



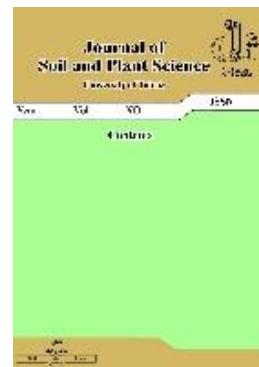
J Soil Plant Sci, 2025, 35(2): 23–41.

<https://doi.org/10.22034/sps.2025.66736.1004>

Journal of Soil and Plant Science

E-ISSN: 3092-6106
<https://sps.tabrizu.ac.ir>

Research Article



Comparison of Different Bioremediation Methods in Reducing Petroleum Hydrocarbons of a Contaminated Soil (Case Study: Evaporation Ponds of Tabriz Refinery)

Mohammad Reza Sarikhani^{1✉} , Mahnaz Afsharnia² , Mahmoud Zarei³ , Ali Lotfollahi⁴ 

1-Corresponding Author, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

E-mail: sarikhani@tabrizu.ac.ir or rsarikhani@yahoo.com

2-Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

E-mail: mahnaz.afsharnia@gmail.com

3-Department of Applied Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

E-mail: mzarei@tabrizu.ac.ir or zarei90211@yahoo.com

4-Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

E-mail: lotfollahimarkid@gmail.com

Received: April 20, 2025

Revised: May 21, 2025

Accepted: July 23, 2025

Published: July 26, 2025

Extended Abstract

Background and Objectives

Petroleum and its derivatives serve as the primary energy source for industrial and domestic use today. However, soil contamination by crude oil and its refined products represents one of the most hazardous forms of environmental pollution. Bioremediation has emerged as an effective strategy for eliminating petroleum hydrocarbons from contaminated soils. Among bioremediation approaches, the application of beneficial free-living bacteria and plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) associated with the rhizosphere has gained significant attention for their bioremediation potential. Substantial experimental evidence supports the efficacy of these microbial agents in reducing both contaminant concentrations and ecotoxicity in polluted soils through bioremediation processes. Three principal bioremediation strategies have demonstrated effectiveness in petroleum hydrocarbon removal: 1- Intrinsic bioremediation - relying on natural biodegradation by indigenous microorganisms without human intervention; 2- Biostimulation - enhancing microbial activity through fertilizer addition, organic amendments, surfactants, and optimization of aeration and moisture conditions; 3- Bioaugmentation - introducing specialized hydrocarbon-degrading microorganisms into the soil microbiome while providing optimal growth conditions and nutrient supplementation.

Methodology

In the present study, a petroleum-contaminated soil was collected from evaporation ponds at Tabriz refinery, East Azerbaijan province, Iran to evaluate different bioremediation methods for hydrocarbon degradation. Following collection, hydrocarbon-degrading bacteria were isolated from the contaminated soils. Three bioremediation approaches were tested: (1) intrinsic bioremediation (control, with no amendments), (2) biostimulation (including aeration, NPK fertilization, organic amendments [cow manure, chicken manure, compost], and Tween 80 surfactant addition), and (3) bioaugmentation (using either individual inoculations of five crude oil-degrading bacterial strains or their consortium). The experiment was conducted in 2 kg pots over a four-month period. Upon completion, we measured: (1) total petroleum hydrocarbons (TPH), (2) soil enzyme

activities (dehydrogenase, urease, phosphatase, catalase), and (3) biological indicators (BR: basal respiration and SIR: substrate-induced respiration).

Results

Among all treatments, the use of Tween 80, cow manure, Nutrient Broth (NB) without bacteria, and NPK fertilizers resulted in hydrocarbon degradation rates of 89.0%, 86.3%, 57.6%, and 67.4%, respectively, representing the highest degradation efficiencies in the soil. Among the bioaugmentation treatments, *Arthrobacter* sp. COD 2-3 and the bacterial consortium showed the highest TPH degradation rates, at 69.7% and 63.3%, respectively. The activity of dehydrogenase and urease enzymes increased in all treatments at the beginning of the experiment but declined after 2 and 4 months, respectively. Initially, dehydrogenase activity was highest in the bioremediation treatments involving *Pseudochrobactrum* sp. COD 1-4, *Stenotrophomonas* sp. COD 1-1, the bacterial consortium, and chicken manure, while Tween 80 exhibited the lowest activity. Urease activity was highest in NB, watering, chicken manure, and the consortium treatments, but lowest in the compost treatment and the *Arthrobacter* sp. COD 2-3 inoculation. Catalase enzyme activity increased significantly 2–3 days after treatment in the NB, Tween 80, and consortium treatments compared to other treatments. However, over time, activity in these three treatments declined, whereas in other bioremediation treatments and the contaminated control soil, it increased gradually, indicating sustained microbial viability and petroleum-degrading activity. The activity of acidic and alkaline phosphatase enzymes remained relatively unchanged throughout the experiment. Basal respiration (BR) and substrate-induced respiration (SIR) increased initially in all treatments but decreased significantly after four months. At baseline, the bacterial consortium, compost, and cow manure treatments exhibited the highest basal respiration rates, followed by microbial inoculations and chicken manure. Tween 80, aerated soil, and the contaminated control had the lowest basal respiration. Finally, the percentage of TPH degradation showed positive correlations with soil basal respiration, substrate-induced respiration, and dehydrogenase activity.

Conclusion

Finally, the treatments for remediation of oil-contaminated soil were introduced, including the addition of cow dung, NPK fertilizer, and a bacterial consortium as the most effective bioremediation method. Adding animal manure improved the soil's physical and chemical properties such as enhancing soil structure and facilitated oxygen transport, providing energy for microorganisms and thereby boosting microbial activity. Dehydrogenase, an intracellular enzyme, is directly linked to the activity of the soil's microbial population. An increase in this enzyme's activity at the beginning of the experiment in oil-contaminated soil indicated heightened microbial degradation activity. However, the subsequent decline in enzyme activity by the end of the experiment was likely due to the prolonged test duration and the microbes entering the death phase. In general, it is recommended to use shorter sampling intervals and testing periods for all enzyme activities to better monitor changes over time. This approach would help clarify the trends in enzyme activity throughout the experiment.

Keywords: Bioaugmentation, Bioremediation, Biostimulation, Phytoremediation, Total petroleum hydrocarbons

Data Availability Statement

Data is available on reasonable request from the authors.

Acknowledgements

This paper is published as a part of a Ph.D. thesis supported by the Vice Chancellor for Research and Technology of the University of Tabriz, Tabriz, Iran. The authors are thankful to the University of Tabriz for financial supports.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Ethical considerations

The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

Cite this article: Sarikhani, M.R., Afsharnia, M., Zarei, M. & Lotfollahi, A. (2025). Comparison of different bioremediation methods in reducing petroleum hydrocarbons in a contaminated soil (Case study: evaporation ponds of Tabriz refinery). *Journal of Soil and Plant Science*, 35(2), 23–41.

<https://doi.org/10.22034/sps.2025.66736.1004>

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



Copyright © 2025 The Authors.
Publisher: The University of Tabriz





مقاله پژوهشی

مقایسه کارایی روش‌های مختلف زیست‌پالایی در کاهش هیدروکربن‌های نفتی یک خاک آلوده (مطالعه موردی: حوضچه‌های تبخیر پالایشگاه تبریز)

محمد رضا ساریخانی^۱، مهناز افشارنیا^۲، محمود زارعی^۳، علی لطف‌اللهی^۴

۱- نویسنده مسئول، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. رایانامه: rsarikhani@yahoo.com

۲- گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. رایانامه: mahnaz.afsharnia@gmail.com

۳- گروه شیمی کاربردی، دانشکده شیمی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. رایانامه: zare90211@yahoo.com

۴- گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. رایانامه: lotfollahimarkid@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۱/۳۱	تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۲/۳۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۵/۰۱	تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۰۵/۰۴

چکیده

آلودگی خاک به نفت خام و مشتقات آن از جمله خطرناک‌ترین انواع آلودگی‌های محیط‌زیست محسوب می‌شود. برای ارزیابی کاهش هیدروکربن‌های نفتی در یک خاک آلوده برداشت شده از حوضچه‌های تبخیر پالایشگاه تبریز، مطالعه‌ای بر روی انواع روش‌های زیست‌پالایی نفت انجام شد. برای این کار، بعد از جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های نفتی از خاک آلوده، انواع تیمارهای زیست‌پالایی از جمله تحریک زیستی، تلقیح زیستی و زیست‌پالایی ذاتی به مدت ۴ ماه در گلدان‌های ۲ کیلوگرمی بررسی شد. تیمارهای تحریک زیستی شامل هوادهی، آبدهی، تأمین NPK، افزودن کود گاوی، کود مرغی، کمپوست و سورفکتانت توئین ۸۰ و تیمارهای تلقیح زیستی شامل استفاده منفرد پنج باکتری کارآمد شامل *Stenotrophomonas* sp. COD1-1، *Pseudochrobactrum* sp. COD 1-4، *Shewanella*، *Arthrobacter* sp. COD 2-3 و *Stenotrophomonas* sp. COD 5-6، در این آزمایش چند تیمار شاهد در نظر گرفته شد که شامل تیمار شاهد تلقیح میکروبی (تیمار نوترینت برات)، تیمار شاهد زیست‌پالایی (زیست‌پالایی ذاتی یا همان خاک شاهد آلوده نفتی) و یک تیمار خاک غیرآلوده بودند. پس از پایان آزمایش، مقدار کل هیدروکربن‌های نفتی (TPH)، فعالیت آنزیم‌های دهیدروژناز، اوره‌آز، فسفاتاز، کاتالاز و تنفس میکروبی خاک شامل تنفس پایه و تنفس برانگیخته سنجش شدند. نتایج نشان داد که بیشترین میزان تجزیه هیدروکربن‌های نفتی را در خاک در تیمارهای سورفکتانت توئین ۸۰، کود گاوی، نوترینت برات فاقد باکتری و کودهای NPK به ترتیب با مقادیر ۸۹/۲، ۸۶/۳، ۷۵/۶ و ۶۷/۴ درصد مشاهده شد. بین درصد تجزیه TPH و تنفس پایه و فعالیت آنزیم دهیدروژناز همبستگی‌های مثبت و معنادار وجود داشت. نهایتاً با توجه به تجزیه و تحلیل پایش‌های انجام یافته، تیمارهای توئین ۸۰، کود گاوی، نوترینت برات و تیمار باکتریایی COD 2-3 از بهترین روش‌های زیست‌پالایی برای حذف آلودگی‌های نفتی در خاک معرفی شدند.

واژه‌های کلیدی: تحریک زیستی، تلقیح زیستی، زیست‌پالایی، هیدروکربن‌های نفتی کل

استناد به این مقاله: ساریخانی، م.ر.، افشارنیا، م.، زارعی، م. و لطف‌اللهی، ع. (۱۴۰۴). مقایسه کارایی روش‌های مختلف زیست‌پالایی در کاهش هیدروکربن‌های نفتی یک خاک آلوده (مطالعه موردی: حوضچه‌های تبخیر پالایشگاه تبریز). نشریه دانش خاک و گیاه، ۳۵(۲)، ۲۳-۴۱.

مقدمه

امروزه به دلیل استفاده زیاد از ترکیبات نفتی در سراسر جهان، آلودگی ناشی از این ترکیبات در سطح جهانی بسیار گسترده است. هیدروکربن‌های نفتی یکی از متداول‌ترین آلاینده‌های آلی پایدار محیط‌زیست هستند. این ترکیبات اثرهای سوئی بر محصولات کشاورزی، آب‌های سطحی، آب‌های زیرزمینی و کیفیت خاک دارند. بنابراین، ورود آن‌ها به زنجیره غذایی از طریق آب، هوا و خاک آلوده به شدت سلامت انسان را تهدید می‌کند و باید پسماندهای حاصل از فعالیت‌های مربوط به صنعت نفت، قبل از دفع به محیط، مورد تصفیه قرار گیرند (Hu & Zeng, 2013).

روش‌های متنوعی برای پاکسازی خاک‌های آلوده وجود دارند که انتخاب و استفاده از یک روش به عوامل متعددی از جمله قوانین سختگیرانه موجود، هزینه، نوع آلودگی، غلظت آلاینده و غیره بستگی دارد. به طور کلی، روش‌های پاکسازی خاک‌های آلوده به سه روش فیزیکی، شیمیایی و زیستی (مانند زیست‌پالایی و گیاه‌پالایی) تقسیم می‌شوند که گاه ممکن است ترکیبی از این روش‌ها بکار گرفته شود. زیست‌پالایی (کنترل، کاهش یا حذف آلودگی از محیط‌زیست با استفاده از افزایش فعالیت‌های بیولوژیکی محیط)، روشی مفید و مؤثر در اصلاح این مشکل است. در این روش ریزجانداران از مواد هیدروکربنی به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده کرده و آن‌ها را به مواد حدواسط دیگر و در نهایت به آب و کربن دی‌اکسید تبدیل می‌نمایند و حاصل این فرایند، کاهش هیدروکربن‌های نفتی کل موجود در خاک می‌باشد (Agamuthu et al., 2013; Yu et al., 2011).

زیست‌پالایی روش‌های مختلفی دارد: ۱) زیست‌پالایی ذاتی^۱، فرایند طبیعی تجزیه زیستی است که با تکیه بر ریزجانداران بومی خاک^۲ حذف آلودگی انجام می‌شود و هیچ مداخله‌ای صورت نمی‌گیرد (Mortazavi et al., 2013). ۲) تحریک زیستی^۳، در این فرایند از طریق بهبود شرایط حاصلخیزی خاک با افزودن کودهای شیمیایی و مواد آلی، افزودن سورفاکتانت‌ها و نیز هوادهی و آبدهی باعث افزایش جمعیت ریزجانداران بومی خاک شده و به دنبال آن سرعت تجزیه آلاینده‌ها افزایش می‌یابد (Minai-Tehrani et al., 2006). ۳) تلقیح زیستی^۴، در این روش از ریزجاندارانی که توانایی زیاد در تجزیه مواد نفتی دارند و زادمایه‌های میکروبی تهیه شده و به صورت منفرد یا مخلوط (کنسرسیون) به خاک آلوده افزوده می‌شود (Wu et al., 2013). ۴) گیاه‌پالایی، گیاه‌پالایی روشی است که در آن از گیاه برای کاهش میزان تحرک و سمیت آلاینده در خاک، آب زیرزمینی و یا دیگر محیط‌های آلوده استفاده می‌شود (Etim, 2012). ۵) روش‌های تلفیقی شامل تحریک و تلقیح زیستی و گیاه‌پالایی می‌باشند که بسته به شرایط خاک آلوده هر یک از روش‌های ذکر شده می‌توانند به صورت تلفیقی مورد استفاده قرار گیرند.

ورود نفت به خاک به علت وارد کردن مقادیر عظیم کربن آلی به خاک باعث بالا رفتن نسبت C/N می‌شود که برای رشد و فعالیت ریزجانداران نامناسب می‌باشد. با تأمین مواد غذایی معدنی از جمله نیتروژن و سایر عناصر با استفاده از کوددهی شیمیایی می‌توان این نسبت را تعدیل کرد و با افزایش جمعیت و میزان فعالیت‌های باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت موجب افزایش تجزیه هیدروکربن‌های نفتی در مدت زمان کوتاهی شد (Lee et al., 2007). اثر کوددهی حیوانی و استفاده از کمپوست و هوادهی فعال نیز در افزایش تحریک زیستی ریزجانداران نفت‌خوار خاک به اثبات رسیده است (Chen et al., 2015). محققان در استفاده از کمپوست برای زیست‌پالایی خاک معمولاً کمپوست حاصل از لجن فاضلاب و یا زباله شهری و یا ضایعات کشاورزی و صنعتی را به صورت ترکیب با مایه تلقیح باکتریایی و یا با افزودن سورفاکتانت به آن بکار می‌برند (Pedra et al., 2007).

¹ Intrinsic Bioremediation

² Endogenous

³ Biostimulation

⁴ Bioaugmentation

آفرت و همکاران (Auffret et al., 2014) در مطالعه‌ای پس از جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت از خاک و فاضلاب و استفاده از مخلوط ۱۳ گونه باکتریایی مؤثر در تجزیه آلاینده‌های نفتی در خاک، مشاهده کردند که با تلقیح این کنسرسیون باکتریایی به خاک، پس از ۱۱۳ روز، آن‌ها توانستند از ۱۶ نوع ترکیب نفتی موجود در خاک ۱۳ نوع از آن را به‌طور کامل و ۲ نوع را به‌طور نسبی از خاک حذف کنند و فقط ترت- بوتیل الکل^۵ به‌وسیله باکتری‌ها قابل تجزیه نبود. مینو تیاقی و همکارانش (Tyagi et al., 2011) نشان دادند که ۱۳ روز پس از تلقیح باکتری و کاربرد کود آمونیوم نیترات، آلودگی خاک به گازوئیل به میزان ۹۰ درصد کاهش یافت. این نتیجه با مقایسه سطح زیرمنحنی پیک‌های کروماتوگرافی گازی (GC) به دست آمد که نشان‌دهنده مصرف گازوئیل به‌وسیله جمعیت باکتری و افزایش فعالیت میکروبی در خاک آلوده بر اثر تلقیح باکتری به خاک و کاربرد کود بود.

روش‌های متفاوتی برای پایش وضعیت آلودگی و بررسی سلامت خاک وجود دارد که از جمله آن‌ها می‌توان توجه به پارامترهای زیستی (نظیر تنفس پایه و برانگیخته، جمعیت میکروبی و زیست‌توده آن) و فعالیت‌های آنزیمی اشاره کرد. بعد از بکارگیری انواع تیمارهای زیست‌پالایی، نیز می‌توان از همین موارد برای بررسی موفقیت روش‌های زیست‌پالایی بهره جست. آنزیم‌ها در خاک به عنوان یکی از ابزارهای قابل‌اعتماد، آسان و حساس به کیفیت و سلامت خاک، برای تشخیص و اندازه‌گیری مقدار و غلظت آلاینده‌ها قبل از آزمایش، در طول آن و بعد از فرایند پالایش خاک می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند (Rao et al., 2014; Soldatkin et al., 2012). تاوامانی و همکاران (Thavamani et al., 2012) دریافتند که در خاک آلوده به ترکیبات PAH^۶ و فلزات سنگین، کاهش در جمعیت، تنوع میکروبی و فعالیت متابولیکی اتفاق افتاد و فعالیت‌های آنزیمی نیز به‌شدت مهار شدند.

در این پژوهش سعی بر آن شد که برای کاهش هیدروکربن‌های نفتی در خاک‌های آلوده واحد بازیافت پالایشگاه تبریز با انجام انواع مختلف روش‌های زیست‌پالایی و مقایسه آن‌ها، بهترین و کاراترین روش به‌طور کاربردی برای رفع آلودگی این خاک‌ها معرفی گردد. برای این کار، بعد از جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های نفتی از خاک منطقه و انتخاب کارآمدترین جدایه‌های باکتریایی پس از ارزیابی کمی و کیفی آزمایشگاهی، از این باکتری‌ها به همراه سایر تیمارها در آلودگی زایی ترکیبات نفتی بهره برده شد. تیمارهای زیست‌پالایی اجرا شده در قالب دو روش کلی تحریک زیستی و تلقیح زیستی و مقایسه آن‌ها با زیست‌پالایی ذاتی بود که هر روش خود از چندین زیرتیمار تشکیل می‌شد. به عنوان نمونه در روش تحریک زیستی، تیمار هوادهی، افزودن کود دامی (به صورت کود گاوی و کود مرغی در دو تیمار مجزا)، افزودن کمپوست، تأمین NPK بر اساس آزمون خاک، کاربرد توئین ۸۰ به عنوان سورفکتانت و در روش تلقیح زیستی، باکتری‌های تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی به‌صورت منفرد و تلفیق شده با هم به‌صورت کنسرسیون باکتریایی در قالب چندین تیمار مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج پیاده‌سازی روش‌های مختلف زیست‌پالایی از طریق پایش شاخص‌های آنزیمی و زیستی (نظیر فعالیت‌های آنزیمی و تنفس خاک) و شاخص‌های غیرزیستی (سنجش غلظت اولیه و نهایی TPH) و مقایسه آن‌ها این امکان را فراهم می‌سازد تا بهترین و مناسب‌ترین روش برای حذف آلودگی‌های نفتی در خاک آلوده معرفی گردد.

مواد و روش‌ها

۱- نمونه‌برداری از خاک‌های آلوده به مواد نفتی

محل نمونه‌برداری خاک و رسوبات آلوده به نفت از حوضچه‌های تبخیر حاصل از بازیافت تصفیه نفت پالایشگاه تبریز بود. به جز انباشته کردن رسوبات در این حوضچه‌ها که با گذشت زمان هیدروکربن‌های سبک و فرار تبخیر شده و

⁵ Tert-butyl alcohol

⁶ Polycyclic aromatic hydrocarbons

هیدروکربن‌های سنگین در آن‌ها تجمع یافته بودند، هیچ تیماری روی آن‌ها برای رفع آلودگی صورت نگرفته بود. از بخش‌های مختلف این حوضچه به مقدار لازم نمونه برای انجام آزمایش و اعمال تیمارهای مختلف زیست‌پالایی، نمونه‌برداری شد. نمونه‌های موجود با توجه به ریخت و حجم آلودگی، ساختاری لجن‌مانند داشتند. سپس نمونه‌های برداشت شده که حجم بالایی از آلودگی و رطوبت داشتند، برای یکنواخت‌سازی، ابتدا پهن شده، و پس از خشک شدن نسبی، کوبیده شدند و از الک ۴/۷ میلی‌متری عبور داده شدند. به دلیل غلظت بالای آلودگی و اطمینان بخشی از موفقیت تیمارهای زیست‌پالایی در حذف ترکیبات نفتی، خاک آلوده نفتی با خاک غیرآلوده پالایشگاه به ترتیب با نسبت ۶۰ به ۴۰ با هم آمیخته شدند. به دلیل مقدار بالای آلودگی نفتی، برای رقیق‌سازی خاک آلوده نفتی از همین خاک‌های غیرآلوده پالایشگاه برای اختلاط خاک‌ها استفاده شد. همچنین برای اینکه بتوان نتایج تغییرات شاخص‌های بیولوژیکی و آنزیمی به دست آمده از اعمال تیمارهای زیستی را در حضور یک خاک فاقد مشکل آلودگی بررسی نمود و مقایسه‌ای انجام داد، از خاک‌های غیرآلوده اطراف حوضچه نیز چندین نمونه خاک از عمق ۲۰-۰ سانتی‌متری (خاک شاهد غیرآلوده) برداشته شد.

۲- تهیه و آماده‌سازی گونه‌های میکروبی مورد استفاده در آزمایش

در این آزمایش پنج سویه باکتریایی (*Pseudochrobactrum* sp. COD 1-4، *Stenotrophomonas* sp. COD 1-1، *Shewanella* sp. COD 2-1، *Arthrobacter* sp. COD 2-3 و *Stenotrophomonas* sp. COD 5-6) جدا سازی شده از خاک‌های آلوده نفتی (Afsharnia et al., 2022) در پنج تیمار هر یک به صورت جداگانه و در یک تیمار به صورت کنسرسیوم (مخلوطی از پنج جدایه) برای تلقیح در تیمارهای تلقیح زیستی استفاده شد. این پنج جدایه در محیط NB کشت و تکثیر داده شد و به مقدار ۵ درصد (V/W) در هر گلدان استفاده شد. یک نمونه تیمار بدون تلقیح حاوی همین مقدار NB استریل به عنوان شاهد بکار رفت. مایه تلقیح‌های باکتریایی قبل از استفاده به حامل پرلیت: باگاس (۱:۱) وزنی/وزنی افزوده شد و مورد استفاده قرار گرفت. جزئیات روش تلقیح میکروبی در بخش ۳-۳ ارائه شده است.

۳- اعمال تیمارهای زیست‌پالایی

برای اجرای تیمارهای تحریک زیستی، تلقیح زیستی و زیست‌پالایی ذاتی (به عنوان تیمار شاهد) از گلدان‌های ۲ کیلوگرمی استفاده شد. مدت اجرای آزمایش چهار ماه بود. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار انجام شد. تیمار زیست‌پالایی ذاتی، به عنوان تیمار شاهد برای بررسی کارایی دو روش نخست یعنی تحریک زیستی و تلقیح زیستی لحاظ شد. تیمارهای زیست‌پالایی با روش‌های زیر اعمال شدند:

۳-۱- روش زیست‌پالایی ذاتی (تیمار شاهد خاک آلوده): یک خاک آلوده بدون هیچ‌گونه تیمار زیست‌پالایی خاص بود که در واقع به عنوان تیمار شاهد برای کنترل و مقایسه زیست‌پالایی سایر تیمارها مورد استفاده قرار گرفت. قابل ذکر است که در این تیمار هیچ‌گونه هوادهی، تأمین رطوبت یا کار دیگری صورت نپذیرفت.

۳-۲- روش تحریک زیستی که تیمارهای زیر برای آن لحاظ شد:

الف) هوادهی خاک آلوده: دو بار در هفته خاک این گلدان‌ها به هم زده شد. فقط صرفاً هوادهی بدون تأمین رطوبت، تا فقط اثر همزدن در رفع آلودگی نفتی مشخص شود (Doustaki et al., 2013).

ب) آب‌دهی خاک آلوده: رطوبت خاک آلوده بر روی ۷۰ درصد ظرفیت نگهداری آب خاک تنظیم شد. تنظیم رطوبت هر سه روز یکبار انجام می‌گرفت. فقط صرفاً تأمین رطوبت، بدون همزدن تا فقط اثر آب‌دهی در رفع آلودگی نفتی مشخص شود.

ج) افزودن عناصر NPK به خاک آلوده: با در نظر گرفتن نسبت C: N: P، ۱: ۵: ۲۰ که به عنوان یک نسبت بهینه در اکثر آزمایش‌های تجزیه زیستی نفت معرفی شده است و با توجه به اینکه غلظت کربن، نیتروژن و فسفر اولیه در خاک

به ترتیب (۱۱/۹ درصد، ۱ درصد و ۸۴/۸ mg/kg) بود، فسفر و نیتروژن به خاک افزوده شد (Doustaki et al., 2013). علاوه بر آن تأمین رطوبت و هوادهی نیز مطابق دو تیمار الف و ب انجام می گرفت.

د) افزودن کود دامی به خاک آلوده: برای این منظور کود مرغی و کود گاوی به صورت جداگانه به نسبت ۵ درصد وزنی استفاده شدند (Agamuthu et al., 2013). دو تیمار مجزا در این بخش استفاده شد. علاوه بر آن تأمین رطوبت و هوادهی نیز مطابق تیمار الف و ب انجام می گرفت.

ه) افزودن کود کمپوست به خاک آلوده: از این کود نیز به مقدار ۵ درصد وزنی استفاده شد (Bastida et al., 2015). همچنین تأمین رطوبت و هوادهی نیز مطابق دو تیمار الف و ب انجام می گرفت.

ی) افزودن سورفکتانت به خاک آلوده: برای این منظور از توئین ۸۰ به میزان (۱ درصد، V/W) استفاده شد (Sun et al., 2012). همچنین تأمین رطوبت و هوادهی نیز مطابق دو تیمار الف و ب انجام می گرفت.

۳-۳- روش تلقیح میکروبی: پنج سویه باکتریایی برای تلقیح زیستی استفاده شدند، این باکتری ها از خاک های آلوده به هیدروکربن های نفتی جداسازی شده بودند. این پنج باکتری کارآمد به صورت تیمارهای منفرد از هر باکتری و مخلوطی از باکتری ها به نسبت مساوی با (OD=1، جمعیتی معادل با 1×10^9 CFU/ml) به خاک افزوده شد. برای این کار، باکتری ها در محیط کشت NB کشت داده سپس در هر کیلوگرم خاک به میزان ۵ درصد (V/W) افزوده شد. برای این منظور با توجه به وزن گلدان، مقدار ۱۰۰ میلی لیتر سوسپانسیون باکتریایی ابتدا بر روی ۶۰ گرم حامل پرلیت: باگاس (۱:۱) استریل افزوده و به خاک با ۷۰ درصد ظرفیت نگهداری مرطوب اضافه شد و کاملاً مخلوط گردید تا باکتری ها در خاک به صورت یکنواخت پخش شوند. برای اینکه بتوان اثر محیط کشت NB در تکثیر باکتری را نیز در این نوع زیست پالایی از اثر باکتری متمایز نمود، یک تیمار (شاهد بدون باکتری) صرفاً با افزودن همان مقدار محیط کشت NB با حامل پرلیت و باگاس استریل در نظر گرفته شد که به خاک آلوده افزوده شد. این تیمار به عنوان تیمار نوترینت برات (تیمار NB) نامگذاری شد (Mao et al., 2012). شایان ذکر است که تأمین رطوبت و هوادهی نیز مطابق تیمار الف و ب در تمام تیمارهای این بخش انجام می گرفت.

۴- اندازه گیری TPH قبل و بعد از تیمار زیست پالایی

تعیین غلظت هیدروکربن های نفتی کل قبل و بعد از تیمار زیست پالایی بر اساس روش UNEP/IOC/IAEA سازمان محیط زیست آمریکا انجام شد (Anonymus, 1998). در این روش برای تعیین غلظت کل هیدروکربن های نفتی خاک، ابتدا ۱۰ گرم از نمونه خاک خشک در عصاره گیر سوکسله با ۱۵۰ میلی لیتر از دی کلرومتان به مدت ۲۴ ساعت مورد استخراج قرار گرفت. سپس عصاره نفتی استخراج شده به داخل فالكون منتقل شد و ۲۴ ساعت در آون در ۶۰ درجه سلسیوس گذاشته شد تا دی کلرومتان تبخیر شود. هیدروکربن های نفتی باقیمانده در ته فالكون وزن شدند. برای محاسبه درصد تجزیه زیستی TPH از رابطه ۱ استفاده شد:

$$B (\%) = (W1 - WC) / WC \times 100 \quad (1)$$

B درصد تجزیه زیستی TPH، W1 وزن نفت باقیمانده در تیمار شاهد و WC وزن نفت باقیمانده در تیمارها می باشد.

۵- اندازه گیری فعالیت زیستی خاک

فعالیت زیستی خاک شامل فعالیت آنزیمی و تنفس میکروبی در نمونه خاک های تیمار شده در ابتدا و انتهای آزمایش اندازه گیری شد.

۵-۱- فعالیت آنزیم دهیدروژناز

۱۰ گرم خاک هوا خشک را از غربال ۲ میلی‌متری عبور داده، خاک به دو قسمت ۵ گرمی تقسیم شد و هر یک در یک لوله آزمایش ریخته شد (یک لوله شاهد و دیگری نمونه)، در لوله نمونه بر روی ۵ گرم خاک مقدار ۱ میلی‌لیتر سوبسترای $\text{TTC}^{7/2}$ (۰/۲ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر) و ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد، درپوش لوله قرار داده و ورتکس شد. در لوله شاهد بر روی ۵ گرم خاک ۳/۵ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته و همانند لوله نمونه عمل شد. لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. به هر لوله ۱۰ میلی‌لیتر متانول افزوده و ۱ دقیقه ورتکس شد. سپس با کاغذ صافی صاف شدند. مجدداً به هر لوله ۱۰ میلی‌لیتر متانول افزوده، ورتکس و صاف شد. در نتیجه وجود فعالیت آنزیم دهیدروژناز، سوبسترای مورد استفاده تغییر رنگ یافته و رنگ قرمز یا صورتی تشکیل خواهد داد، سپس مقدار جذب عصاره‌ها در طول موج ۴۸۵ نانومتر قرائت شد. در این روش غلظت تری‌فنیل‌فورمازان (TPF^{A}) تولید شده طی فرایند آنزیمی به صورت مقایسه‌ای و نسبی بوده و برحسب میزان جذب طول موج (شدت رنگ قرمز) گزارش شده است (Aliasgharzad, 2005).

۵-۲- فعالیت آنزیم اوره‌آز

اندازه‌گیری فعالیت اوره‌آزی نمونه خاک‌ها به روش ایندوفنل‌بلو انجام گرفت (Aliasgharzad, 2005; Rump & Krist, 1988). به این ترتیب که بعد از تهیه بافر هیپوکلریت و معرف‌های فنل-نیتروپروپوساید و EDTA و سوبسترای مناسب (اوره) برای اندازه‌گیری فعالیت اوره‌آز، از روش پایش تولید آمونیم استفاده شد. یک نمونه شاهد نیز در هر سنجش به منظور کسر اثرهای زمینه‌ای (NH_4^+) در نظر گرفته شد. در این روش پس از استخراج آمونیم خاک به وسیله KCl، میزان آمونیم آزاد شده بعد از ۲ ساعت انکوباسیون در حضور سوبسترای اوره و بافر مناسب تعیین شد. بدین ترتیب که پس از استخراج آمونیم خاک به وسیله KCl، ۱ میلی‌لیتر از عصاره به داخل بالن ۲۵ میلی‌لیتری ریخته شد و به آن ۱ میلی‌لیتر محلول EDTA افزوده شد، پس از مخلوط کردن ۱ دقیقه ثابت ماند و سپس ۲ میلی‌لیتر معرف فنل-نیتروپروپوساید به همراه ۴ میلی‌لیتر بافر هیپوکلریت بدان افزوده و با آب مقطر به حجم رسانده شد. بالن‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سلسیوس در انکوباتور نگهداری شدند. در این واکنش شاهد تشکیل رنگ آبی بوده و سپس میزان جذب آن با اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۳۶ nm قرائت شد.

۵-۳- فعالیت آنزیم کاتالاز

دو گرم نمونه خاک خشک شده به داخل ارلن مایر ۱۲۵ میلی‌لیتری ریخته، سپس ۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۳ درصد پراکسید هیدروژن اضافه شده و مخلوط در شیکر دورانی به مدت ۲۰ دقیقه بهم زده شد. سپس ۵ میلی‌لیتر H_2SO_4 ۱/۵ مولار بدان افزوده شد. محتوای ارلن از کاغذ صافی عبور داده شده و سپس ۲۵ میلی‌لیتر از آن با KMnO_4 ۰/۰۲ M تیتر شد، که مقدار KMnO_4 واکنش داده (مصرفی) به ازای هر گرم از خاک خشک محاسبه شد (Johnson & Temple, 1964).

۴-۳- فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی و قلیایی

فعالیت فسفاتاز اسیدی و قلیایی با استفاده از روش توصیف شده به وسیله (Tabatabai, 1994) تعیین شد. ابتدا از هر نمونه خاک ۱ گرم در لوله‌های آزمایش توزین شده، ۴ میلی‌لیتر بافر اصلاح‌شده (MUB) معرف (اسیدی یا بازی) و ۱ میلی‌لیتر سوبسترای پارانیتروفنیل فسفات (pNPP) (در بافر اسیدی یا بازی) به آن اضافه شد. بافر مورد استفاده برای فسفاتاز اسیدی و قلیایی به ترتیب دارای pH ۶/۵ و ۱۱ بود. پس از اختلاط نمونه، برای تأمین دمای بهینه فعالیت آنزیم،

⁷ Tetrazolium chloride

⁸ Tri phenyl formazan

لوله‌ها را در آون با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرارداده و به مدت یک ساعت در این شرایط نگهداری شدند. سپس با افزودن محلول‌های متوقف‌کننده (۱ میلی‌لیتر کلرید کلسیم ۰/۵ مولار و ۴ میلی‌لیتر سدیم هیدروکسید ۰/۵ مولار) واکنش متوقف شد و قبل از قرائت میزان جذب، نمونه‌ها با استفاده از کاغذ صافی فیلتر شدند. برای اندازه‌گیری مقدار PNP آزاد شده، جذب آن در طول موج ۴۱۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر قرائت شد. برای گزارش فعالیت آنزیم خاک به صورت میکروگرم PNP در هر گرم خاک در هر ساعت، منحنی استاندارد PNP با تهیه استانداردهای ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم ترسیم شد.

۴-۵- تنفس پایه و برانگیخته

تنفس پایه خاک به روش اندرسون (Anderson, 1998) اندازه‌گیری شد، برای این منظور ۱۰ گرم خاک مرطوب در شیشه‌های درب‌دار با ۲۰ میلی‌لیتر سود ۰/۱ مولار به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شده و سپس با اسید کلریدریک ۰/۱ مولار با افزودن چند قطره کلرید باریم ۲۰ درصد و فل فتالئین تیترا شد. تنفس ناشی از سوبسترا (SIR)، پس از افزودن ۴۰ میلی‌گرم گلوکز (۰/۴ درصد) به ۱۰ گرم خاک مرطوب همانند روش فوق اندازه‌گیری شد، با این تفاوت که CO₂ متصاعد شده پس از گذشت ۶ ساعت به روش تیتراسیون اندازه‌گیری شد.

۶- تحلیل آماری داده‌ها

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

نتایج و بحث

درصد تجزیه TPH در ابتدا و انتهای آزمایش

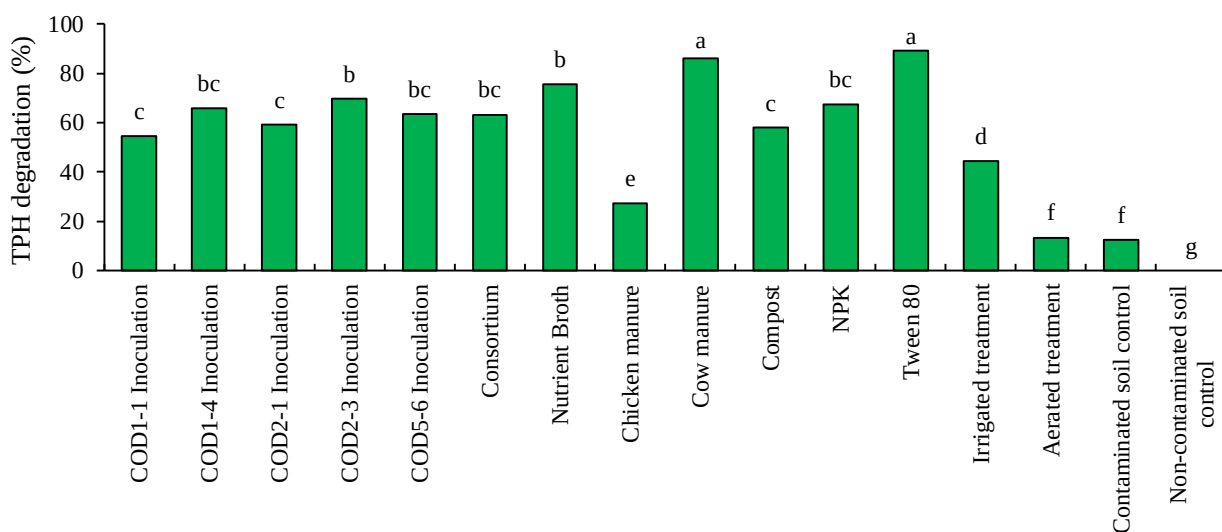
در تیمارهای زیست‌پالایی بعد از گذشت ۴ ماه مقدار کل هیدروکربن‌های نفتی^۹ پس از اعمال تیمارها اندازه‌گیری شدند. پس از گذشت ۴ ماه تفاوت معنادار بین همه تیمارها با تیمار شاهد آلوده در شروع آزمایش مشاهده شد. در میان تیمارهای تحریک زیستی به ترتیب تیمارهای سورفاکتانت توئین ۸۰، کود گاوی، نوترینت برات فاقد باکتری، کود NPK کمترین مقدار TPH باقیمانده در خاک را داشتند به بیان دیگر بیشترین میزان تجزیه هیدروکربن‌های نفتی در خاک به ترتیب با مقادیر ۸۹/۲، ۸۶/۳۳، ۷۵/۵۷ و ۶۷/۴۲ درصد به این تیمارها اختصاص داشت (شکل ۱). در میان تیمارهای تلقیح زیستی، تلقیح با باکتری COD 2-3 *Arthrobacter* sp. با ۶۹/۷۶ درصد تجزیه، بیشترین مقدار تجزیه TPH را به خود اختصاص داد، هرچند با جدایه‌های COD 1-4 و COD 5-6 در یک گروه آماری قرار گرفتند و با هم تفاوت معنادار نداشتند. لازم به توضیح است که بین درصد تجزیه TPH و تنفس پایه و برانگیخته رابطه همبستگی مثبت معنادار به ترتیب در سطح احتمال ۰/۰۵ و ۰/۰۱ وجود داشت.

افزودن کودهای حیوانی (کود گاوی) به دلیل بهبود ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک از جمله بهبود ساختمان خاک، تسهیل ترابری اکسیژن، فراهم کردن انرژی برای ریزجانداران بسیار مؤثر می‌باشد. علاوه بر آن فلور میکروبی موجود در آن نیز می‌تواند به تشدید فعالیت میکروبی منجر شده و به نظر در تجزیه مواد هیدروکربنی مؤثر واقع شده است. استفاد از کود حیوانی ضمن ایجاد پوکی و بهبود تهویه خاک و کمک به عدم چسبندگی ذرات خاک (گلوله‌ای شدن در حالت مرطوب) ضمن تأمین منبع کربن و انرژی دیگر (کومتابولیسم) به تجزیه بیشتر ترکیبات نفتی به وسیله

⁹ Total petroleum hydrocarbons

ریزجانداران بومی خاک کمک می‌کند (Doustaki et al., 2013; Thapa et al., 2012). بنا به دلیل آب‌گریزی و جذب سطحی بالای هیدروکربن‌های نفتی در فاز جامد خاک، دسترسی آن‌ها برای تجزیه میکروبی کاهش می‌یابد و این پدیده موجب ماندگاری هیدروکربن‌ها در خاک می‌شود (Sun et al., 2012). در تیمار NB بدون باکتری، افزوده شدن مواد غذایی به همراه مواد حامل (باگاس و پرلیت) هم به بهبود تهویه و هم تأمین منبع کربن برای رشد باکتری‌های بومی خاک کمک نموده است و مشاهده می‌شود که از نظر رتبه تجزیه مواد هیدروکربنی در رتبه سوم قرار دارد.

به دلیل ماهیت آب‌گریز بودن مواد نفتی، یکی از چالش‌های پیش‌رو برای حذف آن‌ها به وسیله جامعه میکروبی افزایش فراهمی و دسترسی آن‌ها است. یکی از روش‌های افزایش دسترسی جامعه میکروبی به مواد نفتی برای تجزیه آن‌ها، افزودن سورفاکتانت‌هاست. سورفاکتانت‌ها ممکن است از نوع شیمیایی یا زیستی باشند و منجر به افزایش ظرفیت حلالیت هیدروکربنی و دسترسی زیستی آن‌ها برای میکروب‌ها می‌شوند (Li & Hungchen, 2009). در برخی موارد سورفاکتانت‌های شیمیایی ممکن است اثر منفی بر جمعیت میکروبی داشته باشند اما در مقادیر و غلظت‌های توصیه شده می‌توانند اثر مثبت بر زیست‌پالایی ایفا کنند. علاوه بر آن برخی از گونه‌های میکروبی قادر به تولید بیوسورفاکتانت می‌باشند و نقش مؤثری در افزایش فراهمی هیدروکربن‌های نفتی و تجزیه آن دارند (Ganesh & Lin, 2009; Li & Hungchen, 2009). آزمایش حاضر نشان داد که افزودن توپین ۸۰ به میزان یک درصد توانسته است به دلیل ویژگی مهم و تأثیرگذار بر حذف زیستی هیدروکربن‌های نفتی مؤثر واقع شود.



شکل ۱- درصد تجزیه TPH در تیمارهای مختلف در ابتدا و انتهای آزمایش.

پژوهشگران در تحقیقی نشان دادند که زیست‌پالایی به روش ترکیبی از تحریک زیستی و تلقیح زیستی، بیشترین تأثیر را در حذف آلاینده‌های نفتی در خاک داشته است. نتایج این پژوهش بیانگر این بود که در صورت فعال بودن ریزجاندارانی بومی و با بهبود شرایط محیطی از جمله هوادهی، اضافه کردن مواد مغذی و رطوبت می‌تواند تجزیه هیدروکربن‌های نفتی را سرعت بخشد ولی اگر فعالیت ریزجاندارانی بومی کم باشد، مخلوط کردن موادی مثل خاک اره، کود حیوانی به همراه تلقیح ریزموجودات غیربومی از جمله باکتری‌های فعال نفت‌خوار روند کاهش آلاینده‌های نفتی، را افزایش خواهد داد (Doustaki et al., 2013).

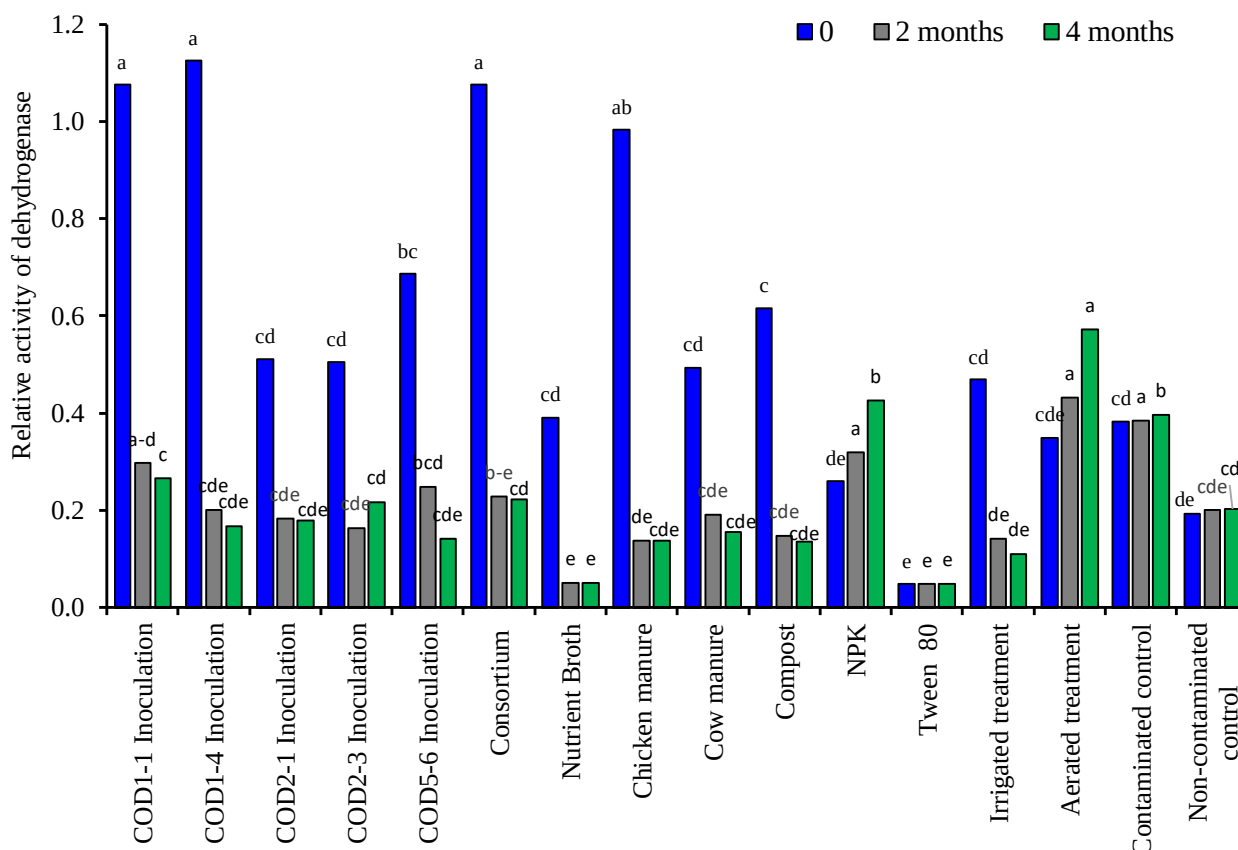
فعالیت آنزیم دهیدروژناز

همه تیمارهای زیست‌پالایی در لحظه شروع آزمایش دارای فعالیت آنزیم دهیدروژناز بالایی نسبت به تیمارهای شاهد آلوده نفتی و غیرآلوده نفتی بودند که نشانگر وجود جمعیت میکروبی بالا در تیمارهای زیست‌پالایی نسبت به تیمارهای شاهد بود و بین فعالیت این آنزیم و تنفس پایه در شروع آزمایش همبستگی مثبت معنادار در سطح احتمال ۱ درصد وجود داشت (شکل ۲). در میان انواع تیمارهای زیست‌پالایی در لحظه شروع آزمایش، تیمار *Pseudochrobactrum* sp. COD 1-4، *Stenotrophomonas* sp. COD 1-1، کنسرسیوم و تیمار کود مرغی به ترتیب دارای بیشترین و تیمار توئین ۸۰ دارای کمترین فعالیت آنزیمی در میان همه تیمارها بودند که این نتیجه به دلیل افزودن زادمایه باکتریایی در تیمارهای تلقیحی و تحریک فعالیت باکتری‌های بومی خاک در تیمارهای تحریک زیستی بوده است. کود مرغی افزوده شده به نظر به دلیل فلور میکروبی موجود در آن مقادیر بالایی از فعالیت دهیدروژنازی را نشان داده است اما با نگاهی به شکل ۱ و درصد تجزیه پائین ترکیبات نفتی در این تیمار، می‌توان اینگونه برداشت نمود که این جمعیت میکروبی حساس و ناکارآمد در تجزیه این مواد بوده‌اند. اما افزودن سورفاکتانت تیمار توئین ۸۰ و کاهش فعالیت باکتری‌های بومی خاک احتمالاً در نتیجه لیز شدن دیواره باکتریایی می‌تواند قابل توجه باشد، هرچند در مقدار توصیه شده کارایی مطلوبی برای حذف هیدروکربن‌های نفتی داشته است (شکل ۱).

برای اینکه بتوان به درستی در مورد این تیمار قضاوت نمود بایستی سایر صفات مورد مطالعه را نیز در نظر داشت. پائین بودن سایر فعالیت‌های آنزیمی و همچنین تنفس اندازه‌گیری شده حاکی از آن است که اعمال این تیمار باعث افت جمعیت میکروبی بومی شده اما کارایی آن بسیار بالا بوده است. بقیه تیمارهای زیست‌پالایی نیز در لحظه شروع آزمایش دارای فعالیت دهیدروژنازی نسبتاً بالایی بودند اما تمامی تیمارها با گذشت زمان در انتهای آزمایش با گذشت ۴ ماه، کاهش فعالیت چشمگیری داشتند، هر چه از ابتدای آزمایش سپری شده است پویایی جمعیت میکروبی کاهش یافته است و همین امر باعث کاهش فعالیت این آنزیم شده است. توصیه می‌شود برای این‌که تغییرات این آنزیم در طول زمان بهتر پایش می‌شد، بایستی دوره‌های نمونه‌برداری در فواصل زمانی نزدیک‌تر انتخاب می‌شدند تا روند تغییرات این آنزیم آشکارتر باشد (شکل ۲).

فعالیت آنزیم دهیدروژناز در مطالعات اکولوژیکی تجزیه زیستی واجد اهمیت است. آنزیم دهیدروژناز جزء آنزیم‌های اکسیدوردوکتاز می‌باشد که در زنجیره تنفسی سلول‌های میکروبی نقش ایفا می‌کند. این آنزیم یک شاخص مفید برای شدت کلی متابولیسم میکروبی است، زیرا آنزیم از نوع درون سلولی بوده و مربوط به سلول‌های زنده میکروبی می‌باشد که پس از مرگ سلولی سریعاً از بین می‌رود (Shen et al., 2016). شن و همکاران (Shen et al., 2016) فعالیت آنزیم دهیدروژناز را در خاک آلوده به نفت تلقیح شده با کنسرسیوم باکتریایی و خاک آلوده به نفت بدون تلقیح را در بازه‌های زمانی ۰، ۸، ۱۶، ۲۴، ۳۲ و ۴۰ روز سنجش کردند و دریافتند که در خاک آلوده به نفت تلقیح شده با کنسرسیوم میزان دهیدروژناز با گذشت زمان افزایش چشمگیری نسبت به دو خاک دیگر داشت ولی بعد از گذشت ۳۲ روز این فعالیت رو به کاهش بود. در آزمایش ما به نظر کاهش فعالیت دهیدروژناز در ماه چهارم به خاطر فاصله زمانی زیاد در نمونه‌برداری بوده است و برای مشاهده روند تغییرات این آنزیم بایستی فاصله زمانی کوتاه‌تری انتخاب می‌شد.

حسن شاهیان و زیدآبادی نژاد (Hasan shahiyan & Zeydabadinezhad, 2017) طی بررسی جمعیت میکروبی و فعالیت آنزیم دهیدروژناز در دو خاک مزرع‌ای و بیابانی آلوده به نفت در فرایند زیست‌پالایی عنوان کردند فعالیت این آنزیم در تیمارهای زیست‌پالایی در خاک مزرعه تا روز ۶۰ روند افزایشی ولی بعد از آن تا ۱۲۰ روز روند کاهشی داشته است و در خاک‌های بیابانی تا روز سی‌ام، الگوی افزایشی و پس از آن تا انتهای آزمایش، کاهش در فعالیت آنزیم دهیدروژناز مشاهده شد.



شکل ۲- میزان نسبی فعالیت آنزیم دهیدروژناز خاک در تیمارهای مختلف در ابتدا و انتهای آزمایش. اندازه‌گیری در سه زمان ۰، ۲ و ۴ ماه انجام شده است.

فعالیت آنزیم اوره‌آز

فعالیت آنزیم اوره‌آز در همه تیمارهای زیست‌پالایی و حتی تیمار شاهد آلوده در ابتدا و انتهای آزمایش در مقایسه با تیمار شاهد غیرآلوده بالاتر بود. افزایش آنزیم اوره‌آز در خاک شاهد آلوده نفتی در مقایسه با خاک شاهد غیرآلوده این استدلال را بوجود می‌آورد که حضور مواد نفتی دلیل بر افزایش فعالیت این آنزیم می‌باشد. با گذشت زمان فعالیت این آنزیم در نیم دوره (پس از گذشت ۲ ماه) و پایان دوره (پس از گذشت ۴ ماه) روند کاهشی داشت بجز تیمارهای شاهد آلوده و غیرآلوده خاک که در ابتدا و انتهای آزمایش تغییر معنادار را نشان ندادند. تیمارهای NPK و Tween 80 دارای بیشترین فعالیت آنزیمی بودند و با گذشت زمان تفاوت معنی داری در میزان فعالیت آن‌ها حاصل نشد. در بین تیمارهای زیست‌پالایی در ابتدای آزمایش بیشترین فعالیت آنزیم اوره‌آز را به‌ترتیب تیمارهای NPK، Tween 80 و نوترینت برات با تفاوت معنی داری نسبت به سایر تیمارها به خود اختصاص دادند. تیمارهای کمپوست شهری، تلقیح باکتری *Arthrobacter sp. COD 2-3* نیز کمترین مقدار فعالیت اوره‌آز را در ابتدای آزمایش داشتند. در انتهای آزمایش نیز فعالیت آنزیمی همه تیمارها کاهش چشمگیری یافته بود بجز تیمارهای NPK و Tween 80. پس از گذشت ۴ ماه تیمارهای نوترینت برات، آبدی و تلقیح باکتری *Arthrobacter sp. COD 2-3* به‌ترتیب کمترین فعالیت آنزیم اوره‌آزی را داشتند (جدول ۱).

فعالیت آنزیم اوره‌آز در مطالعات زیست‌پالایی مواد نفتی مورد توجه بوده و بدین خاطر در این تحقیق نیز بدان پرداخته شده است (Shen et al., 2016; Margesin et al., 2000). فعالیت اوره‌آزی در بین جامعه میکروبی خاک در برخی از گونه‌های میکروبی مشاهده می‌شود اما در این آزمایش در خصوص پنج جدایه مورد استفاده فعالیت اوره‌آزی

آن‌ها مورد آزمون قرار نگرفت. مارجسین و همکاران (Margesin et al., 2000) گزارش کردند که فعالیت آنزیم اوره‌آز که جزء آنزیم‌های برون سلولی می باشد بلافاصله پس از افزودن نفت به خاک افزایش یافت و پس از گذشت ۲۵-۱۱ روز به حداکثر خود رسید، آن‌ها اعلام کردند که تغییری در تیمارهای کودی زیست‌پالایی در طول دوره آزمایش با تیمار شاهد آلوده نفتی مشاهده نشد. بنابه گزارش شن و همکاران (Shen et al., 2016) در مقایسه سه خاک، خاک آلوده نفتی با تلقیح زیستی، خاک آلوده نفتی بدون تلقیح زیستی و خاک غیرآلوده با گذشت ۴۰ روز، فعالیت آنزیم اوره‌آز در تیمار تلقیح زیستی افزایش یافته بود ولی در تیمارهای شاهد آلوده و غیرآلوده در هفته اول کمی افزایش داشته و بعد به تدریج ثابت شد و سپس روند کاهشی داشته است. کاهشی بودن روند فعالیت آنزیم اوره‌آز دلیل بر رسیدن میکروبها به فاز ثابت بر اثر کمبود مواد غذایی در طول آزمایش می‌تواند باشد.

فعالیت آنزیم کاتالاز

در ابتدای آزمایش ۲-۳ روز پس از اعمال تیمارها، تیمارهای نوترینت براث، Tween 80 و کدسر سیوم افزایش بسیار چشمگیری نسبت به سایر تیمارها داشتند ولی با گذشت زمان در طول آزمایش میزان فعالیت این آنزیم روند کاهشی داشته است. در بقیه تیمارهای زیست‌پالایی و شاهد خاک آلوده بتدریج با گذشت زمان افزایشی بوده است که نشان از زنده بودن میکروبهای تجزیه‌کننده نفتی و فعالیت آن‌ها دارد (جدول ۱).

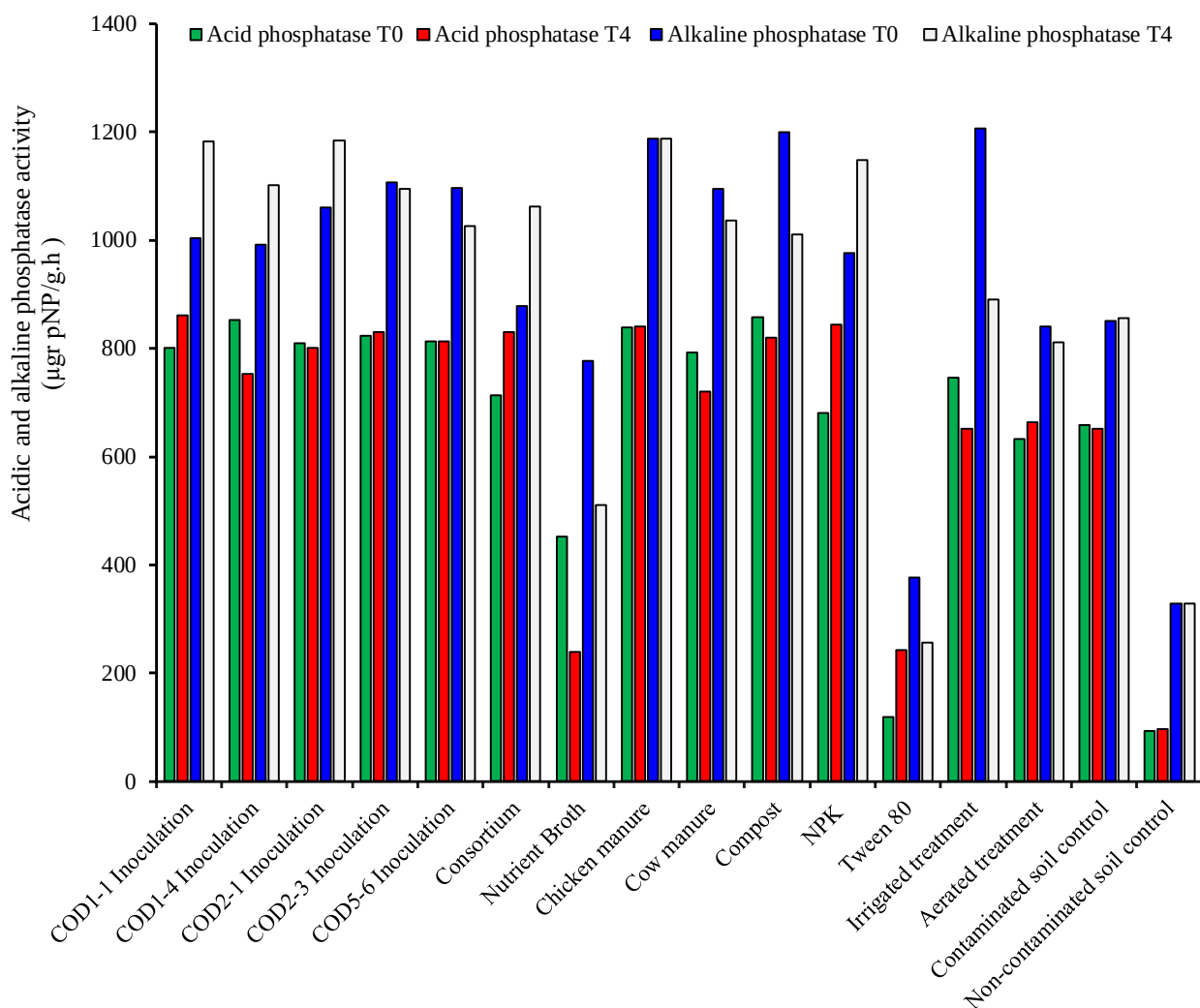
جدول ۱- فعالیت آنزیم‌های اوره‌آز و کاتالاز در تیمارهای مختلف در شروع آزمایش (T_0)، و با گذشت دو ماه (T_2) و چهار ماهه (T_4).

تیمارها (Treatments)	فعالیت آنزیم اوره‌آز (Urease enzyme activity) ($\mu\text{gNH}_4\text{-N g}^{-1} \text{ 2h}^{-1}$)			فعالیت آنزیم کاتالاز (Catalase enzyme activity) (ml 0.2 N KMnO_4 20 min^{-1})		
	T_0	T_2	T_4	T_0	T_2	T_4
COD 1-1 Inoculation	238.31 $\pm$ 3.92	160.76 $\pm$ 10.01	125.47 $\pm$ 6.75	0.75 $\pm$ 0.05	0.85 $\pm$ 0.05	0.95 $\pm$ 0.15
COD 1-4 Inoculation	233.14 $\pm$ 3.55	174.73 $\pm$ 5.99	161.75 $\pm$ 7.41	0.45 $\pm$ 0.05	0.75 $\pm$ 0.05	0.80 $\pm$ 0.00
COD 2-1 Inoculation	228.00 $\pm$ 2.82	222.83 $\pm$ 3.85	146.00 $\pm$ 8.34	0.35 $\pm$ 0.15	0.50 $\pm$ 0.1	1.10 $\pm$ 0.20
COD 2-3 Inoculation	149.60 $\pm$ 8.74	105.66 $\pm$ 0.00	83.60 $\pm$ 6.31	0.40 $\pm$ 0.1	0.80 $\pm$ 0.00	1.05 $\pm$ 0.05
COD 5-6 Inoculation	189.11 $\pm$ 5.54	155.49 $\pm$ 0.00	146.78 $\pm$ 9.12	0.30 $\pm$ 0.1	0.40 $\pm$ 0.10	0.40 $\pm$ 0.20
Consortium	259.21 $\pm$ 9.79	165.25 $\pm$ 5.46	96.68 $\pm$ 8.03	2.50 $\pm$ 0.2	0.95 $\pm$ 0.05	0.70 $\pm$ 0.00
Nutrient Broth	403.84 $\pm$ 1.76	378.28 $\pm$ 7.58	31.31 $\pm$ 14.86	3.20 $\pm$ 0.3	1.95 $\pm$ 0.15 ^a	1.50 $\pm$ 0.10
Chicken manure	271.06 $\pm$ 2.05	89.28 $\pm$ 6.37	93.98 $\pm$ 4.74	0.55 $\pm$ 0.05	0.40 $\pm$ 0.00	0.25 $\pm$ 0.05
Cow manure	237.78 $\pm$ 8.91	95.115 $\pm$ 5.54	64.05 $\pm$ 10.85	0.45 $\pm$ 0.05	0.65 $\pm$ 0.05	1.20 $\pm$ 0.10
Compost	145.19 $\pm$ 8.38	114.95 $\pm$ 9.30	138.4 $\pm$ 0.88	0.45 $\pm$ 0.05	1.25 $\pm$ 0.05	1.65 $\pm$ 0.15 ^a
NPK	411.09 $\pm$ 0.26 ^a	407.25 $\pm$ 0.36 ^a	405.34 $\pm$ 0.89 ^a	0.45 $\pm$ 0.05	0.45 $\pm$ 0.05	0.50 $\pm$ 0.00
Tween 80	404.37 $\pm$ 0.15	399.52 $\pm$ 0.96	390.69 $\pm$ 4.41	3.65 $\pm$ 0.35 ^a	1.45 $\pm$ 0.05	1.00 $\pm$ 0.10
Irrigated treatment	281.70 $\pm$ 13.07	91.06 $\pm$ 6.49	63.31 $\pm$ 7.35	0.35 $\pm$ 0.05	0.75 $\pm$ 0.05	1.35 $\pm$ 0.15
Aerated treatment	235.29 $\pm$ 6.93	216.51 $\pm$ 2.46	119.64 $\pm$ 10.02	0.45 $\pm$ 0.05	0.75 $\pm$ 0.05	1.05 $\pm$ 0.05
Contaminated soil control	259.97 $\pm$ 3.02	265.75 $\pm$ 1.75	269.65 $\pm$ 0.65	0.50 $\pm$ 0.00	0.65 $\pm$ 0.05	1.00 $\pm$ 0.00
Non-contaminated soil control	14.20 $\pm$ 0.20	-	11.36 $\pm$ 0.05	0.35 $\pm$ 0.05	-	0.70 $\pm$ 0.05
LSD (5%)	235.5	225.2	227.5	1.98	0.9	0.83

کاتالاز و دهیدروژناز جزء آنزیم‌های درون سلولی هستند که رابطه مستقیمی با فعالیت جمعیت زنده میکروبی خاک دارند و افزایش فعالیت این آنزیم‌ها در خاک آلوده به نفت نشان‌دهنده افزایش فعالیت میکروبیهای تجزیه‌کننده نفت می‌باشد (Margesin et al., 2000). شن و همکاران (Shen et al., 2016) گزارش کردند که فعالیت آنزیم کاتالاز در خاک شاهد آلوده نفتی تفاوت چندانی با خاک غیرآلوده نداشته است ولی افزایش قابل توجه فعالیت این آنزیم در خاک آلوده نفتی تلقیح شده با سه باکتری تجزیه‌کننده نفت مشاهده شد ولی بعد از یک ماه کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار کدسر سیوم دیده شد که نشان از تخلیه مواد غذایی برای باکتری‌ها بوده است؛ علاوه بر این تولید محصولات واسطه بسیار سمی نیز می‌تواند عامل بازدارنده فعالیت آنزیمی باشد. شایان ذکر است که پنج جدایه مورد استفاده در این تحقیق کاتالاز مثبت بودند و همین امر باعث شده است تا در تیمار کنسرسیوم باکتریایی مقادیر فعالیت آنزیمی افزایش داشته باشد. تیمار توپین ۸۰ به نظر با اثری که برآزادسازی این آنزیم از جمعیت میکروبی بومی خاک داشته باعث افزایش میزان فعالیت اندازه‌گیری شده این آنزیم در این تیمار شده است.

فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی و قلیایی

میزان فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی در اکثر تیمارهای زیست‌پالایی در ابتدا و انتهای آزمایش پس از گذشت چهار ماه تغییر قابل ملاحظه‌ای نداشت. میزان فعالیت فسفاتاز قلیایی نیز نسبت به فسفاتاز اسیدی در همه تیمارها بیشتر بود ولی باز تغییر چشمگیری در ابتدا و انتهای آزمایش مشاهده نشد. مابین تیمارها در ابتدا و انتهای آزمایش تیمارهای شاهد غیرآلوده نفتی، Tween 80 و نوترینت براث به ترتیب کمترین میزان فعالیت فسفاتاز اسیدی و قلیایی را داشتند. همچنین در ابتدای آزمایش تیمار کمپوست شهری دارای بیشترین فسفاتاز اسیدی و تیمار آبدی و کمپوست شهری دارای بیشترین فسفاتاز قلیایی بوده و در انتهای آزمایش تیمار تلقیحی COD 1-1، NPK و کود مرغی به ترتیب دارای بیشترین فسفاتاز اسیدی و تیمار کود مرغی، تیمار تلقیحی COD 1-1 و COD 2-1 دارای بیشترین فسفاتاز قلیایی بودند (شکل ۳). لازم به ذکر است که در خصوص سویه‌های باکتریایی مورد استفاده در این تحقیق فعالیت فسفاتازی آنها مورد بررسی قرار نگرفته بود. هرچند در تمام تیمارهای تلقیح میکروبی (منفرد و کنسرسیوم) تفاوت محسوسی دیده نمی‌شود. روی و همکاران (Roy et al., 2014) نیز گزارش کردند که در انواع تیمارهای زیست‌پالایی مختلف در خاک‌های آلوده نفتی میزان آنزیم فسفاتاز در مقایسه با قبل و بعد از اعمال تیمارهای زیست‌پالایی تفاوت چندانی نداشته است و این آنزیم پایشگر خوبی برای انجام پالایندگی نفتی به وسیله میکروبیها نمی‌باشد.



شکل ۳- فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی و قلیایی خاک در تیمارهای مختلف در ابتدا و انتهای آزمایش.

تنفس پایه و برانگیخته در ابتدا و انتهای آزمایش‌ها

طبق نتایج بدست آمده به ترتیب تیمارهای کنسرسیوم باکتریایی، کمپوست شهری و کود گاوی بیشترین مقدار تنفس پایه را در لحظه شروع آزمایش داشتند و پس از آن‌ها تیمارهای تلقیح میکروبی و کود مرغی در رتبه‌های بعدی قرار داشتند. تیمار Tween 80، هوادهی و خاک شاهد آلوده به ترتیب کمترین مقدار تنفس پایه را داشتند. بین تنفس پایه و میان درصد تجزیه TPH و فعالیت آنزیم دهیدروژناز در شروع آزمایش همبستگی معنادار به ترتیب در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد وجود داشت.

پس از گذشت ۴ ماه، تنفس پایه و برانگیخته تیمارها نسبت به شروع آزمایش کاهش بسیار چشمگیری داشت که این امر را دلیل بر کاهش مواد غذایی میکروبها و کاهش پویایی میکروبی می‌توان توجیه کرد. تنفس برانگیخته نیز در تیمار کود گاوی، نوترینت برات (برخلاف تنفس پایه) و تیمار آبدهی در لحظه شروع آزمایش بیشترین مقدار بود. شاخص‌های بیولوژیکی می‌تواند به عنوان یک شاخص خوب برای بررسی اثر آلاینده در خاک باشد. ریزجانداران خاک، به کوچکترین تنش‌های اکوسیستمی بسیار حساس هستند و با تنظیم میزان فعالیت، زیست‌توده میکروبی، و ساختار جامعه خود به سرعت در حال پاسخگویی به عوامل تنش‌زا هستند (Moreno et al., 2011). خاک‌هایی که به مدت طولانی

در معرض آلودگی با هیدروکربن‌های نفتی هستند با چالشی شدید برای حفظ و نگهداری جامعه میکروبی و تنوع ساختاری و عملکردی این جوامع میکروبی مواجه هستند (Pessacq et al., 2015).

جدول ۲- تنفس پایه و برانگیخته میکروبی خاک در تیمارهای مختلف در ابتدا و انتهای آزمایش.

تیمارها (Treatments)	تنفس پایه (Basal Respiration) (mg CO ₂ g ⁻¹ 24 h ⁻¹)		تنفس برانگیخته (Substrate Induced Respiration) (mg CO ₂ g ⁻¹ 24 h ⁻¹)	
	ابتدای آزمایش (T ₀)	انتهای آزمایش (T ₄)	ابتدای آزمایش (T ₀)	انتهای آزمایش (T ₄)
COD 1-1 Inoculation	2.44 ± 0.01	0.91 ± 0.19 ^a	9.75 ± 0.21	2.44 ± 0.02
COD 1-4 Inoculation	2.01 ± 0.66	0.76 ± 0.04	11.30 ± 0.04	2.30 ± 0.02
COD 2-1 Inoculation	2.33 ± 0.09	0.71 ± 0.04	12.05 ± 0.32	2.46 ± 0.06
COD 2-3 Inoculation	2.41 ± 0.10	0.31 ± 0.10	9.75 ± 0.08	3.35 ± 0.11
COD 5-6 Inoculation	2.57 ± 0.03	0.66 ± 0.00	11.90 ± 0.02	2.34 ± 0.02
Consortium	3.13 ± 0.16 ^a	0.49 ± 0.16	10.05 ± 0.04	3.05 ± 0.02
Nutrient Broth	0.43 ± 0.16	0.42 ± 0.15	8.48 ± 0.13	2.00 ± 0.02
Chicken manure	2.39 ± 0.24	0.58 ± 0.07	12.44 ± 0.19	2.75 ± 0.02
Cow manure	2.65 ± 0.19	0.58 ± 0.07	13.45 ± 0.00 ^a	3.35 ± 0.02
Compost	2.69 ± 0.45	0.64 ± 0.16	11.24 ± 0.21	4.24 ± 0.04 ^a
NPK	1.09 ± 0.19	0.87 ± 0.06	11.26 ± 0.15	2.51 ± 0.00
Tween 80	0.09 ± 0.03	0.42 ± 0.06	7.74 ± 0.02	0.95 ± 0.02
Irrigated treatment	1.17 ± 0.03	0.64 ± 0.01	12.35 ± 0.02	2.49 ± 0.02
Aerated treatment	0.15 ± 0.00	0.31 ± 0.01	6.05 ± 0.02	2.51 ± 0.00
Contaminated soil control	0.15 ± 0.00	0.30 ± 0.00	0.61 ± 0.04	1.8 ± 0.00
Non-contaminated soil control	0.30 ± 0.00	0.45 ± 0.00	1.24 ± 0.00	2.25 ± 0.00
LSD (5%)	1.71	0.43	2.88	1.64

نتیجه‌گیری کلی

این آزمایش برای مقایسه تیمارهای مورد استفاده در سه روش زیست‌پالایی (زیست‌پالایی ذاتی، تحریک زیستی و تلقیح زیستی) انجام گرفت. توجه به داده‌های به دست آمده از درصد تجزیه مواد نفتی حاکی از آن است گرچه در گروه تیمارهای مربوط به تحریک زیستی نظیر توپین ۸۰، کود گاوی و افزودن نوترینت براث بالاترین درصد تجزیه نفتی را شاهد بودیم، تیمار نوترینت براث و استفاده از تلقیح زیستی به ویژه باکتری *Arthrobacter* sp. COD 2-3 در یک گروه آماری قرار گرفتند. این در حالی بود که درصد تجزیه مواد نفتی در تیمار زیست‌پالایی ذاتی (تیمار شاهد بدون اعمال هیچ تیماری) تنها ۱۰ درصد به دست آمد، اما در برخی از تیمارهای تحریک و تلقیح زیستی این عدد تا نزدیک ۹۰ درصد افزایش نشان داد. توجه به دیگر شاخصه‌های زیستی نظیر فعالیت‌های آنزیمی و تنفس میکروبی در برخی موارد با نتایج فوق همسویی خوبی داشت ولی در مواردی تغییرات قابل توجه نبود و شاید این موضوع به پیچیدگی بستر مورد آزمایش، حساسیت پارامترهای اندازه‌گیری شده به نحوه انجام آزمایش و شرایط کار یا زمانهای انتخابی برای بررسی صفات مربوط باشد. آنزیم‌های دهیدروژناز و اوره‌آز با اعمال تیمارها در ابتدای زیست‌پالایی افزایش یافته و پس از گذشت ۲ ماه و ۴ ماه کاهش داشت. فعالیت کاتالاز در ابتدای آزمایش در بعضی تیمارها کم بوده و با گذشت زمان افزایش یافت و در بعضی دیگر روند کاهشی را داشت. فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی و قلیایی در طول آزمایش تغییر معنادار نکرد. تنفس پایه و برانگیخته در ابتدای اجرای زیست‌پالایی افزایش یافته و با گذشت زمان در طول چهار ماه کاهش چشمگیری داشت. نهایتاً با توجه به تجزیه و تحلیل پایش‌های انجام یافته تیمارهای توپین ۸۰، کود گاوی، نوترینت براث و تیمار باکتریایی COD 2-3 از بهترین روش‌های زیست‌پالایی برای حذف آلودگی‌های نفتی در خاک معرفی می‌شوند، هر چند اجرای آزمایش‌های میدانی نیز ضرورت دارد تا بتوان توصیه نهایی را داشت.

References

- Aliasgharzad, N. (2005). *Methods in Soil Biology (Translation)*. Published by University of Tabriz, Tabriz, Iran. (In Persian)
- Afsharnia, M., Sarikhani, M. R., & Zarei, M. (2022). Isolation of oil degrading bacteria from oil contaminated soil around the oil refinery and petrochemical plants of Tabriz and identification of the efficient bacteria. *Water and Soil Science*, 32(4), 91-104. (In Persian with English abstract).
DOI: [10.22034/WS.2021.45023.2408](https://doi.org/10.22034/WS.2021.45023.2408)
- Agamuthu, P., Tan, Y. S., & Fauziah, S. H. (2013). Bioremediation of hydrocarbon contaminated soil using selected organic wastes. *Procedia Environmental Sciences*, 18, 694-702.
<https://doi.org/10.1016/j.proenv.2013.04.094>
- Anderson, J. P. (1982). Soil respiration. *Methods of Soil Analysis: part 2 Chemical and Microbiological Properties*, 9, 831-871.
- Anonymous. (1998). *Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical Chemical Methods*. Environmental Protection Agency, USEPA, Washington DC, USA.
- Auffret, M. D., Yergeau, E., Labbé, D., Fayolle-Guichard, F., & Greer, C. W. (2015). Importance of *Rhodococcus* strains in a bacterial consortium degrading a mixture of hydrocarbons, gasoline, and diesel oil additives revealed by metatranscriptomic analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 2419-2430.
DOI: [10.1007/s00253-014-6159-8](https://doi.org/10.1007/s00253-014-6159-8)
- Bastida, F., Jehmlich, N., Lima, K., Morris, B. E. L., Richnow, H. H., Hernández, T., Von Bergen, M., & García, C. (2016). The ecological and physiological responses of the microbial community from a semiarid soil to hydrocarbon contamination and its bioremediation using compost amendment. *Journal of Proteomics*, 135, 162-169.
DOI: [10.1016/j.jprot.2015.07.023](https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.07.023)
- Chen, M., Xu, P., Zeng, G., Yang, C., Huang, D., & Zhang, J. (2015). Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: applications, microbes and future research needs. *Biotechnology Advances*, 33(6), 745-755.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.05.003>
- Doustaki, M., Ebrahimi, S., Movahhedi Naiini, A., & Olamaii, M. (2013). Optimization of biodegradation of hydrocarbons conditions by endogenous and exogenous microorganisms. *Journal of Water and Soil Conservation Research*. 20 (4):165- 181. (In Persian with English abstract).
<https://sanad.iau.ir/Journal/he/Article/848393>
- Etim, E. E. (2012). Phytoremediation and its mechanisms: a review. *International Journal of Environment and Bioenergy*, 2(3), 120-136.
- Hasn Shahian, M., & Zeyd Abadi, Z. (2017). Study the effect of kerosene contamination on desert and farmland soil microbial community. *Journal of Water and Soil Conservation*, 24(4), 227-241. (In Persian with English abstract).
DOI: [10.22069/JWSC.2017.12714.2740](https://doi.org/10.22069/JWSC.2017.12714.2740)
- Hu, G., Li, J., & Zeng, G. (2013). Recent development in the treatment of oily sludge from petroleum industry: a review. *Journal of Hazardous Materials*, 261, 470-490.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.07.069>
- Ganesh, A., & Lin, J. (2009). Diesel degradation and biosurfactant production by Gram-positive isolates. *African Journal of Biotechnology*, 8(21), 5847-5854.
DOI: [10.5897/AJB09.811](https://doi.org/10.5897/AJB09.811)
- Johnson, J. L., & Temple, K. L. (1964). Some variables affecting the measurement of “catalase activity” in soil. *Soil Science Society of America Journal*, 28(2), 207-209.
<https://doi.org/10.2136/sssaj1964.03615995002800020024x>
- Li, J. L., & Chen, B. H. (2009). Surfactant-mediated biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Materials*, 2(1), 76-94.

[DOI: 10.3390/ma2010076](https://doi.org/10.3390/ma2010076)

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

[DOI: 10.1016/j.ibiod.2012.03.002](https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.03.002)

Margesin, R., Zimmerbauer, A., & Schinner, F. (2000). Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere*, 40(4), 339-346.

[https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00218-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00218-0)

Minai-Tehrani, D., Herfatmanesh, A., & Azari, D. F. (2006). Biodegradation of heavy crude oil in soil in a pilot scale. *Environmental Science*, 10: 71-81. (In Persian with English abstract).

https://envs.sbu.ac.ir/article_97026.html?lang=en

Tyagi, M., da Fonseca, M. M. R., & de Carvalho, C. C. (2011). Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, 22, 231-241.

<https://doi.org/10.1007/s10532-010-9394-4>

Moreno, B., Nogales, R., Macci, C., Masciandaro, G., & Benitez, E. (2011). Microbial eco-physiological profiles to estimate the biological restoration of a trichloroethylene-contaminated soil. *Ecological Indicators*, 11(6), 1563-1571.

<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2011.03.026>

Mortazavi, B., Horel, A., Beazley, M. J., & Sobecky, P. A. (2013). Intrinsic rates of petroleum hydrocarbon biodegradation in Gulf of Mexico intertidal sandy sediments and its enhancement by organic substrates. *Journal of Hazardous Materials*, 244, 537-544.

[DOI: 10.1016/j.jhazmat.2012.10.038](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.10.038)

Pedra, F., Polo, A., Ribeiro, A., & Domingues, H. (2007). Effects of municipal solid waste compost and sewage sludge on mineralization of soil organic matter. *Soil biology and biochemistry*, 39(6), 1375-1382.

<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.12.014>

Pessacq, J., Medina, R., Terada, C., Bianchini, F. E., Morelli, I. S., & Del Panno, M. T. (2015). Assessment of the responsiveness to different stresses of the microbial community from long-term hydrocarbon-contaminated soils. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226, 1-13.

<https://doi.org/10.1007/s11270-014-2262-9>

Rao, M. A., Scelza, R., Acevedo, F., Diez, M. C., & Gianfreda, L. (2014). Enzymes as useful tools for environmental purposes. *Chemosphere*, 107, 145-162.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.12.059>

Roy, A. S., Baruah, R., Borah, M., Singh, A. K., Boruah, H. P. D., Saikia, N., Deka, M., Dutta, N., & Bora, T. C. (2014). Bioremediation potential of native hydrocarbon degrading bacterial strains in crude oil contaminated soil under microcosm study. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 94, 79-89.

<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.03.024>

Rump, H.H., & Krist H. (1988). *Laboratory Manual of the Examination of Water and Soil*. VCH publishers. Escbborn. Germany.

Lee, S. H., Lee, S., Kim, D. Y., & Kim, J. G. (2007). Degradation characteristics of waste lubricants under different nutrient conditions. *Journal of Hazardous Materials*, 143(1-2), 65-72.

[DOI: 10.1016/j.jhazmat.2006.08.059](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.08.059)

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

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.10.005>

Soldatkin, O. O., Kucherenko, I. S., Pyeshkova, V. M., Kukla, A. L., Jaffrezic-Renault, N., El'Skaya, A. V., Dzyadevych, S. V., & Soldatkin, A. P. (2012). Novel conductometric biosensor based on three-enzyme system for selective determination of heavy metal ions. *Bioelectrochemistry*, 83, 25-30.

<https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2011.08.001>

Sun, M., Luo, Y., Christie, P., Jia, Z., Li, Z., & Teng, Y. (2012). Methyl- β -cyclodextrin enhanced biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and associated microbial activity in contaminated soil. *Journal of Environmental Sciences*, 24(5), 926-933.

[https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(11\)60865-6](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(11)60865-6)

- Tabatabai, M.A. (1994). Soil enzymes. *Methods of Soil Analysis: Part 2 Microbiological and Biochemical Properties*, 5, 775- 833.
- Thapa, B., Kc, A. K., & Ghimire, A. (2012). A review on bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil. *Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology*, 8(1), 164-170.
[DOI: 10.3126/kuset.v8i1.6056](https://doi.org/10.3126/kuset.v8i1.6056)
- Thavamani, P., Malik, S., Beer, M., Megharaj, M., & 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.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.12.030>
- Wu, J. H., Wu, F. Y., Chuang, H. P., Chen, W. Y., Huang, H. J., Chen, S. H., & Liu, W. T. (2013). Community and proteomic analysis of methanogenic consortia degrading terephthalate. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(1), 105-112.
[DOI: 10.1128/AEM.02327-12](https://doi.org/10.1128/AEM.02327-12)
- Yu, Z., Zeng, G. M., Chen, Y. N., Zhang, J. C., Yu, Y., Li, H., Liu, Z. F., & Tang, L. (2011). Effects of inoculation with *Phanerochaete chrysosporium* on remediation of pentachlorophenol-contaminated soil waste by composting. *Process Biochemistry*, 46(6), 1285-1291.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.02.018>