



Publisher: Soil Science Society of Iran

Journal of Soil Biology<https://sbj.areeo.ac.ir/>**Research article**

The impact of soil moisture on the bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by bacterial strains

Reza Mohammadikia^{1*}, Alireza Fallah Nosratabad², and Bahman Khoshrou³ 

1-Researcher, Department of On-Farm Water Management Research, Soil and Water Research Institute (SWRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Email: swirm@yahoo.com

2-Professor, Department of Biology and Biotechnology Research, Soil and Water Research Institute (SWRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Email: a.r.fallah1350@gmail.com

3-Postdoctoral Researcher, Department of Biology and Biotechnology Research, Soil and Water Research Institute (SWRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Email: bahmankhoshrou@yahoo.com

Article Info

Extended Abstract

Received: 2025-07-16

Accepted: 2025-09-09

Keywords:

Microbial Remediation,
Soil Moisture,
Polycyclic Aromatic
Hydrocarbons (PAHs),
Oil Pollution,
Biodegradation

Corresponding author's email:

swirm@yahoo.com

DOI:

10.22092/SBJ.2025.3700
68.282

Background and Objectives: Soil contamination by petroleum hydrocarbons, particularly Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), due to industrial activities, poses significant environmental and health risks. PAHs are persistent, toxic organic compounds, and their presence in soil alters its physicochemical and biological properties, threatening ecosystem health and food security. Bioremediation, utilizing microorganisms to degrade pollutants, offers an eco-friendly and cost-effective solution. The efficacy of bacterial degradation of PAHs is, however, critically influenced by environmental factors, especially soil moisture, which affects microbial activity, nutrient and oxygen availability, and pollutant accessibility. While optimal moisture is known to enhance degradation, a comprehensive understanding of the interactive effects of specific bacterial strains and varying moisture levels on PAH bioremediation remains incomplete. This study aimed to address this gap by investigating the effects of different soil moisture levels and three selected bacterial strains on PAH bioremediation in a contaminated loamy-clay soil under laboratory conditions. The main hypothesis was that both bacterial strain type and soil moisture level, along with their interaction, would significantly impact PAH degradation efficiency.

Materials and Methods: A factorial pot experiment based on a Randomized Complete Block Design (RCBD) with three replicates was conducted. Treatments included four bacterial applications (three individual strains: *Pseudomonas alcaligenes* (B1), *Pseudomonas stutzeri* (B2), *Enterobacter cloacae* (B3); and an uninoculated control (B0)) and four soil moisture levels. Surface soil (0–30 cm) from an oil-contaminated site near Tehran refinery was sieved, characterized (loamy-clay), and autoclaved at 121°C for 60 minutes. Bacterial strains were cultured in Nutrient Broth, harvested, washed, and resuspended to an OD600 of 0.7 (approx. $1.5\text{--}2.8 \times 10^8$ CFU/mL). Thirty mL of inoculum (or sterile water for control) were added to each pot. The four moisture levels were: I1 (30% depletion of available water, AWC), I2 (50% AWC depletion), I3 (70% AWC depletion), and I4 (90% AWC depletion), maintained daily by weighing. Pots were kept at $25 \pm 2^\circ\text{C}$. After a 20-

day bacterial stabilization period, the moisture levels were imposed for 65 days. Bacterial populations were enumerated (CFU/g dry soil) on Nutrient Agar. Concentrations of 14 target PAHs were determined by HPLC (Agilent 1260, fluorescence detector, C18 column) following USEPA method 8310 after Soxhlet extraction (hexane/acetone 1:1) and silica/alumina column cleanup. Data were analyzed by two-way ANOVA, and means were compared by Duncan's Multiple Range Test ($P \leq 0.05$) using SAS and SPSS software.

Results: The initial concentration of total PAHs in the soil was 33.4 mg/kg, classifying it as highly contaminated. Fluoranthene was the dominant compound among the 14 PAHs analyzed. Total bacterial populations did not show significant changes across treatments throughout the experiment. However, the performance of the inoculated strains in reducing PAH concentrations was notable; treatments with *P. alcaligenes* (B1) and *E. cloacae* (B3) achieved total PAH reductions of 45.65% and 50.57%, respectively, although these differences were not statistically significant ($P > 0.05$). In contrast, soil moisture had a statistically significant effect ($P < 0.05$), with the highest PAH reduction (56.8%) observed in the optimal moisture treatment (I1). Analysis of individual compounds revealed that lighter PAHs, such as phenanthrene and fluorene, were more biodegradable. Conversely, the concentrations of heavier and more complex compounds like benzo(a)pyrene increased in some treatments, likely due to the incomplete degradation of larger molecules.

Conclusion: The present study demonstrated that soil moisture is the main determining factor in enhancing the biodegradation efficiency of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), with the greatest reduction of contaminants observed at moisture levels close to field capacity. Optimal moisture improves soil aeration, increases contaminant mobility, and provides a suitable environment for microbial activity, thereby facilitating effective degradation of pollutants. Regarding bacterial strains, *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas alcaligenes* exhibited a high potential in reducing PAH concentrations, highlighting the importance of functional capacity and adaptability of microorganisms rather than merely their population size. However, the observed increase in the concentration of certain toxic compounds in some treatments raises the possibility of incomplete degradation and the formation of hazardous intermediates. Overall, successful microbial remediation of petroleum-contaminated soils requires simultaneous consideration of optimal moisture, effective microbial strain selection, and precise monitoring of contaminant behavior. Future studies should employ more specific indicators such as catabolic genes and bioavailability assays, and also take into account the impact of soil sterilization on contaminant structure and bioavailability. It should be noted that although soil autoclaving in this study was necessary to accurately assess the performance of inoculated strains, it may have influenced the initial bioavailability of PAHs.

Cite this article: Mohammadikia, R., Fallah Nosratabad, A., Khoshrou, B., 2025. The impact of soil moisture on the bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by bacterial strains. *Soil Biology*, 13 (1), 107-125.



DOI: 10.22092/SBJ.2025.370068.282

Publisher: Soil Science Society of Iran



مقاله پژوهشی

تأثیر رطوبت خاک بر تخریب زیستی هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای (PAHs) توسط سویه‌های باکتریایی

رضا محمدی کیا^{۱*}، علیرضا فلاح نصرت‌آباد^۲ و بهمن خوشرو^۳ 

محقق بخش تحقیقات مدیریت آب در مزرعه، مؤسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. swirm@yahoo.com

استاد، بخش تحقیقات بیولوژی و بیوتکنولوژی، مؤسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. a.r.fallah1350@gmail.com

محقق پسادکتر، بخش تحقیقات بیولوژی و بیوتکنولوژی، مؤسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

bahmankhoshru@yahoo.com

دریافت: ۱۴۰۴/۴/۲۵ پذیرش: ۱۴۰۴/۶/۱۸

چکیده

آلودگی خاک با هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای (PAHs) به دلیل پایداری بالا، سمیت زیاد و تجمع زیستی، یکی از چالش‌های زیست‌محیطی مهم به‌شمار می‌رود. پالایش میکروبی با بهره‌گیری از ریزجانداران تجزیه‌کننده، روشی مؤثر و پایدار برای کاهش این آلاینده‌ها محسوب می‌شود. در این پژوهش، تأثیر سطوح مختلف رطوبت خاک با چهار سطح از تخلیه آب آبیاری به مقدار ۳۰٪، ۵۰٪، ۷۰٪ و ۹۰٪ آب قابل استفاده و سه سویه باکتریایی منتخب (*Pseudomonas alcaligenes*، *Pseudomonas stutzeri* و *Enterobacter cloacae*) بر کارایی تخریب زیستی PAHs در یک خاک لوم‌رسی آلوده به مواد نفتی، در شرایط آزمایشگاهی و در قالب طرح فاکتوریل با پایه بلوک‌های کامل تصادفی (RCBD) در سه تکرار انجام گرفت. نتایج نشان داد که رطوبت خاک اثر معناداری بر کاهش غلظت کل PAHs داشت ($P < 0.05$) و بیشترین کاهش غلظت (۵۶/۸٪) در رطوبت نزدیک به ظرفیت زراعی مشاهده شد. اگرچه اثر آماری سویه‌های باکتری بر کاهش غلظت کل PAHs در سطح پنج درصد معنی‌دار نشد، اما کاهش‌های مشاهده‌شده (۴۵ تا ۵۱ درصد) از نظر زیستی و کاربردی قابل توجه بوده و نشان‌دهنده پتانسیل این سویه‌ها است. یافته‌ها بر اهمیت بهینه‌سازی هم‌زمان شرایط محیطی و انتخاب سویه‌های میکروبی مناسب در افزایش اثربخشی پالایش میکروبی تأکید دارند.

واژه‌های کلیدی: آلودگی نفتی، باکتری‌های تجزیه‌کننده PAHs، پالایش میکروبی، ریزجانداران تجزیه‌کننده.

استناد: محمدی کیا، ر.، فلاح نصرت‌آباد، ع.، خوشرو، ب.، ۱۴۰۴. تأثیر رطوبت خاک بر تخریب زیستی هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای (PAHs)

توسط سویه‌های باکتریایی. مقاله پژوهشی، نشریه زیست‌شناسی خاک، ۱۳(۱)، ۱۰۷-۱۲۵.

مقدمه

فعالیت‌های روزافزون صنعتی، توسعه صنایع پتروشیمی، گسترش حمل‌ونقل و استخراج گسترده نفت و گاز، منجر به ورود مقادیر قابل توجهی از آلاینده‌های نفتی به محیط‌زیست، به‌ویژه خاک، شده است. در این میان، هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای (PAHs)، به‌عنوان گروهی از ترکیبات آلی سمی و پایدار، به دلیل خطرات بالقوه‌شان اهمیت ویژه‌ای یافته‌اند. این ترکیبات، که عمدتاً حاصل احتراق ناقص سوخت‌های فسیلی و فرآیندهای صنعتی هستند، از دو یا چند حلقه بنزنی متصل به هم تشکیل شده‌اند. ویژگی‌هایی نظیر پایداری شیمیایی بالا، فشار بخار پایین و انحلال‌پذیری ناچیز در آب، موجب ماندگاری طولانی‌مدت آن‌ها در خاک و آب می‌شود (Chen et al., 2023; US EPA, 2017). علاوه بر این، مطالعات سم‌شناسی نشان داده‌اند که بسیاری از PAHs دارای اثرات سرطان‌زایی، جهش‌زایی و اختلال در عملکرد سیستم غدد درون‌ریز هستند و می‌توانند در زنجیره‌های غذایی تجمع یابند. از این‌رو، آلودگی خاک با این ترکیبات نه تنها مخاطره‌ای جدی برای محیط زیست، بلکه تهدیدی برای سلامت عمومی و امنیت غذایی نیز محسوب می‌شود (Zeynali et al., 2024).

ورود ترکیبات نفتی به خاک، پیامدهای عمیقی بر خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و زیستی آن بر جای می‌گذارد. Ali و همکاران (2023) در یک بررسی جامع نشان دادند که آلودگی به هیدروکربن‌های نفتی می‌تواند منجر به تخریب ساختار خاک، انسداد خلل و فرج، کاهش ظرفیت نگهداری آب و محدودیت در نفوذ آب و تبادل گازی شود. این تغییرات فیزیکی، به‌ویژه با ایجاد پدیده آب‌گریزی، در نهایت به کاهش فعالیت‌های زیستی در ناحیه ریشه‌گاه (ریزوسفر) منجر می‌شود. (Zeynali et al., 2025) از نظر شیمیایی، مطالعات جدید همچنان تأیید می‌کنند که آلودگی نفتی قادر است pH خاک را تغییر داده،

فراهمی عناصر غذایی ضروری نظیر نیتروژن و فسفر را کاهش دهد و حتی منجر به افزایش غلظت ترکیبات سمی در خاک گردد (Ali et al., 2023). علاوه بر این، همانطور که Nkwe و همکاران (2024) نیز به تفصیل بررسی کرده‌اند، تنوع و جمعیت ریزجانداران سودمند خاک و همچنین فعالیت آنزیم‌های کلیدی خاک به شدت تحت تأثیر این آلاینده‌ها قرار می‌گیرد که این امر می‌تواند فروپاشی چرخه‌های زیست‌شیمیایی ضروری خاک را در پی داشته باشد (Moradi et al., 2024). Sharma و همکاران (2023) نیز اشاره می‌کنند که چنین شرایط نامساعدی، به‌ویژه در مناطق کشاورزی یا اراضی مجاور تأسیسات نفتی، به‌طور مستقیم عملکرد اکولوژیکی و حاصل‌خیزی خاک را تهدید کرده و رشد و سلامت گیاهان را با محدودیت جدی مواجه می‌سازد. این مجموعه اثرات نامطلوب، ضرورت توسعه و به‌کارگیری روش‌های پاکسازی مؤثر و پایدار برای خاک‌های آلوده را دوچندان می‌کند.

در میان روش‌های موجود برای مقابله با آلودگی نفتی خاک، پالایش میکروبی^۲ به‌عنوان راهکاری طبیعت‌محور، سازگار با محیط زیست، مقرون‌به‌صرفه و مؤثر، مورد توجه گسترده قرار گرفته است؛ Sharma و همکاران (2023) نیز بر اهمیت و چشم‌انداز مثبت این رویکردها تأکید دارند. این فناوری بر توانایی ذاتی ریزجانداران در استفاده از آلاینده‌های آلی به‌عنوان منبع کربن و انرژی استوار است. باکتری‌ها، قارچ‌ها و حتی برخی گیاهان قادرند از طریق سامانه‌های آنزیمی اختصاصی خود، ساختارهای پیچیده PAHs را شکسته و آن‌ها را به ترکیبات ساده‌تر، با سمیت کمتر یا کاملاً بی‌خطر تبدیل کنند (Akinpelu et al., 2024). در این میان، باکتری‌های بومی که با شرایط ویژه خاک آلوده سازگار شده‌اند، نقش کلیدی در تسریع فرآیند تخریب زیستی آلاینده‌ها ایفا می‌کنند. پژوهش‌های جدیدتر همچنان بر کارایی ریزجانداران تأکید دارند؛ برای

^۲ Bioremediation^۱ Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

مطالعات اخیر نشان داده‌اند که شرایط خاک (شوری، قلیائیت و بافت) تأثیر چشمگیری بر موفقیت پالایش میکروبی دارد. به‌عنوان نمونه، Hashemi و همکاران (2025) گزارش کردند که در خاک‌های شور-سدیمی آهکی، استفاده از کنسرسیوم هالوفیل موجب تجزیه سریع فنانترن شد. همچنین Zeynali و همکاران (2024) نشان دادند که گونه‌های *Bacillus* می‌توانند به‌طور مؤثر در کاهش آلودگی‌های نفتی نقش‌آفرینی کنند.

با وجود پیشرفت‌های اخیر، مطالعات اندکی به بررسی هم‌زمان اثر رطوبت و سویه‌های باکتری بر تخریب طیف وسیعی از PAHs، به‌ویژه در خاک‌های لوم‌رسی آلوده پرداخته‌اند. علاوه‌براین، در مواردی ممکن است اثر آماری سویه‌های میکروبی معنی‌دار نباشد ولی کاهش‌های قابل توجهی از نظر زیستی مشاهده شود که می‌تواند برای کاربرد عملی مهم باشد (Haritash & Kaushik, 2009; Viñas et al., 2005).

بنابراین، شکاف تحقیقاتی موجود در زمینه درک اثرات متقابل این عوامل کلیدی، به‌ویژه در مورد کارایی سویه‌های باکتریایی کمتر شناخته‌شده در شرایط رطوبتی متفاوت، همچنان احساس می‌شود.

بر این اساس، پژوهش حاضر با هدف اصلی بررسی تأثیر رژیم‌های مختلف رطوبتی خاک و سه سویه باکتریایی منتخب بر کارایی تخریب زیستی هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای (PAHs) در یک خاک لوم‌رسی آلوده و در شرایط کنترل‌شده آزمایشگاهی طراحی و اجرا گردید. فرضیه اصلی این بود که هم نوع سویه باکتریایی و هم سطح رطوبت خاک و همچنین اثر متقابل آن‌ها، کارایی تجزیه PAHs را تحت تأثیر قرار خواهند داد. وجه تمایز این پژوهش، بررسی هم‌زمان چندین سطح رطوبتی و مقایسه کارایی سه سویه باکتری (که یکی از آن‌ها، *Enterobacter cloacae* کمتر در مطالعات مشابه پالایش میکروبی PAHs مورد توجه قرار گرفته) در تجزیه طیف وسیعی از ترکیبات PAHs و همچنین ارزیابی تغییرات جمعیت باکتریایی در این شرایط است. انتظار می‌رود

مثال، Singh و Fulekar (2024) در بررسی پیشرفت‌های اخیر، به تفصیل نقش جنس‌های مختلف باکتریایی از جمله *Bacillus*، *Pseudomonas* و سایرین را در تجزیه هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای و مسیرهای آنزیمی آن‌ها (شامل مونواکسیژنازها و دی‌اکسیژنازها) تشریح کرده‌اند. پالایش میکروبی همچنین می‌تواند در تلفیق با سایر روش‌های اصلاحی مانند تثبیت شیمیایی، شست‌وشوی خاک یا گیاه‌پالایی، عملکرد بهتری از خود نشان دهد، موضوعی که Kumar و همکاران (2023) در بررسی فناوری‌های ترکیبی پالایش میکروبی به آن پرداخته‌اند.

موفقیت فرآیند پالایش میکروبی به عوامل محیطی متعددی وابسته است که از میان آن‌ها، رطوبت خاک یکی از پارامترهای بحرانی و تعیین‌کننده به‌شمار می‌رود. Wang و همکاران (2024) در بررسی خود بر تنظیم رطوبت خاک در پالایش میکروبی، تأکید می‌کنند که ریزجانداران تجزیه‌کننده برای فعالیت‌های زیستی خود، از جمله جذب مؤثر مواد مغذی و اکسیژن و پیشبرد فرآیندهای متابولیکی، به مقدار مشخصی آب نیاز دارند. کاهش بیش‌ازحد رطوبت، منجر به غیرفعال شدن یا حتی مرگ سلول‌های باکتریایی و کاهش شدید فعالیت آنزیمی آن‌ها می‌شود. در مقابل، افزایش بیش‌ازحد رطوبت و اشباع شدن خاک، با محدود کردن تبادل گاز و ایجاد شرایط بی‌هوازی، توان تجزیه هوازی بسیاری از ترکیبات نفتی را به‌شدت کاهش می‌دهد (Wang et al., 2024). Li و همکاران (2023) نیز در مرور عوامل کلیدی مؤثر بر پالایش میکروبی خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی، بیان می‌کنند که رطوبت بهینه برای این فرآیند معمولاً در بازه ۵۰ تا ۸۰ درصد ظرفیت نگهداری آب خاک (ظرفیت مزرعه) قرار دارد. این دامنه رطوبتی، دسترسی مناسب به اکسیژن و مواد غذایی و تحرک میکروبی مطلوب را فراهم آورده و به افزایش بازدهی فرآیند پالایش میکروبی کمک می‌کند. بنابراین، کنترل دقیق و مدیریت رطوبت در عملیات پالایش میکروبی، به‌ویژه در شرایط مزرعه‌ای، از اهمیت بسزایی برخوردار است.

یافته‌های این مطالعه، اطلاعات کاربردی و سودمندی برای انتخاب شرایط بهینه و سویه‌های میکروبی مناسب در طراحی و اجرای پروژه‌های احیای خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی فراهم آورد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه با هدف بررسی اثر متقابل رژیم‌های مختلف رطوبتی خاک و سویه‌های باکتری بر کارایی تخریب زیستی هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای (PAHs)، در شرایط کنترل‌شده گلدانی (گلخانه‌ای) و بدون حضور گیاه طراحی و اجرا شد. آزمایش در قالب طرح فاکتوریل و در پایه بلوک‌های کامل تصادفی (RCBD) با چهار سطح باکتری (شامل سه سویه باکتری تجزیه‌کننده و یک تیمار شاهد بدون تلقیح) و چهار سطح رژیم رطوبتی، در سه تکرار انجام گرفت.

نمونه‌برداری و آماده‌سازی خاک

نمونه‌برداری از خاک سطحی (عمق ۳۰-۰ سانتی‌متر) از نواحی اطراف پالایشگاه تهران (ایران)، که دارای سابقه آلودگی با نفت خام بودند، صورت گرفت. نمونه‌ها پس از جمع‌آوری، به آزمایشگاه منتقل شده و با دقت، مخلوط و از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شدند تا یکنواخت و همگن گردند. ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی اولیه خاک شامل بافت، pH (با استفاده از pH متر در نسبت خاک به آب ۲:۱/۵)، هدایت الکتریکی (EC) (با استفاده از EC متر در عصاره اشباع)، درصد مواد آلی (با استفاده از روش Walkley-Black)، ظرفیت نگهداری آب (FC^*) و نقطه پژمردگی دائم (PWP^*) (به روش صفحه‌فشاری) تعیین گردید (Page et al., 1982; Sparks et al., 1996; Dane and Topp, 2002). به منظور کاهش جمعیت میکروبی بومی و جلوگیری از تداخل با سویه‌های

تلقیح‌شده، خاک‌های مورد استفاده به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شدند. سپس، خاک‌ها به حجم مناسب (یک کیلوگرم خاک خشک) در گلدان‌های پلاستیکی با زهکشی مناسب (مجهز به سوراخ‌های زهکش در کف) ریخته شدند.

منبع، شناسایی و غربالگری سویه‌های باکتریایی

سه سویه باکتریایی مورد استفاده در این پژوهش، جدایه‌های بومی^۵ هستند که طی یک مطالعه جامع از خاک‌های آلوده به مواد نفتی در استان بوشهر ایران جداسازی و شناسایی شدند (Ebrahimi, 2010). شناسایی نهایی این سویه‌ها به روش مولکولی (توالی‌یابی ژن 16S rRNA) انجام شده است. لازم به توضیح است که اگرچه توالی ژن این جدایه‌ها برای تأیید هویت در پایگاه داده NCBI جستجو (BLAST) گردید، اما این توالی‌ها در پایگاه مذکور ثبت نشده و در نتیجه فاقد کد دسترسی رسمی می‌باشند؛ از این رو، در این پژوهش با کدهای داخلی PDB15 (*Pseudomonas alcaligenes*)، PDB16 و PDB18 (*Enterobacter cloacae*) و *Pseudomonas stutzeri* به آن‌ها ارجاع داده می‌شود. انتخاب این سویه‌ها بر اساس یک فرآیند غربالگری دو مرحله‌ای صورت گرفت؛ در مرحله اول (غنی‌سازی)، توانایی رشد آن‌ها در محیط کشت حداقل مایع (CFMM) با گازوئیل (۲٪) به عنوان تنها منبع کربن و انرژی تأیید شد و در مرحله دوم (غربالگری تکمیلی)، عملکرد آن‌ها بر روی محیط کشت حداقل جامد حاوی ترکیبات آروماتیک اختصاصی شامل فنانترون (۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و تولوئن (۱٪) ارزیابی گردید. ویژگی‌های کلیدی این سه سویه در جدول ۱ خلاصه شده است.

^۵ Indigenous

^۶ Field Capacity

^۷ Permanent Wilting Point

جدول ۱- ویژگی‌های کلیدی سه سویه باکتریایی منتخب مورد استفاده در پژوهش (Ebrahimi, 2010)

کد سویه	شناسایی نهایی	شکل باکتری	رنگ‌آمیزی گرم	تست اسپور	تست کاتالاز	تست اکسیداز	رشد روی فنانترن	رشد روی تولوئن
PDB15	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	کوکوباسیل	منفی	منفی	مثبت	مثبت	رشد نکرده	متوسط
PDB16	<i>Enterobacter cloacae</i>	باسیل	منفی	منفی	مثبت	منفی	ضعیف	رشد نکرده
PDB18	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	باسیل	منفی	منفی	مثبت	مثبت	خوب	متوسط

آماده‌سازی تلقیح

سویه‌ها در محیط کشت NB^{*} کشت داده شدند. کشت‌ها به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۵۰ دور در دقیقه (rpm) در شیکر انکوباتور نگهداری شدند تا به فاز لگاریتمی رشد خود برسند. پس از کشت، سوسپانسیون باکتری با سانتریفیوژ (۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه) جمع‌آوری شده و سلول‌ها با محلول استریل نمکی (۰/۸۵٪ NaCl) شست‌وشو داده شدند تا محیط کشت اولیه جایگزین گردد. در نهایت، غلظت هر سویه با تنظیم چگالی نوری (OD[†]) در طول موج ۶۰۰ نانومتر (OD600) به حدود ۰/۷ رسانده شد، که معادل تقریبی $1/5 \times 10^9$ تا $2/8 \times 10^9$ واحد تشکیل‌دهنده کلونی در میلی‌لیتر (CFU/mL) بود. سپس، ۳۰ میلی‌لیتر از هر سوسپانسیون باکتری به گلدان‌های مربوطه تلقیح گردید. در تیمار شاهد (B0)، به‌جای سوسپانسیون باکتری، ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه شد.

تیمارهای آبیاری

چهار سطح مدیریت آبیاری برای بررسی تأثیر رطوبت بر تخریب زیستی PAHs در نظر گرفته شد:

I1: تخلیه ۳۰٪ از آب قابل استفاده (معادل پتانسیل ماتریک منفی ۰/۸ بار)

I2: تخلیه ۵۰٪ از آب قابل استفاده (معادل پتانسیل ماتریک منفی ۱/۵ بار)

I3: تخلیه ۷۰٪ از آب قابل استفاده (معادل پتانسیل ماتریک

منفی ۲/۵ بار)

I4: تخلیه ۹۰٪ از آب قابل استفاده (معادل پتانسیل ماتریک

منفی ۸ بار)

برای اعمال دقیق رژیم‌های رطوبتی، ابتدا وزن خاک خشک در هر گلدان تعیین شد. سپس، بر اساس ظرفیت نگهداری آب در مزرعه (FC) و نقطه پژمردگی دائم (PWP) خاک، میزان آب قابل استفاده (AWC[^]) محاسبه گردید (FC-PWP=AWC). رطوبت هر گلدان به‌صورت روزانه با توزین دقیق پایش شده و هر روز آب مقطر استریل به میزان تبخیر شده یا مصرف شده اضافه می‌شد تا وزن و در نتیجه رطوبت خاک در سطح هدف هر تیمار ثابت بماند. گلدان‌ها در یک اتاق رشد با دمای کنترل‌شده 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی 60 ± 5 ٪ نگهداری شدند.

دوره تیمار و نمونه‌برداری

پس از تلقیح باکتری‌ها، یک دوره تثبیت ۲۰ روزه برای استقرار و سازگاری باکتری‌ها در خاک در نظر گرفته شد. طی این دوره، رطوبت تمام گلدان‌ها در سطح بهینه (AWC ۶۰٪) حفظ شد و هر سه روز یک‌بار، ۱۰۰ میلی‌لیتر آب استریل برای اطمینان از رطوبت کافی اضافه گردید. پس از این دوره، گلدان‌ها وارد مرحله اصلی اعمال رژیم‌های رطوبتی شده و به مدت ۶۵ روز تحت شرایط آزمایشی قرار گرفتند. نمونه‌برداری دوره‌ای از خاک هر گلدان، در روزهای ۳۲، ۴۵ و ۶۷ پس از آغاز اعمال

[^] Available Water Content

^{*} Nutrient Broth

[†] Optical Density

رژیم‌های رطوبتی صورت گرفت. در هر مرحله نمونه‌برداری، از هر تیمار، یک گلدان به طور کامل برای آنالیزهای نهایی برداشت و حذف شد. نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده بلافاصله به آزمایشگاه منتقل و برای تجزیه‌های میکروبی و شیمیایی در فریزر با دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد (تا زمان تجزیه) نگهداری گردیدند.

تجزیه‌های میکروبی و شیمیایی

الف) اندازه‌گیری جمعیت باکتری‌ها

جمعیت باکتری کل در خاک هر گلدان با استفاده از روش سریال رقت‌ها^۹ و شمارش کلونی (CFU/g خاک) بر روی محیط کشت (NA^{۱۰}) اندازه‌گیری شد (Alef and Nannipieri, 1995). برای این منظور، ۱۰ گرم از نمونه خاک برداشته و در ۹۰ میلی‌لیتر محلول نمکی استریل (NaCl ۰/۰۸۵٪) رقیق شد. سپس، رقت‌های متوالی از ۱۰^{-۱} تا ۱۰^{-۷} تهیه گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های پایانی (که منجر به شمارش ۳۰ تا ۳۰۰ کلونی در پلیت شود) روی پلیت‌های NA کشت داده شده و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس، تعداد کلونی‌ها شمارش و بر حسب CFU/g خاک خشک گزارش گردید.

ب) استخراج و تجزیه PAHs

غلظت ترکیبات PAHs شامل ۱۵ ترکیب هدف (Naphthalene, Acenaphthene, Fluorene, Phenanthrene, Anthracene, Fluoranthene, Pyrene, Benzo(a)Anthracene, Chrysene, Benzo(k)Fluoranthene, Benzo(b)Fluoranthene, Benzo(a)Pyrene, Dibenzo(a, h)Anthracene و Perylene (Benzo(ghi) با استفاده از دستگاه

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC^{۱۱}) و مطابق با پروتکل استاندارد USEPA 8310 تعیین گردید (U.S. EPA, 1996). ابتدا، ۱۰ گرم از نمونه خاک خشک شده از الک دو میلی‌متری عبور داده شد. سپس، PAHs با استفاده از روش استخراج سوکسله^{۱۲} با ۲۵۰ میلی‌لیتر مخلوط حلال‌های هگزان/استون (۱:۱ v/v) به مدت ۱۲ ساعت استخراج شدند. پس از استخراج، عصاره‌های حاصل برای حذف مواد مزاحم از طریق ستون‌های پاکسازی سیلیکاژل/آلومینا پاکسازی شدند. ستون‌ها با پنج گرم سیلیکاژل (فعال شده در ۱۸۰ °C به مدت ۱۲ ساعت) در پایین و پنج گرم آلومینا (خنثی، فعال شده در ۱۸۰ °C به مدت ۱۲ ساعت) در بالا پر شدند. سپس، عصاره از ستون عبور داده شده و با ۵۰ میلی‌لیتر مخلوط حلال هگزان/استون (۱:۹ v/v) شست‌وشو داده شد. در نهایت، عصاره‌های پاکسازی‌شده توسط یک تبخیرکن چرخان^{۱۳} تا حجم یک میلی‌لیتر تغلیظ شدند. آنالیز نهایی با دستگاه HPLC (Agilent 1260 Infinity II HPLC System) مجهز به شناساگر فلورسانس^{۱۴} انجام شد. ستون C18^{۱۵} با ابعاد ۲۵۰ میلی‌متر طول و ۴/۶ میلی‌متر قطر داخلی و اندازه ذرات ۵ میکرومتر و فاز متحرک شامل گرادایانت متانول و آب با سرعت جریان یک میلی‌لیتر بر دقیقه مورد استفاده قرار گرفت. حجم تزریق نمونه ۲۰ میکرولیتر بود. شناسایی PAHs بر اساس زمان بازداری^{۱۶} و کمی‌سازی آن‌ها با استفاده از منحنی‌های کالیبراسیون استاندارد PAHs با غلظت‌های مشخص انجام شد.

تحلیل آماری

داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده از نرم‌افزارهای آماری SAS (نسخه ۹/۴) و SPSS (نسخه ۲۶) تجزیه و تحلیل شدند. برای بررسی اثرات اصلی

^{۱۳} Rotary Evaporator

^{۱۴} Fluorescence Detector

^{۱۵} 250 mm × 4.6 mm, 5 µm particle size

^{۱۶} Retention Time

^۹ Serial dilution technique

^{۱۰} Nutrient Agar

^{۱۱} High-performance liquid chromatography

^{۱۲} Soxhlet extraction

نتایج و بحث

مشخصات فیزیکی و شیمیایی خاک آزمایشی

جدول ۲ مشخصات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در این مطالعه را نمایش می‌دهد. نمونه خاک با بافت لوم‌رسی و ظرفیت بالای نگهداری آب، از عمق ۳۰-۰ سانتی‌متری اراضی اطراف پالایشگاه تهران برداشت شد. این خاک به دلیل بافت مناسب خود (۳۳٪ شن، ۳۵٪ سیلت و ۳۲٪ رس) و ظرفیت نگهداری آب قابل قبول (ظرفیت زراعی ۲۳٪ وزنی و نقطه پژمردگی دائم ۱۲٪ وزنی)، بستر مناسبی برای مطالعه فرآیندهای پالایش میکروبی و رشد ریزجانداران فراهم می‌آورد. همچنین، میزان کربنات کلسیم معادل ۱۳/۴٪، هدایت الکتریکی عصاره اشباع ۷/۴ دسی‌زیمنس بر متر و آلودگی نفتی با غلظت کل ۳۳/۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم از دیگر ویژگی‌های مهم این خاک است که بر فعالیت میکروبی و حرکت آلاینده‌ها تأثیرگذار بود.

باکتری‌ها و رژیم‌های رطوبتی و همچنین اثر متقابل آن‌ها بر میزان تخریب PAHs، از تجزیه و تحلیل واریانس دوعاملی^{۱۷} استفاده گردید. به‌منظور نمایش تغییرات درصد غلظت ترکیبات PAHs در تیمارهای مختلف باکتریایی، از نقشه حرارتی (Heatmap) استفاده شد. در این نمودار، ترکیبات مختلف PAHs در محور عمودی و سویه‌های باکتریایی و رژیم‌های رطوبتی در محور افقی قرار گرفتند. رنگ‌ها بیانگر میزان تغییر غلظت بودند؛ به‌طوری‌که رنگ‌های قرمز نشان‌دهنده افزایش غلظت، و رنگ‌های خاکستری بیانگر کاهش غلظت ترکیبات نسبت به نمونه شاهد بودند. شدت رنگ متناسب با مقدار تغییر (کاهش یا افزایش) تنظیم شد. این نوع نمایش داده‌ها امکان مقایسه سریع و بصری تأثیر تیمارهای مختلف بر ترکیبات PAHs را فراهم می‌سازد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح معناداری پنج درصد انجام گرفت و نمودارهای مقاله با استفاده از کتابخانه Seaborn در زبان برنامه‌نویسی پایتون رسم گردید.

جدول ۲- برخی خصوصیات خاک محل آزمایش

منطقه	بافت	درصد شن	درصد سیلت	درصد رس	PWP (%)	FC (%)	کربنات کلسیم معادل (%)	هدایت الکتریکی عصاره اشباع (dS/m)	غلظت اولیه PAHs در خاک (mg/Kg)
اطراف پالایشگاه تهران	لوم رسی	۳۳	۳۵	۳۲	۱۲	۲۳	۱۳/۴	۷/۴	۳۳/۴

غلظت اولیه ترکیبات هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی (PAHs) در خاک

غلظت کل این ترکیبات در ابتدای آزمایش و بعد از اتوکلاو برابر با ۳۳/۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک (معادل ۳۳۴۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم) بود. بر اساس طبقه‌بندی (Malawska & Wilkomirski, 2001)، این مقدار در کلاس پنجم (بیش از ۱۰۰۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم) قرار گرفته و نشان‌دهنده آلودگی بسیار شدید خاک است. در بین

۱۵ ترکیب شناسایی‌شده، فلورانتن (Fluoranthene) با غلظت ۲۰/۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم (۶۲/۱٪ از کل PAHs) بیشترین میزان را به خود اختصاص داده بود، در حالی‌که آنتراسن (Anthracene) با غلظت صفر، کمترین میزان را داشت. همچنین، ترکیبات پنج‌حلقه‌ای شامل Benzo(a)Perylene، Benzo(k)Fluoranthene و Benzo(b)Fluoranthene به ترتیب ۱۵/۹٪، ۱/۷۲٪ و ۳/۴۸٪ و ترکیبات سه‌حلقه‌ای Fluorene و

^{۱۷} Two-way ANOVA

Phenanthrene به ترتیب ۳/۴٪ و ۳/۱۴٪ از مجموع کل PAHs را تشکیل داده بودند. این ترکیب آلاینده اولیه، نمایانگر الگوی پیچیده‌ای از PAHs در خاک‌های آلوده

جدول ۳- غلظت اولیه ترکیبات هیدروکربن آروماتیک حلقوی (PAHs) خاک بعد از اتوکلاو

ترکیبات هیدروکربن آروماتیک حلقوی (PAHs)	تعداد حلقه‌های آروماتیک	غلظت در خاک (mg/Kg)	نسبت ترکیب به کل ترکیبات هیدروکربن آروماتیک حلقوی (درصد)
Naphthalene	۲	۰/۱۶	۰/۵۰
Acenaphthene	۳	۰/۳۰	۰/۸۰
Fluorene	۳	۱/۱۳	۳/۴۰
Phenanthrene	۳	۱/۰۵	۳/۱۴
Anthracene	۳	۰	۰
Fluoranthene	۴	۲۰/۷۲	۶۲/۱۰
Pyrene	۴	۰/۳۵	۱/۰۶
Benzo(a)Anthracene	۴	۰/۲۱	۰/۶۳
Chrysene	۴	۰/۴۶	۱/۳۹
Benzo(b)Fluoranthene	۵	۱/۱۶	۳/۴۸
Benzo(K)Fluoranthene	۵	۵/۳۱	۱۵/۹۲
Benzo(a)Pyrene	۵	۰/۵۷	۱/۷۲
Dibenzo (a, h) Anthracene	۵	۰/۲۱	۰/۶۴
Benzo(ghi)Perylene	۶	۱/۷۲	۵/۱۵
کل		۳۳/۴	

تأثیر رطوبت و تلقیح باکتری‌ها بر جمعیت میکروبی و تجزیه PAHs

نتایج آنالیز واریانس (جدول ۴) نشان داد که تغییرات رطوبت و تلقیح باکتری‌ها بر جمعیت کل باکتری‌های خاک تأثیر معنی‌داری نداشت ($P > 0.05$). این یافته بیانگر آن است که افزایش تعداد کل میکروارگانیسم‌ها لزوماً تحت تأثیر این عوامل قرار نمی‌گیرد و بنابراین شمارش جمعیت میکروبی به تنهایی شاخص قابل اعتمادی برای ارزیابی توانایی تجزیه آلاینده‌ها نیست. در عوض،

فعالیت متابولیکی و توان تجزیه‌کننده سویه‌ها اهمیت بیشتری دارد. همچنین اثر متقابل رطوبت و سویه‌های باکتریایی نیز فاقد معنی‌داری آماری بود، که نشان می‌دهد تعامل این دو عامل نیز بر جمعیت کل مؤثر نبوده است. در مقابل، اثر رطوبت خاک بر کاهش غلظت کل PAHs معنی‌دار بود ($P < 0.05$) که نشان می‌دهد مدیریت رطوبت عامل کلیدی در بهبود تجزیه ترکیبات هیدروکربنی است. این یافته‌ها تأکید می‌کنند که تلقیح باکتری‌ها بدون بهینه‌سازی بستر خاک و رفع محدودیت‌های زیست‌فراهمی به تنهایی قادر به ایجاد کاهش معنی‌دار آلاینده‌ها نیست.

جدول ۴- خلاصه نتایج تجزیه واریانس برای لگاریتم جمعیت باکتری و غلظت کل PAHs

منبع تغییرات (Source of Variation)	درجه آزادی (df)	جمعیت باکتری	غلظت کل PAHs	میانگین مربعات (Mean Squares)
بلوک (Block)	۲	۰/۲۸۷*	۵۹/۸۲۶ ^{ns}	
رژیم رطوبتی (I)	۳	۰/۱۸ ^{ns}	۱۷۳/۲۷*	
باکتری (B)	۳	۰/۱۵۷ ^{ns}	۴۳/۰۷۷ ^{ns}	
اثر متقابل (I × B)	۹	۰/۰۴۶ ^{ns}	۱۹/۷۶ ^{ns}	
خطا (Error)	۳۰	۰/۰۸۵	۳۸/۴۶	
ضریب تغییرات (C.V)		۳/۶۳	۲۴/۳۷	

* و ns به ترتیب معنی‌دار و غیرمعنی‌داری در سطح پنج درصد

ارزیابی توانایی تجزیه PAHs نیست. بر اساس مطالعات پیشین (Margesin et al., 2007; Wang et al., 2016; Li et al., 2023)، فعالیت‌های عملکردی مانند بیان ژن‌های تجزیه‌ای، تولید بیوسورفکتانت، و فعالیت آنزیمی ارتباط مستقیم‌تری با توان پالایش میکروبی دارند. به دلیل محدودیت‌های پژوهش، در این پژوهش، امکان اندازه‌گیری این شاخص‌های عملکردی وجود نداشت و تنها تغییرات جمعیت کل باکتری‌ها بر اساس شمارش کلونی (CFU) بررسی شد. با این حال، پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده، شاخص‌های مولکولی و بیوشیمیایی نیز در کنار شمارش جمعیت میکروبی مورد استفاده قرار گیرند تا ارزیابی دقیق‌تری از فرآیند پالایش میکروبی حاصل شود.

به طور کلی، نتایج این بخش از پژوهش حاضر و مقایسه با منابع مختلف نشان می‌دهد که پایداری جمعیت باکتری به‌تنهایی تضمین‌کننده موفقیت پالایش میکروبی نیست. بلکه ویژگی‌های عملکردی باکتری‌ها، سازگاری سویه‌ها با محیط و بهینه‌سازی شرایط فیزیکی مانند رطوبت، دما و pH، تعیین‌کننده اصلی کارایی تجزیه PAHs هستند. بنابراین، طراحی فرآیندهای پالایش میکروبی باید تمرکز خود را بیش از افزایش جمعیت کل بر فعالیت متابولیکی و شرایط محیطی بهینه معطوف کند.

تأثیر سویه‌های باکتریایی بر تجزیه PAHs

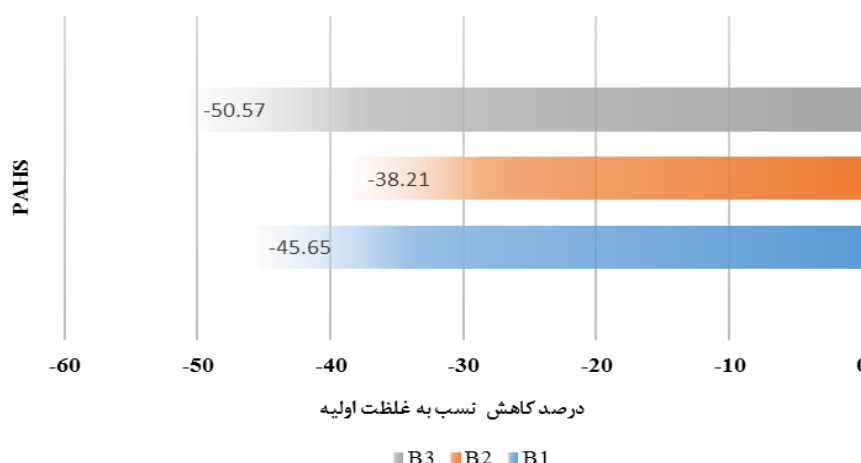
نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تلقیح سویه‌های باکتریایی و اثر متقابل آن با رطوبت، تأثیر آماری معنی‌داری بر کاهش غلظت کل PAHs نداشت ($P < 0.05$). با این وجود، بررسی عددی نتایج حاکی از پتانسیل قابل توجه سویه‌های منتخب در کاهش بار آلودگی بود. بررسی درصد تغییرات غلظت کل PAHs (شکل ۱) نشان داد که بیشترین کاهش غلظت کل PAHs در تیمار تلقیح‌شده با *Enterobacter cloacae* (B3) به میزان ۵۰/۶٪ مشاهده شد و پس از آن سویه‌های *Pseudomonas alcaligenes* (B1) و *Pseudomonas*

مقایسه نتایج پژوهش حاضر با مطالعات داخلی و خارجی نشان می‌دهد که یافته‌های مشابهی گزارش شده است. برای مثال، (Hoseini et al., 2020) در خاک‌های آلوده به نفت خام مشاهده کردند که تغییرات رطوبت و تیمار باکتریایی تأثیر قابل توجهی بر جمعیت میکروبی نداشت و جمعیت نسبتاً پایدار باقی ماند.

مطالعه (Ghasemi Piranloo et al., 2019) نیز نشان داد که نوع حامل‌های جامد مانند باگاس و پرلیت می‌تواند پایداری جمعیت باکتری‌ها را افزایش دهد و نوسانات جمعیتی بیشتر تحت تأثیر تنش‌های محیطی رخ می‌دهد. یافته‌های (Mohsenzadeh و Farahani (2014) و Mirbagheri (2012) نیز بر اهمیت شرایط فیزیکی محیط، از جمله رطوبت، دما و pH، در عملکرد میکروبی تأکید دارند. مطالعات خارجی مانند (Wang et al., 2016)، (Margesin et al., 2007)، (Li et al., 2023) و (Zhang et al., 2021) نیز نشان داده‌اند که جمعیت کل باکتری‌ها در شرایط مختلف رطوبتی تغییر چندانی نمی‌کند، اما کارایی تجزیه به فعالیت سویه‌ها و شرایط محیطی وابسته است.

(Rahman et al., 2020) نیز تأکید کردند که افزایش صرف جمعیت باکتری لزوماً منجر به بهبود پالایش میکروبی نمی‌شود و سازگاری و عملکرد سویه‌ها اهمیت بیشتری دارد. با این حال، برخی مطالعات نشان داده‌اند که باکتری‌های خاص و شرایط محیطی مناسب می‌توانند کاهش معنی‌دار PAHs ایجاد کنند. برای مثال (Karimi et al., 2020) گزارش کردند که ترکیب گیاه‌پالایی با *Pseudomonas aeruginosa* منجر به کاهش معنی‌دار PAHs شد (Safari et al., 2017). نیز نشان دادند که *Bacillus sp.* و *Acinetobacter sp.* قادر به تجزیه قابل توجه PAHs هستند. مطالعات (Li, Zhang & Wang (2021) و (Kumar & Singh (2020) نیز نقش بیوسورفکتانت‌ها و فعالیت آنزیمی را در افزایش زیست‌فراهمی و کارایی پالایش میکروبی تأیید کرده‌اند. تعداد کل باکتری‌ها به‌تنهایی شاخص دقیقی برای

stutzeri (B2) به ترتیب با کاهش ۴۵/۷٪ و ۳۸/۲٪ قرار گرفتند.



شکل ۱- درصد کاهش PAHs کل در تیمارهای مختلف باکتری

زیست‌فراهمی محدود (Limited Bioavailability) در خاک لوم‌رسی

احتمالاً مهم‌ترین عامل محدودکننده در این پژوهش، زیست‌فراهمی پایین ترکیبات PAHs در خاک مورد استفاده بوده است. خاک‌های لوم‌رسی به دلیل داشتن درصد بالای رس و مواد آلی، دارای سطح ویژه و ظرفیت تبادل کاتیونی بالایی هستند. این ویژگی‌ها باعث جذب سطحی (Sorption) قوی مولکول‌های آب‌گریز PAHs به ذرات خاک می‌شود.

با گذشت زمان، این ترکیبات در ریزحفره‌های (micropores) خاک به دام افتاده و به شدت به ماتریکس آلی-معدنی متصل می‌شوند، فرآیندی که به آن "کهنگی" یا "پیرشدگی" (Aging) آلاینده می‌گویند (Posada-Baquero et al., 2022). در نتیجه، حتی اگر سویه‌های باکتریایی تلقیح‌شده دارای تمام ژن‌ها و آنزیم‌های لازم برای تجزیه باشند، به دلیل عدم دسترسی فیزیکی به سوبسترا (آلاینده)، نمی‌توانند عملکرد واقعی خود را نشان دهند. بنابراین، سرعت فرآیند پالایش میکروبی بیش از آنکه توسط پتانسیل ژنتیکی باکتری کنترل شود، توسط سرعت

بررسی تغییرات ترکیبات منفرد (شکل ۲) جزئیات بیشتری از این واکنش پیچیده را آشکار ساخت و یک الگوی دوگانه را در تمام تیمارها نشان داد. از یک سو، ترکیبات با وزن مولکولی پایین و متوسط، به ویژه ترکیب غالب فلورانتن، توسط هر سه سویه با کارایی بالایی تجزیه شدند (کاهش ۷۸٪ تا ۹۱٪). به طور مشابه، فنانترون نیز کاهش قابل توجهی (بین ۶۲٪ تا ۸۰٪) را نشان داد. از سوی دیگر، غلظت ترکیبات سنگین، چندحلقه‌ای و مقاوم به تجزیه به شکل چشمگیری افزایش یافت. به طور مشخص، غلظت ترکیب سرطان‌زای بنزو(a)پیرن افزایش شدیدی بین ۵۳۸٪ تا ۶۹۳٪ و غلظت دی‌بنزو(a,h)آنتراسن افزایشی بین ۳۸۷٪ تا ۵۹۷٪ در تیمارهای باکتریایی داشت.

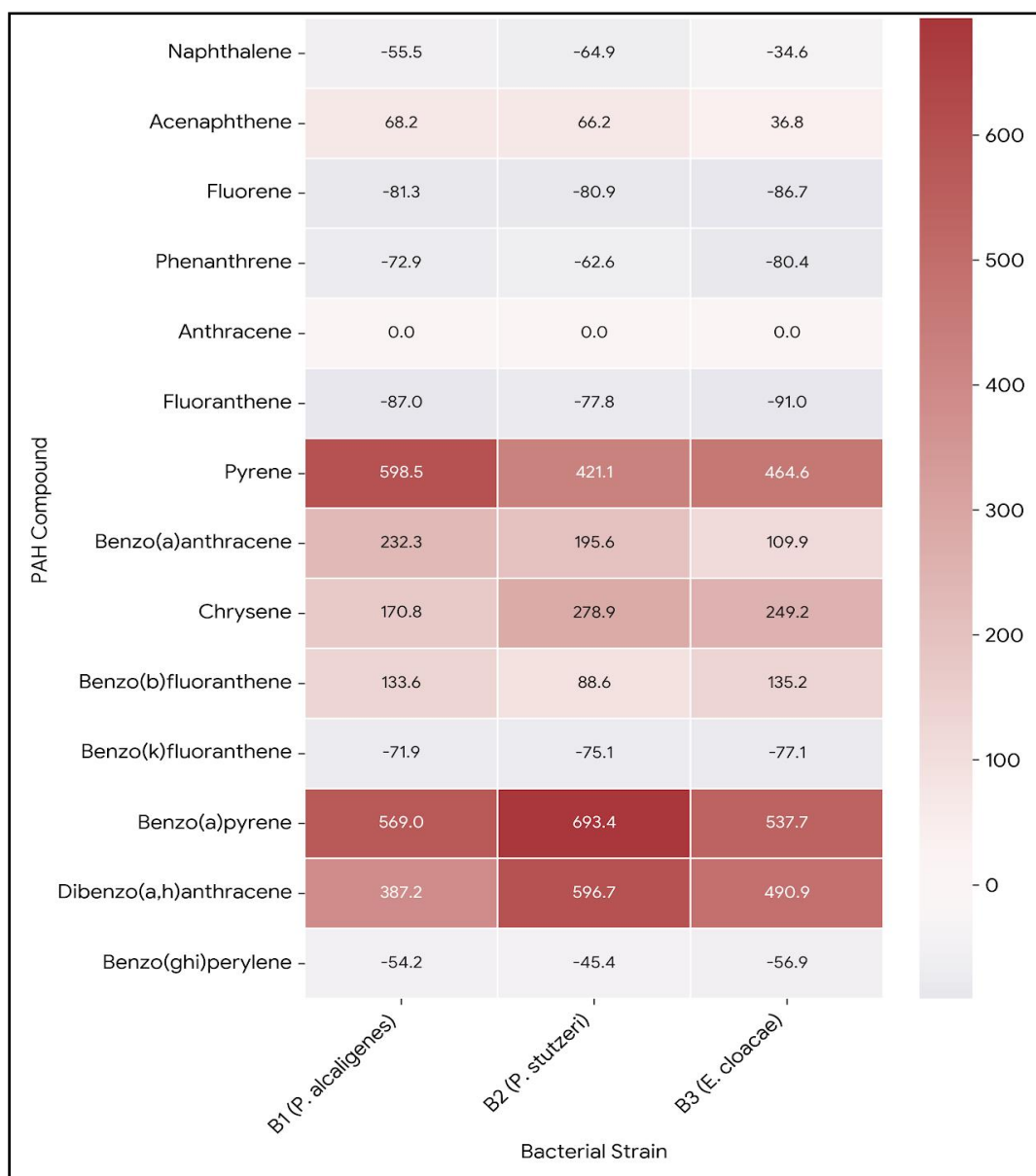
عدم مشاهده اثر آماری معنی‌دار برای تلقیح باکتری، پدیده‌ای است که در سایر پژوهش‌های پالایش میکروبی نیز گزارش شده است (Al-Mailem et al., 2002; Kostka et al., 2022) و تفسیر آن نیازمند در نظر گرفتن برهم‌کنش‌های پیچیده میان میکروارگانیسم، آلاینده و ماتریکس خاک است. می‌توان چندین عامل کلیدی را به عنوان دلایل اصلی این پدیده مطرح کرد:

سازگار شده و تمام کنام‌های اکولوژیک (ecological niches) موجود را اشغال کرده است. سویه‌هایی که از خارج به این سیستم تلقیح می‌شوند، برای بقا و فعالیت با چالش‌های جدی مواجه هستند، از جمله رقابت شدید برای منابع محدود کربن، نیتروژن و سایر عناصر غذایی و همچنین آنتاگونیسم از سوی جمعیت بومی (Siles and Margesin, 2018).

آزادسازی آلاینده از فاز جامد به فاز محلول خاک کنترل می‌گردد.

رقابت با میکروفلور بومی و چالش‌های استقرار

خاک اتوکلاو نشده، یک اکوسیستم میکروبی پیچیده و پایدار است. میکروفلور بومی از قبل با شرایط فیزیکوشیمیایی خاص خاک (مانند pH، شوری و بافت)



شکل ۲- درصد تغییر غلظت ترکیبات منفرد PAHs در تیمارهای مختلف باکتریایی (رنگ‌های خاکستری نشان‌دهنده کاهش و رنگ‌های قرمز نشان‌دهنده افزایش غلظت هستند).

قابل اندازه‌گیری دست یابند یا به سرعت کارایی خود را از دست بدهند.

در چنین شرایطی، سویه‌های تلقیح‌شده ممکن است نتوانند به جمعیت کافی برای ایجاد یک اثر آماری

اکولوژیک مانند زیست‌فراهمی و رقابت میکروبی قرار گرفت. این یافته تأکید می‌کند که در پروژه‌های پالایش میکروبی، صرفاً حضور یک باکتری تجزیه‌کننده برای موفقیت کافی نیست و تمرکز اصلی باید بر بهینه‌سازی شرایط محیطی (مانند رطوبت که در این پژوهش اثر معنی داری داشت) و استفاده از راهکارهایی برای افزایش زیست‌فراهمی آلاینده‌ها (مانند افزودن بیوسورفکتانت‌ها) باشد.

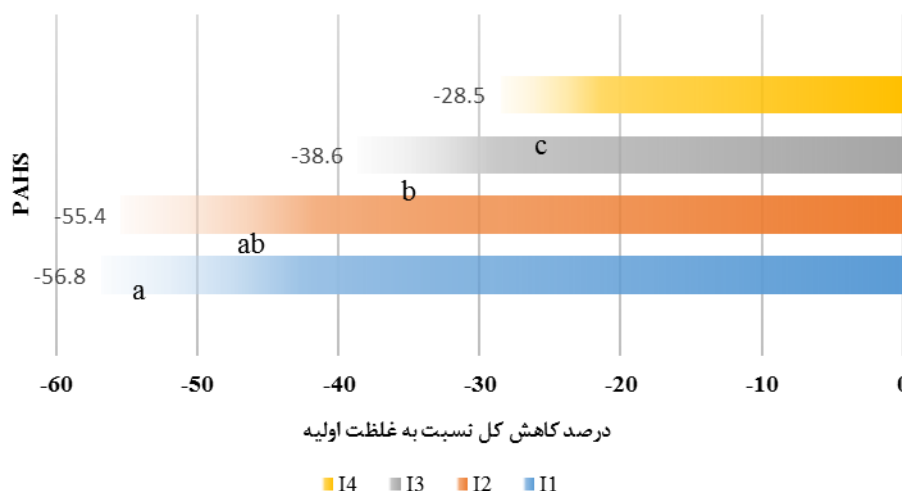
تأثیر رژیم‌های رطوبتی بر تجزیه PAHs

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که رژیم رطوبتی خاک، تأثیر آماری معنی‌داری بر کاهش غلظت کل PAHs داشت ($P < 0.05$). مقایسه میانگین‌ها حاکی از آن بود که بیشترین کارایی تخریب در تیمارهای با رطوبت بالاتر مشاهده شد؛ به طوری که بیشترین کاهش غلظت کل PAHs (به میزان ۵۶/۸٪ و ۵۵/۴٪) به ترتیب در تیمارهای I1 (تخلیه ۳۰٪ آب قابل استفاده) و I2 (تخلیه ۵۰٪) رخ داد. در مقابل، با افزایش تنش خشکی، کارایی تخریب به شدت کاهش یافت و به کمترین مقدار خود (٪) ۲۸/۵- در خشک‌ترین تیمار (I4) رسید (شکل ۳).

تجزیه ناقص و تجمع ترکیبات واسطه مقاوم

الگوی تجزیه ترجیحی ترکیبات سبک (۲ تا ۴ حلقه) و تجمع ترکیبات سنگین (۵ و ۶ حلقه)، بیانگر پیچیدگی مسیرهای متابولیکی است. تجزیه مؤثر ترکیباتی مانند فنانترون و فلورانتن نشان می‌دهد که سویه‌های مورد استفاده دارای آنزیم‌های کلیدی برای حمله اولیه به حلقه آروماتیک، مانند دی‌اکسیژنازها، هستند. این آنزیم‌ها اولین و مهم‌ترین مرحله در کاتابولیسم PAHs را کاتالیز می‌کنند. اما افزایش غلظت ترکیبات سنگین‌تر مانند بنزو (a) پیرن، پدیده تجزیه ناقص (Incomplete Metabolism) را مطرح می‌کند. این امر می‌تواند ناشی از تبدیل ترکیبات بزرگ‌تر به محصولات واسطه مقاوم باشد که باکتری‌ها توانایی تجزیه کامل آن‌ها را در بازه زمانی آزمایش نداشته‌اند (Haritash and Kaushik, 2009; Silva et al., 2020). به عبارت دیگر، مسیر متابولیکی در یک نقطه دچار گلوگاه (bottleneck) شده و به معدنی‌سازی کامل (Complete Mineralization) منجر نشده است.

بنابراین، اگرچه سویه‌های منتخب دارای پتانسیل آنزیمی برای آغاز فرآیند تجزیه هستند، اثربخشی کلی آن‌ها در این پژوهش تحت‌الشعاع عوامل قدرتمند محیطی و



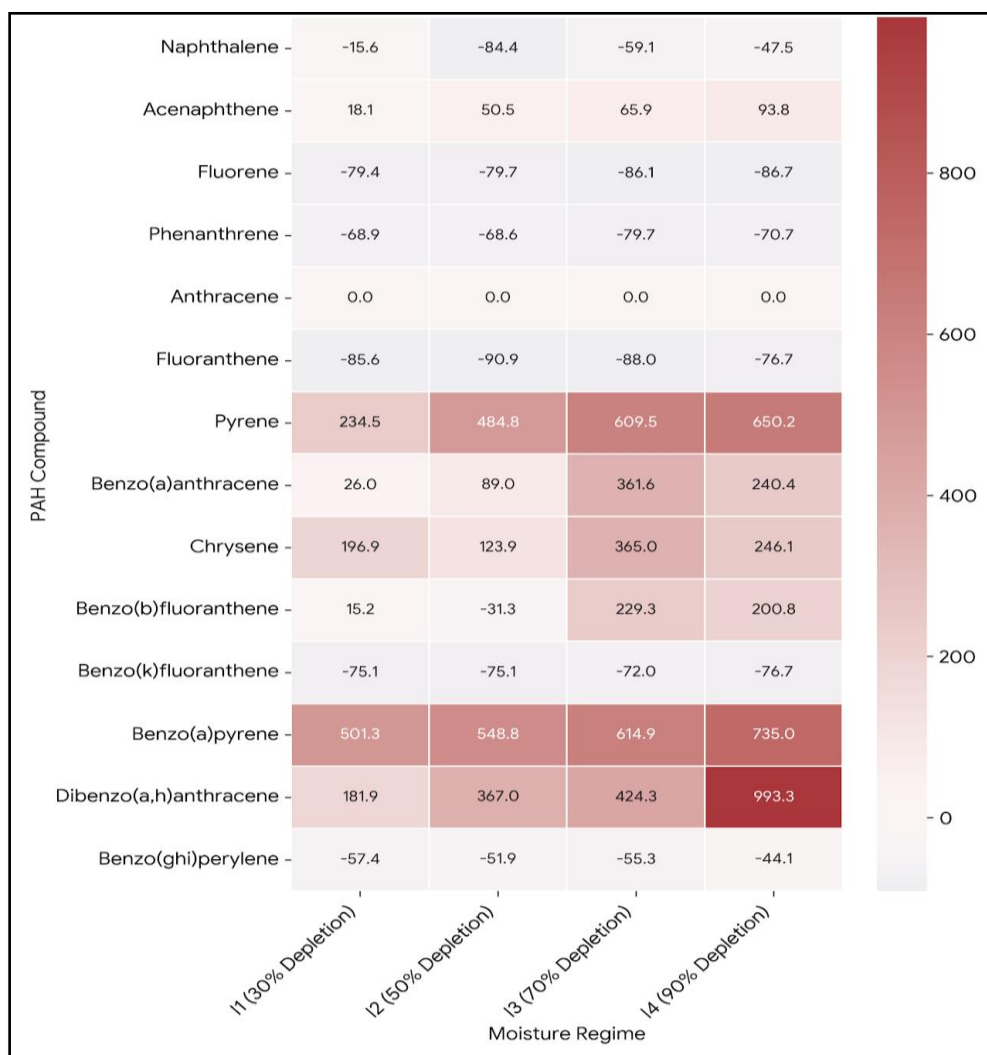
شکل ۳- درصد کاهش PAHs کل در تیمارهای مختلف رژیم رطوبتی

تیمارهای رطوبتی، ترکیبات سبک‌تر مانند فلورانتن و فنانترون کاهش قابل توجهی داشتند. با این حال، الگوی

بررسی تغییرات ترکیبات منفرد (شکل ۴)، جزئیات بیشتری از این روند را آشکار ساخت. در تمام

افزایش در خشک‌ترین تیمار (I4) به بیش از ۹۹۳٪ رسید که نشان‌دهنده تأثیر شدید تنش خشکی بر ناقص ماندن فرآیند تجزیه است.

تجمع ترکیبات سنگین و سمی به شدت تحت تأثیر رطوبت بود. برای مثال، غلظت دی‌بنزو (a,h) آنتراسن در تیمار بهینه رطوبتی (I1) حدود ۱۸۲٪ افزایش یافت، در حالی که این



شکل ۴- درصد تغییر غلظت ترکیبات منفرد PAHs در تیمارهای مختلف رطوبتی (رنگ‌های خاکستری نشان‌دهنده کاهش و رنگ‌های قرمز نشان‌دهنده افزایش غلظت هستند).

این فاز آبی به عنوان یک پل ارتباطی، تحرک آلاینده‌های آب‌گریز را از سطح ذرات جامد خاک به سمت سلول‌های میکروبی تسهیل کرده و احتمال برخورد مؤثر بین آنزیم و سوبسترا را افزایش می‌دهد. علاوه بر این، لایه‌های نازک

معنی‌دار بودن اثر رطوبت، نقش حیاتی آب را به عنوان متغیر اصلی^{۱۸} کنترل‌کننده در فرآیندهای پالایش میکروبی تأیید می‌کند. رطوبت بهینه خاک، که در این پژوهش در تیمارهای I1 و I2 (نزدیک به ظرفیت زراعی) حاصل شد، یک محیط آبی پیوسته^{۱۹} ایجاد می‌کند که برای فعالیت حداکثری میکروبی ضروری است. در وهله اول،

^{۱۹} Continuous Aqueous Phase

^{۱۸} Master Variable

نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر نشان داد که رطوبت خاک عامل اصلی و تعیین‌کننده در افزایش کارایی تخریب زیستی هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای (PAHs) است، به‌طوری‌که بیشترین کاهش آلاینده‌ها در سطوح رطوبتی نزدیک به ظرفیت زراعی مشاهده شد. رطوبت بهینه با بهبود تهویه خاک، افزایش تحرک آلاینده‌ها و فراهم کردن بستر مناسب برای فعالیت میکروبی، تجزیه مؤثر آلاینده‌ها را تسهیل می‌کند.

در بررسی سویه‌های باکتری، *Enterobacter cloacae* و *Pseudomonas alcaligenes* توانایی بالایی در کاهش غلظت PAHs نشان دادند، که بیانگر اهمیت کیفیت عملکردی و سازگاری میکروارگانیسم‌ها نسبت به صرفاً افزایش جمعیت آن‌ها است. با این حال، افزایش غلظت برخی ترکیبات سمی در برخی تیمارها، احتمال تجزیه ناقص و تشکیل محصولات میانی خطرناک را مطرح می‌کند.

در مجموع، موفقیت پالایش میکروبی خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی مستلزم در نظر گرفتن هم‌زمان رطوبت بهینه، انتخاب سویه‌های میکروبی مؤثر و پایش دقیق رفتار آلاینده‌ها است. مطالعات آینده باید از شاخص‌های اختصاصی‌تر مانند ژن‌های کاتابولیکی و آزمون‌های زیست‌فراهمی استفاده کنند و تأثیر استریل‌سازی خاک بر ساختار و زیست‌فراهمی آلاینده‌ها را نیز در نظر بگیرند. لازم به ذکر است که اتوکلاو کردن خاک در این پژوهش، اگرچه برای ارزیابی دقیق عملکرد سویه‌های تلقیح‌شده ضروری بود، اما ممکن است بر زیست‌فراهمی اولیه ترکیبات PAHs تأثیر گذاشته باشد.

آبی پیرامون ذرات خاک برای انتقال نفوذی^{۲۰} اکسیژن به عنوان پذیرنده نهایی الکترون در تنفس هوازی و همچنین مواد مغذی ضروری برای سنتز آنزیم‌های تجزیه‌کننده، حیاتی است (Wang et al., 2024). در مقابل، شرایط خشکی شدید (مانند تیمار I4) باعث ایجاد تنش اسمزی بر سلول‌های میکروبی می‌شود. در این حالت، باکتری‌ها مجبور می‌شوند انرژی متابولیکی خود را از تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده به سمت سنتز املاح سازگار^{۲۱} برای حفظ بقا هدایت کنند که نتیجه آن کاهش شدید فعالیت کاتابولیکی است (Bastos and Magan, 2009). یافته‌های این پژوهش که کارایی حداکثری را در رطوبت نزدیک به ظرفیت زراعی نشان می‌دهد، با مطالعات متعدد دیگری که رطوبت بهینه برای تجزیه هیدروکربن‌ها را در محدوده ۴۰٪ تا ۶۰٪ ظرفیت نگهداری آب گزارش کرده‌اند، همخوانی کامل دارد (Viñas et al., 2005; Mao et al., 2012). الگوی تجمع بیشتر ترکیبات واسطه سمی در شرایط خشکی نیز نشان می‌دهد که تنش آبی باعث توقف یا کند شدن مسیرهای کامل متابولیکی می‌شود؛ به این معنی که اگرچه حمله آنزیمی اولیه ممکن است رخ دهد، اما مراحل بعدی برای معدنی‌سازی کامل متوقف شده و به انباشت ترکیبات مقاوم و خطرناک می‌انجامد. این یافته بر اهمیت مدیریت دقیق رطوبت در پروژه‌های میدانی پالایش میکروبی برای جلوگیری از ایجاد آلودگی ثانویه تأکید دارد. در مجموع، نتایج به وضوح نشان می‌دهد که بهینه‌سازی رطوبت خاک یک پیش‌نیاز اساسی برای دستیابی به پالایش میکروبی کارآمد است و اهمیت آن کمتر از انتخاب سویه میکروبی مناسب نیست.

^{۲۱} Compatible Solutes

^{۲۰} Diffusive Transport

References

1. Akinpelu, A.A., Salami, T.O., Olawale, O.O., Olayiwola, H.A., Atoyebi, D.V., Oyerinde, A.A., Olima, B.O.O., Adebayo, O.S., Oluwalanu, F.A. and Akinhanmi, T.F. 2024. Advanced bioremediation strategies for petroleum hydrocarbon contaminated soils. *Frontiers in Environmental Science* 12: 1354422. doi: 10.3389/fenvs.2024.1354422
2. Alef, K. and Nannipieri, P. (Eds.). 1995. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, London.
3. Ali, N., Khan, M.I., Shah, M., Ullah, S., Zafar, M., Iqbal, A., Tariq, M., Al-Wabel, M.I., Al-Qahtani, N. and Alharbi, M.S. 2023. A comprehensive review on petroleum hydrocarbon contamination in soil: Impacts and remediation. *Environmental Science and Pollution Research* 30: 79005–79031. doi: 10.1007/s11356-023-27357-8
4. Al-Mailem, D. M., Al-Deieg, M., Elias, M., & Radwan, S. S. (2017). Biostimulation of indigenous microorganisms for bioremediation of oily hypersaline microcosms from the Arabian Gulf Kuwaiti coasts. *Journal of Environmental Management*, 193, 576–583.
5. Bastos, A. C., & Magan, N (2009). *Trametes versicolor*: Potential for atrazine bioremediation in calcareous clay soil, under low water availability conditions. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 63, 389–394.
6. Chen, L., Zhang, Y., Wang, S., Li, J., He, L. and Sheng, X.F. 2023. Biodegradation of PAHs in soil environments: microbial strategies and environmental interactions. *Environmental Pollution* 325: 121305. doi: 10.1016/j.envpol.2023.121305
7. Dane, J.H. and Topp, G.C. (Eds.). 2002. *Methods of Soil Analysis, Part 4: Physical Methods*. Soil Science Society of America Book Series No. 5.¹ SSSA, ASA, Madison, WI.
8. Ebrahimi, M. (2010). *Isolation, purification and identification of oil decomposing bacteria from contaminated soils and the study of their efficiency*. M.Sc. Thesis, Department of Soil Science, Islamic Azad University of Karaj Branch. (In Persian).
9. Farahani, M., & Mirbagheri, S. A. (2012). Application of indigenous microorganisms for reducing petroleum pollution in soil. *Journal of Environmental Sciences, University of Tehran*. (In Persian).
10. Ghasemi Piranloo, M., et al. (2019). Survival of *Enterobacter cloacae* in different solid carriers. *Journal of Water and Soil Science, University of Tabriz*. (In Persian).
11. Haritash, A.K. and Kaushik, C.P. 2009. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials* 169(1-3): 1–15. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.03.137
12. Hashemi, N., Pourbabaee, A. A., Shariati, S., & Yadzanfar, N. (2025). Rapid phenanthrene biodegradation in highly calcareous saline sodic soil using an artificial halophile bacterial consortium. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 22(3), 1817-1828.
13. Hoseini, M., et al. (2020). Study on the effect of moisture and bacterial strains on bioremediation of oil-contaminated soils. *Iranian Journal of Environmental Sciences*. (In Persian).
14. Karimi, M., Soleimani, N., & Azizi, F. (2020). Effect of phytoremediation and *Pseudomonas aeruginosa* treatment on removal of petroleum compounds from soil. *Environmental and Sustainable Development Quarterly*. (In Persian).
15. Kostka, J. E., et al. (2002). Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 6256.
16. Kumar, A., & Singh, R. (2020). Role of *Rhodococcus indonesiensis* in biodegradation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils. *International Journal of Environmental Research*, 14(3), 201-210.

17. Kumar, A., Singh, A., Singh, N., Bishnoi, K. and Bishnoi, N.R. 2023. Hybrid bioremediation technologies for the remediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soils: A review. *Chemosphere* 311(Pt 2): 136962. doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.136962
18. Li, J., Zhang, J., Li, S., Wang, Y. and Liu, J. 2023. Key factors affecting the bioremediation of petroleum-hydrocarbon-contaminated soil: A review. *Molecules* 28(3): 1362. doi: 10.3390/molecules28031362
19. Li, J., Zhang, Y., Zhao, J., & Wang, F. (2021). Biodegradation of PAHs in saline-alkali soil using *Sphingomonas* immobilized on biochar. *Environmental Pollution*, 268, 115749.
20. Li, X., Zhang, Y., & Wang, J. (2021). Enhanced biodegradation of PAHs in saline soils using *Sphingomonas* sp. immobilized on biochar. *Environmental Pollution*, 289, 117920. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117920>
21. Li, Y., Wang, J., Chen, Y., & Zhang, X. (2023). Functional responses of microbial communities to hydrocarbon contamination and soil moisture variation. *Science of The Total Environment*, 870, 161988.
22. Malawska, M. and Wilkomirski, B. 2001. An analysis of soil pollution by petroleum products in the surroundings of a HGV service station. *Water, Air, and Soil Pollution* 127(1-4): 257-267. doi: 10.1023/A:1005278615802
23. Mao, X., Jiang, R., Xiao, W. and Wu, J. 2012. Influence of soil moisture content on bioremediation of PAH-contaminated soil. *Chemosphere* 89(5): 597-603. doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.05.081
24. Margesin, R., et al. (2007). Microbial communities and their response to contamination in alpine soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 59(2), 307-317.
25. Mohsenzadeh, F. (2014). Evaluation of bioremediation efficiency of petroleum pollution by indigenous bacterial strains in cold regions (Case study: Tabriz Refinery). *Iranian Journal of Cell Biology*. (In Persian).
26. Moradi, S., Sarikhani, M. R., Beheshti Ale-Agha, A., Reyhanitabar, A., Alavikia, S. S., & Sharifi, R. (2024). Effects of Long-term Oil Pollution on Soil Microbial Respiration and β -glucosidase Activity. *Journal of Soil Biology*, 11(2), 213-230. <https://doi.org/10.22092/sbj.2024.362697.254>.
27. Nkwe, D.O., Thekiso, O.M.M. and Moloantoa, D.F.P. 2024. Impacts of petroleum hydrocarbon contamination on soil microbial diversity and functioning: A review. *Environmental Advances* 15: 100459. doi: 10.1016/j.envadv.2023.100459
28. Page, A.L., Miller, R.H. and Keeney, D.R. (Eds.). 1982. *Methods of Soil Analysis, Part 2: Chemical and Microbiological Properties (2nd ed.)*. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Soil Science Society of America,³ Madison, WI.
29. Posada-Baquero, R., Semple, K. T., Ternero, M., & Ortega-Calvo, J.-J. (2022). Determining the bioavailability of benzo(a)pyrene through standardized desorption extraction in a certified reference contaminated soil. *Science of the Total Environment*, 803, Article 150025.
30. Rahman, K.S.M., Megharaj, M., & Naidu, R. (2020). Bioremediation of contaminated sites: The influence of environmental factors on microbial degradation of pollutants. *Environmental Technology & Innovation*, 20, 101159.
31. Safari, N., Razavi, S., & Karimi, L. (2017). Evaluation of indigenous bacteria efficiency in biodegradation of petroleum compounds. In *Proceedings of the National Conference on Environment, Energy, and Sustainable Natural Resources*. (In Persian).
32. Sharma, B., Joshi, S., Kumar, S., Saxena, S. and Varma, A. 2023. Petroleum hydrocarbon contamination in soil: Bioremediation approaches and future outlook. *Bioresource Technology Reports* 22: 101423. doi: 10.1016/j.biteb.2023.101423
33. Siles, J. A., & Margesin, R (2018). Insights into microbial communities

- mediating the bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil from an Alpine former military site. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(10), 4409–4421.
34. Silva, R.M., Aguiar, M.S., Oliveira, L.M.S., Silva, V.L., Ferreira, S.L.C. and Sousa, E.M.L.S. 2020. Biodegradation of PAHs by bacterial consortia in contaminated soil: effect of different nutrients and surfactants. *Biodegradation* 31(1): 69–81. doi: 10.1007/s10532-019-09896-z
35. Singh, P. and Fulekar, M.H. 2024. Recent advances in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Bioresource Technology Reports* 25: 101762. doi: 10.1016/j.biteb.2023.101762
36. Sparks, D.L. (Editor-in-Chief), Page, A.L., Helmke, P.A., Loeppert, R.H., Soltanpour, P.N., Tabatabai, M.A., Johnston, C.T. and Sumner, M.E. (Eds.). 1996. *Methods of Soil Analysis, Part 3: Chemical Methods*. Soil Science Society of America Book Series No. 5. SSSA, ASA, Madison, WI.
37. U.S. Environmental Protection Agency (EPA). (2017). Bioremediation: using the activities of microorganisms and/or plants to treat contaminated soil and groundwater. Retrieved from EPA bioremediation overview pages.
38. U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA). (1996). *Method 8310: Polynuclear Aromatic Hydrocarbons*. Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods (SW-846). Washington, DC: U.S. EPA.
39. Viñas, M., Sabaté, J., Espuny, M.J. and Solanas, A.M. 2005b. Microbial potential for bioremediation of PAH-contaminated soils: influence of soil matric potential and water content. *Journal of Hazardous Materials* 120(1–3): 127–134. doi: 10.1016/j.jhazmat.2004.12.033
40. Viñas, M., Sabaté, J., Espuny, M.J., Solanas, A.M. and Grifoll, M. 2005a. Bioremediation of PAHs in soil by microbial consortia. *Applied and Environmental Microbiology* 71(3): 1347–1355. doi: 10.1128/AEM.71.3.1347-1355.2005
41. Wang, X., et al. (2016). Effects of soil moisture on the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by indigenous microorganisms. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(2), 1234-1242.
42. Wang, Z., Zhang, L., Li, Y., Liu, Y., Wang, Y. and Ma, F. 2024. Soil moisture regulation in bioremediation: microbial response and pollutant degradation. *Science of the Total Environment* 906: 167614. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.167614
43. Zeynali, K., Shariati, S., & Pourbabaee, A. A. (2024). The role of effective oil-eating bacteria in the remediation of oil-contaminated soils (Case study: *Bacillus* genus). *Journal of Soil Biology*, 12(1), 105-139. <https://doi.org/10.22092/sbj.2024.366140.266>.
44. Zeynali, K., Shariati, S., Pourbabaee, A. A., & Shorafa, M. (2025). The efficiency of oil-degrading and phosphate-solubilizing bacteria in phosphorus availability of a oil-contaminated calcareous soil. *Journal of Soil Biology*, 12(2), 191-212. <https://doi.org/10.22092/sbj.2024.366874.268>.
45. Zeynali, K., Shariati, Sh., Pourbabaee, A. A., & Shorafa, M. (2024). Application of biosurfactant-producing and oil-degrading bacterial consortium in enhancing the hydraulic conductivity of TPH-contaminated soil. *Iranian Journal of Water and Soil Research*, 55(9), 1585–1599. (In Persian).
46. Zhang, H., Liu, Y., Wen, J., & Wang, X. (2021). Effects of indigenous bacteria and soil moisture on bioremediation of petroleum-contaminated soils. *Environmental Pollution*, 284, 117464.