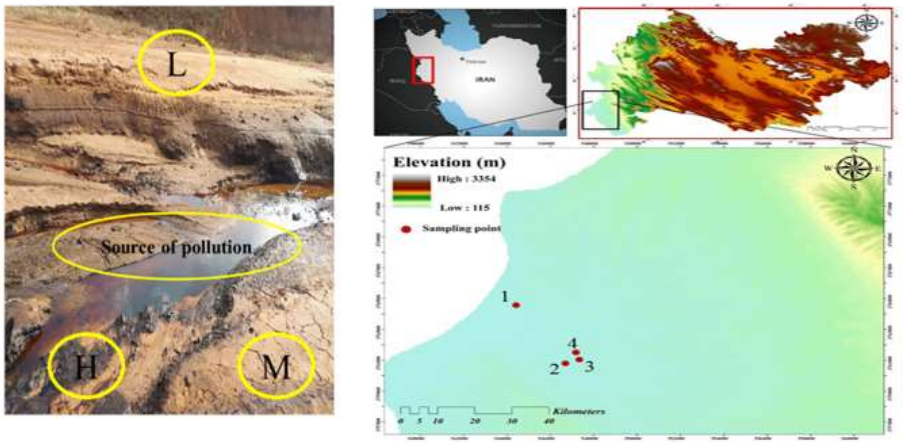
مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و آماده‌سازی خاک

در این پژوهش نمونه‌برداری از خاک‌های آلوده به نفت از منطقه نفت‌خیز نفت‌شهر واقع در غرب استان کرمانشاه انجام شد (شکل ۱). باتوجه به اینکه در این منطقه منابع طبیعی نفتی، میدان‌های نفتی و به ویژه سفره‌های زیرزمینی نفت وجود دارند، آلودگی نفتی در خاک‌های سراسر منطقه فراگیر شده‌بود. ۴ منطقه برای نمونه‌برداری گزینش و نمونه‌ها با توجه به نزدیکی و دوری از منبع آلودگی و سطوح غلظت آلاینده نفتی به صورت چشمی از بخش‌های سه گانه با سطح آلودگی شدید (H:High)، متوسط (M:Moderate) و کم (L: Low) گزینش شدند و تفکیک درست آنها پس از اندازه‌گیری غلظت آلاینده در آزمایشگاه انجام شد. قابل ذکر است که از نظر استاندارد، خاک‌های دارای آلودگی نفتی بیش از ۳ درصد، خاک‌های با آلودگی شدید محسوب می‌شوند. بنابراین طبق این استاندارد خاک های استفاده‌شده در این پژوهش خاک‌های با آلودگی شدید محسوب می‌شوند (وینسنت و همکاران، ۲۰۱۱) اما منطقه نمونه‌برداری به گونه‌ای بود که حتی خاک‌هایی که عاری از نفت به نظر می‌رسیدند نیز دارای درصدی از نفت بودند زیرا طی سالیان متمادی تحت تأثیر آلودگی نفتی قرارگرفته‌بودند. همچنین خاک دارای آلودگی صفر که بتوان به عنوان شاهد بدون آلودگی درنظر گرفت در آن وجود نداشت. نمونه‌خاک‌ها با درجات مختلف آلودگی برداشت شده‌اند و نام‌گذاری آنها براساس درصد نفت موجود در آنها به صورت Low (L)، Moderate (M) و High (H) بود. از هر منطقه ۳۰ نمونه خاک برداشت‌شد که از این ۳۰ نمونه، ۱۰ نمونه خاک با آلودگی کم (L) ، ۱۰ نمونه خاک با آلودگی متوسط (M) و ۱۰ نمونه خاک با آلودگی شدید (H) بود. در مجموع ۱۲۰

[3] In-situ

نمونه از لایه ۱۵-۰ سانتیمتری برداشته‌شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.



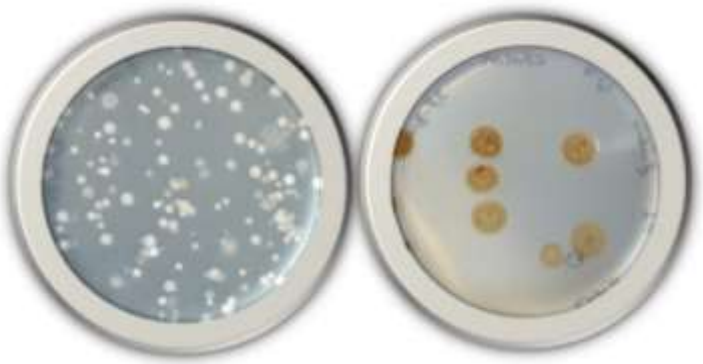
شکل۱- موقعیت جغرافیایی مناطق چهارگانه نمونه‌برداری و محل جمع‌آوری خاک‌های H، M و L

شمارش جمعیت میکروبی

فراوانی جمعیت میکروبی قابل کشت، در محیط کشت‌های NA[۴] و CFMM[۵] شمارش شد. ترکیبات محیط کشت CFMM بر حسب گرم بر لیتر شامل (NH_4NO_3؛ ۳، Na_2HPO_4؛ ۲/۲، KH_2PO_4؛ ۰/۸، $MgSO_4.7H_2O$؛ ۰/۰۱، $FeCl_3.6H_2O$؛ ۰/۰۰۵، $CaCl_2.2H_2O$؛ ۰/۰۰۵ و pH=۷/۲) بود و در این محیط حداقل، به میزان ۱ درصد نفت خام افزوده شد. به دلیل آبگریز بودن و عدم اختلاط نفت با سایر اجزای محیط کشت جامد، پس از ریختن محیط کشت در پلیت و جامد شدن آن به میزان تقریبی ۲۰۰ میکرولیتر از نفت خام بر سطح پلیت گسترده شد. برای شمارش و خالص‌سازی باکتری‌های بومی تجزیه‌کننده نفت سری‌های رقت تهیه شدند (10^{-5} تا 10^{-8}) و از هر رقت ۱۰۰ میکرولیتر به محیط جامد CFMM انتقال داده‌شد و در دمای ۲۸ درجه سلیسوس گرمخانه‌گذاری شدند (ابراهیمی و همکاران، ۱۳۹۲). ۱۰ گرم از هر نمونه خاک به ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی شیکر قرار گرفتند. سپس سایر سری‌های رقت تهیه شدند و بدین ترتیب سوسپانسیون جهت شمارش جمعیت میکروبی آماده شدند. کلنی‌های رشد یافته بر روی محیط‌کشت NA معرف کل باکتری‌های خاک و باکتری‌های رشدیافته بر روی محیط‌کشت CFMM تنها معرف باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت بود (شکل ۲). قابل ذکر است که مطالعه متاژنوم به منظور بررسی ساختار جوامع باکتریایی در این پژوهش انجام شده است اما از پرداختن به نتایج آن خودداری شده است (مرادی، ۱۴۰۲).

[4] Nutrient Agar

[5] Carbon Free Minimal Medium



شکل۲- شمارش جمعیت میکروبی در دو محیط CFMM (راست) و NA (چپ)

اندازه‌گیری تنفس پایه

اندازه‌گیری تنفس پایه (BR) به روش تیتراسیون انجام‌شد. ۱۰ گرم خاک مرطوب به درون ظرف شیشه‌ای تیره افزوده شد. ۱۰ میلی‌لیتر محلول هیدروکسیدسدیم ۰/۵ نرمال در بالن ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و سپس در درون ظرف شیشه‌ای قرار داده، درپوش ظرف شیشه‌ای را گذاشته و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس گرمخانه-گذاری شد. پس از اتمام انکوباسیون بالن را برداشته و محلول هیدروکسیدسدیم درون ارلن مایر ۱۰۰ میلی‌لیتر ریخته‌شد و محتویات بالن دو مرتبه با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر شستشو داده و به ارلن افزوده‌شد. سپس دو میلی‌لیتر محلول کلریدباریم ۰/۵ مولار اضافه‌شد. ۳-۴ قطره شناساگر فنل‌فتالئین به محلول افزوده و با اسید کلریدریک ۰/۵ نرمال تیتر شد. برای تهیه شاهد، همان روش بدون خاک اجرا شد (شاینر و همکاران، ۲۰۱۲).

روش محاسبه:

$$BR= (B-S)\ N\times\ 22\ \times\ 100\ /\ (SW\ \times\ \%dm) \quad (۱)$$

B و S به ترتیب حجم اسید کلریدریک (HCl) مصرفی در شاهد و نمونه خاک (ml)

SW: وزن اولیه نمونه خاک (g)، dm: فاکتور تبدیل خاک خشک، BR: تنفس پایه ($mg\ CO_2.g^{-1}.h^{-1}$)

N: نرمالیته اسید، ۲۲: وزن اکی‌والانی دی‌اکسیدکربن (mg)

اندازه‌گیری تنفس برانگیخته

تنفس ناشی از بستر خاک‌ها SIR (تنفس برانگیخته) با توجه به میزان حداکثر تنفس اولیه ریزجانداران پس از غنی‌سازی خاک با منبع اضافی کربن و انرژی (گلوکز) با روش افزودن گلوکز و تیتراسیون ارزیابی شد. ۱۰ گرم خاک مرطوب با ۴۰ میلی‌گرم گلوکز (۰/۴ درصد) مخلوط شد و به مدت ۵ ساعت گرمخانه‌گذاری شد و سپس بقیه مراحل همانند تنفس پایه انجام شد (شاینر و همکاران، ۲۰۱۲).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم بتاگلوکوزیداز

برای تعیین فعالیت آنزیم بتادی‌گلوکوزیداز در نمونه‌های مورد مطالعه، از سوبسترای ۴-نیتروفنیل‌بتادی‌گلوکوپیرانوزید استفاده شد. به این ترتیب که سوسپانسیونی شامل ۲ گرم از نمونه خاک، ۴ میلی‌لیتر بافر MUB با pH=6 و ۰/۶ میلی‌لیتر سوبسترا (۲۵ میلی‌مولار) به مدت ۱/۵ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری و سپس یک میلی‌لیتر کلریدکلسیم ۰/۵ مولار و ۴ میلی‌لیتر بافر تریس (pH=۱۲) به آن افزوده‌شد. سوسپانسیون را با استفاده از کاغذصافی واتمن صاف و غلظت پارانیتروفنل در عصاره صاف‌شده

در طول‌موج ۴۰۰ نانومتر اندازه‌گیری و براساس تیمار شاهد، فعالیت آنزیم بتاگلوکوزیداز برحسب میلی‌گرم پارانیتروفنل آزادشده در هر گرم خاک در ساعت ($\mu gPNP.g^{-1}.h^{-1}$) محاسبه شد (طباطبایی، ۱۹۹۴).

اندازه‌گیری ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی

برخی ویژگی‌های عمومی خاک همچون بافت، pH، EC و کربن آلی (OC) (راول، ۱۹۹۴) و کربنات-کلسیم (CCE) (مارتین و ریو، ۱۹۹۵) با استفاده از روش‌کارهای استاندارد با در نظر گرفتن دو تکرار اندازه‌گیری شدند. برای تعیین غلظت آلاینده‌های نفتی (%Oil) در نمونه‌های خاک برداشته شده از سه سطح آلودگی شدید (H)، متوسط (M) و کم (L)، از دستگاه سوکسله استفاده و تعیین غلظت هیدروکربن‌های نفتی کل بر اساس روش UNEP/IOC/IAEA سازمان محیط زیست آمریکا انجام‌شد (کریستوفر و همکاران، ۱۹۸۸). در این روش برای تعیین غلظت کل هیدروکربن‌های نفتی خاک، ابتدا ۱۰ گرم از نمونه خاک را روی کاغذ صافی ریخته سپس کاغذ صافی از هر طرف به‌طور کامل بسته و وزن اولیه یادداشت شد (W_1) و سپس در دستگاه سوکسله قرارگرفت. برای استخراج مواد نفتی از ۴۰۰-۳۰۰ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان استفاده شد که تقریبا ۴ ساعت به طول انجامید، سپس ۷۲ ساعت در آون در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری و پس از تبخیر دی‌کلرومتان، وزن ثانویه (W_2) یادداشت شد و در نهایت با استفاده از رابطه $B= 100\ (W_1-W_2)/W_2$ درصد نفت در هر نمونه خاک محاسبه شد (B درصد نفت، W_1 وزن اولیه و W_2 وزن ثانویه).

تجزیه و تحلیل آماری

این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی آشیانه‌ای[6] در سه تکرار انجام شد و داده‌ها از طریق نرم افزار آماری SPSS آنالیزشده و نمودارهای حاصله نیز از طریق نرم افزار Excel و SPSS ترسیم شدند. ابتدا استانداردسازی داده‌ها انجام و داده‌های پرت حذف شدند. پیش از انجام هر آنالیز آماری ابتدا نرمال بودن داده‌های به دست آمده با استفاده از شاخص کلموگروف-اسمیرنوف (K-S) بررسی شد و برخی از ویژگی‌های اندازه‌گیری شده که دارای توزیع نرمال نبودند، با استفاده از روش تبدیل داده لگاریتمی نرمال شدند. به منظور بررسی تفاوت بین سطوح مختلف آلودگی (کم، متوسط و زیاد) و همچنین مناطق چهارگانه نمونه‌برداری از نظر تغییرات میزان ویژگی‌های اندازه‌گیری شده، تحلیل واریانس چندمتغیره و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪ انجام شد. در پایان تحلیل همبستگی و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام گرفت.

نتایج و بحث

خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک

میانگین خصوصیات فیزیکی و شیمیایی اندازه-گیری‌شده در نمونه‌های خاک در جداول ۱ و ۲ نشان داده شده است. غلظت نفت در نمونه‌های خاک از ۴/۰۳ درصد در خاک‌های L تا ۲۲/۵ درصد در خاک‌های H متغیر بود (جدول ۱). با توجه به درصدهای نفت اندازه‌گیری شده در نمونه‌های خاک، به منظور تقسیم‌بندی ۱۲۰ نمونه خاک در سه گروه ۴۰ تایی (۴۰ نمونه L، ۴۰ نمونه M و ۴۰ نمونه H)، گروه بندی نمونه‌های خاک به صورت زیر انجام‌شد: ۷/۱-۰درصد نفت، خاک های L، ۱۲/۹۴-۷/۱۲ درصد نفت، خاک‌های M و درصد نفت بیشتر از ۱۲/۹۴ درصد برای خاک‌های H درنظر گرفته‌شد. بیشترین میزان رطوبت (۱۴/۲۴ درصد) در خاک‌های منطقه ۴ و کمترین مقدار آن مربوط به خاک‌های منطقه ۱ (۶/۹۱ درصد) بود (جدول ۲). درصد Θ_m در خاک‌های H (۱۵/۷۹ درصد)، با اختلاف معنی‌دار بالاتر از خاک‌های L (۵/۵۷ درصد) و خاک‌های M (۱۱/۸۴ درصد) بود (جدول ۱). تجزیه و تحلیل پارامترهای فیزیکوشیمیایی نشان داد که میانگین pH خاک

[6] Nested

از ۷/۰۵ در خاک‌های L تا ۷/۳۶ در خاک های H متغیر بود (جدول ۱). بالاترین pH در منطقه ۳ (۷/۴۴) و پایین‌ترین آن در منطقه ۴ (۷/۰۷) اندازه‌گیری شد (جدول ۲). همانطور که نتایج نشان می‌دهد، EC در نمونه‌های خاک با آلودگی نفتی متفاوت از ۱/۷۱ $dS.m^{-1}$ (خاک H) تا ۷/۵۹ $dS.m^{-1}$ (خاک L) متغیر بود. حداکثر مقدار EC در منطقه ۳ و حداقل مقدار آن در منطقه ۲ مشاهده شد (جدول ۲). محتوای کربن آلی (OC) در نمونه‌های خاک از ۵/۰۵ تا ۲۰/۸۴ درصد بسیار متغیر بود (جدول ۱). همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، درصد OC به طور قابل توجهی بین چهار منطقه مورد بررسی از ۸/۸۳ درصد در منطقه ۴ تا ۱۵/۹۶ درصد در منطقه ۱ متفاوت بود.

خاک‌های L دارای بالاترین درصد CCE (۹/۵۶ درصد) و خاک‌های H دارای پایین‌ترین درصد (۸/۷۴ درصد) بودند (جدول۱). بیشترین میانگین درصد CCE در خاک‌های منطقه ۲ (۹/۹۱ درصد) و کمترین آن در خاک‌های منطقه ۱ (۸/۴۹ درصد) مشاهده شد. در ارزیابی بافت خاک‌های مورد بررسی، توزیع اندازه ذرات نشان داد که بین نمونه‌های خاک جمع‌آوری‌شده در شیب آلودگی نفتی (L، M و H) از نظر درصد شن و سیلت تفاوت معناداری وجود ندارد و تنها درصد رس تفاوت معناداری نشان داد (جدول۱). درصد رس در خاک‌های L، (۲۳/۶۷ درصد) به طور معنی-داری از خاک‌های H (۲۰/۷۹ درصد) بیشتر بود (جدول ۱).

جدول۱- برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی به دست آمده از نمونه‌های خاک با سه سطح آلودگی شدید (High)، متوسط (Moderate) و کم (Low)

آلودگی نفتی	%Oil	Clay (%)	Silt (%)	Sand (%)	CCE (%)	OC (%)	EC ($dS.m^{-1}$)	pH	Θ_m (%)
Low	۴/۰۳^{c}	۲۳/۶۷^{a}	۲۸/۶۷^{a}	۴۴/۹۶^{a}	۹/۵۶^{a}	۵/۰۵^{c}	۷/۵۹^{a}	۷/۰۵^{c}	۵/۵۷^{c}
Moderate	۹/۹۵^{b}	۲۴/۳۰^{a}	۳۰/۱۷^{a}	۴۴/۲۲^{a}	۹/۰۹^{b}	۱۲/۳۱^{b}	۳/۲۴^{b}	۷/۲۶^{b}	۱۱/۸۴^{b}
High	۲۲/۵۰^{a}	۲۰/۷۹^{b}	۲۸/۲۲^{a}	۴۹/۳۵^{a}	۸/۷۴^{b}	۲۰/۸۴^{a}	۱/۷۱^{c}	۷/۳۶^{a}	۱۵/۷۹^{a}

درصد نفت (Oil)، جمعیت میکروبی در محیط کشت NA (NA)، جمعیت میکروبی در محیط کشت CFMM (CFMM)، درصد شن (Sand)، درصد رس (Clay)، درصد سیلت (Silt)، درصد کربنات کلسیم معادل (CCE)، درصد کربن آلی (OC)، هدایت الکتریکی (EC)، درصد رطوبت (Θm)

جدول۲- برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی نمونه‌های خاک در چهار منطقه نمونه‌برداری

مکان‌های نمونه-برداری	%Oil	Clay (%)	Silt (%)	Sand (%)	CCE (%)	OC (%)	EC (dS.m-1)	pH	Θm (%)
Location 1	a۱۵/۹۵	b۱۷/۷۳	c۲۱/۴۴	a۵۹/۴۵	c۸/۴۹	a۱۵/۹۶	b۲/۹۴	b۷/۲۲	C۶/۹۱
Location 2	۱۲/۶۲b	۱۶/۳۲b	۳۰/۲۹b	۴۸/۶۹b	۹/۹۱a	۱۴/۶۳a	۲/۶۷b	۷/۲۰b	۱۰/۳۱b
Location 3	۱۲/۳۷b	۲۷/۴۳a	۲۷/۰۲bc	۴۳/۹۲b	۹/۴۴b	۱۲/۵۷b	۵/۴۳a	۷/۴۴a	۱۳/۰۱ab
Location 4	۸/۷۸c	۲۹/۶۸a	۳۷/۰۱a	۳۳/۳۱c	۸/۶۹c	۸/۸۳c	۵/۳۱a	۷/۰۷c	۱۴/۲۴a

شمارش جمعیت میکروبی

همانطور که اشاره شد در این پژوهش مطالعه متاژنوم نیز انجام گرفته اما در این نوشتار تنها به نتایج شمارش جمعیت باکتریایی اکتفا شده است (مرادی، ۱۴۰۲). نتایج به‌دست آمده در این پژوهش نشان داد که جمعیت میکروبی شمارش شده در دو محیط کشت NA و CFMM، متفاوت بودند و مشاهده شد که فراوانی میکروبی در محیط کشت NA بیشتر از محیط کشت CFMM بود (جدول ۳). از آنجا که محیط کشت NA یک محیط کشت عمومی برای رشد اکثر باکتری‌هاست، تعداد میکروب شمارش شده در آن بیشتر است اما محیط کشت CFMM محیط کشتی با حداقل عناصر غذایی است و تنها منبع کربن برای ریزجانداران خاک، کربن موجود در نفت افزوده شده در آن است و طبیعی است که شمار میکروبی کمتری در آن به دست آید زیرا باتوجه به تفاوت ذکرشده، تنها جوامع میکروبی با قابلیت تجزیه هیدروکربن‌های نفتی می‌توانند در آن رشد کنند. نتایج مطالعه ما نشان داد که جمعیت میکروبی در خاک‌های دارای آلودگی شدید بیشتر

بود. تعداد کلنی‌های شمارش‌شده در خاک‌های با آلودگی شدید (H) با اختلاف آماری معنی‌دار (P<۰/۰۱) بالاتر از خاک‌های دارای غلظت متوسط (M) و غلظت پایین نفت (L) بود (جدول۳).

جدول ۳- جمعیت میکروبی شمارش شده ($CFU.g^{-1}$) در محیط کشت‌های NA و CFMM در چهار منطقه نمونه‌برداری و در سطوح مختلف آلودگی نفتی (Low، Moderate و High)

مکان‌های نمونه‌برداری	محیط کشت	غلظت آلاینده نفتی			
		Low	Medium	High	Mean
مکان ۱	NA	۵/۰۶×۱۰$^{۵\,d}$	۱/۱۳×۱۰$^{۶\,a}$	۱/۱۲×۱۰$^{۶\,a}$	۹/۳۷×۱۰$^{۵\,A}$
مکان ۲	NA	۳/۵۵×۱۰$^{۵\,e}$	۸/۴۰×۱۰$^{۵\,bc}$	۹/۴۶×۱۰$^{۵\,ab}$	۷/۲۲×۱۰$^{۵\,B}$
مکان ۳	NA	۲/۸۵×۱۰$^{۵\,e}$	۷/۰۷×۱۰$^{۵\,c}$	۸/۱۲×۱۰$^{۵\,bc}$	۶/۲۵×۱۰$^{۵\,C}$
مکان ۴	NA	۱/۶۰×۱۰$^{۵\,f}$	۳/۶۷×۱۰$^{۵\,e}$	۶/۹۸×۱۰$^{۵\,c}$	۳/۳۱×۱۰$^{۵\,D}$
میانگین	NA	۳/۲۸×۱۰$^{۵\,C}$	۶/۴۸×۱۰$^{۵\,B}$	۹/۵۴×۱۰$^{۵\,A}$	
مکان ۱	CFMM	۶/۰۶×۱۰$^{۴\,f}$	۲/۹۳×۱۰$^{۵\,bc}$	۴/۵۴×۱۰$^{۵\,bc}$	۲/۹۸×۱۰$^{۵\,A}$
مکان ۲	CFMM	۱/۸۱×۱۰$^{۵\,d}$	۶/۶۱×۱۰$^{۵\,a}$	۲/۵۲×۱۰$^{۵\,c}$	۳/۳۴×۱۰$^{۵\,A}$
مکان ۳	CFMM	۵/۶۲×۱۰$^{۴\,f}$	۱/۰۵×۱۰$^{۵\,e}$	۱/۹۳×۱۰$^{۵\,cd}$	۱/۲۶×۱۰$^{۵\,B}$
مکان ۴	CFMM	۲/۹۷×۱۰$^{۴\,g}$	۱/۴۲×۱۰$^{۵\,de}$	۲/۹۷×۱۰$^{۵\,bc}$	۱/۲۰×۱۰$^{۵\,C}$
میانگین	CFMM	۸/۱۱×۱۰$^{۴\,C}$	۲/۵۳×۱۰$^{۵\,B}$	۳/۱۱×۱۰$^{۵\,A}$	

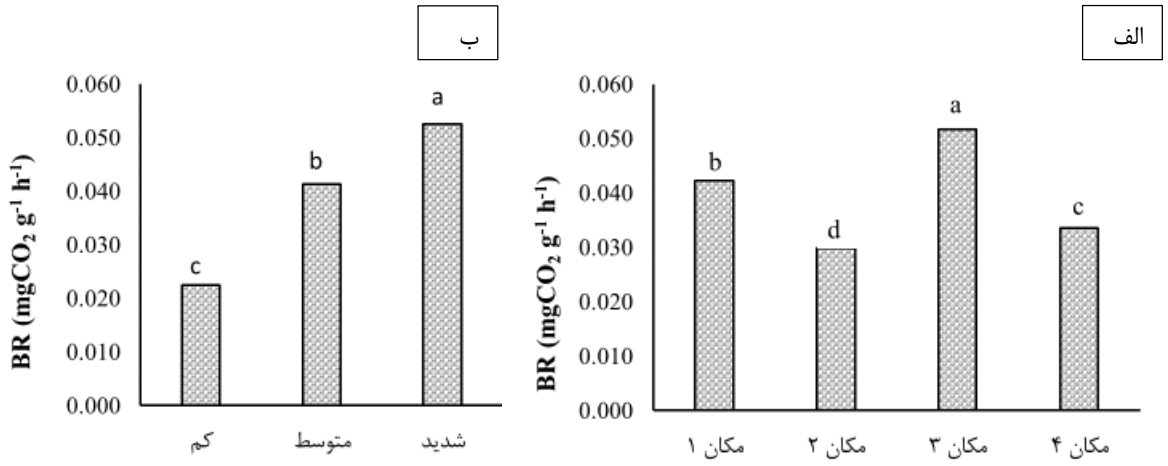
جمعیت کل ریزجانداران خاک در اثر تنش‌های غیرزیستی نظیر آلاینده‌های نفتی و فقر غذایی، کاهش می-یابند اما باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت دچار تغییر نمی‌شوند. به عبارت دیگر آلودگی نفتی، موجب ایجاد شرایط انتخابی در خاک می‌شود به گونه‌ای که تنها ریزجانداران که قادر به استفاده از هیدروکربن‌های نفتی هستند از فراوانی بالاتری برخوردار باشند. در گزارشی (لیائو و همکاران، ۲۰۱۵) تأثیرات آلودگی نفتی را بر ساختار و فعالیت میکروبی و عملکرد متابولیسم کربن توسط ریزجانداران را مورد مطالعه قرار دادند و بیان کردند که آلودگی نفتی طولانی‌مدت، به شدت الگوهای جامعه میکروبی خاک را تغییر داده و تغییرات میکروبی به لحاظ فراوانی، غنای باکتریایی، تنوع زیستی باکتریایی و عملکرد آنها به لحاظ آماری معنی‌دار بود. آنها دریافتند که بالا بودن فراوانی و تنوع میکروبی، رشد میکروارگانیسم‌های هتروتروف که قابلیت تخریب هیدروکربن‌ها و استفاده از منابع غنی نفتی را دارند افزایش داده‌است. در تحقیقی که بر روی متاژنوم خاک‌های متأثر از آلودگی نفتی (داس سنتوس و همکاران، ۲۰۱۱) انجام شد، مشاهده کردند که در خاک‌های آلوده به نفت، تعداد OTU[۷]ها به طور قابل‌توجهی افزایش یافت. نتایج پژوهش آنها گویای این مطلب بود که برخی از گونه‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های نفتی در محیط آلوده به نفت، به دلیل انتخاب طبیعی غالب شده‌اند. محققان زیادی با بررسی تاثیرات آلاینده‌های نفتی بر جمعیت و فعالیت میکروبی نتایج مشابهی به دست آوردند (هوی و همکاران، ۲۰۰۷؛ مارگزین و همکاران،۲۰۰۷).

تنفس پایه

نتایج به‌دست آمده در اندازه‌گیری تنفس پایه نشان داد که، با افزایش شدت آلودگی، میزان تنفس افزایش یافت. میانگین CO_2 رها شده در اثر تنفس پایه در خاک‌های L، در خاک‌های M و در خاک‌های H به ترتیب ۰/۰۲۳، ۰/۰۴۱ و ۰/۰۵۳ $mgCO_2.g^{-1}.h^{-1}$ بود. تنفس پایه اندازه-گیری شده در هرسه غلظت آلاینده نفتی اختلاف آماری معنی‌داری (P<۰/۰۱) نشان دادند (شکل ۳ ب). میانگین تنفس پایه اندازه‌گیری‌شده در ۴ منطقه مورد بررسی نشان

[7] Operational Taxonomic Unit

داد که منطقه ۳ با ۰/۰۵۲ $mgCO_2.g^{-1}.h^{-1}$، بالاترین و منطقه ۲ با ۰/۰۳۰ $mgCO_2.g^{-1}.h^{-1}$، پایین‌ترین مقادیر را به خود اختصاص دادند. چهار منطقه مختلف با هم اختلاف آماری معنی‌داری نشان دادند (P<۰/۰۱) و در کلاس‌های آماری مختلف قرار گرفتند (شکل ۳ الف).



شکل۳- تنفس پایه اندازه‌گیری‌شده در ۴ منطقه نمونه‌برداری (الف). تنفس پایه (BR) اندازه‌گیری شده در ۳ سطح آلودگی زیاد (High)، متوسط (Moderate) و کم (Low) (ب)

در پژوهش‌هایی که شاخص‌های زیستی خاک از جمله تنفس و جمعیت میکروبی را مورد بررسی قرار می‌دهند، غالباً انتظار می‌رود که سمیت آلاینده‌های نفتی روی جوامع میکروبی اثر گذاشته و شمار میکروبی و میزان تنفس میکروبی نیز کاهش یابد زیرا ریزجانداران خاک به هرگونه آشفتگی اکوسیستم بسیار حساس هستند و لذا گوناکونی و فعالیت آنها به سرعت توسط چنین آشفتگی‌هایی تغییر می‌کند. اکثر پژوهش‌های این چنینی خاک‌های آلوده‌ای را مورد ارزیابی قرار داده‌اند که به صورت مصنوعی، آلاینده به آنها افزوده شده–است. نوروزپور و همکاران (۱۴۰۲) تغییرات تنفس میکروبی را در خاک آلوده به نفتای سنگین که به میزان ۷ درصد به صورت دستی به خاک افزوده بودند، مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج آنها نشان داد که تنفس (BR و SIR) در خاک آلوده در ابتدای آزمایش بالا بود زیرا جوامع باکتریایی از هیدروکربن‌ها به عنوان منبع کربن استفاده کرده بودند اما با گذشت زمان تقریباً ۱۵ روز روند کاهشی بود زیرا هیدروکربن‌های در دسترس کاهش یافته و تنفس حتی از نمونه شاهد بدون آلودگی نیز کمتر شده بود. اما در پژوهش حاضر نمونه‌خاک‌های مورد بررسی سال‌های متمادی تحت تأثیر آلاینده نفتی بوده‌اند و به عبارتی می‌توان گفت سازگاری لازم بین جوامع میکروبی و آلاینده نفتی ایجاد شده‌است. نتایج آزمایش مربوطه در این پژوهش نشان داد که میزان CO_2 متصاعدشده ناشی از فعالیت تنفسی میکروارگانیسم‌ها، در حضور ماده نفتی بیشتر بود. همبستگی بالای بین تنفس پایه و میزان درصد نفت (۰/۷۶۶ =r و P<۰/۰۱) گواهی بر این ادعاست (جدول ۵).

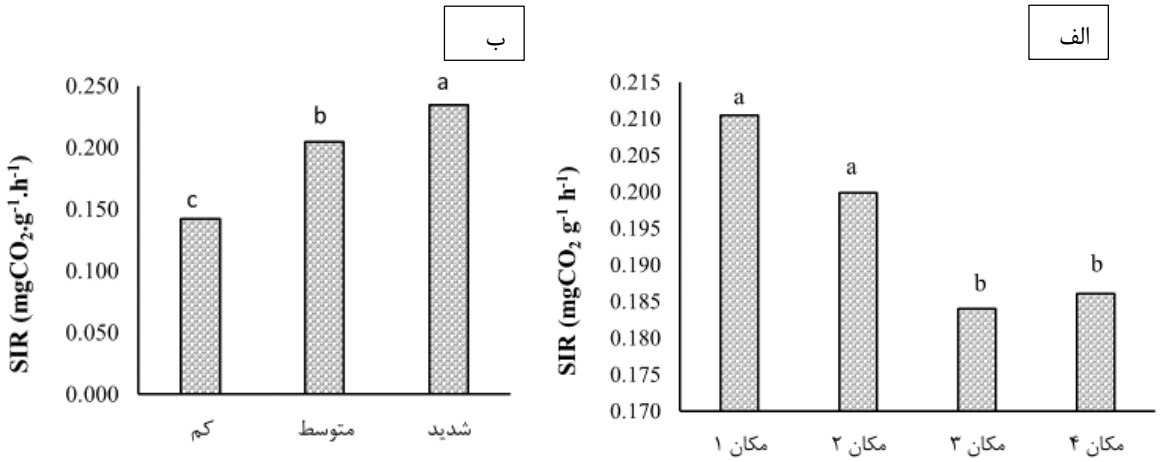
بدیهی است که جمعیت میکروبی بالا در این خاک‌ها، میزان تنفس بیشتری خواهد داشت. جمعیت بالای میکروبی در خاک‌های آلوده در این آزمایش (جدول ۳) بیانگر این موضوع است که میکروارگانیسم‌های خاک طی مدت طولانی، به حضور آلاینده سازگار شده و حتی از هیدروکربن‌های نفتی به عنوان منبع کربن برای رشد و تغذیه خود استفاده کرده‌اند. در تأیید صحت مطالب گفته‌شده، نتایج این پژوهش نشان داد که همبستگی مثبت و معنی‌داری بین تنفس پایه خاک و شمار جمعیت میکروبی رشدیافته در محیط کشت عمومی NA (۰/۶۸۴ =r و P<۰/۰۱) و محیط کشت حاوی ترکیبات نفتی (۰/۵۰۲ =r و P<۰/۰۱) وجود داشت (جدول ۵). خاک‌هایی که به مدت طولانی در معرض آلودگی با هیدروکربن‌های نفتی هستند با چالش شدیدی برای حفظ و نگهداری جامعه میکروبی و تنوع ساختاری و عملکردی این جوامع میکروبی مواجه هستند (پساک و همکاران، ۲۰۱۵). همچنین 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.

طبیعتاً جوامع میکروبی مقاوم به آلودگی نفتی و تجزیه‌کننده‌های نفت می‌توانند با افزایش مقدار هیدروکربن‌ها در خاک، جمعیت و فعالیت خود را افزایش دهند. کرونیگ و گرین فیلد (۲۰۰۳) برای ارزیابی تأثیرات آلاینده‌های نفتی همچون نفت دیزل بر کیفیت خاک، فعالیت میکروبی را از طریق اندازه‌گیری تنفس میکروبی بررسی کردند. آنها مشاهده کردند که پس از ۱۶ هفته، به طور معنی‌داری جمعیت میکروبی خاک نسبت به سطوح اولیه که میزان آلودگی کمتر بود، افزایش یافت. نتایج آنها نشان داد که تا دو سال پس از آلودگی، نوسان قابل توجهی در جمعیت میکروبی مشاهده نشد اما با بررسی الگوهای تولید CO_2 به‌دست آمده از تنفس و فعالیت میکروبی خاک دریافتند که دوره‌های طولانی‌تر می‌تواند موجب سازگاری بیشتر جوامع میکروبی خاک با هیدروکربن‌های نفتی شود. آبد و الکیندی (۲۰۱۷)، تأثیر اختلال ناشی از آلودگی نفتی را بر گوناکونی و فعالیت جوامع میکروبی خاک بررسی کردند و نشان دادند که افزایش غلظت نفت منجر به افزایش CO_2 متصاعدشده از تنفس شد. نتایج به‌دست آمده از پژوهش آنها گویای این مطلب بود که افزودن نفت می‌تواند موجب تحریک فعالیت باکتری‌های هتروتروف باشد که انرژی و منبع کربن خود را از بیرون تأمین می‌کنند. باکتری-های هتروتروف در مقابل آلودگی نفتی مقاومت بالاتری نشان می‌دهند و در حضور نفت، نسبت به باکتری‌های اتوتروف رشد بهتری خواهند داشت. آنها در مقایسه بین سیانوباکترها به عنوان باکتری‌های اتوتروف و فیرمیکیوت‌ها (*باسیلوس*ها و *کلستریدیوم*ها) به عنوان باکتری‌های هتروتروف، مشاهده کردند که سطح CO_2 تولیدی ناشی از تنفس، با افزایش نفت افزایش یافت. *باسیلوس*ها توانایی تجزیه ترکیبات نفتی را در شرایط هوازی دارند و با تولید بیوسورفاکتانت می‌توانند نفت را به شکل امولسیون تبدیل کنند و امکان دسترسی و تخریب آن را افزایش دهند. لذا می‌توان نتیجه گرفت که افزایش جمعیت میکروبی در این پژوهش، که منجر به افزایش تنفس می‌شود، ممکن است ناشی از افزایش شمار باکتری‌های هتروتروف باشد که از منابع نفتی برای تأمین کربن، انرژی و زنده‌مانی خود استفاده می‌کنند.

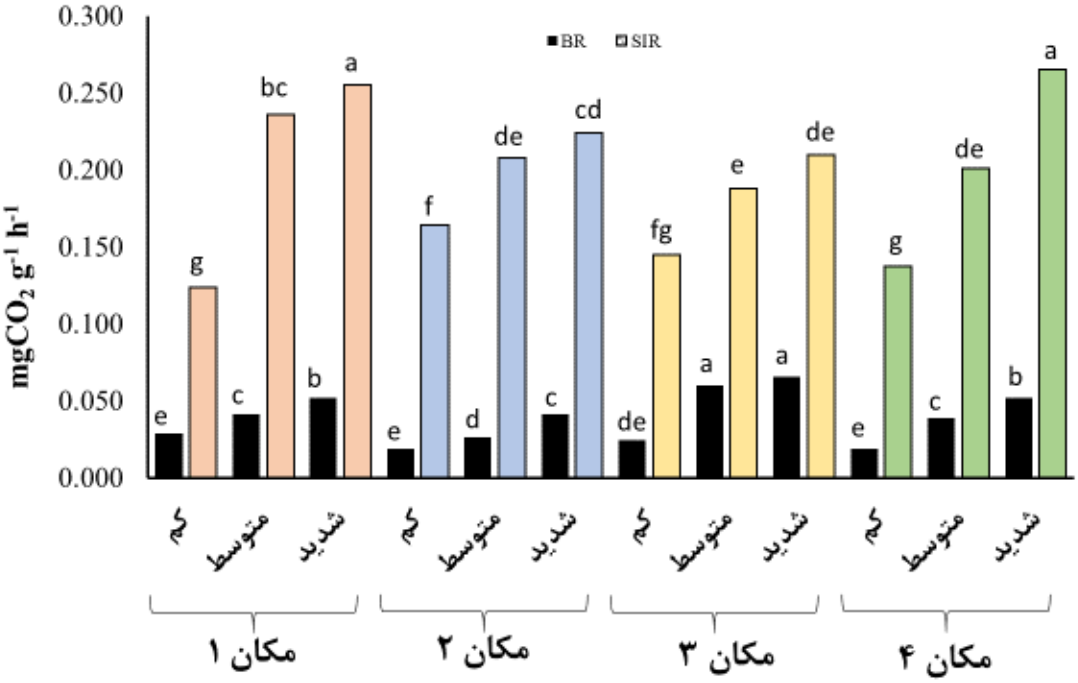
تنفس برانگیخته

اندازه‌گیری تنفس ناشی از سوبسترای گلوکز نیز همانند تنفس پایه، در خاک‌های H بالاتر بود (شکل ۴ ب). میزان CO_2 متصاعدشده در اثر افزودن گلوکز به نمونه‌های خاک، در خاک‌های با آلودگی زیاد (H)، متوسط (M) و کم (L) به ترتیب ۰/۲۳۴، ۰/۲۰۵ و ۰/۱۴۲ $mgCO_2.g^{-1}\ h^{-1}$ بود. میانگین تنفس برانگیخته اندازه‌گیری‌شده در هرسه غلظت آلاینده نفتی اختلاف آماری معنی داری ($P<0/01$) نشان‌دادند (شکل ۴ الف).



شکل۴- تنفس برانگیخته اندازه‌گیری شده در چهار منطقه نمونه‌برداری (الف)، تنفس برانگیخته اندازه‌گیری شده در سه سطح آلودگی زیاد (High)، متوسط (Moderate) و کم (Low) (ب)

در اندازه‌گیری تنفس برانگیخته در چهار منطقه مورد بررسی مشاهده شد که مناطق ۱ و ۲ در یک کلاس آماری قرار گرفتند و بیشترین مقدار مربوط به منطقه ۱ (۰/۲۱۰ $mgCO_2.g^{-1}.h^{-1}$) بود. منطقه ۳ با ۰/۱۸۴ $mgCO_2.g^{-1}.h^{-1}$، پایین‌ترین مقدار را به خود اختصاص داد اما به لحاظ آماری با منطقه ۴ اختلاف قابل توجهی نداشت (شکل ۵).



شکل ۵- مقایسه تنفس پایه و تنفس برانگیخته اندازه‌گیری شده در چهار منطقه نمونه‌برداری

تنفس SIR یکی از ساده‌ترین روش‌های تخمین مقدار زیست‌توده میکروبی در خاک می‌باشد. بیشتر ریزجانداران در خاک خفته هستند، بنابراین تنفس آنها در خاک کم است. با این حال تنفس آنها می‌تواند با افزوده شدن سوبسترا به راحتی تحریک شود. گلوکز عموماً به عنوان سوبسترا استفاده می‌شود؛ چون بیشتر ریزجانداران می‌توانند از آن به عنوان منبع کربن استفاده کنند (داوسان و همکاران ۲۰۰۷). در این پژوهش نیز میزان تنفس برانگیخته

با افزودن گلوکز و برانگیختن فعالیت میکروبی نسبت به تنفس پایه بالاتر بود (شکل ۵). 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.

نتایج پژوهش حاضر در این بخش نیز نشان داد که با افزایش میزان آلودگی در نمونه‌خاک‌ها، میزان CO_2 آزادشده در اثر تنفس تحریک شده با سوبسترای گلوکز بیشتر است. نتایج نشان داد که SIR اندازه‌گیری شده با جمعیت میکروبی شمارش شده در محیط کشت عمومی NA (r= ۰/۷۷۴ و P<۰/۰۱) و همچنین با جمعیت میکروبی شمارش‌شده در محیط کشت CFMM نیز همبستگی مثبت و معنادار (r= ۰/۸۴۵ و P<۰/۰۱) وجود دارد (جدول ۵). ابراهیمی و همکاران (۲۰۱۹) در پژوهش خود که به تخمین تنفس میکروبی در کاربری¬های مختلف پرداختند به همبستگی مثبت بین SIR و جمعیت میکروبی (جمعیت باکتریایی شمارش شده) اشاره داشتند. اندرسون و دامش (۱۹۷۳) با بررسی نقش زیست توده قارچی و باکتریایی در تنفس کل خاک، مشاهده کردند که پس از افزودن گلوکز به نمونه های خاک، تنفس به مدت چند ساعت (۲ تا ۸ ساعت) به سطح بالاتری افزایش یافت. آنها گزارش کردند که آزادسازی CO_2 به دلیل تکثیر جمعیت خاک افزایش یافت.

اندازه‌گیری تنفس BR و SIR مستقل از هم هستند زیرا تنفس پایه منعکس‌کننده فعالیت میکروفلور خاک است که ترکیبات آلی خاک را تجزیه می‌کنند اما SIR تنفس خاص ناشی از تجزیه گلوکز را نشان می‌دهد که نشان‌دهنده پتانسیل ریزجانداران خاک برای تخریب یک سوبسترای ساده است. SIR می‌تواند منجر به تخمین بیش از حد زیست‌توده میکروبی در یک خاک آلوده شود زیرا بخشی از میکروفلور خاک در فاز خواب[۸] است و در صورت حضور سوبسترایی همچون گلوکز مجدداً فعال می‌شوند. تنفس SIR، وضعیت فیزیولوژیکی آشفته میکروفلور را به خوبی نشان می‌دهد و می‌تواند به عنوان یک شاخص حساس‌تر نسبت به BR در خاک‌های آلوده، به‌کاررفته قرارگیرد زیرا BR اتلاف قابل توجهی از زیست-توده در اثر آلودگی نفتی را نشان نمی‌دهد (برون و همکاران ۲۰۰۱). به طور کلی نتایج مطالعات آلودگی‌های نفتی کوتاه-مدت، قابل مقایسه با اثرات بلندمدت آلودگی نفتی روی ویژگی‌های خاک به ویژه فعالیت‌های میکروبی نیست. علاوه براین، ترکیب و گوناکونی جوامع میکروبی خاک بستگی به نوع خاک دارد و اطلاعات محدودی در خصوص شباهت نتایج اثرات کوتاه‌مدت و بلندمدت وجود دارد.

فعالیت آنزیم بتاگلوکوزیداز

فعالیت آنزیم بتاگلوکوزیداز با سنجش میزان PNP تولیدی ناشی مصرف سوبسترای 4-Nitrophenyl β-D-glucopyranoside در هر ساعت در یک گرم خاک ارزیابی شد که بیشترین مقدار آن در منطقه ۱ ($\mu gPNP.g^{-1}.h^{-1}$ ۲۱/۶۷) و کمترین مقدار آن در منطقه ۴ ($\mu gPNP.g^{-1}.h^{-1}$ ۷/۰۵) به‌دست آمد (جدول ۴). فعالیت این آنزیم با افزایش میزان نفت موجود در نمونه‌های خاک، افزایش یافت به گونه‌ای که بالاترین فعالیت $\mu gPNP.g^{-1}.h^{-1}$ ۲۴/۷۸ در خاک‌های H و پایین‌ترین فعالیت آن $\mu gPNP.g^{-1}.h^{-1}$ ۶/۰۹ در خاک‌های L مشاهده‌شد (جدول ۴).

[6] Dormant State

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

مکان نمونه‌برداری	فعالیت بتاگلوکوزیداز ($\mu gPNP.g^{-1}.h^{-1}$)
Location 1	۲۱/۶۷^{a}
Location 2	۱۷/۵۰^{b}
Location 3	۱۲/۰۴^{c}
Location 4	۷/۰۵^{d}
غلظت آلاینده نفتی	
Low	۶/۰۹^{C}
Moderate	۱۲/۳۶^{B}
High	۲۴/۷۸^{A}

بتاگلوکوزیداز آنزیمی کلیدی در چرخه کربن است که مسئول آخرین مرحله تجزیه میکروبی سلولز به گلوکز می‌باشد. این آنزیم گروه‌های انتهایی غیراحیایی - βD سلوبیوز را هیدرولیز می‌کند و β گلوکز را آزاد می‌کند که منبع بسیار مهم انرژی برای میکروارگانیسم‌هاست. فعالیت این آنزیم به شدت به حضور ترکیبات کربنی وابسته است و می‌تواند تغییرات ایجادشده در وضعیت ترکیبات کربنی را منعکس کند (ریفالدی و همکاران، ۲۰۰۶). همانطور که در جدول ۵ مشاهده می‌شود همبستگی مثبت و معنی‌داری بین فعالیت بتاگلوکوزیدازی و درصد نفت ($r= ۰/۷۹۴، P< ۰/۰۱$) و درصد کربن آلی ($P< ۰/۰۱$ ،$r= ۰/۸۰۴$) وجود داشت که خود بیانگر این موضوع است که با افزایش میزان ترکیبات کربنی، فعالیت بتاگلوکوزیدازی نیز افزایش یافته است. در پژوهشی (ریفالدی و همکاران، ۲۰۰۶) به منظور ارزیابی کیفیت خاک‌های آلوده به نفت، فعالیت آنزیم بتاگلوکوزیداز را اندازه‌گیری نمودند و گزارش کردند که با گذشت زمان بیشتر از ۱۰۰ روز شاهد افزایش فعالیت این آنزیم بودند زیرا مواد مغذی برای میکروارگانیسم‌ها تامین شده‌بود. همبستگی مثبت و معنی دار فعالیت این آنزیم و کربن بیوماس میکروبی در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است (تورنر و همکاران، ۲۰۰۲) در مطالعه ما نیز بررسی ضرایب همبستگی حاکی از این رابطه مثبت و معنی‌دار بود ($r= ۰/۶۸۰، P< ۰/۰۱$). به نظر حضور ترکیبات نفتی به عنوان منبعی از کربن در تکثیر جامعه میکروبی خاک مورد استفاده قرار گرفته است و ضمن افزایش تعداد آن (جدول ۵) باعث افزایش تولید این آنزیم توسط میکروارگانیسمها شده است

.

جدول ۵- ضرایب همبستگی بین شاخص‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی اندازه‌گیری شده در نمونه‌های خاک

	غلظت نفت Oil	محیط NA NA	محیط CFMM CFMM	تنفس پایه BR	تنفس برانگیخته SIR	فعالیت BGA	شن %Sand	رس %Clay	سیلت %Silt	کربنات- کلسیم معادل CCE	pH	هدایت الکتریکی EC	کربن آلی OC	MBC
Oil	1													
NA	0.766	1												
CFMM	0.707**	0.829**	1											
BR	0.766**	0.684**	0.502**	1										
SIR	0.847**	0.774**	0.845**	0.667**	1									
BGA	0.794**	0.893**	0.764**	0.591**	0.735**	1								
Sand	0.041	0.223*	0.124	-0.072	0.104	0.197*	1							
Clay	-0.127	-0.370**	-0.441**	0.163	-0.230*	-0.347**	-0.644**	1						
Silt	0.009	-0.146	-0.027	0.013	-0.023	-0.091	-0.875**	0.370**	1					
CCE	-0.361**	-0.158	-0.093	-0.257**	-0.254**	-0.176	-0.004	-0.070	0.025	1				
pH	0.418**	0.478**	0.371**	0.615**	0.350**	0.463**	0.016	-0.032	-0.073	0.150	1			
EC	-0.769**	-0.728**	-0.664	-0.552**	-0.702**	-0.827**	-0.167	0.291**	0.097	0.160	-0.502**	1		
OC	0.853	0.750**	0.660	0.611**	0.731**	0.804**	0.153	-0.265**	-0.067	-0.299**	0.374**	-0.740**	1	
MBC	0.781**	0.742**	0.782**	0.642**	0.916**	0.680**	0.016	-0.116	0.056	-0.223*	0.311**	-0.663**	0.672**	1

درصد نفت (Oil)، تنفس پایه (BR)، تنفس برانگیخته (SIR)، جمعیت میکروبی در محیط کشت NA (NA)، جمعیت میکروبی در محیط کشت CFMM (CFMM)، فعالیت آنزیم اوره‌آز (UA)، درصد شن (Sand)، درصد رس (Clay)، درصد سیلت (Silt)، درصد کربنات کلسیم معادل (CCE)، درصد کربن آلی (OC).
** و * به ترتیب معنی‌دار در سطوح ۱ و ۵ درصد.

PCA

نتایج اندازه‌گیری شاخص‌های شیمیایی، فیزیکی و زیستی با بهره‌گیری از آنالیز مؤلفه‌های اصلی (PCA) مورد بررسی قرارگرفت. PCA یک روش تجزیه و تحلیل داده‌های آماری چند متغیره است که مجموعه‌ای از داده‌های خام را به تعدادی از مؤلفه‌های اصلی (PCA) کاهش می‌دهد و بیشتر واریانس را در داده‌های اصلی حفظ می‌کند تا الگوها یا خوشه‌های احتمالی بین تیمارها و متغیرها را شناسایی کند (کاکس و همکاران، ۲۰۰۳). در آنالیز PCA داده‌ها به مجموعه‌هایی جداگانه از امتیازات و بارگذاری‌ها برای تیمارها و متغیرها تجزیه می‌شوند و کل تنوع داده‌ها برای ارائه یک تصویر واضح و قابل تفسیر از ساختار داده‌ها توضیح داده می‌شوند. علاوه بر این، آنالیز PCA اطلاعات واضحی را به گونه گرافیکی ارائه می‌دهد. در این پژوهش برای بررسی میزان تأثیرگذاری شاخص‌های اندازه‌گیری-شده فیزیکوشیمیایی و زیستی، از تحلیل مؤلفه‌های اصلی با به کارگیری نرم‌افزار آماری SPSS استفاده شد که نتایج بدست آمده از آنها شامل بردارهای ویژه، میزان واریانس نسبی و تجمعی مؤلفه‌های اصلی شاخص‌های مورد بررسی به صورت نمودار و جدول در زیر گزارش شده‌است. براساس نتایج PCA تقریبا ۷۲ درصد از واریانس تراکمی توسط دو مؤلفه اول (C1 و C2) توجیه می‌شود (جدول ۶). در این پژوهش مقادیر ویژه بزرگ‌تر از ۱ درنظر گرفته-شد و دو مؤلفه اول دارای مقدار ویژه بالاتر از ۱ بودند. نتایج تحلیل مؤلفه‌های اصلی نشان داد که ۱۰ مؤلفه می-توانند واریانس کل نمونه‌های خاک مورد بررسی را توجیه کنند و همان‌طور که در جدول ۶ مشاهده می‌شود، مؤلفه اول، ۵۳/۶۱۱ درصد از واریانس کل را توجیه‌کرد. درصد واریانس تراکمی دو مؤلفه اول ۷۲/۴۸۲ درصد بود و به همین ترتیب برای سایر مؤلفه‌ها نیز در همین جدول قابل مشاهده است.

در جدول ۷ متغیرهای مؤثر بر هر مؤلفه و مقادیر بردارهای ویژه هر متغیر نشان داده شده‌است و مشاهده می-شود که هر مؤلفه شامل تعدادی متغیر با ضرایب مختلف است و هر متغیری که دارای ضریب بالاتر از ۰/۵ باشد

گزینش می‌شود (کاکس و همکاران، ۲۰۰۳). برخی از این متغیرها دارای ضریب منفی و برخی دارای ضریب مثبت هستند. علامت منفی به معنی رابطه معکوس بین این متغیر با سایر متغیرهای مؤلفه است و هرچه مقدار متغیری که ضریب منفی دارد افزایش یابد، تأثیرپذیری و اختلاف بین نمونه‌های خاک از مناطق مختلف نمونه‌برداری بر اثر آن متغیر کاهش می‌یابد. علامت مثبت نشان می‌دهد که با افزایش مقدار متغیری که ضریب مثبت دارد، تأثیرپذیری و اختلاف بین نمونه‌های خاک از مناطق مختلف نمونه‌برداری بر اثر آن متغیر بیشتر می‌شود. تأثیرپذیری زیاد یعنی اختلاف بیشتر بین مقادیر متغیرها در خاک‌های مختلف که بیانگر تفاوت بین مناطق مختلف نمونه‌برداری است (شکل ۶).

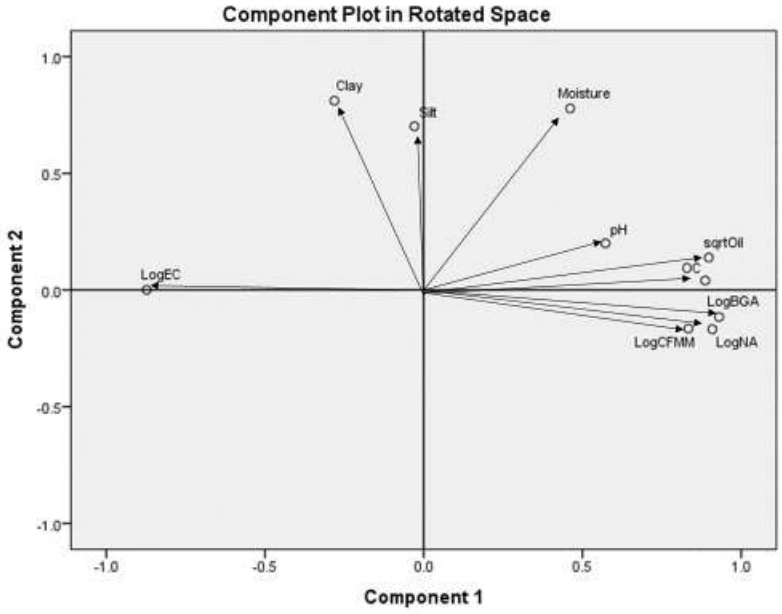
جدول ۶- تجزیه به مؤلفه اصلی برای نمونه‌خاک‌های ۴ مکان نمونه‌برداری

مؤلفه‌ها	مقادیر ویژه	درصد واریانس تراکمی	درصد واریانس
C1	۵/۳۶۱	۵۳/۶۱۱	۵۳/۶۱۱
C2	۱/۸۸۷	۷۲/۴۸۲	۱۸/۸۷۱
C3	۰/۸۵۳	۸۱/۰۱۱	۸/۵۲۹
C4	۰/۶۳۳	۸۷/۳۴۵	۶/۳۳۵
C5	۰/۳۵۶	۹۰/۹۰۶	۳/۵۶۱
C6	۰./۳۱۸	۹۴/۰۸۷	۳/۱۸۱
C7	۰/۲۴۱	۹۶/۴۹۴	۲/۴۰۷
C8	۰/۱۶۰	۹۸/۰۹۶	۱/۶۰۱
C9	۰/۱۲۰	۹۹/۲۹۶	۱/۲۰۱
C10	۰/۰۷۰	۱۰۰	۰/۷۰۴

جدول ۷- مقادیر بردارهای ویژه شاخص‌های مورد بررسی در تجزیه مؤلفه‌های اصلی (PCA)

متغیرها	C1	C2
Oil	۰/۸۹۸	۰/۱۳۹
EC	-۰/۸۷۳	۰/۰۰۰
βGA	۰/۹۳۰	-۰/۱۱۶
NA	۰/۹۰۹	-۰/۱۶۸
CFMM	۰/۸۳۳	-۰/۱۶۵
Clay	-۰/۲۸۱	۰/۸۱۱
Silt	-۰/۰۲۹	۰/۷۰۲
Θm	۰/۴۶۱	۰/۷۷۹
pH	۰/۵۷۲	۰/۲۰۰
OC	۰/۸۸۷	۰/۰۴۱

باتوجه به بالا بودن مقادیر بردارهای ویژه شاخص‌های زیستی و شیمیایی، می‌توان مؤلفه اول را مؤلفه بیوشیمیایی و همچنین با مشاهده مقدار بردار ویژه رس و سیلت، می‌توان مؤلفه دوم را مؤلفه فیزیکی نامید. به عبارتی می‌توان گفت شاخص‌های بیوشیمیایی به ویژه فعالیت آنزیم بتاگلوکوزیداز، درصد نفت، درصد کربن آلی و جمعیت میکروبی منبع اصلی تنوع در داده‌ها هستند (جدول ۷). برون و همکاران (۲۰۰۱) برای تعیین روابط بین ویژگی‌های بیوشیمیایی در خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی، آنالیز مؤلفه‌های اصلی (PCA) را انجام دادند و نتایج آنها نشان داد که تنفس میکروبی به عنوان یکی از متغیرهای مهم و تأثیرگذار با بیشترین مقدار بردار ویژه بود. هرچه یک متغیر در نمودار بای پلات (Bi-plot)، فاصله بیشتری از مرکز داشته‌باشد، تأثیرگذاری بیشتری در تحلیل دارد (شکل ۶). آنالیز مؤلفه‌های اصلی در مطالعات بسیاری در خاک‌های آلوده به نفت انجام شد که در اغلب آنها درصد نفت به عنوان قوی‌ترین عامل تعیین‌کننده تنوع بین داده‌ها بود (نای و همکاران، ۲۰۰۹).



شکل ۶- پراکنش پارامترهای مورد بررسی بر اساس دو مؤلفه اول و دوم در تحلیل مؤلفه‌های اصلی

نتیجه‌گیری

اغلب پژوهش‌های انجام‌شده، در خاک‌های با آلودگی نفتی مصنوعی و کوتاه‌مدت و یا در مدت‌زمان‌های مشخصی انجام‌شده‌اند که نتایج آنها با آلودگی طبیعی و بلندمدت، قابل مقایسه نیست زیرا پارامترهای زیستی ارزیابی‌شده بسیار متفاوت است. در پژوهش حاضر، خاک منطقه نمونه‌برداری، مدت زمان زیادی تحت تأثیر آلاینده-های نفتی بوده و به کشف نفت در این مکان (سال ۱۲۸۰ هجری شمسی) برمی‌گردد. در صورتی که آلاینده‌های نفتی در خاک به طور طبیعی و بلندمدت حضور داشته‌باشند، با گذشت زمان میکروارگانیسم‌های خاک که توانایی تجزیه هیدروکربن‌های نفتی را دارند، در محیط غالب شده و به عبارتی جوامع میکروبی خاک با شرایط آلودگی سازگار می‌شوند، بنابراین شاهد افزایش برخی فعالیت‌های میکروبی و همچنین فراوانی جمعیت میکروبی خواهیم‌بود. نتایج آزمایشات صورت گرفته در این پژوهش نیز حاکی از افزایش شمار میکروبی، تنفس میکروبی و فعالیت آنزیم بتاگلوکوزیداز اندازه‌گیری شده بود. به نظر حاکم شدن آلودگی نفتی طبیعی و طولانی مدت باعث انتخاب طبیعی گونه‌های میکروبی مقاوم به این شرایط شده است. نتایج آنالیزهای PCA نیز نشان داد که شاخص¬های بیوشیمیایی به ویژه فعالیت بتاگلوکوزیداز، درصد نفت و جمعیت میکروبی، از مؤثرترین عوامل در تفاوت بین نمونه¬ها بود.

فهرست منابع

۱. ابراهیمی، م.، ع. ر.، فلاح و م.ر.، ساریخانی. ۱۳۹۲. جداسازی و شناسایی برخی از باکتری‌های تجزیه‌کننده مواد نفتی از خاک‌های آلوده به مواد نفتی و بررسی توان رشد آن‌ها در حضور گازوئیل. دانش آب و خاک, ۲۳(۱): ۱۰۹-۱۲۱.

۲. مرادی، ش.. ۱۴۰۲. مطالعه متاژنوم و شاخص‌های زیستی خاک‌های آلوده به نفت و مدل‌سازی برخی از پارامترهای زیستی (مطالعه موردی: نفت شهر). رساله دکتری رشته مدیریت حاصلخیزی و زیست‌فناوری خاک، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۳. نوروزپور, م., م.ر., ساریخانی., و ن., علی اصغر زاد. ۱۴۰۲. پایش تغییرات تنفسی خاک لوم‌شنی آلوده به نفتای سنگین در تیمارهای مختلف زیست‌پالایی. دانش آب و خاک، ۵۳-۷۲.

4. Abed, R.M., and S, Al-Kindi. 2017. Effect of disturbance by oil pollution on the diversity and activity of bacterial communities in biological soil crusts from the Sultanate of Oman. Applied Soil Ecology. 110: 88-96.
5. Anderson, J.P., and KH, Domsch. 1973. Quantification of bacterial and fungal contributions to soil respiration. Archives of Microbiology. 93: 113-127.
6. Brohon, B., C, Delolme,, and R, Gourdon. 2001. Complementarity of bioassays and microbial activity measurements for the evaluation of hydrocarbon-contaminated soils quality. Soil Biology and Biochemistry. 33(7-8): 883-891.
7. Christopher, S., P, Hein., J, Marsden., and A.S, Shurleff. 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.
8. Cox, J.F., JH, Blackstone and JG Schleier. 2003. Managing Operations: A Focuse on Excellence. North River Press, Great Barrington, MA.
9. Dawson, J.J.C., E.J., Godsiffe., I.P., Thompson., T.K., Ralebitso-Senior., K.S., Killham., and G.I., Paton. 2007. Application of biological indicators to assess recovery of hydrocarbon impacted soils. Soil Biology and Biochemistry. 39(1): 164-177.
10. Doran, J.W., and M.R., Zeiss. 2000. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. Appl Soil Ecol.15;3–11.
11. Dos Santos, H. F., J.C., Cury., F.L., Do Carmo., A.L., Dos Santos., J., Tiedje., J.D., van Elsas., ... and R.S., Peixoto. 2011. Mangrove bacterial diversity and the impact of oil contamination revealed by pyrosequencing: bacterial proxies for oil pollution. PloS one. 6(3): e16943.
12. Hui, L. I., Y., Zhang., I., Kravchenko., X.U., Hui., and C.G., Zhang. 2007. Dynamic changes in microbial activity and community structure during biodegradation of petroleum compounds: a laboratory experiment. Journal of Environmental Sciences. 19(8): 1003-1013.
13. Kroening, S.J., and L.G., Greenfield. 2002. Effects of diesel oil contamination on soil microorganisms.
14. Labud, V., C., Garcia., and T., Hernandez. 2007. Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. Chemosphere. 66(10): 1863-1871.
15. Lee, S.H., B., Oh., and J.G., Kim. 2008. Effect of various amendments on heavy mineral oil bioremediation and soil microbial activity. Bioresource technology. 99(7): 2578-2587.
16. Liang, Y., X., Zhang., J., Zhou., and G., Li. 2015. Long-term oil contamination increases deterministic assembly processes in soil microbes. Ecological Applications. 25(5): 1235-1243.
17. Liao, J., J., Wang., D., Jiang., M.C., Wang., and Y., Huang. 2015. Long-term oil contamination causes similar changes in microbial communities of two distinct soils. Applied microbiology and biotechnology. 99: 10299-10310.
18. Margesin, R., M., Hämmerle., and D., Tscherko. 2007. Microbial activity and community composition during bioremediation of diesel-oil-contaminated soil: effects of hydrocarbon concentration, fertilizers, and incubation time. Microbial ecology. 53: 259-269.
19. Martin, A. E., and R., Reeve. 1955. A rapid manometeic method for determining soil carbonate. Soil Science. 79(3): 187-198.
20. Moreno, B., R., Nogales., C., Macci., G., Masciandaro., and E., Benitez. 2011. Microbial eco-physiological profiles to estimate the biological

restoration of a trichloroethylene-contaminated soil. Ecological Indicators. 11(6),: 1563-1571.

21. Nie, M., X.D., Zhang., J.Q., Wang., L.F., Jiang., J., Yang., Z.X., Quan., ... and B., Li. 2009. Rhizosphere effects on soil bacterial abundance and diversity in the Yellow River Deltaic ecosystem as influenced by petroleum contamination and soil salinization. Soil Biology and Biochemistry. 41(12): 2535-2542.
22. Pessacq, J., R., Medina., C., Terada., F.E., Bianchini., I.S., Morelli., M.T., Del Panno. 2015. Assessment of the responsiveness to different stresses of the microbial community from long-term hydrocarbon-contaminated soils. WAT. AIR AND SOIL POLL. 226(2): 1-13.
23. Riffaldi, R., R., Levi-Minzi., R., Cardelli., S., Palumbo., A., Saviozzi. 2006. Soil biological activities in monitoring the bioremediation of diesel oil-contaminated soil. Water, air, and soil pollution. 170: 3-15.
24. Rowell, D.L. (1994). Soil Science: Methods and Applications. Longman, UK.
25. Schinner, F., R., Öhlinger., E., Kandeler., and R., Margesin. (Eds.). 2012. Methods in soil biology. Springer Science & Business Media.
26. Sutton, N.B., F., Maphosa., J.A., Morillo., W., Abu Al-Soud., A.A., Langenhoff., T., Grotenhuis., H.H., Rijnaarts., H., Smidt. 2013. Impact of long-term diesel contamination on soil microbial community structure. Appl Environ Microbiol. 79(2):619–630.
27. Turner, B. L., D.W., Hopkins., P.M., Haygarth., N., Ostle. 2002. β-Glucosidase activity in pasture soils. Applied Soil Ecology. 20(2): 157-162.
28. Vincent, A.O., E., Felix., M.O., Weltime., O.K., Ize-iyamu., E.E., Daniel. 2011. Microbial degradation and its kinetics on crude oil polluted soil. Research Journal of Chemical Sciences.

Effects of Long-term Oil Pollution on Soil Microbial Respiration and β-glucosidase Activity

Sh.Moradi, M.R.Sarikhani*, A.Beheshti Ale-Agha, A.Reyhanitabar, S.S.Alavi-kia and R.Sharifi

Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran:moradishokufeh@gmail.com
Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran: rsarikhani@yahoo.com
Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran: beheshtiali97@gmail.com
Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran: areyhanitabar@yahoo.com
Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran: ss.alavikia@tabrizu.ac.ir
Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran: rsharifi@ut.ac.ir

Received: June 27, 2023 and Accepted: March 11, 2024

Abstract

Oil pollution is one of the most critical environmental contaminations that can affect soil's biological, physical, and chemical properties. To investigate the effects of long-term and natural oil pollution on soil microbial respiration, including basal respiration (BR) and substrate-induced respiration (SIR), and beta-glucosidase enzyme activity, 120 oil-contaminated soil samples were collected from 0-15 cm depth in the oil-rich region of Naft-Shahr in Kermanshah province with three pollution levels: high (H), moderate (M), and low (L). After measuring the physical and chemical properties of the soils, the total bacteria and oil-degrading bacteria were counted on NA and CFMM culture media, respectively. This finding showed a positive and significant correlation between microbial population and oil concentration. The average oil percentage measured by Soxhlet extraction was 4.03%, 9.95%, and 22.50% for L, M, and H levels, respectively. The results showed that with the increase in oil concentration in soil samples, BR and SIR increased, and the highest BR and SIR respiration rates were 0.053 and 0.234 ($mgCO_2.g^{-1}.h^{-1}$) in H soils, respectively. The measured beta-glucosidase activity was also higher in the presence of oil pollutants, with the highest activity (24.78 $\mu gPNP.g^{-1}.h^{-1}$) in H soils and the lowest (6.09 $\mu gPNP.g^{-1}.h^{-1}$) in L soils. Finally, a Principal Component Analysis (PCA) was conducted, and the results showed that 72% of the variance among samples could be explained by the first two components (biochemical and physical components). Oil pollutants that are naturally present in the soil for an extended period lead to the adaptation of pollution-resistant microbial communities over time, increasing their abundance, microbial respiration, and the activity of enzymes such as beta-glucosidase.

Keywords: BR, β-glucosidase, Oil pollution, SIR.

* Corresponding author: rsarikhani@yahoo.com