دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
نشریه پژوهش‌های حفاظت آب و خاک
جلد بیست و چهارم، شماره چهارم، ۱۳۹۶
http://jwsc.gau.ac.ir

بررسی اثر آلودگی نفت سفید بر روی جمعیت میکروبی خاک بیابان و خاک مزرعه

*مهدی حسن‌شاهیان[1] و زهرا زیدآبادی‌نژاد[2]
[1]دانشیار میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان،
[2]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات سیرجان
تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۱۵ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۷/۱۲

چکیده

سابقه و هدف: نفت سفید یا کروزن مایعی بیرنگ و کمی سنگین‌تر از بنزین است. قسمت اعظم نفت سفید شامل هیدروکربن‌هایی است که مولکول آن‌ها دارای ۱۱ تا ۱۵ اتم کربن است. اکوسیستم مزرعه ممکن است با هیدروکربن‌های نفتی از طریق روش‌های گوناگونی مانند انتقال نفت و نشت نفت خام از ذخایر نفتی آلوده شود. این آلاینده‌ها دارای اثراتی روی بافت خاک و جمعیت میکروبی هستند. هدف از این پژوهش شناخت اثر آلودگی نفت سفید بر دو نوع خاک متفاوت می‌باشد.

مواد و روش‌ها: از دو نوع خاک متفاوت شامل خاک‌های بیابان و مزرعه نمونه‌برداری شد و شش نوع میکروکازم طراحی گردید. هر خاک دارای سه میکروکازم شامل بدون آلودگی، آلوده به نفت سفید و آلوده به نفت سفید همراه با مواد غذایی نیتروژن و فسفر بود. شاخص‌هایی هم‌چون جمعیت باکتری‌های هتروتروف، جمعیت باکتری‌های تجزیه‌کننده، آنزیم دهیدروژناز و میزان تجزیه نفت سفید در مورد هر میکروکازم در یک دوره زمانی ۱۲۰ روزه سنجش گردید. برای شمارش باکتری‌های هتروتروف محیط نوترینت اگار استفاده شد. در این روش سری رقت برای هر خاک انجام شد و روی محیط نوترینت آگار بصورت سفره‌ای کشت داده شد و کلنی‌های متفاوت شمارش شدند. برای شمارش باکتری‌های تجزیه‌کننده از محیط بوشنل‌هاس استفاده شد. برای شمارش تعداد حداکثر احتمالی باکتری‌ها از روش میکروپلیت استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که بالاترین میزان باکتری‌های هتروتروف مربوط به خاک مزرعه با ارزش ۱×۱۰^{۱۰} می‌باشد. اما به‌طورکلی تعداد باکتری‌های تجزیه‌کننده در همه خاک‌ها به‌طور قابل‌توجهی کم‌تر از تعداد کل باکتری‌های هتروتروف در خاک‌ها می‌باشد. با گذشت زمان تیمار از زمان صفر تا زمان ۱۲۰ روز در این دو نوع خاک الگوهای متفاوتی دیده می‌شود. به‌طوری‌که در خاک بیابان از روز اول آزمایش تا روز ۳۰ آزمایش باکتری‌ها الگوی افزایشی دارند اما در روز ۶۰ کاهش قابل‌ملاحظه‌ای در تعداد باکتری‌ها دیده می‌شود. کمیت باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت سفید تا روز ۶۰ سیر کاهشی و پس از آن افزایشی بود. در خاک بیابان افزایش در تعداد تجزیه‌کننده در تمامی حالات خاک در روز ۳۰ آزمایش دیده شد. پس از این زمان الگو به‌صورت کاهشی بود. در خاک مزرعه افزایش از روز ۹۰ آغاز می‌شود و تا انتهای آزمایش نیز الگو افزایشی است. بالاترین میزان باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت سفید مربوط به خاک

* مسئول مکاتبه: hasanshahi@gmail.com

مزرعه با ارزش ۱۰٦ × ۲ و کم‌ترین آن مربوط به خاک بیابان با ارزش ۱۰٤ × ۳ می‌باشد. بهترین فعالیت آنزیم دهیدروژناز در میکروکازم‌های گوناگون مربوط به میکروکازم آلوده همراه با ماده غذایی بود. بالاترین تجزیه زیستی نفت سفید در همه خاک‌های مورد مطالعه مربوط به خاک مزرعه با میزان ۹۵ درصد بود. تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که یک ارتباط معنی‌دار بین تعداد کل باکتری‌های هتروتروف که با روش MPN سنجیده شده با سایر شاخص‌های مورد بررسی وجود دارد.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش ثابت کرد که انتخاب بهترین روش زیست‌پالایی وابسته به نوع خاک است و در این پژوهش این ثابت شد که نوع خاک دارای اثر مهمی در تجزیه زیستی نفت سفید است.

واژه‌های کلیدی: آلودگی، تجزیه‌زیستی، خاک، میکروکازم، نفت سفید

مقدمه

خاک ترکیبی پیچیده از مواد معدنی، آلی و موجودات زنده است. دارای خصوصیات فیزیکی و شیمیایی زودیافت و دیریافت است. خصوصیات شیمیایی خاک مانند: pH، هدایت الکتریکی و ظرفیت تبادل کاتیونی تابع ترکیبات معدنی، مواد آلی و محیط است. خصوصیات فیزیکی خاک از عوامل مهم و مؤثر بر رشد گیاهان می‌باشند. نفت سفید یا کروزن، برشی از نفت خام است که حدود نقطه جوش آن ۱۸۰ الی ۲۷۵ درجه سانتی‌گراد و چگالی آن ۰/۷۸ می‌باشد. قسمت اعظم نفت سفید شامل هیدروکربن‌هایی است که مولکول آن‌ها دارای ۱۱ تا ۱۵ اتم کربن است. نفت سفید مایعی بیرنگ و کمی سنگین‌تر از بنزین است که بوی مخصوص آن پس از تبخیر شدن از بین می‌رود. نفت سفید از آغاز پیدایش صنعت نفت تا ۵۰ سال، مهم‌ترین فرآورده نفتی بوده است. افزایش چگالی نفت سفید معرف وجود درصد بیش‌تری از هیدروکربن‌های نفتنی و معطره است و کیفیت آن بستگی به نوع اجزاء تشکیل‌دهنده و حدود نقطه جوش آن دارد (۳ و ٤).

مواد نفتی و مشتقات آن‌ها در اثر حمل و نقل یا ذخیره‌سازی ممکن است موجب آلودگی خاک شود. هر قدر مواد نفتی به عمق بیش‌تری از خاک نفوذ کنند رفع آن آلودگی مشکل‌تر خواهد بود. آلودگی‌های نفتی یک پیامد اجتناب‌ناپذیر از افزایش سریع جمعیت و فرایند صنعتی شدن است که به‌دنبال آن آلودگی خاک توسط مواد هیدروکربنه نفتی به شکل وسیع در اطراف تاسیسات اکتشاف و پالایش و به شکل موضعی در مسیرهای انتقال این مواد قابل مشاهده است (۵).

وجود آلودگی نفتی باعث کاهش حاصلخیزی خاک، غیرقابل استفاده بودن آن برای کشاورزی، نفوذ آلودگی به آب‌های زیر زمینی و ورود آلاینده به آب می‌شود. در برخی مکان‌ها باعث آلودگی هوا و اثرات منفی روی تنفس دارد. همچنین به‌علت هم‌جواری با تاسیسات نفتی، آب نیز آلوده می‌شود و جمعیتی از ساکنان این مناطق به انواع بیماری‌های پوستی و گوارشی مبتلا می‌شوند. آلودگی‌های نفتی به سه روش فیزیکی، شیمیایی و زیستی پاک‌سازی می شوند. برای حذف آلودگی آب‌ها به روش فیزیکی ممکن است از ابزارهای جمع‌کننده مثل اسکیمر[1] استفاده شود. در مورد خاک‌های آلوده نیز روش لندفیلینگ[2] که نوعی سیستم دفن بهداشتی مواد آلوده است و یا سوزاندن به‌کار گرفته می‌شود. بعضی از این روش‌ها مثل

1- Skimmer
2- Land filling

لندفیلینگ و سوزاندن بسیار گران هستند علاوه بر این سوزاندن باعث آلودگی هوا می‌شود. استفاده از اسکیمر نیز برای نشت نفت در سطح وسیع آن‌چنان که باید مؤثر نیست. روش‌های شیمیایی شامل تزریق مستقیم اکسیدکننده‌های شیمیایی به محیط است که منجر به تغییر ماهیت طبیعی محیط می‌شود. اما روش‌های زیستی که به‌طور معمول شامل تبدیل آلودگی به مواد غیرسمی با استفاده از فرآیندهای میکروبی است مؤثرتر و بی‌ضررتر به‌نظر می‌رسد. زیست‌پالایی[1] یک فن‌آوری حذف آلودگی است که در آن سیستم زیستی برای تخریب یا تغییر شکل مواد شیمیایی زیانبار استفاده می‌شود. در زیست‌پالایی از موجودات زنده به‌ویژه باکتری‌ها، قارچ‌ها و گیاهان، به‌منظور تجزیه آلاینده‌های محیطی و تبدیل آن‌ها به ترکیبات غیرسمی استفاده می‌شود (٦، ٨ و ٩).

از آن‌جائی‌که درک اثرات آلودگی نفت سفید بر روی جمعیت میکروبی اکوسیستم خاک از لحاظ طراحی استراتژی‌های تجزیه زیستی در مناطق آلوده دارای اهمیت است و با توجه به این‌که در خاک‌های ایران از منابع گوناگون تاکنون به‌طور دقیق کار مشخصی در خصوص فهم اثرات الودگی بر روی آن‌ها انجام نشده است. بنابراین هدف از این پژوهش بررسی تأثیر نفت سفید بر روی جامعه میکروبی خاک بیابان و مزرعه و همچنین بررسی تأثیر الودگی نفت سفید روی فعالیت میکروب‌های این دو نوع خاک و نقش آن‌ها در حذف آلودگی می‌باشد. به‌همین منظور شش اکوسیستم مدل که در ادامه این مقاله به آن میکروکازم[2] می‌گوییم طراحی گردید و شرایط متفاوتی در هر یک از آن‌ها با توجه به نوع خاک اعمال گردید و سپس با سنجش شاخص‌های میکروبی، شیمیایی و آنزیمی در هر میکروکازم و تحلیل آماری نتایج حاصله پاسخ هر جمعیت میکروبی هر خاک نسبت به نفت سفید تعیین گردید.

1- Bioremediation
2- Microcosm

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: نمونه‌برداری تحت شرایط استریل انجام شد. از کویر شهداد در استان کرمان برای نمونه‌برداری خاک بیابان استفاده شد. برای نمونه‌گیری خاک مزرعه از خاک یک مزرعه ذرت در حوالی شهر سیرجان در استان کرمان استفاده شد. نحوه نمونه‌گیری بدین‌صورت بود که ابتدا ۱۰ سانتی‌متر از سطح خاک برداشته شد و حدود ۳ کیلوگرم از خاک داخل ظروف استریل ریخته شد. نمونه‌های خاک تا انتقال به آزمایشگاه روی یخ نگهداری شدند و سپس در دمای ٤ ^{o}C تا انجام آزمایش‌های بعدی قرار داده شدند (۱).

طراحی میکروکازم‌ها: سه میکروکازم برای هر نوع خاک در ظروف شیشه‌ای با مشخصات ۵۰ cm طول، ۱۰ cm عمق و ۲۵ cm عرض جهت مطالعه تغییرات در جوامع میکروبی طراحی گردید. هر میکروکازم حاوی ۵۰۰ گرم خاک بود. میکروکازم‌ها در سه حالت طراحی شدند به‌طوری‌که شامل میکروکازم خاک غیرآلوده[3] (با نام اختصاری N)، میکروکازم خاک آلوده به نفت سفید[4] (با نام اختصاری P) و میکروکازم خاک آلوده به نفت سفید همراه با افزودن مواد غذایی[5] (با نام اختصاری NP) بودند. میکروکازم خاک بیابان با علامت[6] (D) و میکروکازم خاک مزرعه با علامت[7] (G) مشخص گردید که در ادامه این پژوهش از این علامات برای نشان دادن میکروکازم‌ها استفاده می‌شود. جهت تنظیم نسبت کربن، نیتروژن و فسفات به‌عنوان ماده غذایی (۱:۱۰:۱۰۰) به‌میزان ۰/۱ وزن نفت سفید،

3- Non pollutant
4- Polluted soil
5- Nutrient polluted soil
6- Desert
7- Garden

نیترات آمونیم و به‌میزان ۰/۰۱ از وزن نفت سفید، دی‌پتاسیم فسفات در ۱٤۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل شده و به میکروکازم‌ها اضافه شد. سپس محتویات میکروکازم‌ها کاملاً مخلوط شدند. به میکروکازم کنترل فقط به‌میزان ۱٤۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه شد. وزن ظرف‌ها در ابتدا یادداشت شد و با وزن کردن هفته‌ای ظروف، رطوبت از دست رفته با اضافه نمودن آب مقطر استریل جبران شد. میکروکازم‌ها در تاریکی و دمای ۲۵ °C به‌مدت ۱۲۰ روز خوابانیده شدند. در فواصل زمانی هر دو روز یک بار خاک‌ها در میکروکازم‌ها بر هم زده شدند تا شرایط بی‌هوازی ایجاد نگردد. در زمان‌های صفر، ۳۰ روز، ٦۰ روز، ۹۰ روز و ۱۲۰ روز نمونه‌گیری از میکروکازم‌ها انجام شد (۷).

شمارش تعداد کل هتروتروف‌ها و تجزیه‌کننده‌ها در خاک با روش سریال رقت (CFU)[1]: ابتدا ۱۰ گرم از خاک‌های هر میکروکازم در ۱۰۰ میلی‌لیتر از بافر فسفات نمکی (PBS)[2] حل شد. سپس درون لوله‌های آزمایش میزان ۹ میلی‌لیتر بافر PBS ریخته شد. برای شمارش هتروتروف‌ها رقت 10^{-7} و 10^{-8} در لوله‌های آزمایش تهیه گردید و ۱۰۰ میکرولیتر از این رقت در پلیت‌های نوترینت آگار کشت سفره‌ای داده شد. برای شمارش تجزیه‌کننده‌ها رقت 10^{-4} و 10^{-5} تهیه شد و ۱۰۰ میکرولیتر از این رقت در پلیت‌های بوشنل‌هاس آگار حاوی ۱٪ نفت سفید به‌عنوان تنها منبع کربن کشت سفره‌ای داده شد. پس از انکوباسیون در دمای ۳۰ °C، شمارش کلنی‌ها انجام شد و طبق فرمول زیر تعداد کلنی در هر گرم خاک محاسبه شد (۱۳). برای حذف آلودگی قارچی از ضدقارچ بنومیل در محیط کشت استفاده شد.

Cfu/gram = میانگین تعداد کلنی‌های شمارش‌شده × عکس رقت × ۱۰

1- Colony forming unit
2- Phosphate Buffer Saline

شمارش تعداد کل هتروتروف‌ها و تجزیه‌کننده‌ها در خاک با روش MPN[3]: ابتدا ۱۰ گرم از خاک در ۱۰۰ میلی‌لیتر از بافر فسفات نمکی (PBS) حل شد. سپس درون لوله‌های آزمایش میزان ۹ میلی‌لیتر بافر PBS ریخته شد. برای شمارش هتروتروف‌ها رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-5} در لوله‌های آزمایش تهیه گردید و در میکروپلیت‌های ۲٤ خانه میزان ۱۵۰۰ میکرولیتر محیط نوترینت براث تحت شرایط استریل ریخته شد. از رقت‌های 10^{-3} تا 10^{-5} تهیه‌شده، میزان ۱۰۰ میکرولیتر درون محیط کشت تلقیح گردید. برای شمارش تجزیه‌کننده‌ها رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-3} در در لوله‌های آزمایش تهیه گردید و در میکروپلیت‌های ۲٤ خانه میزان ۱۵۰۰ میکرولیتر محیط بوشنل‌هاس براث حاوی ۱٪ نفت سفید به‌عنوان تنها منبع کربن، تحت شرایط استریل ریخته شد. از رقت‌های تهیه شده، میزان ۱۰۰ میکرولیتر درون محیط کشت تلقیح گردید. هر رقت دارای ۳ تکرار بود و MPN به‌صورت ۳ تایی انجام شد. میکروپلیت‌های جهت شمارش هتروتروف‌ها به‌مدت ۷ روز و میکروپلیت‌های جهت شمارش تجزیه‌کننده‌ها به‌مدت ۲۱ روز در دمای ۳۰ °C انکوبه شدند و پس از گذشت دوره انکوباسیون، ایجاد کدورت در مقایسه با شاهد به‌عنوان شاخص مثبت آزمایش MPN به حساب آمد و با استفاده از نرم‌افزار MPN calculator version 2.3 تعداد باکتری‌ها در هر گرم خاک محاسبه گردید (۱٦).

سنجش میزان نفت سفید باقی‌مانده در خاک: ۵ گرم از هر خاک داخل ارلن ریخته و ۲۰ سی‌سی دی‌کلرومتان به آن اضافه شد. ۲ سی‌سی از محلول رویی برداشته با دستگاه اسپکتروفوتومتر قدرت جذب آن در طول موج ٤۲۰ نانومتر خوانده شد و از رابطه

3- Most Probable Number

زیر جهت محاسبه درصد حذف نفت سفید استفاده شد (١٤).

١٠٠ × میزان جذب شاهد / میزان جذب نمونه – میزان جذب شاهد = درصد حذف نفت سفید

سنجش آنزیم دهیدروژناز در خاک: روش سنجش آنزیم بدین‌صورت بود که ابتدا ٥ گرم خاک از هر میکروکازم توزین شد و سپس با ٥ سی‌سی محلول TTC[1] با غلظت ١ درصد حل گردید و به‌مدت ٢٤ ساعت در تاریکی و دمای ٣٠ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد سپس به‌میزان ٤٠ میلی‌لیتر استون سرد به لوله‌ها اضافه گردید به‌مدت ١٠ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد پس از عبور مخلوط از کاغذ صافی میزان جذب درطول موج ٤٨٥ نانومتر تعیین گردید (٢).

روش تحلیل آماری داده‌ها: نتایج حاصله از همه شاخص‌های مورد بررسی در میکروکازم‌های مورد مطالعه در طی زمان‌های مختلف انکوباسیون همراه با سه تکرار وارد نرم‌افزار SPSS شد و مورد تجزیه و تحلیل آماری از نظر ارتباط بین شاخص‌های مختلف در هر میکروکازم قرار گرفت. آزمون آماری به‌کار رفته آزمون دانکن با سطح معنی‌داری ٠/٠٥ درصد می‌باشد.

نتایج

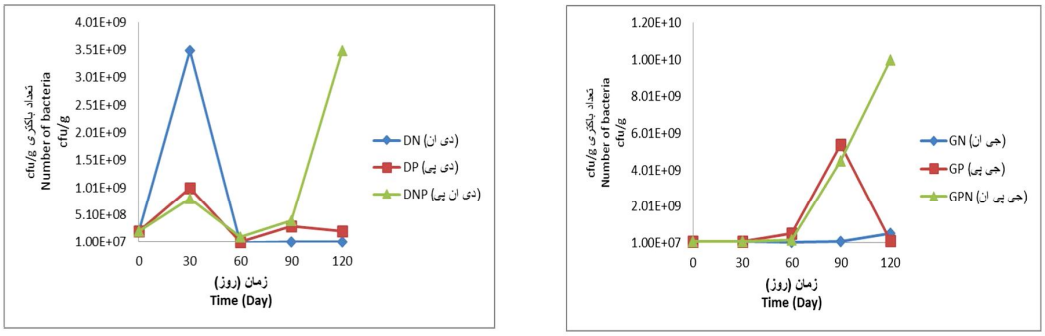
کمیت باکتری‌های هتروتروف شمارش‌شده به روش سری رقت در خاک‌های مورد بررسی: نتایج حاصل از آنالیز فیزیکوشیمیایی خاک‌های مورد مطالعه که با فرستادن نمونه‌های خاک به آزمایشگاه مکانیک خاک به‌دست آمده است در جدول ١ نشان داده شده است. همه خاک‌های مورد تیمار از لحاظ تغییر در جمعیت باکتری‌های هتروتروف با روش سری رقت مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصله در شکل ١ نشان داده شده است. همان‌طور که در این شکل دیده می‌شود با گذشت زمان تیمار از زمان صفر تا زمان ١٢٠ روز در این دو نوع خاک الگوهای متفاوتی دیده می‌شود. به‌طوری‌که در خاک بیابان از روز اول آزمایش تا روز ٣٠ آزمایش باکتری‌ها الگوی افزایشی دارند اما در روز ٦٠ کاهش قابل‌ملاحظه‌ای در تعداد باکتری‌ها دیده می‌شود. پس از دوره زمانی ٦٠ یک افزایش کم در تعداد باکتری‌ها در خاک‌های آلوده و غیرآلوده دیده می‌شود اما در خاک با الودگی و نیتروژن و فسفر افزایش قابل‌توجه است. در خاک‌های مزرعه این افزایش در روز ٩٠ اتفاق می افتد. در مجموع بالاترین میزان باکتری‌های هتروتروف مربوط به خاک مزرعه با ارزش ١×١٠^{١٠} و کم‌ترین آن مربوط به خاک بیابان با ارزش $٣/٥ \times ١٠^{٩}$ می‌باشد.

جدول ١- ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک‌ها مورد استفاده جهت طراحی میکروکازم‌ها. [1]

Table 1. The physicochemical properties of soils that used for design the microcosms.

نوع خاک	هدایت الکتریکی (Electrical conductivity) (ds/m)	اسیدیته (pH)	کربن آلی (Total Carbon) (mg/kg)	نیتروژن (N) (mg/kg)	فسفر (P) (mg/kg)	پتاسیم (K) (mg/kg)	شن (sand) (٪)	سیلت (Silt) (٪)	رس (Clay) (٪)
بیابان (Desert)	0.8	7.9	3	0.28	1.75	18.11	78	14	8
مزرعه (Farmland)	1.8	67.7	9.5	0.58	7.6	21	46	12	42

1- Triphenyl Tetrazolium Cholride



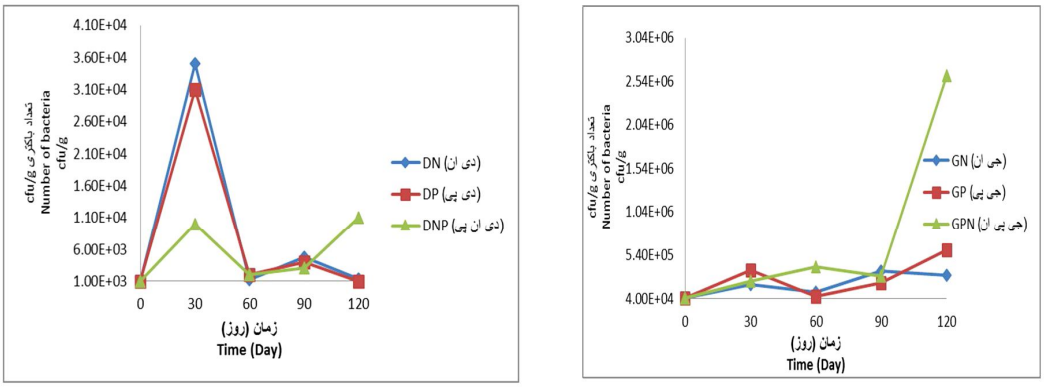
Desert Soil
خاک بیابان

Farmland soil
خاک مزرعه

شکل ۱- تعداد باکتری‌های هتروتروف در خاک بیابان و مزرعه در زمان‌های مختلف.

Figure 1. The quantity of heterotrophic bacteria in desert and farmland soils at different time.

نتایج حاصله از شمارش باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت سفید به روش سریال رقت در خاک‌های مورد بررسی: باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت سفید در تیمارهای میکروکازم با روش کشت در محیط اختصاصی حاوی نفت سفید به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی شمارش گردیدند. نتایج حاصله از این تعیین کمیت در شکل ۲ آمده است. با توجه به آن‌چه که در این شکل دیده می‌شود، در خاک بیابان افزایش در تعداد تجزیه‌کننده در تمامی حالات خاک در روز ۳۰ آزمایش دیده شد. پس از این زمان الگو به‌صورت کاهشی بود. در خاک مزرعه افزایش از روز ۹۰ آغاز می شود و تا انتهای آزمایش نیز الگو افزایشی است. بالاترین میزان باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت سفید مربوط به خاک مزرعه با ارزش ۲×۱۰^{٦} و کم‌ترین آن مربوط به خاک بیابان با ارزش ۳×۱۰^{٤} می‌باشد. اما به‌طورکلی تعداد باکتری‌های تجزیه‌کننده در همه خاک‌ها به‌طور قابل‌توجهی کم‌تر از تعداد کل باکتری‌های هتروتروف در خاک‌ها می‌باشد. البته این نتیجه نیز قابل انتظار است زیرا باکتری‌های تجزیه‌کننده تنها از نفت سفید استفاده می‌کنند اما باکتری‌های هتروتروف از منابع کربن دیگری نیز می‌توانند استفاده کنند.



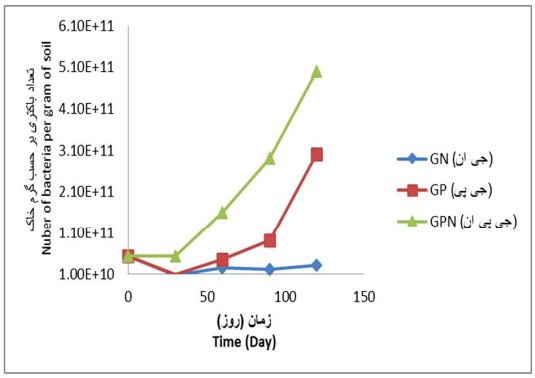
Desert Soil
خاک بیابان

Farmland soil
خاک مزرعه

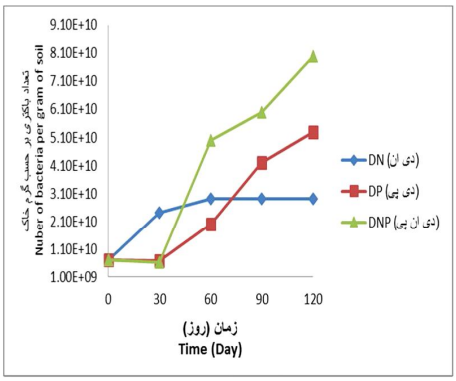
شکل ۲- تعداد باکتری‌های تجزیه‌کننده در خاک بیابان و مزرعه در زمان‌های مختلف.

Figure 2. The quantity of degrading bacteria in desert and farmland soils at different time.

کمیت حداکثر احتمالی (MPN) باکتری‌های هتروتروف در میکروکازم‌های مورد مطالعه: برای درک بهتر اثر آلودگی بر روی جمعیت میکروبی خاک‌های مختلف این سنجش اجرا گردید. نتایج حاصل از تعیین کمیت باکتری‌های هتروتروف با این روش در شکل ۳ آمده است. از این شکل این‌طور می‌توان نتیجه گرفت که در همه خاک‌ها سیر صعودی افزایش کمیت باکتری‌های هتروتروف از روز شروع آزمایش تا انتهای انکوباسیون وجود دارد. نتیجه دیگری که از این چهار نمودار به‌دست می‌آید بالا بودن کمیت هتروتروف‌ها در میکروکازم خاک آلوده همراه با افزودن نیتروژن و فسفر است. حداکثر کمیت باکتری‌های هتروتروف برای همه خاک‌ها انتهای دوره انکوباسیون یعنی روز ۱۲۰ است. بالاترین کمیت حداکثر احتمالی باکتری‌های هتروتروف مربوط به خاک مزرعه با ارزش ۵×۱۰^{۱۱} و کم‌ترین آن مربوط به خاک بیابان با ارزش ۸×۱۰^{۱۰} می‌باشد.



Farmland soil
خاک مزرعه



Desert Soil
خاک بیابان

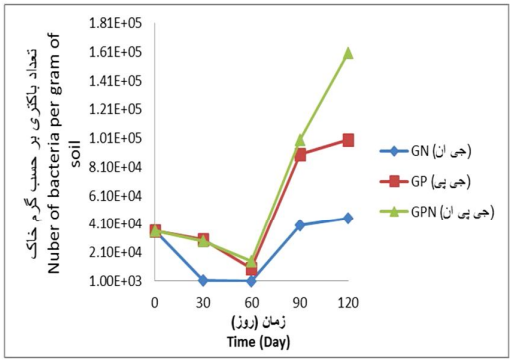
شکل ۳- کمیت MPN باکتری‌های هتروترف در خاک بیابان و مزرعه در زمان‌های مختلف.

Figure 3. The MPN of heterotrophic bacteria in desert and farmland soils at different time.

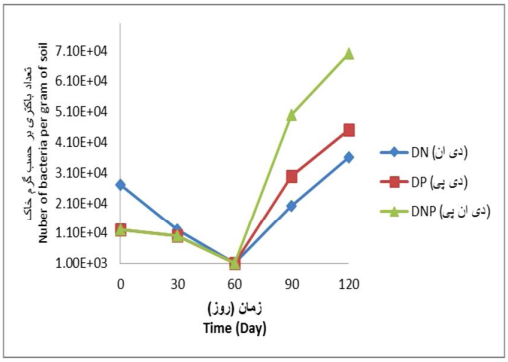
کمیت حداکثر احتمالی (MPN) باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت سفید در میکروکازم‌های مورد مطالعه: با استفاده از نفت سفید به‌عنوان منبع کربن و کدورت به‌عنوان شاخص مثبت کمیت باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت سفید در میکروکازم‌های مورد بررسی معین گردید. نتایج حاصله در شکل ٤ آمده است. همان‌طور که در این شکل دیده می‌شود تا روز ٦٠ سیر کمیت باکتری‌های تجزیه‌کننده به‌صورت کاهشی و پس از آن افزایشی است. این الگو را می‌توان به اثر سمی نفت سفید و تطابق باکتری‌ها پس از گذشت زمان نسبت داد. به‌طوری‌که ابتدا نفت سفید اثر سمی بر روی جامعه میکروبی خاک وارد می‌کند و باکتری‌ها پس از گذشت ٦٠ روز با گازوئیل موجود در خاک تطابق پیدا کرده و توانایی استفاده از آن را پیدا می‌کنند و پس از این روز بر کمیت باکتری‌های تجزیه‌کننده افزوده می‌شود. اما نکته قابل‌توجه دیگری که از شکل ٤ به‌دست می‌آید بالا بودن تعداد باکتری‌های تجزیه‌کننده گازوئیل در میکروکازم حالت آلوده و همراه با مواد غذایی نسبت به سایر میکروکازم‌ها در تمامی انواع خاک‌ها به‌جز خاک بیابان می‌باشد. این امر

امکان‌پذیر است زیرا حضور مواد غذایی استرس نفتی و فقر غذایی را بر روی جامعه میکروبی کاهش داده و کمیت باکتری‌های تجزیه‌کننده دچار تغییر نمی‌شود.

بالاترین کمیت حداکثر احتمالی باکتری‌های تجزیه‌کننده مربوط به خاک مزرعه با ارزش $۱/۸ \times ۱۰^{۵}$ و کم‌ترین آن مربوط به خاک بیابان با ارزش ۷×۱۰^{٤} می‌باشد.



Farmland soil
خاک مزرعه

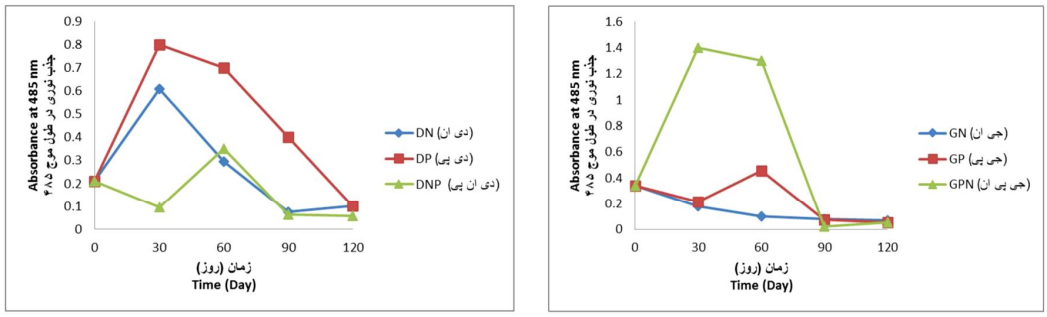


Desert Soil
خاک بیابان

شکل ٤- کمیت MPN باکتری‌های تجزیه‌کننده در خاک بیابان و مزرعه در زمان‌های مختلف.

Figure 4. The MPN of degrading bacteria in desert and farmland soils at different time.

فعالیت آنزیم دهیدروژناز در میکروکازم‌های مورد مطالعه: سنجش فعالیت برخی از آنزیم‌ها در میکروکازم‌ها می‌تواند اطلاعات مفیدی در خصوص فعالیت باکتری‌ها و جامعه میکروبی در آن‌ها ارایه کند. به همین منظور فعالیت آنزیم دهیدروژناز که در مطالعات اکولوژیکی تجزیه زیستی واجد اهمیت است، مورد بررسی قرار گرفت. آنزیم دهیدروژناز جزء آنزیم‌های اکسیدو روداکتاز می‌باشد که در بخشی از زنجیره تنفسی سلول‌های میکروبی واقع شده است. این آنزیم ترکیبات آلی را به‌وسیله انتقال جفت الکترون از سوبسترا به NADP اکسیده می‌کند. این آنزیم یک اندیکاتور مفید برای شدت کلی متابولیسم میکروبی است زیرا آنزیمی درون‌سلولی بوده که پس از مرگ سلولی سریعاً از بین می‌رود. همان‌طور که در شکل ۵ دیده می شود در خاک مزرعه فعالیت انزیمی تا روز ٦۰ الگوی افزایشی و پس از آن کاهشی است. در خاک بیابان تا روز ۳۰ الگوی افزایشی و پس از آن کاهش در فعالیت آنزیمی دیده می‌شود. در بین سه نوع میکروکازم خاک بیابان بالاترین فعالیت آنزیمی دهیدروژناز در میکروکازم الوده به نفت سفید دیده می‌شود و در خاک‌های مزرعه میکروکازم آلوده همراه با مواد غذایی بالاترین فعالیت آنزیمی را دارد. آنزیم دهیدروژناز بیش‌ترین فعالیت خود را در خاک مزرعه با ارزش ۱/٤ در روز ۳۰ داراست و کم‌ترین میزان فعالیت این آنزیم مربوط به خاک بیابان با ارزش ۰/۸ در روز ۳۰ می‌باشد. علت تفاوت در این دو روند می‌تواند مربوط به ماهیت دو خاک مورد مطالعه باشد.



Desert Soil
خاک بیابان

Farmland soil
خاک مزرعه

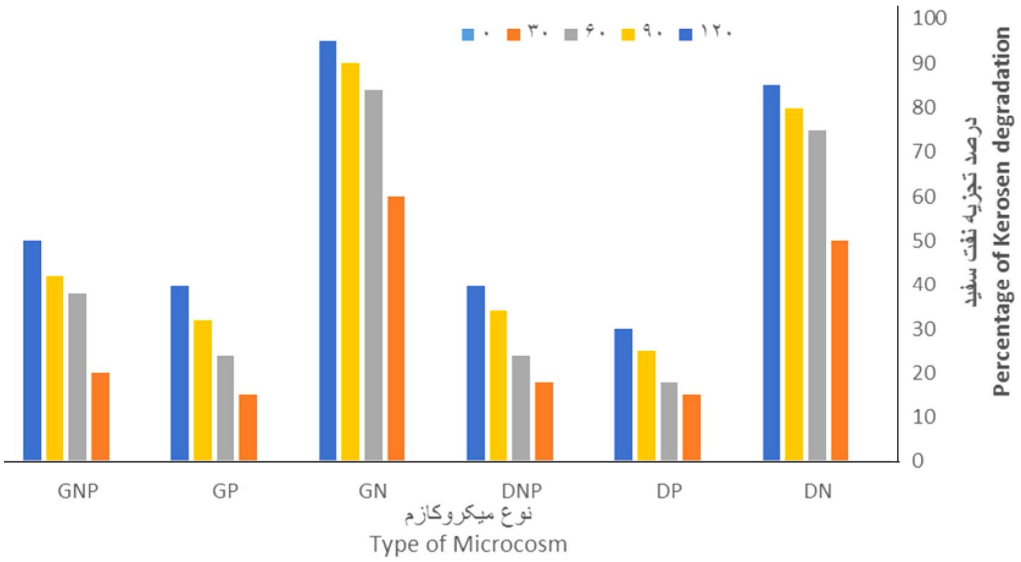
شکل ۵- فعالیت آنزیم دهیدروژناز در خاک بیابان و مزرعه در زمان‌های مختلف.

Figure 5. The dehydrogenase enzyme activity in desert and farmland soils at different time.

میزان تجزیه نفت سفید در میکروکازم‌های مورد مطالعه: یکی از شاخص‌های مهم در مطالعات میکروکازم خاک سنجش میزان حذف گازوئیل در طول زمان انکوباسیون می‌باشد. به همین منظور میزان تجزیه نفت سفید در طول زمان انکوباسیون با استخراج نفت سفید باقی‌مانده محاسبه گردید. نتایج حاصله در شکل ٦ آمده است. همان‌طور که در این شکل نشان داده شده است، با پیش رفتن زمان انکوباسیون میزان تجزیه نفت سفید در همه میکروکازم‌ها الگوی افزایشی دارد به‌طوری‌که کم‌ترین میزان تجزیه در روز اول آزمایش و بیش‌ترین میزان در روز انتهای آزمایش (روز ۱۲۰) دیده می‌شود. اما این الگو و میزان تجزیه در همه میکروکازم‌ها یکسان نیست. به‌طور مثال کم‌ترین تجزیه (٤٠٪) مربوط به خاک در میکروکازم بیابان و بیش‌ترین تجزیه مربوط به خاک در میکروکازم مزرعه (٩٥٪) می باشد. اما حالات مختلف میکروکازم‌ها نیز با یکدیگر تفاوت دارند به‌طوری‌که میکروکازم‌ها در حالت غیرآلوده را اگر در نظر نگیریم چون در واقع نفت سفید وارد این خاک نشده که بخواهد تجزیه شود و به همین علت در نمودارها بالاترین درصد تجزیه را به خود اختصاص داده است. اما بالاترین درصد واقعی تجزیه مربوط به میکروکازم آلوده همراه با مواد غذایی می‌باشد و نوعی تأییدکننده نتایج شرح داده شده در قبل می‌باشد و با فعالیت آنزیمی و تعداد باکتری‌ها همخوانی دارد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

ارتباط بین شاخص‌های سنجش‌شده در هر میکروکازم مورد مطالعه: نتایج حاصل از تحلیل آماری ارتباط بین شاخص‌هایی که در هر میکروکازم سنجیده شد مانند: تعدادکل هتروتروف‌ها، تعداد کل تجزیه‌کننده‌ها، آنزیم و میزان تجزیه در جدول ۲ آمده است. همان‌طور که در این جدول نشان داده شده است یک ارتباط معنی دار بین تعداد کل باکتری‌های هتروتروف که با روش MPN سنجیده شده با سایر شاخص‌های مورد بررسی وجود دارد. سایر شاخص‌های مورد بررسی با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند.



شکل ٦- میزان تجزیه نفت سفید در میکروکازم‌های مختلف.

Figure 6. The percentage of kerosene degradation in different microcosms.

جدول ۲- رابطه بین شاخص‌های مختلف در هر میکروکازم.

Table 2. The relationship between different factors in each microcosm.

فاکتورهای سنجش شده و آزمون دانکن Factor Assay $Duncan_{a,b}$	میانگین N	زیر سطح Subset	
		1	2
آنزیم Enzyme	2.30E+10	2.90E-01	
تجزیه Degradation	2.30E+10	4.69E+01	
تعداد باکتری تجزیه‌کننده CFU Degrader	2.30E+10	1.01E+05	
کمیت احتمالی تجزیه‌کننده MPN Degrader	2.30E+10	6.41E+04	
تعداد باکتری هتروتروف CFU Heterotroph	2.30E+10	8.12E+08	
کمیت احتمالی هتروتروف MPN Heterotroph	2.30E+10		1.37E+11
سطح معنی‌داری Sig.	P>0.05		

اثر زمان‌های مختلف نمونه‌برداری بر شاخص‌های مورد بررسی: تأثیر زمان‌های مختلف انکوباسیون بر روی شاخص‌های سنجش و به‌خصوص میزان تجزیه نفت سفید با تحلیل آماری آزمون دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ درصد در جدول ۳ آمده است. این جدول نشان می‌دهد که زمان‌های ۹۰ و ۱۲۰ روز آزمایش با سایر زمان‌ها (۰، ۳۰، ۶۰) دارای اختلاف معنی‌دار هستند. یعنی این‌که شاخص‌های سنجش شده در این دو زمان با سایر زمان‌های نمونه‌برداری تفاوت معنی‌داری دارند. البته شاخص‌ها در زمان‌های صفر، ۳۰ و ۶۰ تفاوت معنی‌داری ندارند. این امر نشان تغییرات عمده در جمعیت میکروبی پس از گذشت ۶۰ روز از ایجاد آلودگی با نفت سفید صورت می‌گیرد. این نتیجه با اصل تطابق جمعیت میکروبی که در قسمت‌های قبلی شرح داده شد، هم‌خوانی دارد.

جدول ۳- اثر زمان انکوباسیون بر روی شاخص‌های سنجش‌شده در میکروکازم.

Table 3. The effect of incubation time on assayed factors in each microcosm.

روز Day	میانگین N	آزمون دانکن $Duncan_{a,b}$ 1	2	3
روز صفر 0 Day		2.30E+10	3.40E+09	
روز سی 30 Day		2.30E+10	3.59E+09	
روز شصت 60 Day		2.30E+10	6.64E+09	3.07E+10
روز نود 90 Day		2.30E+10		
روز نود 120 Day		2.30E+10		6.10E+10
سطح معنی‌داری Sig.		P> 0.05		

بحث و نتیجه‌گیری

نشت ترکیبات نفتی تحت‌تأثیر نیروهای مویینگی و ثقلی منجر به حرکت عمودی در خاک‌های غیراشباع‌شده، خلل و فرج خاک را پر می‌کند و در صورت زیاد بودن مقدار نشتی فاز مایع به سطح آب رسیده و در آن‌جا تجمع می‌یابد و به همراه آب‌های زیرزمینی حرکت کرده و به‌دلیل وزن مخصوص کم‌تر نسبت به آب در سطح آب شناور باقی می‌ماند. میکروب‌های خاک قابلیت معدنی کردن و تجزیه هر نوع ترکیب آلی را دارند. این خصوصیت کاهش آلاینده طبیعی اکوسیستم، در تصفیه بیولوژیک آلاینده‌های زیست‌محیطی اهمیت دارد (۱۰).

در این پژوهش شرایطی در میکروکازم‌ها جهت بررسی اثر آلودگی ایجاد شد. به‌طوری‌که شرایط

طبیعی اکوسیستم، شرایط آلودگی و نیز حالت آلودگی همراه با تقویت میکروب‌های خاک با مواد معدنی نیتروژن و فسفر ایجاد شد. علت افزودن این دو نوع ماده معدنی به خاک نیز این بود که وقتی آلودگی با آلاینده‌های نفتی در خاک اتفاق می افتد، کاهش قابل‌توجهی در میزان نیتروژن و فسفر قابل دسترس ریزجانداران در خاک رخ می‌دهد. بنابراین با تامین این فقر عنصری در خاک تحت فرایندی که تحریک زیستی[1] خوانده می‌شود می‌توان کارایی میکروب‌های خاک برای پاسخ‌دهی در مقابل استرس نفتی را افزایش داد (۱۱ و ۱۵).

در این پژوهش نتایج حاصله از شمارش باکتری‌های هتروتروف با دو روش سری رقت و شمارش حداکثر احتمالی در خاک‌های مورد بررسی نشان داد که افزایش تعداد باکتری‌ها در خاک‌های مورد بررسی متفاوت است به‌طوری‌که بالاترین تعداد باکتری‌های هتروتروف مربوط به خاک مزرعه و کم‌ترین آن‌ها مربوط به خاک بیابان است. همچنین در این پژوهش نتایج حاصله از شمارش باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت سفید به روش سری رقت و محتمل‌ترین در خاک‌های مورد بررسی و کشت در محیط اختصاصی حاوی نفت سفید به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی نشان داد که افزایش باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت سفید در خاک‌های مختلف متفاوت است و به‌طورکلی بالاترین میزان باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت سفید مربوط به خاک مزرعه و کم‌ترین آن مربوط به خاک بیابان می‌باشد.

باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت سفید در خاک بیابان کم‌تر از خاک مزرعه بود. این نتیجه قابل انتظار است زیرا به‌دلیل کم بودن کربن در خاک بیابان باکتری‌های موجود تحمل شوک بار آلی را نخواهند داشت و با توجه به این‌که نفت سفید دارای ترکیب بسیار پیچیده‌ای است وارد شدن ناگهانی آن به خاک بیابان باعث کاهش فوق‌العاده در جمعیت باکتری‌ها می‌گردد. آنزیم دهیدروژناز نیز در خاک بیابان دارای ارزش پایین‌تری از فعالیت نسبت به خاک مزرعه بود. علت این امر کاهش کمیت جمعیت فعال متابولیکی در خاک بیابان می‌باشد. در مجموع همه این شاخص‌ها منجر به این می‌شود که میزان پایین تجزیه نفت سفید نیز در خاک بیابان مشاهده گردد زیرا میکروب‌های فعال در امر تجزیه در این خاک کمیت پایینی دارند و از طرفی از لحاظ متابولیکی نیز در وضعیت مطلوبی نیستند.

پژوهشگران دیگری نیز در سراسر جهات اثرات آلودگی را بر روی این دو نوع خاک بررسی کرده‌اند که نتایج حاصله با نتایج گزارش شده در این پژوهش هم‌خوانی دارد. در این‌جا چند مثال برای مقایسه آورده می‌شود (۱۸).

Nseabasi و همکاران اثر آلودگی با نفت سفید را در چهار مزرعه که با گیاهان مختلفی کشت می‌شدند در نیجریه بررسی کردند. نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد که آلودگی نفتی دارای اثرات کاهشی در کمیت باکتری‌های هتروتروف و اثر افزایشی در کمیت باکتری‌های تجزیه‌کننده می‌باشد. تفسیر این پژوهشگران در خصوص این نتایج بدین‌صورت بود که استرس نفت سفید وارد شده بر جمعیت میکروبی خاک منجر به انتخاب گروه‌های باکتریایی می‌شود که قابلیت استفاده از نفت سفید را به‌عنوان منبع کربن داشته باشند و بنابراین جمعیت باکتریایی هتروتروف حساس از بین رفته و باکتری‌های تجزیه‌کننده بر کل جمعیت میکروبی غلبه می‌یابند. این نتایج با نتایج گزارش شده در این پژوهش همخوانی دارد (۱۲).

Xu و همکاران یک‌سری از مطالعات آزمایشگاهی شبیه‌سازی‌شده با نمونه‌های خاک بیابان آلوده شده با نفت سفید را در چین انجام دادند. آن‌ها در یک دوره

1- Biostimulation

زمانی ۱۸۰ روزه به این نتیجه رسیدند که با افزایش مدت زمان انکوباسیون خاک‌ها شاخص‌های میکروبی، آنزیمی و تجزیه‌ای در خاک افزایش معنی‌داری نشان می‌دهد. آن‌ها این افزایش را به تطابق جامعه میکروبی با آلاینده نفتی با گذشت زمان نسبت دادند. در این پژوهش نیز نتایج مشابهی به‌دست آمد با تفاوت این‌که ما پاسخ جامعه میکروبی را در ۱۲۰ روز سنجش کردیم اما افزایش شاخص‌ها با گذشت زمان در این پژوهش نیز ثابت شد (۱۷).

نتیجه‌گیری کلی

در مجموع نتایج این پژوهش نشان داد که خاک بیابان یکی از حساس‌ترین نوع خاک در برابر آلودگی با نفت سفید است و خاک مزرعه تأثیر کم‌تری را از آلودگی با نفت سفید می‌بیند. تحلیل آماری نتایج این پژوهش نشان داد که زمان لازم برای بازگشت خاک به شرایط طبیعی ۹۰ روز می‌باشد که با سایر زمان‌ها اختلاف معنی‌داری دارد. با به‌کارگیری نتایج حاصله از این پژوهش می‌توان بر حسب نوع خاک راهکارهای مناسبی جهت احیای زیستی آن‌ها پیشنهاد نمود.

منابع

1.Alef, K., and Nanniper, P. 1995. Methods in applied soil microbiology and biochemistry. Academic Press, New York, 324p.

2.Andreoni, V., Cavalca, L., Rao, M.A., Nocerino, G., Bernasconi, S., Amico, M., and Colombo, L. 2004. Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. Chemosphere. 57: 401-412.

3.Barathi, S., and Vasudevan, N. 2001. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from petroleum contaminated soil. Environ. Inter. 26: 413-416.

4.Hasanshahian, M., and Emtiazi, G. 2008. Investigation of alkane biodegradation using the microtiter plate method and correlation between biofilm formation, biosurfactant production and crude oil biodegradation. Inter. Biodeterior. Biodegrad. 62: 170-178.

5.Hassanshahian, M., Zeynalipour, M.S., and Hosseinzadeh Musa, F. 2014a. Isolation and characterization of crude oil degrading bacteria from the Persian Gulf (Khorramshahr province). Mar Pollut. Bull. 82: 39-44.

6.Hassanshahian, M. 2014b. The effects of crude oil on marine microbial communities in sediments from the Persian Gulf and the Caspian Sea: A microcosm experiment. Inter. J. Adv. Biol. Biomed. Res. 2: 1. 1-17.

7.Ives, A.R., Foufopoulos, J., Klopfer, E.D., Klug, J.L., and Palmer, T.M. 1996. Bottle or big-scale studies: how do we do ecology. Ecology. 77: 681-685.

8.Leahy, D., and Colwell, H. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiol. Rev. 54: 3. 305-315.

9.Lenson, P. 1992. Forest soil biology impossible challenge or open market. Responses of Forest Ecosystems to Environmental Changes. John Wiley & Sons, NewYork, 234p.

10.Li, Z., Kravchenko, I., Xu, H., and Zhang, C. 2007. Dynamic changes in microbial activity and community structure during biodegradation of petroleum compounds: A laboratory experiment. J. Environ. Sci. 19: 1003-1013.

11.Mathew, M., and Obbard, J.P. 2001. Optimization of the dehydrogenase assay for measurement of indigenous microbial activity in beach sediments contaminated with petroleum. Biotechnol. Lett. 23: 227-230.

12.Nseabasi, N.O., and Antai, S.P. 2012. Effects of Long-Term Kerosene Spillage on Heterotrophic Microorganisms in Soil from Niger Delta, Southern Nigeria. J. Appl. Sci. Environ. Manage. 16: 2. 195-199.

13.Okerentugba, P.O., and Ezeronye, O.U. 2003. Petroleum degrading potentials of single and mixed microbial cultures isolated from rivers and refinery effluents in Nigeria. Afr. J. Biotechnol. 2: 9. 288-292.

14.Rahman, K.S.M., Thahira-Rahman, J., Lakshmanaperumalsamy, P., and Banat, I.M. 2004. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. Biores. Technol. 85: 257-261.
15.Weigand, H., Totsche, G., and Huwe, B. 2001. PAH mobility in contaminated industrial soils: a Markov chain approach to the spatial variability of soil properties and PAH levels. Geoderma. 102: 371-389.
16.Wrenn, B.A., and Venosa, A.D. 1996. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most probable number procedure. Can J. Microbiol. 42: 3. 252-258.
17.Xu, R., and Obbard, J.P. 2003. Effect of nutrient amendments on indigenous hydrocarbon biodegradation in oil contaminated beach sediments. J. Environ. Qual. 32: 1234-1243.
18.Zhou, J., Bruns, M.A., and Tiedje, J.M. 1996. DNA recovery from soils of divers composition. Appl. Environ. Microbiol. 62: 316-320.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

J. of Water and Soil Conservation, Vol. 24(4), 2017
http://jwsc.gau.ac.ir

Study the effect of kerosene contamination on desert and farmland soil microbial community

***M. Hassanshahian[1] and Z. Ziadabadinejad[2]**
[1]Associate Prof. of Microbiology, Dept. of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran, [2]M.Sc. Graduate of Microbiology, Sirjan Science and Research Branch, Islamic Azad University, Sirjan, Iran
Received: 02/03/2017; Accepted: 10/04/2017

Abstract
Background and Objectives: Kerosene is colorless liquid and slightly heavier than gasoline that specific odor removes after evaporation. The majority fraction of kerosene contains hydrocarbons between 11 to 15 carbon molecules. Farmland ecosystems may be polluted with petroleum hydrocarbons via different ways such as transportation and spill of crude oil from resource of petroleum storage. These pollutants have some effect on the texture of the soil and microbial community. The aim of this research is understands the effect of kerosene pollution on two different soils.
Materials and Methods: Two different soils samples were collected from desert and farmland soils. Six microcosms were designed. Indeed each soil has three microcosms such as: unpolluted microcosm, polluted microcosm and polluted microcosm with nutrient (Nitrogen and Phosphor). Some factors were assayed in each microcosm during 120 day of experiment. These factors include: total heterotrophic bacteria, total Kerosene degrading bacteria, dehydrogenase enzyme and Kerosene biodegradation. For enumeration of heterotrophic bacteria nutrient agar medium was used. In this method serial dilutions were done from each soil and spread on nutrient agar medium then different colonies were counted. For enumeration of degrading bacteria Bushnel-Hass (BH) medium were used.
Results: The results of this study show that the highest quantity of heterotrophic bacteria related to farmland soil (1×10^{10}). The quantities of degradative bacteria significantly were lower than heterotrophic bacteria in all soil microcosms. By passing the time if treatment from zero to 120 days two different patterns were seen in soils. In desert soil from the beginning of experiment until day 30 the increment pattern were recorded but in day 60 the remarkable decrease were observed in the quantity of bacteria. The quantity of degradative bacteria have decrement pattern until 60th day of experiment but after this day these bacteria have increment pattern. In desert soil increase in the quantity of degrading bacteria in all microcosms were recorded in day 30 of experiment. After this time the decrement pattern were observed. In farmlands soil increase in the quantity of bacteria were started from day 90 and continue until the end of experiment. The highest quantity of degrading bacteria related to farmland soil (2×10^{6}) and the lowest quantity related to desert soil (3×10^{4}). The best deydrogenase activity between different microcosms related to pollute microcosm with nutrient. The highest biodegradation of Kerosene in all studied soil belong to farmland microcosm (95%). Statistical analysis of the results shows that there is a significant correlation between MPN quantity of heterotrophic bacteria and other assayed factors.
Conclusion: The results of this study confirmed that the selection of best bioremediation strategies belong to type of soil and in this research it was confirmed that the type of soil have significant in the percentage of degradation.

Keywords: Biodegradation, Kerosene, Microcosm, Pollution, Soil

* Corresponding Author; Email: hasanshahi@gmail.com