



Changes in the activity of acid and alkaline phosphatase enzymes in oil-contaminated soils

Shokufeh Moradi^{*1} | Mohammad Reza Sarikhani² | Ali Beheshti Ale-Agha³ | Seyed Siamak Alavi-kia⁴, Adel Reyhanitabar⁵, Roohollah Sharifi⁶

1. Corresponding Author, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
E-mail: moradishokufeh@gmail.com
2. Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
E-mail: rsarikhani@yahoo.com
3. Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran
E-mail: beheshtiali97@gmail.com
4. Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran, Email: ss.alavikia@tabrizu.ac.ir
5. Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran, Email: areyhani@tabrizu.ac.ir
6. Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran, Email: rsharifi@ut.ac.ir

Article Info

Article type: Research Article

Article history:

Received: Sep. 11, 2023

Revised: Dec. 2, 2023

Accepted: Dec. 23, 2023

Published online: March. 2024

Keywords:

CFMM,
Soil,
Hydrocarbon,
Enzyme Activity.

ABSTRACT

Soil hydrocarbons can affect the physical, chemical and biological characteristics. Soil samples were prepared from the oil-rich area of Kermanshah province, which have been under oil pollution for a long time. 120 soil samples were collected from a depth of 0-15 cm with three pollution levels of low (L), moderate (M) and high (H) and the physicochemical characteristics were measured. Then bacteria were counted in NA and CFMM media and a positive and significant correlation was observed between bacterial population and oil concentration. The mean of oil measured by Soxhlet method was 4.03%, 9.95% and 22.50% for L, M and H levels, respectively. With the increase of oil in soil samples, ACP and ALP increased. In all samples, ACP was lower than ALP. The highest ACP and ALP were obtained 45.78 and 84.90 (gPNP.g⁻¹.h⁻¹.l⁻¹) respectively in soil with high pollution level. Regression analysis showed that the oil percentage, sand percentage and EC with an regression coefficient of 0.71 were effective variables on the ACP, and the oil and sand percentage were also effective variables on the activity of ALP with an regression coefficient of 0.43. PCA analysis was also performed and the results showed that the first two components explained 68% of the variance between the samples. Based on the results, it was observed that natural and long-term oil pollution, with the passage of time led to the adaptation of microbial communities resistant to pollution and the number of these microorganisms and the activity of phosphatase enzyme increased.

Cite this article: Moradi, Sh., Sarikhani, M. R., Beheshti Ale-Agha, A., Alavi-kia, S. S., Reyhanitabar, A., Sharifi, R. (2024) Changes in the activity of acid and alkaline phosphatase enzymes in oil-contaminated soils, *Iranian Journal of Soil and Water Research*, 55 (1), 117-130. <https://doi.org/10.22059/ijswr.2023.365078.669569>

© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijswr.2023.365078.669569>



تغییرات فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی و قلیایی در خاک‌های آلوده نفتی

شکوفه مرادی*^۱ | محمدرضا ساریخانی^۲ | علی بهشتی آل آقا^۳ | سیدسیامک علوی کیا^۴ | عادل ریحانی تبار^۵ | روح ا... شریفی^۶۱. نویسنده مسئول، گروه علوم و مهندسی خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. رایانامه: moradishokufeh@gmail.com۲. گروه علوم و مهندسی خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. رایانامه: rsarikhani@yahoo.com۳. گروه علوم و مهندسی خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران. رایانامه: beheshhtiali97@gmail.com۴. گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. رایانامه: ss.alavikia@tabrizu.ac.ir۵. گروه علوم و مهندسی خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. رایانامه: areyhani@tabrizu.ac.ir۶. گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران. رایانامه: rsharifi@ut.ac.ir

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله پژوهشی	هیدروکربن‌های نفتی در خاک می‌توانند ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی خاک را تحت تأثیر قرار دهند. در این مطالعه نمونه خاک‌ها از منطقه نفت شهر استان کرمانشاه تهیه شدند که به مدت طولانی تحت آلودگی نفتی بوده‌اند. ۱۲۰ نمونه خاک از عمق ۱۵-۱۰ سانتی‌متری با سه سطح آلودگی کم (L)، متوسط (M) و شدید (H) جمع‌آوری و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی این خاک‌ها اندازه‌گیری شد. سپس شمارش باکتری‌ها در محیط کشت‌های NA و CFMM انجام و همبستگی مثبت و معنی‌داری بین جمعیت میکروبی و غلظت نفت مشاهده شد. 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. با افزایش غلظت نفت در نمونه‌های خاک فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی و قلیایی، افزایش یافت. در همه نمونه‌ها، فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی از فسفاتاز قلیایی کمتر بود. بیشترین فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی و قلیایی به ترتیب با مقادیر ۴۵/۷۸ و ۸۴/۹۰ (gPNP.g-1.h-1.μ) در خاک با سطح آلودگی بالا به دست آمد. آنالیز رگرسیون نشان داد که درصد نفت، درصد شن و EC با ضریب تبیین ۰/۷۱ متغیرهای مؤثر بر فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی و همچنین درصد نفت و شن نیز با ضریب تبیین ۰/۴۳ متغیرهای مؤثر بر فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز قلیایی بودند. آنالیز PCA نیز انجام شد و نتایج نشان داد که دو مؤلفه اول ۶۸ درصد واریانس بین نمونه‌ها را توجیه کردند. براساس نتایج مشاهده شد که آلودگی نفتی طبیعی و طولانی‌مدت، با گذشت زمان منجر به سازگاری جوامع میکروبی مقاوم به آلودگی شده و تعداد این میکروارگانیسم‌ها و فعالیت آنزیم فسفاتاز افزایش یافته است.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۶/۲۰	
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۹/۱۱	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۲	
تاریخ انتشار: فروردین ۱۴۰۳	
واژه‌های کلیدی: CFMM، خاک، فعالیت آنزیمی، هیدروکربن	

استناد: مرادی؛ شکوفه، ساریخانی؛ محمدرضا، بهشتی آل آقا؛ علی، علوی کیا؛ سیدسیامک، ریحانی تبار؛ عادل، شریفی؛ روح ا... (۱۴۰۳) تغییرات فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی و قلیایی در خاک‌های آلوده نفتی، مجله تحقیقات آب و خاک ایران، ۵۵ (۱)، ۱۱۷-۱۳۰.



<https://doi.org/10.22059/ijswr.2023.365078.669569>

© نویسندگان.

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijswr.2023.365078.669569>

مقدمه

یکی از بحرانی‌ترین آلودگی‌های زیست‌محیطی، حضور آلاینده‌های نفتی در اکوسیستم خاک است که می‌تواند خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و زیستی خاک را تحت تأثیر قرار دهد. هیدروکربن‌های نفتی، آلاینده‌های آلی و پایدار هستند که به مدت طولانی در محیط باقی می‌مانند. آلودگی‌های نفتی ممکن است به صورت طبیعی و یا در اثر فعالیت‌های انسانی در محیط زیست وارد شوند. میکروارگانیسم‌های خاک به عنوان عوامل اصلی تجزیه زیستی هیدروکربن‌ها شناخته شده‌اند که به راحتی از خاک قابل جداسازی هستند. ریزجانداران خاک به تنش‌های محیطی بسیار حساس هستند و از این رو به عنوان شاخص‌های کیفیت و سلامت خاک در نظر گرفته می‌شوند (Liang et al., 2015; Chakravarty et al., 2022). جوامع میکروبی که مدت‌ها در معرض هیدروکربن‌های نفتی بوده‌اند، پتانسیل بالایی برای تجزیه زیستی نفت از خود نشان می‌دهند. قابل ذکر است که نشت تازه نفت در خاک اغلب بخش بزرگی از ریزجانداران را از بین می‌برد در حالی که در خاک‌هایی با آلودگی‌های قدیمی‌تر، تعداد و تنوع میکروبی بالاتر است (Saadoun et al., 2008).

تحقیقات نشان داده‌اند که آنزیم‌های خاک ابزار مفیدی برای تشخیص زود هنگام و پایش آلودگی خاک‌ها هستند. زیرا (الف) آنزیم‌ها معیاری برای فعالیت میکروبی خاک و تأثیرگذار در چرخه‌های عناصر غذایی هستند، (ب) ممکن است به سرعت به تغییرات ناشی از عوامل طبیعی و انسانی پاسخ دهند، (ج) اندازه‌گیری آن‌ها آسان است (Nannipieri et al., 2002; Colombo et al., 2002). منشأ آنزیم‌های موجود در خاک می‌تواند جامعه میکروبی زنده یا مرده خاک (از قبیل باکتری‌ها، قارچ‌ها، ریشه گیاهان یا جانوران خاک) باشد. آنزیم‌ها، کاتالیزورهایی هستند که بدون اینکه دچار تغییر شوند، سرعت واکنش‌های بیوشیمیایی را افزایش می‌دهند و جزء لازم چرخه عناصر غذایی در خاک می‌باشند. آنزیم‌های خاک، شاخص‌های زیستی بسیار حساسی می‌باشند که برای تشخیص و اندازه‌گیری مقدار و غلظت آلاینده‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند به گونه‌ای که هم برای تشخیص نشانه‌های اولیه آلودگی و هم میزان حذف مؤثر آلاینده و به دست آوردن سلامت و کیفیت مجدد خاک مورد استفاده قرار می‌گیرد (Nannipieri et al., 2002).

فسفاتازها (آنزیم‌های کلاس هیدرولاز) از مهم‌ترین آنزیم‌های خاک هستند، زیرا به عنوان آنزیم‌های خارج سلولی، ارتباط نزدیکی با تجزیه مواد آلی در خاک دارند. فسفاتازهای خاک به هرگونه اختلال در وضعیت اکوشیمیایی خاک واکنش بسیار سریعی نشان می‌دهند. فسفاتازها که عمدتاً از میکروارگانیسم‌های خاک و ریشه‌های گیاه سرچشمه می‌گیرند، تبدیل ترکیبات آلی فسفر را به فسفات‌های معدنی کاتالیز و در دسترس گیاهان و ریزجانداران خاک قرار می‌دهند (Borah and Deka 2023; Lipinska et al., 2019). آنزیم‌هایی مانند فسفومونواسترازها، فسفودی‌استرازها و فسفوتری‌استرازها در محیط خاک وجود دارند. بسته به pH بهینه، فسفومونواسترازها به فسفومونواسترازهای اسیدی (فسفاتازهای قلیایی) و فسفومونواسترازهای قلیایی (فسفاتازهای قلیایی) تقسیم می‌شوند. pH از ۴ تا ۶ برای فسفاتازهای اسیدی و بین ۸ تا ۱۰ برای فسفاتازهای قلیایی بهینه است (Lipinska et al., 2019).

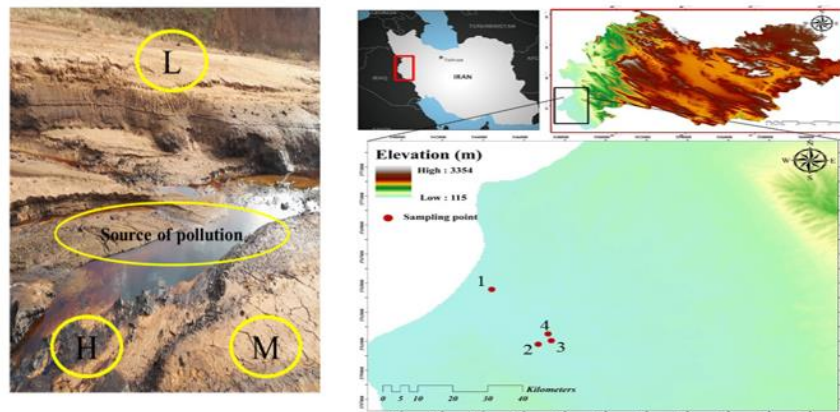
پژوهش‌های انجام شده در خاک‌های آلوده به نفت به دو صورت با ایجاد آلودگی‌های دست‌ساز و یا آلودگی‌های طبیعی و طولانی مدت بوده است که نتایج این دو نوع مطالعه متفاوت از هم است. قابل ذکر است که نتایج حاصل از مطالعات در مورد آلودگی نفتی کوتاه مدت در خاک به سختی قابل مقایسه با آلودگی‌های طولانی مدت و طبیعی است. علاوه بر این، ترکیب و تنوع جوامع میکروبی خاک به نوع خاک نیز بستگی دارد (Sutton et al., 2013). لذا با توجه به اثرات منفی هیدروکربن‌های نفتی بر فراوانی و ساختار جوامع میکروبی و فعالیت‌های آنزیمی آن‌ها، در این پژوهش تأثیرات آلودگی نفتی طبیعی و طولانی مدت بر فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی و قلیایی به عنوان آنزیم کلیدی در چرخه فسفر خاک، مورد مطالعه قرار گرفت. هدف از این پژوهش بررسی اثرات آلودگی نفتی بر فعالیت آنزیمی، 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

این مطالعه در سالهای ۱۳۹۹-۱۴۰۰ در دانشگاه تبریز انجام شده است. نمونه خاک‌های مورد استفاده در این پژوهش، از منطقه نفت‌خیز نفت‌شهر واقع در غرب استان کرمانشاه برداشت شدند. وجود منابع طبیعی نفتی، میدان‌های نفتی و به ویژه سفره‌های زیرزمینی نفت در این منطقه موجب شده که در سراسر آن، آلودگی نفتی گسترش یابد (شکل ۱). چهار مکان برای نمونه‌برداری انتخاب و نمونه‌ها با توجه به نزدیکی و دوری از منبع اصلی آلودگی و سطوح غلظت آلاینده نفتی به صورت چشمی از بخش‌های سه‌گانه 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. ذکر این نکته ضروری است که از نظر استاندارد، خاک‌های دارای آلودگی نفتی بیش از ۳ درصد، خاک‌های با آلودگی شدید محسوب می‌شوند (Vincent et al., 2011). بنابراین طبق این استاندارد، نمونه خاک‌های استفاده‌شده در این پژوهش با این استاندارد، خاک‌های با آلودگی شدید هستند و خاک‌های منطقه نمونه‌برداری طی سالیان متمادی تحت تأثیر آلودگی نفتی قرار گرفته‌بودند، همچنین خاک‌هایی که عاری از نفت به نظر می‌رسیدند نیز دارای درصدی از نفت بودند. همچنین خاک دارای آلودگی صفر که بتوان به عنوان شاهد بدون آلودگی در نظر گرفت در آن وجود نداشت. از هر چهار مکان نمونه‌برداری ۳۰ نمونه خاک برداشت شد که از این ۳۰ نمونه در هر مکان، 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 نمونه از لایه ۰-۱۵ سانتی‌متری برداشته‌شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.



شکل ۱. موقعیت جغرافیایی مکان‌های چهارگانه نمونه‌برداری و محل جمع‌آوری خاک‌های H، M و L از هر مکان

اندازه‌گیری ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و زیستی

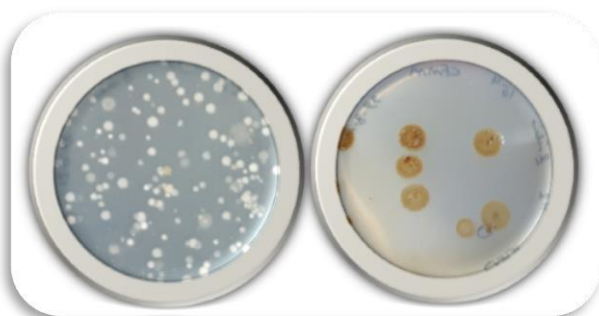
برای تعیین غلظت آلاینده‌های نفتی (Oil %) در نمونه‌های خاک برداشته شده بر اساس روش UNEP/IOC/IAEA سازمان محیط زیست آمریکا از دستگاه سوکسله استفاده شد (Christopher et al., 1988). برخی ویژگی‌های عمومی خاک همچون بافت (به روش هیدرومتر) ، pH (به روش تهیه سوسپانسیون ۱:۵) ، EC (به روش تهیه سوسپانسیون ۱:۵) و کربن آلی (OC) (به روش والکلی و بلک) (Rowell, 1994)، کربنات کلسیم (CCE) (خنثی‌سازی با اسید کلریدریک و تیتراسیون) (Martin and Reeve, 1995) بر اساس روش‌های استاندارد اندازه‌گیری شدند.

شمارش جمعیت میکروبی

جمعیت میکروبی قابل کشت، در محیط کشت‌های NA^۱ (جمعیت کل) و CFMM^۲ (جمعیت میکروبی‌های تجزیه‌کننده نفت) (شکل ۲) شمارش شد. ترکیبات محیط کشت CFMM بر حسب گرم بر لیتر شامل (۳) NH_4NO_3 ۲/۲، Na_2HPO_4 ۰/۸، KH_2PO_4 ۰/۰۱، $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ۰/۰۰۵، $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ۰/۰۰۵، $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ با $\text{pH}=7/2$ بود و در این محیط حداقل، به میزان ۱ درصد (۲۵۰ میکرولیتر) 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 سانتی‌گراد انکوبه شدند (ابراهیمی و همکاران، ۱۳۹۲).

1 Nutrient Agar

2 Carbon Free Minimal Medium



شکل ۲. شمارش جمعیت میکروبی در دو محیط CFMM (راست) و NA (چپ)

اندازه‌گیری فعالیت فسفاتاز اسیدی و قلیایی

فعالیت فسفاتاز (اسیدی و قلیایی) با استفاده از روش توصیف شده توسط (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 پارانیتروفیل فسفات (pNPP) (در بافر اسیدی یا بازی) به آن اضافه شد. بافر مورد استفاده برای فسفاتاز اسیدی دارای $pH=6/5$ و برای فسفاتاز قلیایی دارای $pH=11$ بود. پس از اختلاط نمونه، برای تأمین دمای بهینه فعالیت آنزیم، لوله‌ها را در آن با دمای 37 درجه سانتی‌گراد قرار داده و به مدت ۱ ساعت در این شرایط نگهداری شدند. سپس با افزودن محلول‌های متوقف‌کننده (۱ میلی‌لیتر کلرید کلسیم $0/5$ مولار و ۴ میلی‌لیتر سدیم‌هیدروکسید $0/5$ مولار) واکنش متوقف شد و قبل از قرائت میزان جذب، نمونه‌ها با استفاده از کاغذ صافی فیلتر شدند. این سوبسترا به دلیل فعالیت فسفاتاز، در نهایت به فسفر و پارانیتروفنل (PNP) هیدرولیز می‌شود. برای اندازه‌گیری مقدار PNP آزاد شده، جذب آن در طول موج 410 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 0 ، 10 ، 25 ، 50 و 100 میکروگرم ترسیم شد. در نمونه شاهد، محلول متوقف‌کننده قبل از صاف کردن به نمونه و سوبسترا در مرحله بعد اضافه شد. برای کم کردن اثر رطوبت از فعالیت آنزیم خاک، درصد رطوبت هر نمونه خاک محاسبه شد و اصلاحات با گزارش فعالیت آنزیمی در خاک خشک انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری

با توجه به فاکتورهای موجود در این آزمایش، از طرح کاملاً تصادفی آشیانه‌ای (Nested) برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد. فاکتورهای آزمون شامل مکان نمونه‌برداری (چهار مکان) و سه سطح مختلف آلودگی نفتی (L: کم، M: متوسط و H: شدید) بود. تجزیه و تحلیل آماری نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد و نمودارهای حاصل با استفاده از نرم افزار Excel و SPSS ترسیم شد. ابتدا اقدام به حذف داده‌های پرت شد و از شاخص کلموگروف-اسمیرنوف (KS) برای بررسی نرمال بودن داده‌های آزمون استفاده شد. برخی از پارامترهایی که دارای توزیع غیرنرمال بودند با استفاده از روش تبدیل داده‌های لگاریتمی نرمال‌سازی شدند. به منظور بررسی تفاوت بین غلظت‌های مختلف آلودگی (L، M و H) و همچنین چهار مکان نمونه‌برداری از نظر تغییرات تعداد پارامترهای اندازه‌گیری شده، تحلیل واریانس چند متغیره و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن ($P < 0/01$) انجام شد. لازم به ذکر است که در این تحقیق از هر کدام از ۴ مکان نمونه‌برداری، ۱۰ نمونه خاک با آلودگی کم (L)، ۱۰ نمونه خاک با آلودگی متوسط (M) و ۱۰ نمونه خاک با آلودگی شدید (H) از عمق ۰-۱۵ سانتی‌متری برداشت شد. در مجموع از هر مکان ۳۰ نمونه خاک جمع آوری شد.

۱۰ تکرار در سه سطح آلودگی نفتی در نظر گرفته شد و در مجموع ۱۲۰ نمونه خاک ($10 \times 3 \times 4$) جمع آوری شد. برای تعیین متغیرهای مستقل مهم و مؤثر بر فعالیت فسفاتاز خاک، تجزیه رگرسیون چندگانه متغیرهای مستقل نیز انجام گرفت. در پایان از تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) برای گنجاندن واریانس همه متغیرها در تحقیق استفاده شد.

نتایج و بحث

اندازه‌گیری ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی

میانگین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی اندازه‌گیری شده 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 انجام شد: ۷/۱-۰ درصد نفت، خاک‌های L، ۷/۱۲-۱۲/۹۴ درصد نفت، خاک‌های M و درصد نفت بیشتر از ۱۲/۹۴ درصد برای خاک‌های H در نظر گرفته شد. بیشترین میزان رطوبت (۱۴/۲۴ درصد) در خاک‌های مکان ۴ و کمترین مقدار آن مربوط به خاک‌های مکان 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 از ۷/۰۵ در خاک‌های L تا ۷/۳۶ در خاک‌های H متغیر بود (جدول ۱). بالاترین pH در مکان ۳ (۷/۴۴) و پایین‌ترین آن در مکان ۴ (۷/۰۷) اندازه‌گیری شد (جدول ۲). همانطور که نتایج نشان می‌دهد، EC در نمونه‌های خاک با آلودگی نفتی متفاوت از $1/71 \text{ dS.m}^{-1}$ (خاک H) تا $7/59 \text{ dS.m}^{-1}$ (خاک L) متغیر بود. حداکثر مقدار EC در مکان ۳ و حداقل مقدار آن در مکان 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 مکان مورد بررسی از ۸/۸۳ درصد در مکان ۴ تا ۱۵/۹۶ درصد در مکان ۱ متفاوت بود. خاک‌های L دارای بالاترین درصد CCE (۹/۵۶ درصد) و خاک‌های H دارای پایین‌ترین درصد (۸/۷۴ درصد) بودند (جدول ۱). بیشترین میانگین درصد CCE در خاک‌های مکان ۲ (۹/۹۱ درصد) و کمترین آن در خاک‌های مکان ۱ (۸/۴۹ درصد) مشاهده شد. در ارزیابی بافت خاک‌های مورد بررسی، توزیع اندازه ذرات نشان داد که بین نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده 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 (جدول ۱). درصد رس در خاک‌های L، (۲۳/۶۷ درصد) به طور معنی‌داری از خاک‌های H (۲۰/۷۹ درصد) بیشتر بود (جدول ۱).

جدول ۱. برخی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی به دست آمده از نمونه‌های خاک با سه سطح آلودگی شدید (High)، متوسط (Moderate) و کم (Low)

%Oil	Clay (%)	Silt (%)	Sand (%)	CCE (%)	OC (%)	EC (dS.m^{-1})	pH	Θ_m (%)	آلودگی نفتی
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	کم
۹/۹۵ ^b	۲۴/۳۰ ^a	۳۰/۱۷ ^a	۴۴/۲۳ ^a	۹/۰۹ ^b	۱۲/۳۱ ^b	۳/۲۴ ^b	۷/۲۶ ^b	۱۱/۸۴ ^b	متوسط
۲۲/۵۰ ^a	۲۰/۷۹ ^b	۲۸/۲۳ ^a	۴۹/۳۵ ^a	۸/۷۴ ^b	۲۰/۸۴ ^a	۱/۷۱ ^c	۷/۳۶ ^a	۱۵/۷۹ ^a	شدید

درصد نفت (Oil)، درصد شن (Sand)، درصد رس (Clay)، درصد سیلت (Silt)، درصد کربنات کلسیم معادل (CCE)، درصد کربن آلی (OC)، هدایت الکتریکی (EC)، درصد رطوبت وزنی (Θ_m).

جدول ۲. برخی خصوصیات فیزیکوشیمیایی نمونه‌های خاک در چهار مکان نمونه‌برداری

%Oil	Clay (%)	Silt (%)	Sand (%)	CCE (%)	OC (%)	EC (dS.m^{-1})	pH	Θ_m (%)	مکان‌های نمونه‌برداری
۱۵/۹۵ ^a	۱۷/۷۳ ^b	۲۱/۴۴ ^c	۵۹/۴۵ ^a	۸/۴۹ ^c	۱۵/۹۶ ^a	۲/۹۴ ^b	۷/۲۲ ^b	۶/۹۱ ^c	مکان ۱
۱۲/۶۳ ^b	۱۶/۳۳ ^b	۳۰/۲۹ ^b	۴۸/۶۹ ^b	۹/۹۱ ^a	۱۴/۶۳ ^a	۲/۶۷ ^b	۷/۲۰ ^b	۱۰/۳۱ ^b	مکان ۲
۱۲/۳۷ ^b	۲۷/۴۳ ^a	۲۷/۰۲ ^b	۴۳/۹۲ ^b	۹/۴۴ ^b	۱۲/۵۷ ^b	۵/۴۳ ^a	۷/۴۴ ^a	۱۳/۰۱ ^{ab}	مکان ۳
۸/۷۸ ^c	۲۹/۶۸ ^a	۳۷/۰۱ ^a	۳۳/۳۱ ^c	۸/۶۹ ^c	۸/۸۳ ^c	۵/۳۱ ^a	۷/۰۷ ^c	۱۴/۲۴ ^a	مکان ۴

درصد نفت (Oil)، درصد شن (Sand)، درصد رس (Clay)، درصد سیلت (Silt)، درصد کربنات کلسیم معادل (CCE)، درصد کربن آلی (OC)، هدایت الکتریکی (EC)، درصد رطوبت وزنی (Θ_m).

شمارش جمعیت میکروبی

نتایج به دست 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 با توجه به تفاوت ذکر شده، تنها جوامع میکروبی با قابلیت تجزیه هیدروکربن‌های نفتی می‌توانند در آن رشد کنند. نتایج مطالعه نشان داد که جمعیت میکروبی در خاک‌های دارای آلودگی شدید بیشتر بود. تعداد کلنی‌های شمارش شده در خاک‌های با آلودگی شدید (H) با اختلاف آماری معنی‌دار ($P < 0/01$) بالاتر از خاک‌های دارای غلظت متوسط (M) و غلظت

پایین نفت (L) بود (جدول ۳).

جدول ۳. جمعیت میکروبی شمارش شده (CFU.g⁻¹) در محیط کشت‌های NA و CFMM در ۴ مکان نمونه‌برداری و در سطوح مختلف آلودگی نفتی (High و Moderate، Low)

مکان‌های نمونه‌برداری	غلظت آلاینده نفتی			
	کم	متوسط	شدید	میانگین
مکان ۱	۵/۰۶×۱۰ ^۵ d	۱/۱۳×۱۰ ^۶ a	۱/۱۲×۱۰ ^۶ a	۹/۳۷×۱۰ ^۵ A
مکان ۲	۳/۵۵×۱۰ ^۵ e	۸/۴۰×۱۰ ^۵ bc	۹/۴۶×۱۰ ^۵ ab	۷/۲۲×۱۰ ^۵ B
مکان ۳	۲/۸۵×۱۰ ^۵ e	۷/۰۷×۱۰ ^۵ c	۸/۱۲×۱۰ ^۵ bc	۶/۲۵×۱۰ ^۵ C
مکان ۴	۱/۶۰×۱۰ ^۵ f	۳/۶۷×۱۰ ^۵ e	۶/۹۸×۱۰ ^۵ c	۳/۳۱×۱۰ ^۵ D
میانگین	۳/۲۸×۱۰ ^۵ C	۶/۴۸×۱۰ ^۵ B	۹/۵۴×۱۰ ^۵ A	
مکان ۱	۶/۰۶×۱۰ ^۴ f	۲/۹۳×۱۰ ^۵ bc	۴/۵۴×۱۰ ^۵ bc	۲/۹۸×۱۰ ^۵ A
مکان ۲	۱/۸۱×۱۰ ^۵ d	۶/۶۱×۱۰ ^۵ a	۲/۵۲×۱۰ ^۵ c	۳/۳۴×۱۰ ^۵ A
مکان ۳	۵/۶۲×۱۰ ^۴ f	۱/۰۵×۱۰ ^۵ e	۱/۹۲×۱۰ ^۵ cd	۱/۲۶×۱۰ ^۵ B
مکان ۴	۲/۹۷×۱۰ ^۴ g	۱/۴۲×۱۰ ^۵ de	۲/۹۷×۱۰ ^۵ bc	۱/۲۰×۱۰ ^۵ C
میانگین	۸/۱۱×۱۰ ^۴ C	۲/۵۳×۱۰ ^۵ B	۳/۱۱×۱۰ ^۵ A	

جدول ۴. ضرایب همبستگی بین شاخص‌های فیزیکوشیمیایی و زیستی اندازه‌گیری شده در نمونه‌های خاک

	Oil	EC	ALP	NA	CFMM	Θ _m	Sand	Clay	Silt	CCE	pH	OC	ACP
Oil	۱												
EC	-۰/۷۵۵**	۱											
ALP	۰/۵۰۶**	-۰/۳۸۷**	۱										
NA	۰/۷۵۳**	-۰/۷۲۶**	۰/۵۶۴**	۱									
CFMM	۰/۶۷۶**	-۰/۶۶۴**	۰/۴۱۰**	۰/۸۲۴**	۱								
Θ _m	۰/۵۲۲**	-۰/۳۴۵**	۰/۰۵۱	۰/۱۹۸	۰/۲۰۳	۱							
Sand	۰/۰۲۹	-۰/۱۱۴	۰/۳۶۱**	۰/۲۰۶	۰/۰۹۹	۰/۴۱۱**	۱						
Clay	-۰/۱۱۷	۰/۳۲۸*	-۰/۳۹۷**	-۰/۳۶۷**	۰/۴۳۹**	۰/۴۱۵**	-۰/۶۳۵**	۱					
Silt	۰/۰۱۹	۰/۰۵۶	-۰/۲۷۶**	-۰/۱۲۹	۰/۰۰۲	۰/۳۹۱**	-۰/۸۶۸**	۰/۳۴۹**	۱				
CCE	-۰/۳۴۶**	۰/۱۴۱	-۰/۱۸۴	-۰/۱۴۳	-۰/۰۸۲	-۰/۱۴۲	۰/۰۲۷	-۰/۰۹۲	-۰/۰۰۵	۱			
pH	۰/۴۱۰**	-۰/۵۱۰**	۰/۲۸۹**	۰/۴۷۵**	۰/۳۵۹**	۰/۳۹۹**	-۰/۰۳۶	۰/۰۲۴	-۰/۰۲۵	۰/۱۵۸	۱		
OC	۰/۱۸۶۵**	-۰/۷۲۷**	۰/۵۱۴**	۰/۷۴۹**	۰/۶۵۹**	۰/۴۳۲**	۰/۱۰۹	۰/۲۲۱*	-۰/۰۳۱	-۰/۲۸۹**	۰/۳۷۸**	۱	
ACP	۰/۸۲۰**	-۰/۷۳۶**	۰/۵۹۲**	۰/۷۰۷**	۰/۶۱۵**	۰/۳۵۷**	۰/۱۵۵	-۰/۲۳۰*	-۰/۰۹۶	-۰/۳۲۰**	۰/۳۷۸**	۰/۷۲۴**	۱

** و * به ترتیب معنی‌دار در سطوح ۱ و ۵ درصد.

جمعیت کل ریزجانداران خاک در اثر تنش‌های غیرزیستی نظیر آلاینده‌های نفتی و فقر غذایی کاهش می‌یابند اما باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت دچار تغییر نمی‌شوند. به عبارت دیگر آلودگی نفتی، موجب ایجاد شرایط انتخابی در خاک شده به گونه‌ای که ریزجاندارانی که قادر به استفاده از هیدروکربن‌های نفتی هستند از فراوانی بالاتری برخوردارند (Dos Santos et al., 2011; Liao et al., 2015). گزارشی (Liao et al., 2015) تأثیرات آلودگی نفتی را بر ساختار، فعالیت میکروبی و عملکرد متابولیسم کربن توسط ریزجانداران مورد مطالعه قرار دادند و بیان کردند که آلودگی نفتی طولانی مدت، به شدت الگوهای جامعه میکروبی خاک را تغییر داده و تغییرات میکروبی به لحاظ فراوانی، غنای باکتریایی، تنوع زیستی باکتریایی و عملکرد آن‌ها از نظر آماری معنی‌دار بود. آنها نتیجه گرفتند که فراوانی و تنوع میکروارگانیزم‌های هتروتروف که قابلیت تخریب هیدروکربن‌ها و استفاده از منابع غنی نفتی را دارند در حضور نفت افزایش یافته‌است. Dos Santos و همکاران (۲۰۱۱) در تحقیقی که بر روی متائونوم خاک‌های متأثر از آلودگی نفتی انجام داده مشاهده کردند که در خاک‌های آلوده به نفت، تعداد OTU^۱ها به طور قابل توجهی افزایش یافت. نتایج این پژوهش 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 تأثیرات آلاینده‌های نفتی بر جمعیت و فعالیت میکروبی نتایج مشابهی به دست آوردند (Hui et al., 2007; Margesin et al., 2007).

فعالیت آنزیم فسفاتاز (اسیدی و قلیایی)

نتایج اندازه‌گیری فعالیت فسفاتاز نمونه‌ها نشان داد که با افزایش غلظت آلاینده‌های نفتی در خاک، هم فعالیت فسفاتاز اسیدی و هم فعالیت فسفاتاز قلیایی افزایش یافت (شکل ۳ و ۴). بالاترین سطح فعالیت فسفاتاز اسیدی در خاک‌های H ($45/78 \mu\text{gPNP.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) و کمترین آن در خاک‌های L ($9/97 \mu\text{gPNP.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) مشاهده شد (جدول ۵). مکان ۱ با $35/86 \mu\text{gPNP.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ بیشترین و مکان ۴ با $4 \mu\text{gPNP.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ کمترین فعالیت فسفاتاز اسیدی را نشان دادند (جدول ۵). فعالیت فسفاتاز قلیایی در هر سه سطح غلظت نفت (H و M، L) و همچنین در ۴ مکان مورد بررسی بیشتر از فسفاتاز اسیدی بود (جدول ۵). همانطور که در جدول ۵ مشاهده می‌شود، بیشترین فعالیت فسفاتاز قلیایی در خاک‌های H ($84/90 \mu\text{gPNP.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) و کمترین آن در خاک‌های L ($34/97 \mu\text{gPNP.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) اندازه‌گیری شد. همانند فعالیت فسفاتاز اسیدی، فعالیت فسفاتاز قلیایی نیز بیشترین مقدار را در مکان ۱ ($78/13 \mu\text{gPNP.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) و کمترین مقدار را در مکان ۴ ($36/56 \mu\text{gPNP.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) نشان داد. همبستگی مثبت و معنی داری بین درصد نفت و فعالیت فسفاتاز اسیدی ($r=0/820$ ، $P<0/01$) مشاهده شد (جدول ۴).

جدول ۵. میانگین فعالیت فسفاتاز اسیدی و قلیایی در چهار مکان نمونه‌برداری و سه سطح غلظت نفت

مناطق نمونه‌برداری	فسفاتاز اسیدی ($\mu\text{gPNP.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	فسفاتاز قلیایی ($\mu\text{gPNP.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
مکان ۱	۳۵/۸۶ ^a	۷۸/۱۳ ^a
مکان ۲	۲۹/۸۸ ^b	۶۱/۹۰ ^{ab}
مکان ۳	۲۶/۲۲ ^b	۵۷/۰۳ ^b
مکان ۴	۱۷/۸۸ ^c	۳۶/۵۶ ^c
غلظت آلاینده نفتی		
کم	۹/۹۷ ^c	۳۴/۹۷ ^B
متوسط	۲۵/۷۱ ^B	۵۳/۷۳ ^B
شدید	۴۵/۷۸ ^A	۸۴/۹۰ ^A

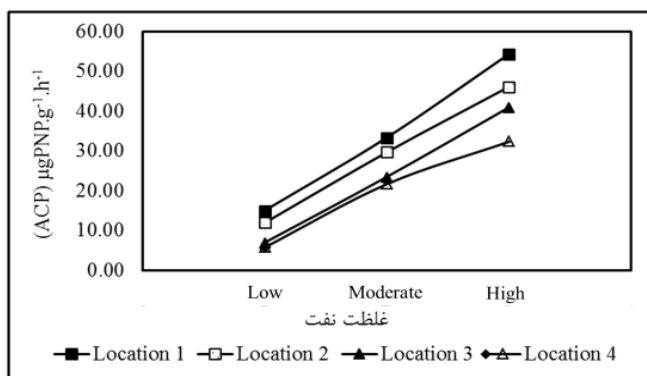
رگرسیون چندگانه متغیرهای مستقل روی فعالیت فسفاتاز اسیدی و قلیایی انجام شد و کل مدل رگرسیونی در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود. ضریب تبیین به دست آمده برای فسفاتاز اسیدی و قلیایی به ترتیب $R^2 = 0/71$ و $R^2 = 0/43$ بود (روابط ۱ و ۲). آماره دوربین واتسون^۱ نیز در محدوده قابل قبول بین ۱ تا ۳ (برای فسفاتاز اسیدی ۲/۱ و برای فسفاتاز قلیایی ۲/۳)، به معنی عدم همبستگی بین باقی‌مانده‌ها، بود. به منظور دستیابی به متغیرهای مهم مؤثر، رگرسیون به صورت نزولی (Backward) انجام گرفت. در اندازه‌گیری فسفاتاز اسیدی، ضریب تبیین به دست آمده $R^2 = 0/71$ در رگرسیون نزولی نشان داد که متغیرهای حذف شده تأثیر چندانی در R^2 مدل نداشتند.

$$\text{ACP} = 1.559 \text{ Oil} + 0.079 \text{ Sand} - 1.128 \text{ EC} + 9.481 \quad R^2 = 0.71 \quad \text{رابطه ۱}$$

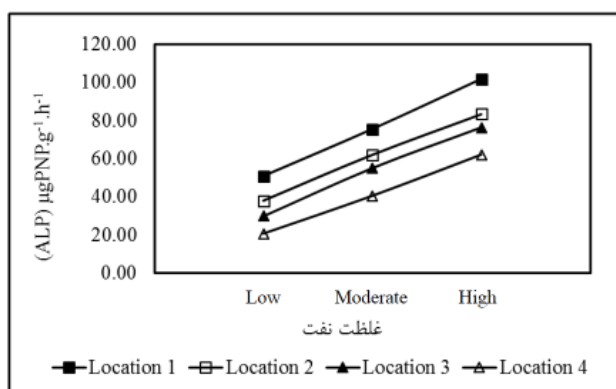
$$\text{ALP} = 2.693 \text{ Oil} + 0.577 \text{ Sand} - 0.777 \quad R^2 = 0.43 \quad \text{رابطه ۲}$$

$$\text{ACP} = 1.866 \text{ Oil} \quad R^2 = 0.67 \quad \text{رابطه ۳}$$

همچنین ضریب تبیین ۷۱ و ۴۳ درصد نیز در روابط ۱ و ۲ به ترتیب به معنای توجیه ۷۱ و ۴۳ درصدی واریانس فسفاتاز اسیدی و قلیایی توسط متغیرهای مستقل ذکر شده است. آنالیز رگرسیون به روش Backward نشان داد که متغیرهای مستقل مهم و تأثیرگذار بر فسفاتاز اسیدی، شامل درصد نفت (Oil)، درصد شن (Sand) و EC و متغیرهای مؤثر در فسفاتاز قلیایی درصد نفت (Oil) و درصد شن (Sand) بود (روابط ۱ و ۲). رابطه ۱ نشان می‌دهد که به ازای یک واحد افزایش درصد نفت، فسفاتاز اسیدی $1/559$ میکروگرم PNP بر گرم خاک در ساعت افزایش می‌یابد. قابل ذکر است در حالتی که تنها درصد نفت به عنوان ورودی مدل تعریف شد ضریب تبیین به دست آمده از $0/71$ به میزان $0/67$ کاهش یافت و این نشان می‌دهد که ۶۷ درصد از واریانس ACP توسط درصد نفت در نمونه خاک‌ها توجیه می‌شود و این حاکی از اثربخشی ترکیبات نفتی و اندازه آن بر ویژگی‌های زیستی خاک به خصوص فعالیت فسفاتازی است.



شکل ۳. میانگین فعالیت فسفاتاز اسیدی (ACP) در چهار مکان نمونه‌برداری با سه سطح آلودگی نفتی (Low، Moderate و High).



شکل ۴. میانگین فعالیت فسفاتاز قلیایی (ALP) در چهار مکان نمونه‌برداری با سه سطح آلودگی نفتی (Low، Moderate و High).

میزان پاسخ فسفاتاز به عوامل استرس‌زا، آن را به شاخص آنزیمی موردبررسی در خاک‌های آلوده به نفت تبدیل کرده است. (Telesinski et al., 2018). در این پژوهش نتایج نشان داد که افزایش غلظت آلاینده‌های نفتی در خاک منجر به تحریک فعالیت فسفاتاز اسیدی و قلیایی شد (جدول ۵).

همانطور که در جدول ۵ نشان داده شده است، بیشترین فعالیت فسفاتاز (اسیدی و قلیایی) در خاک‌های مکان ۱ به دست آمد و بیشترین جمعیت میکروبی نیز در این مکان مشاهده شد. آنزیم فسفاتاز اسیدی نسبت به فسفاتاز قلیایی حساسیت کمتری به حضور نفت دارد، به عبارت دیگر وجود آلاینده‌های نفتی در خاک برای مدت طولانی می‌تواند بر فعالیت این آنزیم اثر تحریک‌کننده داشته باشد (Wyszowski and Wyszowska, 2010) در بسیاری از تحقیقات، افزایش فعالیت فسفاتاز در خاک‌های آلوده به نفت گزارش شده است (Wyszowski et al., 2006; Lipimska et al., 2019; Borowik et al., 2017). افزایش فعالیت فسفاتاز در سطوح مختلف آلودگی نفتی را احتمالاً می‌توان به فعالیت فسفاتازی باکتری‌های رشد یافته در حضور این آلاینده نسبت داد. نتایج این آزمایش نشان داد که فعالیت فسفاتاز قلیایی در چهار مکان نمونه‌برداری بیشتر از فعالیت فسفاتاز اسیدی بود (جدول ۵). همچنین در نمونه خاک‌های مورد مطالعه، pH از ۷/۰۷ در مکان ۴ تا ۷/۲۲ در مکان ۱ متغیر بود (جدول ۱). فعالیت فسفاتاز اسیدی عمدتاً در خاک‌های اسیدی و فعالیت فسفاتاز قلیایی در خاک‌های خنثی یا قلیایی بیشتر است. می‌توان توضیح داد که pH نمونه خاک‌های ما در محدوده خنثی بود و بنابراین فعالیت فسفاتاز اسیدی کمتر از فسفاتاز قلیایی به دست آمد. از طرفی بین درصد کربن آلی و فعالیت فسفاتاز اسیدی ($r=0/724, P<0/01$) و فسفاتاز قلیایی ($r=0/514, P<0/01$) همبستگی مثبت و معنی‌داری به دست آمد (جدول ۴). کربن آلی اثر محرکی بر افزایش متابولیسم میکروارگانیسم‌ها دارد و در نتیجه باعث تحریک سطح فعالیت آنزیم در خاک می‌شود. بسیاری از محققان گزارش کرده‌اند که ترکیبات آلی ممکن است آلاینده‌های آلی را در خاک جذب کنند که می‌تواند اثر سمی آن‌ها را به میزان قابل توجهی بر میکروارگانیسم‌ها کاهش دهد (Tejada et al., 2008, Lipinska et al., 2019).

تحلیل مولفه‌های اصلی (PCA)

برای تعیین میزان تأثیرگذاری متغیرهای فیزیکوشیمیایی و زیستی اندازه‌گیری شده بر تنوع داده‌های به دست آمده، از تحلیل مؤلفه‌های اصلی

(PCA) با به کارگیری نرم افزار آماری SPSS استفاده شد. در این پژوهش مقادیر ویژه بزرگتر از ۱ در نظر گرفته شد و دو مؤلفه اول دارای مقدار ویژه بالاتر از ۱ بودند (جدول ۶). همانطور که در جدول ۶ مشاهده می شود، ۱۱ مؤلفه به دست آمده، کل واریانس داده ها را توجیه می کنند در حالی که ۶۸ درصد از واریانس تراکمی، تنها توسط دو مؤلفه اول قابل توجیه بود.

جدول ۶. مقادیر ویژه، درصد واریانس و درصد واریانس تراکمی برای ۱۱ مؤلفه به دست آمده

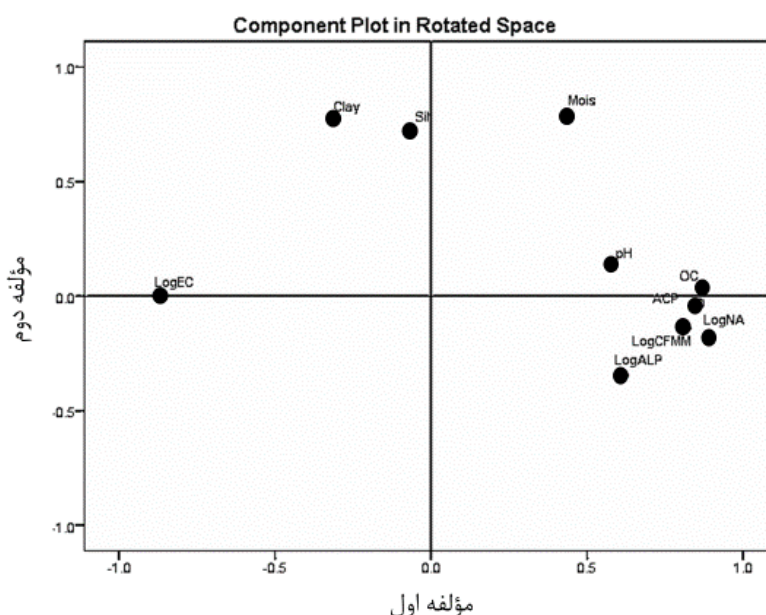
مؤلفه ها	مقدار ویژه	درصد واریانس	درصد واریانس تراکمی
۱	۵/۵۶۲	۵۰/۵۶۲	۵۰/۵۶۲
۲	۱/۹۵۸	۱۷/۸۰۱	۶۸/۳۶۳
۳	۰/۸۸۰	۸/۰۰۴	۷۶/۳۶۷
۴	۰/۷۳۲	۶/۶۵۴	۸۳/۰۲۱
۵	۰/۵۳۷	۴/۸۸۳	۸۷/۹۰۴
۶	۰/۳۷۱	۳/۳۷۶	۹۱/۲۷۹
۷	۰/۳۱۰	۲/۸۲۱	۹۴/۱۰۰
۸	۰/۲۴۲	۲/۱۹۷	۹۶/۲۹۷
۹	۰/۱۹۴	۱/۷۶۱	۹۸/۰۵۹
۱۰	۰/۱۱۸	۱/۰۷۱	۹۹/۱۳۰
۱۱	۰/۰۹۶	۰/۸۷۰	۱۰۰/۰۰۰

آنالیز PCA یک روش برای تجزیه و تحلیل داده های آماری چندمتغیره است که در آن مجموعه ای از داده های خام به تعدادی از مؤلفه های اصلی (PCA) کاهش می یابد و بیشتر واریانس را در داده های اصلی حفظ می کند تا الگوها یا خوشه های احتمالی بین تیمارها و متغیرها را شناسایی کند. جدول ۷ نشان می دهد که برخی متغیرها در هر مؤلفه دارای مقادیر بردارهای ویژه بالاتر از ۰/۵ هستند به عبارت دیگر این متغیرها بیشترین تأثیر را در تنوع بین نمونه خاک های مورد مطالعه دارند (Cox et al., 2003). در مؤلفه اول متغیرهای شیمیایی و زیستی خاک شامل درصد نفت (Oil)، جمعیت میکروبی در محیط کشت های NA (NA) و CFMM (CFMM)، فعالیت فسفاتازهای اسیدی (ACP) و قلیایی (ALP)، pH، EC و درصد کربن آلی (OC) با ضرایب بالاتر از ۰/۵ بیشترین تأثیر را در واریانس نمونه ها به خود اختصاص دادند. همه این متغیرها به غیر از EC دارای ضریب مثبت بودند. ضریب مثبت نشان می دهد که با افزایش این متغیرها، اختلاف بین نمونه های خاک مورد مطالعه نیز افزایش می یابد ولی ضرایب منفی به این معنی است که با افزایش این متغیرها، اختلاف نمونه ها کاهش می یابد (جدول ۷). همچنین در مؤلفه دوم نیز برخی متغیرهای فیزیکی خاک شامل درصد سیلت (Silt)، درصد رس (Clay) و درصد رطوبت (Θ_m) دارای بردارهای ویژه با ضرایب بالاتر از ۰/۵ بودند (جدول ۷). مؤلفه اول به دلیل بالا بودن ضرایب متغیرهای شیمیایی و زیستی، مؤلفه بیوشیمیایی و مؤلفه دوم به دلیل بالا بودن ضرایب متغیرهای فیزیکی خاک، مؤلفه فیزیکی نام گذاری شد. برخی مطالعات انجام شده نتایج مشابهی مبنی بر عدم بازدارندگی آلاینده های نفتی بر فعالیت های میکروبی خاک، گزارش کرده اند (Guo et al., 2012).

جدول ۷. مقادیر بردارهای ویژه پارامترهای مورد بررسی در تجزیه مؤلفه های اصلی (PCA)

متغیرها	مؤلفه ۱	مؤلفه ۲
Oil	۰/۹۱۶	-۰/۱۲۰
EC	-۰/۸۵۸	-۰/۰۱۲
pH	۰/۵۷۱	-۰/۱۸۶
OC	۰/۸۸۹	-۰/۰۲۶
Clay	-۰/۲۵۸	۰/۷۹۱
Silt	-۰/۰۳۷	۰/۷۲۴
Θ_m	۰/۴۸۰	۰/۷۶۴
NA	۰/۸۸۶	-۰/۱۷۱
CFMM	۰/۸۰۶	-۰/۱۴۸
ACP	۰/۸۶۳	-۰/۰۶۸
ALP	۰/۶۱۹	-۰/۳۵۶

نمودار بای پلات نشان می‌دهد که بیشترین اطلاعات در مؤلفه ۱ متمرکز شده است (شکل ۵). متغیرهای پررنگ شده در جدول ۷ منبع اصلی تنوع بین داده‌ها هستند و در نمودار بای پلات نیز بیشترین فاصله را از مرکز دارند. همچنین زاویه کمتر بین متغیرها نشان‌دهنده رابطه قوی و بالاترین همبستگی بین آن‌ها است (شکل ۵). متغیرهای جمعیت میکروبی (NA و CFMM) و درصد نفت (Oil) در سمت راست بای پلات قرار گرفته‌اند و این نشان‌دهنده اثر مثبت نفت بر فعالیت میکروارگانیسم‌هاست. تحلیل مؤلفه‌های اصلی در بسیاری از مطالعات روی خاک‌های آلوده به نفت انجام شده است و در اغلب آن‌ها درصد نفت به عنوان قوی‌ترین عامل تعیین‌کننده تنوع بین داده‌ها بوده است (Nie et al., 2009; Xiao et al., 2016). همچنین Klamerus-Iwan و همکاران (۲۰۱۵) اثرات آلودگی نفتی بر فعالیت‌های آنزیمی و خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک را بررسی کردند و مشاهده کردند که ۷۱ درصد از تغییرات بین داده‌های آن‌ها مربوط به فعالیت‌های آنزیمی مختلف بود.



شکل ۵. پراکنش پارامترهای مورد بررسی بر اساس دو مؤلفه اول و دوم در تحلیل مؤلفه‌های اصلی.

Lipinska et al., (2019) با تحلیل مؤلفه‌های اصلی در بررسی تأثیرات آلودگی هیدروکربن‌ها بر فعالیت آنزیمی خاک گزارش کردند که تمام هیدروکربن‌های آروماتیک اثر محرکی بر فعالیت آنزیم فسفاتاز داشتند که با میزان آلودگی خاک به PAH به طور قابل توجهی افزایش یافت و این موضوع با ضرایب همبستگی مثبت بین درجه آلودگی خاک به PAH و فعالیت فسفاتاز اسیدی تأیید شد. در پژوهش Borowik et al., 2017 نیز نتیجه مشابهی مبنی بر اثرات محرک آلاینده‌های نفتی بر فعالیت فسفاتازی خاک، به دست آمد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه فعالیت آنزیم فسفاتاز به عنوان یک شاخص مهم برای ارزیابی کیفیت خاک‌های آلوده به نفت مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. نتایج آزمایش‌های انجام شده در این تحقیق حاکی از افزایش فراوانی جمعیت میکروبی و فعالیت آنزیم فسفاتاز (اسیدی و قلیایی) بود. اگر آلاینده‌های نفتی به طور طبیعی و طولانی‌مدت در خاک وجود داشته باشند، با گذشت زمان، میکروارگانیسم‌های خاک که توانایی تخریب هیدروکربن‌های نفتی را دارند، در محیط غالب شده و به عبارتی جوامع میکروبی خاک با شرایط آلودگی خاک سازگار می‌شوند. به نظر در ساختار جمعیت میکروبی خاک غالبیت میکروبی با نمونه‌های میکروبی دارای فعالیت فسفاتازی بوده است که این مورد در فعالیت آنزیمی اندازه‌گیری شده نیز عیان می‌باشد. همچنین باتوجه به pH مناسب برای حداکثر فعالیت فسفاتاز اسیدی و قلیایی و اینکه pH نمونه‌های مورد استفاده در این پژوهش در محدوده خنثی بود، مشاهده شد که فعالیت فسفاتاز قلیایی از فسفاتاز اسیدی بیشتر بود.



"هیچ گونه تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد"

منابع

ابراهیمی، میترا؛ فلاح، علیرضا و ساریخانی، محمدرضا (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.

REFERENCES

- Borowik, A., Wyszowska, J. and Wyszowski, M. (2017). Resistance of aerobic microorganisms and soil enzyme response to soil contamination with Ekodiesel Ultra fuel. *Environmental Science and Pollution Research*. 24, 24346- 24363.
- Christopher, S., Hein, P., Marsden, J., and Shurleff, A.S. (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.
- Colombo, C., Palumbo, G., Sannino, F. and Gianfreda, L. (2002). Chemical and biochemical indicators of managed agricultural soils. In 17th World congress of soil science, Bangkok, Thailand. 1740, 1-9.
- Cox, J.F., Blackstone, J. H., and Schleier, J.G. (2003). *Managing operations: A focus on excellence*. Great Barrington, MA: North River Press.
- Dos Santos, H.F., Cury, J.C., Do Carmo, F.L., Dos Santos, A.L., Tiedje, J., Van Elsas, J.D., ... and Peixoto, R.S. (2011). Mangrove bacterial diversity and the impact of oil contamination revealed by pyrosequencing: bacterial proxies for oil pollution. *PloS one*. 6(3), e16943.
- Ebrahimi, M., Fallah, A.R., and Sarikhani, M.R. (2012). Isolation and Identification of Oil-Degrading Bacteria from Oil-Polluted Soils and Assessment of Their Growth in the Presence of Gas Oil. *Water and Soil Science*. 23(1), 109-121. (In Persian).
- Hui, L.I., Zhang, Y., Kravchenko, I., Hui, X.U. and Zhang, C.G. (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.
- Klamerus-Iwan, A., Błońska, E., Lasota, J., Kalandyk, A. and Waligórski, P. (2015). Influence of oil contamination on physical and biological properties of forest soil after chainsaw use. *Water, Air, & Soil Pollution*. 226, 1e 9.
- Liang, Y., Zhang, X., Zhou, J. and Li, G. (2015). Long-term oil contamination increases deterministic assembly processes in soil microbes. *Ecological Applications*. 25(5), 1235-1243.
- Liao, J., Wang, J., Jiang, D., Wang, M.C. and Huang, Y. (2015). Long-term oil contamination causes similar changes in microbial communities of two distinct soils. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 99, 10299-10310.
- Lipińska, A., Kucharski, J., and Wyszowska, J. (2019). Activity of phosphatases in soil contaminated with PAHs. *Water, Air, & Soil Pollution*. 230, 1- 15.
- Margesin, R., Hämmerle, M., and Tscherko, D. (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.
- Martin, A.E., and Reeve, R. (1955). A rapid manometric method for determining soil carbonate. *Soil Science*. 79(3), 187-198.
- Nannipieri, P., Kandeler, E. and Ruggiero, P. (2002). Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. *Enzyme and Microbial Technology*. 1- 33.
- Nie, M., Zhang, X.D., Wang, J.Q., Jiang, L.F., Yang, J., Quan, Z.X., ... and Li, B. (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 & Biochemistry*. 41(12), 2535-2542.
- Rowell, D.L. (1994). *Soil Science: Methods and Applications*. Longman, UK.
- Saadoun, I., Mohammad, M.J., Hameed, K.M., and Shawaqfah, M.A. (2008). Microbial populations of crude oil spill polluted soils at the Jordan-Iraq desert (the Badia region). *Brazilian Journal of Microbiology*. 39, 453-456.
- Sutton, N.B., Maphosa, F., Morillo, J.A., Abu Al-Soud, W., Langenhoff, A.A., Grotenhuis, T., Rijnaarts, H.H., and Smidt, H. (2013). Impact of long-term diesel contamination on soil microbial community structure. *Applied and Environmental Microbiology*. 79(2), 619-630.
- Tabatabai, M.A. (1994). Soil enzymes. *Methods of Soil Analysis: Part 2 Microbiological and Biochemical*

Properties, 5, 775- 833.

- Tejada, M., Gonzalez, J.L., Hernandez, M.T. and Garcia, C. (2008). Application of different organic amendments in a gasoline contaminated soil: effect on soil microbial properties. *Bioresource Technology*. 99(8), 2872- 2880.
- Telesiński, A., Krzyśko-Łupicka, T., Cybulska, K. Wróbel, J. (2018). Response of soil phosphatase activities to contamination with two types of tar oil. *Environmental Science and Pollution Research*. 25, 28642-28653.
- Vincent, A.O., E., Felix., M.O., Weltime., O.K., Ize-iyamu., E.E. and Daniel. (2011). Microbial degradation and its kinetics on crude oil polluted soil. *Research Journal of Chemical Sciences*. 1(6), 8-14.
- Wyszkowska, J. and Wyszkowski, M. (2010). Activity of soil dehydrogenases, urease, and acid and alkaline phosphatases in soil polluted with petroleum. *Environmental Health, Part A*. 73(17-18), 1202- 1210.
- Wyszkowska, J., Kucharsk, I.M., and Kucharski, J. (2006). Application of the activity of soil enzymes in the evaluation of soil contamination by diesel oil. *Polish Journal of Environmental Studies*. 3(15), 501- 506.
- Xiao, K.Q., Li, L.G., Ma, L.P., Zhang, S.Y., Bao, P., Zhang, T., and Zhu, Y.G. (2016). Metagenomic analysis revealed highly diverse microbial arsenic metabolism genes in paddy soils with low-arsenic contents. *Environmental Pollution*. 211, 1- 8.



Changes in the activity of acid and alkaline phosphatase enzymes in oil-contaminated soils

EXTENDED ABSTRACT

Introduction:

One of the most critical environmental pollutants is the presence of oil pollutants in the soil ecosystem, which can affect the soil's physical, chemical, and biological characteristics. Petroleum hydrocarbons are organic and persistent pollutants and can remain in a polluted environment for a long time. Soil microorganisms are in contact with soil particles and are very sensitive to environmental stress, and for this reason, they are considered indicators of soil quality and health. Soil enzymes are susceptible biological indicators that are used to detect and measure the amount and concentration of pollutants in such a way that they are used to detect the initial signs of pollution and the effective removal rate of pollutants and to obtain health and quality. They re-evaluate the soil. Soil phosphatases react very quickly to any disturbances in the biochemical state of the soil. The aim of this research is to investigate the effects of oil pollution on phosphatase activity, the presence or absence of differences between the sampling sites in terms of the measured traits, and the difference between There were different levels of oil pollution.

Materials and Methods:

Soil samples used in this research were taken from the oil-rich area of Naft-Shahr located in the west of Kermanshah province. 30 soil samples were taken from four sampling locations, and out of these 30 samples, 10 soil samples were with low pollution (L), 10 soil samples were with medium pollution (M) and 10 soil samples were with heavy pollution (H). A Soxhlet apparatus was used to determine the concentration of oil pollutants (%Oil) in the soil samples taken according to the UNEP/IOC/IAEA method of the American Environmental Organization (L, M, and H). Some general characteristics of soil were measured based on standard methods. Cultivable microbial population was counted in NA (total population) and CFMM (oil-degrading microbial population). Phosphatase activity (acidic and alkaline) was determined using the method described by Tabatabai, 1994. According to the factors in this experiment, a completely random nested design was used for data analysis through SPSS software. The test factors included sampling location (four locations) and three different levels of oil pollution (L: low, M: moderate, and H: high).

Results and Discussion:

The results showed that with the increase of oil concentration in the soil samples, the activity of acid (ACP) and alkaline phosphatase (ALP) increased. In all soils collected from four locations, ACP was lower than ALP. The highest ACP and ALP were obtained with values of 45.78 and 84.90 (gPNP.g⁻¹.h⁻¹.μ) in H soils, respectively. In the regression analysis, it was observed that the percentage of oil, percentage of sand and EC with the regression coefficient of 0.71 were effective variables in ACP, and also the percentage of oil and sand were the effective variables on ALP with the regression coefficient of 0.43. In the end, PCA analysis was also performed and the results showed that 68% of the variation between the samples could be explained by the first two components (biochemical component and physical component). Petroleum pollutants that are naturally present in the soil for a long time, with the passage of time, lead to the adaptation of microbial communities resistant to pollution, and therefore we will witness an increase in their abundance and the activity of enzymes such as phosphatase. It seems that natural and long-term oil pollution has caused the natural selection of microbial species resistant to these conditions. An increase in oil concentration in soil samples led to an increase in acid and alkaline phosphatase activity, which was related to the phosphatase activity of oil-degrading microorganisms in the soil. Also, according to the appropriate pH for the maximum activity of acid and alkaline phosphatase and that the pH of the samples used in this research was in the neutral range, it was observed that the activity of alkaline phosphatase was higher than that of acid phosphatase.

Conclusion:

If petroleum pollutants exist naturally and long-term in the soil, with the passage of time, soil microorganisms that have the ability to destroy petroleum hydrocarbons dominate in the environment, and in other words, soil microbial communities with soil pollution conditions. They adapt. Therefore, we will see an increase in some microbial activities as well as the abundance of the microbial population. The results of the experiments conducted in this research also indicated an increase in microbial abundance and the measurement of phosphatase enzyme activity (acidic and alkaline).

Keywords: CFMM, Soil, Hydrocarbon, Enzyme Activity.