مقاله پژوهشی

علوم و تکنولوژی محیط زیست، دوره بیست و هفت، شماره یک، فروردین ماه ۱۴۰۳ (۳۵-۲۳)

بهینه‌سازی زنده‌مانی باکتری غیر بومی تجزیه‌گر موثر نفت خام در حامل‌های مختلف

مهران سلیمی بجستانی [۱]

سهیلا ابراهیمی [*۲]

Sohebrahimi@gmail.com

رضا قربانی نصرآبادی [۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۵ **تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۲۸**

چکیده

زمینه و هدف: این پژوهش با هدف امکان‌سنجی معرفی حامل مناسب باکتری‌های موثر غیربومی تجزیه‌کننده نفت خام و بهینه‌سازی فاکتور رطوبت و دمایی مناسب برای حامل مذکور به‌منظور نگهداشت باکتری‌های مورد نظر انجام شد.

روش بررسی: بدین منظور سه حامل پیت، سبوس و بیوچار انتخاب و پس از تلقیح باکتری غیر بومی موثر در دوره ۶ ماهه، تعداد باکتری‌ها پایش شد. علاوه بر آن، دو سطح رطوبتی ظرفیت زراعی و ۷۰٪ ظرفیت زراعی و دو سطح دمایی ۴ و ۲۵ درجه سلسیوس بر روی ماندگاری باکتری *سودوموناس آئروژینوزا*، اعمال و بررسی شد.

یافته‌ها: هر سه حامل ابتدا در زمانهای دو هفته(سبوس و بیوچار) و یکماه(پیت) افزایش تعداد باکتریها را در دمای ۲۵ درجه و رطوبت ظرفیت زراعی نشان دادند، لیکن پایش جمعیت باکتری‌های تجزیه‌گر موثر در ۶ ماه نمایانگر آن بود که پیت، سبوس و بیوچار به ترتیب با مقادیر ۸/۴۰۲، ۸/۲۰۵ و ۸/۱۱۶ (logCFU/g) بیشترین میزان زنده‌مانی را در دوره ۱۸۰ روز در رطوبت ظرفیت زراعی نشان دادند.

بحث ونتیجه گیری: استاندارد جهانی حامل مناسب، وجود جمعیت باکتریایی به میزان $۱۰^{۹}$-$۱۰^{۷}$ باکتری در هر گرم از ماده حامل بمدت ۱۸۰ روز می‌باشد، لیکن دمای بهینه ابتدا ۲۵ درجه سلسیوس در ابتدای دوره و سپس ۴ درجه سلسیوس در پایان دوره بدست آمد، که بهینه بودن دمای پایین‌تر بدلیل کاهش گازهای سمی بازدارنده، کاهش فعالیت باکتری و نگهداشت اندوخته غذایی حامل برای باکتری در دوره ۱۸۰ روز می‌باشد. شرایط بهینه رطوبت در ظرفیت زراعی تهویه مناسب برای رشد و تکثیر باکتری فراهم کرد.

۱- دانشجوی دکتری تخصصی مدیریت منابع خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۲- دانشیار، گروه علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران. *(مسوول مکاتبات)

۳- دانشیار، گروه علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران.

از سویی دیگر با توجه با دو فاکتور مورد مطالعه، حامل‌های پیت، سبوس، بیوچار به ترتیب واجد بیشترین میزان جمعیت باکتری بودند. دلیل اصلی کاهش جمعیت را می‌توان به دلیل هتروتروف بودن باکتری سودوموناس آئروژینوزا و کمبود مواد آلی در حامل‌های بیوچار و سبوس در مقایسه با پیت دانست.

واژه‌های کلیدی: حامل باکتری، پیت، سبوس، بیوچار، *سودوموناس آئروژینوزا*.

J. Env. Sci. Tech., Vol 27, No.1, April, 2025

Optimizing exotic effective oil-hydrolyzing bacteria survival in different carriers

Mehran Salimi Bajestani [1]
Soheila Ebrahimi [2 *]
sohebrahimi@gmail.com
Reza Ghorbani Nasrabadi [3]

Admission Date: February 16, 2025 Date Received: January 24, 2025

Abstract

Background and Objective: This research was conducted to investigate introduction feasibility of a carrier for exotic effective oil-hydrolyzing bacteria and optimizing suitable moisture and temperature factors proper for the mentioned carrier to preserve the bacteria.

Material and Methodology: Hence, three carriers of peat, bran and biochar were selected, bacteria number was monitored during a 6 month period after inoculation of exotic effective bacteria. Furthermore, two moisture levels of carrier moisture and temperature on bacteria persistence, two moisture levels of field capacity and 70% field capacity and two temperatures of 4 and 25 °C were applied and investigated on persistence of *Pseudomonas aeruginosa*.

Findings: All three carriers showed an increase in bacteria count at 25°C and field capacity during 2 weeks (bran and biochar) and one month (peat). However, monitoring effective depredating bacteria population during 6 month illustrated that peat, bran and biochar had the highest survival during 180 days at field capacity, which were 8.402, 8.205 and 8.116 (logCFU / g).

Discussion and Conclusion: Global standard for proper carrier, is the presence of bacteria population of 10^7 to 10^9 logCFU/g for 180 days. However, optimum temperature was first obtained 25°C at the beginning of the period, which was later changed to 4°C at the end. The lower temperature is optimum as a result of less toxic inhibitor gasses, reduction of bacteria activity and preservation of carrier nutrients during 180 day period. Optimum moisture condition at field capacity led to proper ventilation for growth and propagation of the bacteria.

On the other hand, noting the studied factors, peat, bran and biochar carriers had the highest bacteria population respectively. The main reason for population decrease may be attributed to heterotroph state of *Pseudomonas aeruginosa* and deficiency of organic matter in biochar and bran compared to peat.

Keywords: Bacteria carrier, peat, bran, biochar, *Pseudomonas aeruginosa*.

1- Ph.D. Candidate, Dept. of Soil Science and Engineering, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
2- Associate Prof, Dept. of Soil Science and Engineering, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. **(Corresponding Author)*
3- Associate Prof., Dept. of Soil Science and Engineering, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

مقدمه

هیدروکربن‌های سوختی مانند نفت خام و انواع فرآورده‌های آن از آلاینده‌های محیطی رایج در سراسر دنیا می‌باشند. فرایندهای استحصال، بهره‌برداری، ذخیره، نگهداری و انتقال نفت خام و مشتقات آن، به طرق مختلف آلودگی آب‌های سطحی، زیرزمینی، رسوبات و خاک را در پی دارد. ایران چهارمین تولیدکننده بزرگ نفت خام در جهان محسوب می‌شود، بنابراین تهدید آلودگی نفتی ناشی از فعالیت‌های تولید و انتقال در این منطقه به صورت گسترده وجود دارد (۱).

امروزه استفاده از روش‌های غیرتهاجمی و دوستدار محیط زیست برای کاهش یا پالایش آلاینده‌های هیدروکربنی در اولویت قرار دارد. بنظر می‌رسد با تشدید و تحریک ریزاندام‌های تجزیه‌گر بومی نفتی موجود در سیستم آلوده یا اعمال انواع غیربومی کارآمد و موثر از بهترین روش‌های کاهش آلودگی‌های مذکور باشند، که علاوه بر حفظ و صیانت زیست بوم از نظر اقتصادی و کاربردی به خصوص در بعد کلان بسیار موثرترند(۲). سودوموناس‌ها به دلیل داشتن پلاسمیدهای حامل ژن‌های موثر در تجزیه ترکیبات نفتی از اهمیت بیشتری برخوردارند(۳). باکتری‌های سودوموناس با تولید بیوسورفاکتانت‌های متفاوت و با کمک مکانیزم‌های چسبندگی/ واجذبی سبب تجزیه و یا حذف هیدروکربن‌ها در خاک می‌شوند (۴و ۵).

از آنجایی که وارد نمودن باکتری به صورت مستقیم و یا سوسپانسیون در خاک با اشکالات کاربردی متعددی مواجه است، لیکن اعمال حامل مناسب حاوی باکتری‌های بومی یا غیربومی موثر و کارآمد، ضمن حفظ جمعیت قابل قبول از باکتری، وسیله-ای برای عرضه باکتری به سطح آلوده مورد نظر می‌باشد. حامل باکتری به ماده جامد، مایع یا نیمه جامدی اطلاق می‌شود که قادر است جمعیت مشخصی از باکتری مورد نظر را در مدت معین، در خود حفظ کند (۶). بدینسان، تهیه حامل‌های محتوی باکتری‌های موثر تجزیه‌کننده نفت خام و ارائه آن برای پاکسازی منابع مذکور، روشی سریع پیش‌رونده برای کاهش این نوع آلاینده است.

یک ماده حامل خوب دارای ظرفیت نگهداری آب بالا، بدون حالت خمیری یا چسبندگی، با شرایط تهویه‌ای مناسب، بدون ایجاد حرارات در هنگام خیس شدن، فاقد ترکیبات سمی برای باکتری و گیاه، دارای pH تقریبا خنثی یا قابل تنظیم، ظرفیت تبادل کاتیونی و ظرفیت بافری بالا، خواص فیزیکی و شیمیایی یکنواخت، EC پائین، قابلیت تامین عناصرغذایی، بدون عوارض آلایندگی محیط زیست، قابلیت فرآیند پودرسازی، بسته‌بندی و مخلوط‌سازی آسان، قابل دسترس به مقدار کافی برای تولید انبوه مایه تلقیح و ارزان‌قیمت، سطح تماس کافی و استاندارد، سهولت آزادسازی باکتری در خاک و ترجیحا مناسب برای همه گونه‌های باکتری می‌باشد (۷-۱۱).

در نهایت، ماده حامل باید تامین‌کننده رشد باکتری و حفظ جمعیت استاندارد آن برای مدت ۶-۳ ماه باشد (۱۲و۱۳). بر خلاف باکتری‌های ریزوبیوم که تحقیقات زیادی در مورد تهیه ماده حامل مناسب برای آن‌ها انجام شده، در مورد باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت تحقیقی جامعی در دسترس نیست. پژوهش-های مربوط به حامل‌های کارآمد، نشان داده‌اند پیت به عنوان مناسب‌ترین ماده حامل در سرتاسر جهان برای اغلب باکتری‌ها شناخته شده است (۱۴-۱۶).

پیت به دلیل ترکیب غنی از مواد آلی و ساختار متخلل به عنوان یک حامل موثر برای رشد باکتری‌ها عمل می‌کند (۱۷و ۱۸). از دیگر حامل‌های مورد استفاده سبوس گندم است که عموما به عنوان حامل باکتری‌های ازتوباکتر استفاده می‌شود (۱۹). سبوس گندم با محتوای کربن بالا باکتری‌ها را در برابر عوامل محیطی به مدت طولانی حفظ می‌کند (۲۰). از دیگر مواردی که می‌تواند به عنوان حامل، باکتری را در خود نگه دارد بیوچار می‌باشد. بیوچار می‌تواند به دلیل داشتن محتوای کربن بالا، ساختار متخلخل و سطح ویژه بالا و عدم وجود مواد سمی به عنوان بهترین بستر برای میکروارگانیسم‌های مفید عمل کند و بقا و فعالیت میکروارگانیسم‌ها را افزایش دهد (۲۱).

این تحقیق بر مبنای ضرورت تهیه یک ماده حامل مناسب جهت نگهداری بلندمدت باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام و استفاده از آن به عنوان مایه تلقیح انجام شده است. در این راستا هدف از این پژوهش، بررسی کیفیت چندین ماده حامل معمول و موثر، برای تولید حامل باکتری تجزیه‌کننده نفت خام در کشور بوده و

شرط اصلی تحقق این امر فراهم کردن ماده حامل مناسبی است که بتواند جمعیت باکتری را در مدت زمان لازم بین تولید تا مصرف آن، به تعداد کافی و در حد استانداردهای تعیین شده جهانی ($۱۰^{۷}$-$۱۰^{۹}$ باکتری در هر گرم از ماده حامل) به حالت زنده و فعال حفظ کند (۲۲). در ضمن آن که شرایط رطوبتی و دمایی و زمان بهینه نگهداشت حامل از مسایل مهم این پژوهش بوده است.

مواد و روش ها

در این پژوهش، حامل مناسب باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام بر اساس مطالعات پیشین پیت، بیوچار و سبوس در نظر گرفته شد. این ترکیبات ارزان قیمت و در دسترس بوده و به نظر می‌رسد بر اساس اطلاعات موجود در زمینه نیازهای اکولوژیک باکتری‌ها و مشخصات مواد نگهدارنده، توانایی نگهداری باکتری‌ها را دارا باشند.

حامل‌های انتخاب شده ابتدا در آون اتوکلاو به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۹۰ درجه خشک و سپس با استفاده از آسیاب برقی خرد شده و از غربال ۳۵ مش (۰/۰۵ میلی‌متر) عبور داده شدند. برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی مواد مانند رطوبت FC (۲۳)، pH (عصاره گل اشباع)، EC (عصاره گل اشباع)، کربن آلی (روش والکی بلاک)، فسفرقابل جذب (روش اولسن)، سدیم (استات آمونیوم نرمال)، پتاسیم (استات آمونیوم نرمال)، نیتروژن (روش کجلدال) و جرم مخصوص ظاهری (روشن استوانه) اندازه گیری شد (۸). برای تنظیم pH حامل‌ها از کربنات کلسیم و اسید سولفوریک ۲ مولار استفاده شد به این ترتیب که تمام حامل‌ها روی pH=۷ تنظیم شدند. سپس هر یک از آن‌ها در کیسه‌ای پلاستیکی (۳۵×۲۵) سانتی‌متر ریخته و درب آن‌ها دوخته شد. سپس بسته‌های حامل در دستگاه اتوکلاو به مدت ۲۰ دقیقه، در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۲۰ اتمسفر استریل شدند.

مطالعات پیشین امکان‌سنجی کاربرد باکترهای غیربومی موثر، موید کارآمدی و توانمندی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* بود و به همین منظور این باکتری در این پژوهش انتخاب گردید (۲۴). برای تهیه سوسپانسیون باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* یک کلونی از کشت تازه باکتری را برداشته و به محیط مایع مغذی اضافه گردید و با استفاده از انکوباتور شیکردار در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و چرخش ۱۵۰ دور در دقیقه تکثیر شد. با توجه به منحنی رشد باکتری، پس از رشد کافی و رسیدن به مرحله رشد ثابت (حدود ۱۲ ساعت) با استفاده از روش سری‌های رقت دهدهی (۲۵) جمعیت سوسپانسیون $۵/۵\times۱۰^{۹}$ باکتری به ازای هر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. سوسپانسیون کشت تازه باکتری با توجه به رطوبت FC مواد حامل (جدول ۲) به هر بسته اضافه گردید و درب آن‌ها دوخته شد. برای بررسی اثر رطوبت حامل بر روی ماندگاری باکتری *سودوموناس آئروژینوزا*، دو سطح رطوبتی FC و ۷۰٪FC و برای بررسی اثر دما حامل دو سطح دمایی ۲۵ و ۴ درجه سلسیوس انتخاب گردید. بسته‌های مواد حامل به منظور رشد باکتری‌ها به مدت ۱۴ روز در انکوباتور و دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند، سپس تیمار ۴ درجه سلسیوس تا پایان ۱۸۰ روز به یخچال در دمای ۴ درجه سلسیوس انتقال داده شد. شمارش باکتری به روش سری‌های رقت دهدهی (۲۵) در زمان‌های ۷، ۱۴، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰ و ۱۸۰ روز انجام گرفت، بدین صورت که یک گرم از حامل‌های تلقیح شده داخل بسته‌ها در شرایط استریل برداشته شد و سری‌های رقت تهیه گردید. سپس سوسپانسیون‌های حاصل روی محیط نوترینت آگار کشت شدند و بعد از ۱ روز انکوباسیون در دمای ۳±۲۸ درجه سلسیوس کلنی‌های موجود در پلیت‌ها شمارش شده و جمعیت باکتری در هر حامل تعیین گردید. کد تیمارها به شرح ذیل می-باشد:

جدول ۱- کد تیمارهای آزمایشی

Table 1. Experimental treatment codes

تیمار	کد	تیمار	کد
دمای ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت FC در زمان ۷ روز	۱۱۱	دمای ۴ درجه سلسیوس، رطوبت FC در زمان ۷ روز	۲۱۱
دمای ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت FC در زمان ۱۴ روز	۱۱۲	دمای ۴ درجه سلسیوس، رطوبت FC در زمان ۱۴ روز	۲۱۲
دمای ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت FC در زمان ۳۰ روز	۱۱۳	دمای ۴ درجه سلسیوس، رطوبت FC در زمان ۳۰ روز	۲۱۳
دمای ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت FC در زمان ۶۰ روز	۱۱۴	دمای ۴ درجه سلسیوس، رطوبت FC در زمان ۶۰ روز	۲۱۴
دمای ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت FC در زمان ۹۰ روز	۱۱۵	دمای ۴ درجه سلسیوس، رطوبت FC در زمان ۹۰ روز	۲۱۵
دمای ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت FC در زمان ۱۲۰ روز	۱۱۶	دمای ۴ درجه سلسیوس، رطوبت FC در زمان ۱۲۰ روز	۲۱۶
دمای ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت FC در زمان ۱۵۰ روز	۱۱۷	دمای ۴ درجه سلسیوس، رطوبت FC در زمان ۱۵۰ روز	۲۱۷
دمای ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت FC در زمان ۱۸۰ روز	۱۱۸	دمای ۴ درجه سلسیوس، رطوبت FC در زمان ۱۸۰ روز	۲۱۸
دمای ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت ۷۰٪ FC در زمان ۷ روز	۱۲۱	دمای ۴ درجه سلسیوس، رطوبت ۷۰٪FC در زمان ۷ روز	۲۲۱
دمای ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت ۷۰٪ FC در زمان ۱۴ روز	۱۲۲	دمای ۴ درجه سلسیوس، رطوبت ۷۰٪FC در زمان ۱۴ روز	۲۲۲
دمای ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت ۷۰٪ FC در زمان ۳۰ روز	۱۲۳	دمای ۴ درجه سلسیوس، رطوبت ۷۰٪FC در زمان ۳۰ روز	۲۲۳
دمای ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت ۷۰٪ FC در زمان ۶۰ روز	۱۲۴	دمای ۴ درجه سلسیوس، رطوبت ۷۰٪FC در زمان ۶۰ روز	۲۲۴
دمای ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت ۷۰٪ FC در زمان ۹۰ روز	۱۲۵	دمای ۴ درجه سلسیوس، رطوبت ۷۰٪FC در زمان ۹۰ روز	۲۲۵
دمای ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت ۷۰٪ FC در زمان ۱۲۰ روز	۱۲۶	دمای ۴ درجه سلسیوس، رطوبت ۷۰٪FC در زمان ۱۲۰ روز	۲۲۶
دمای ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت ۷۰٪ FC در زمان ۱۵۰ روز	۱۲۷	دمای ۴ درجه سلسیوس، رطوبت ۷۰٪FC در زمان ۱۵۰ روز	۲۲۷
دمای ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت ۷۰٪ FC در زمان ۱۸۰ روز	۱۲۸	دمای ۴ درجه سلسیوس، رطوبت ۷۰٪FC در زمان ۱۸۰ روز	۲۲۸
حامل پیت	P	حامل بیوچار	Bi
حامل سبوس	Br		

این پژوهش به صورت آزمایش کرت‌های خرد شده در زمان بر پایه طرح کاملا تصادفی با سه تکرار که در آن دما به عنوان فاکتور اصلی و رطوبت به عنوان فاکتور فرعی در نظر گرفته شد. برای مقایسه بین حامل‌ها نیز یک طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد آماری با نرم افزار SAS صورت گرفت و رسم نمودارها هم با نرم‌افزار EXCEL 2013 انجام شد.

نتایج

نتایج ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی حامل‌های مورد استفاده در این پژوهش در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲- خصوصیات فیزیکوشیمیایی حامل‌های پیت، سبوس و بیوچار

Table 2. Physico-chemical properties of peat, bran and biochar carriers

ویژگی مورد نظر	نام ماده حامل		
	پیت	سبوس	بیوچار
نیتروژن (٪)	۰/۰۸۱	۰/۰۸۹	۰/۰۴۱
سدیم (٪)	۰/۰۶	۰/۸۳	۰/۰۸
پتاسیم (٪)	۰/۷۱	۱/۱	۰/۸۵
فسفر (٪)	۰/۲۲	۰/۴۷	۱/۰۳

کربن آلی (٪)	۳۲/۷۶	۵/۸۵	۱۷/۷۴۵
pH عصاره اشباع	۶/۷۵	۵/۵	۹/۵۹
EC عصاره اشباع (dS/m)	۰/۷	۶/۳۹	۷/۴۴
جرم مخصوص‌ظاهری(gr/cm^3)	۰/۴۲۶	۰/۲۶۰	۰/۱۶۹
رطوبت ظرفیت زراعی (%)	۱۷۹/۶	۱۶۸/۵	۱۵۸/۴

جدول ۳ نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای مختلف بر جمعیت باکتریایی در سه نوع حامل مختلف را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود، اثرات اصلی و متقابل تمام تیمارها بر جمعیت باکتریایی در سطح ۵ درصد آماری معنی‌دار شد.

جدول۳- تجزیه واریانس حامل‌های آزمایشی

Table 3. Analysis of variance for experimental carriers

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		پیت	سبوس	بیوچار
دما	۱	۱۳/۱۴۲*	۵۵/۱۱۵*	۲۷/۲۷۱*
دما(تکرار)	۴	۰/۰۰۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱
رطوبت	۱۱	۱۶/۱۱۹*	۲۷/۲۲۱*	۲۹/۰۲۷*
دما×رطوبت	۴	۵/۰۲۱*	۰/۳۱۱*	۰/۰۱*
دما×رطوبت(تکرار)	۷	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۶	۰/۰۰۰۷
زمان	۷	۳/۸۱۲*	۱۶/۲۶۸*	۹/۱۷۵*
دما×زمان	۷	۰/۹۲۴*	۲/۳۷۸*	۰/۷۳۷*
رطوبت×زمان	۷	۰/۶۶۳*	۰/۴۳۱*	۰/۲۵۱*
دما×رطوبت×زمان	۷	۰/۲۶۸*	۰/۷۳*	۰/۷۷۶*
خطا	۵۶	۰/۰۰۰۶	۰/۰۰۳	۰/۰۰۰۴
ضریب تغییرات		۰/۲۸۱	۰/۷۲۳	۰/۲۶۴

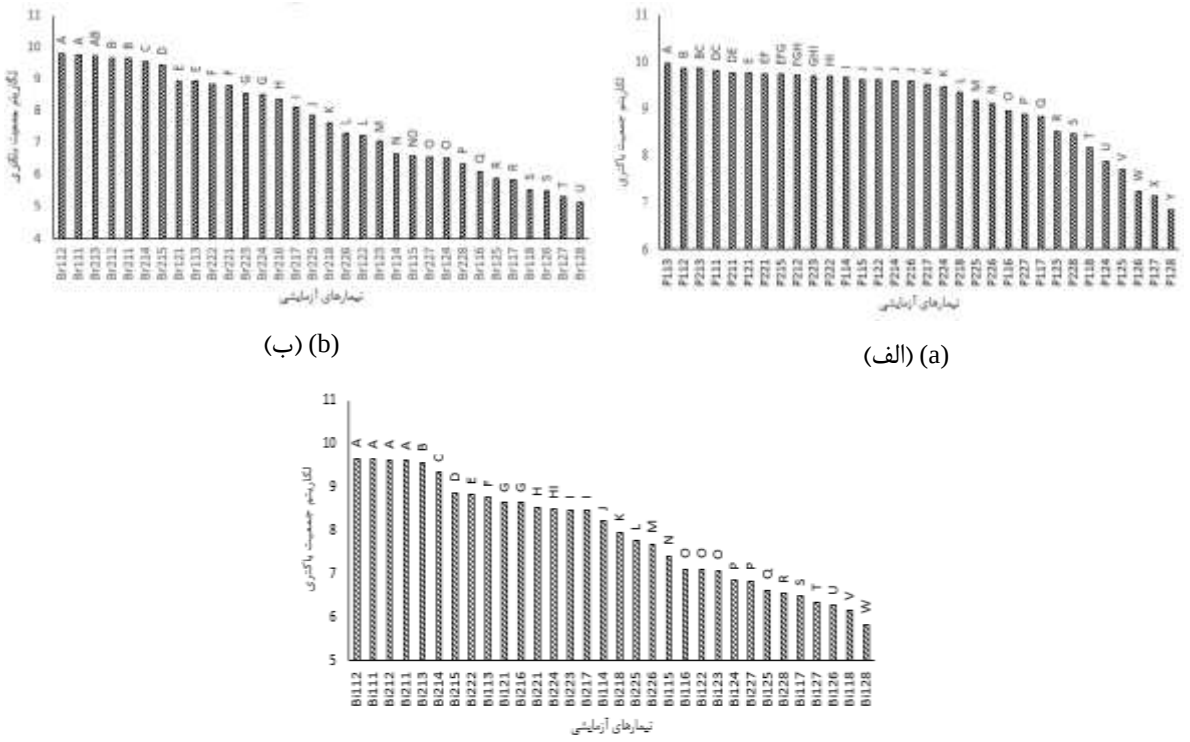
* معنی‌دار در سطح ۰/۰۵

نتایج مقایسه میانگین حامل پیت نشان داد که بیشترین میزان جمعیت باکتری مربوط به تیمار پیت ۱۱۳ (دمای ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت FC، در زمان ۳۰ روز) با جمعیت $۹/۱\times۱۰^{۹}$ باکتری در هر گرم از ماده حامل و همچنین کمترین میزان جمعیت مربوط به تیمار پیت ۱۲۸ (دمای ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت ۷۰٪FC، در زمان ۱۸۰ روز) با جمعیت ۷×۱۰^{۶} باکتری در هر گرم از ماده حامل می‌باشد (شکل الف).

نتایج مقایسه میانگین حامل سبوس نشان داد که بیشترین میزان جمعیت باکتری مربوط به تیمار ۱۱۲ (دمای ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت FC، در زمان ۱۴ روز) با جمعیت $۶/۵\times۱۰^{۹}$ باکتری در هر گرم از ماده حامل که با تیمارهای ۱۱۱، ۲۱۳ در یک گروه آماری قرار گرفتند. همچنین کمترین میزان جمعیت باکتری مربوط به تیمار ۱۲۸ (دمای ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت ۷۰٪FC، در زمان ۱۸۰ روز) با جمعیت $۱/۳۹\times۱۰^{۵}$ باکتری در هر گرم از ماده حامل بود. (شکل ب).

نتایج مقایسه میانگین حامل بیوچار نشان داد که بیشترین میزان جمعیت باکتری مربوط به تیمار ۱۱۲ (دمای ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت FC، در زمان ۱۴ روز) با جمعیت $۴/۵\times۱۰^{۹}$ باکتری در

هر گرم از ماده حامل که با تیمارهای ۱۱۱، ۲۱۲ و ۲۱۱ در یک گروه آماری قرار گرفتند و کمترین میزان جمعیت باکتری مربوط به تیمار ۱۲۸ (دمای ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت ۷۰٪FC، در زمان ۱۸۰ روز) با جمعیت ۷×۱۰^{۵} باکتری در هر گرم از ماده حامل می‌باشد (شکل ج).



(الف) (a)

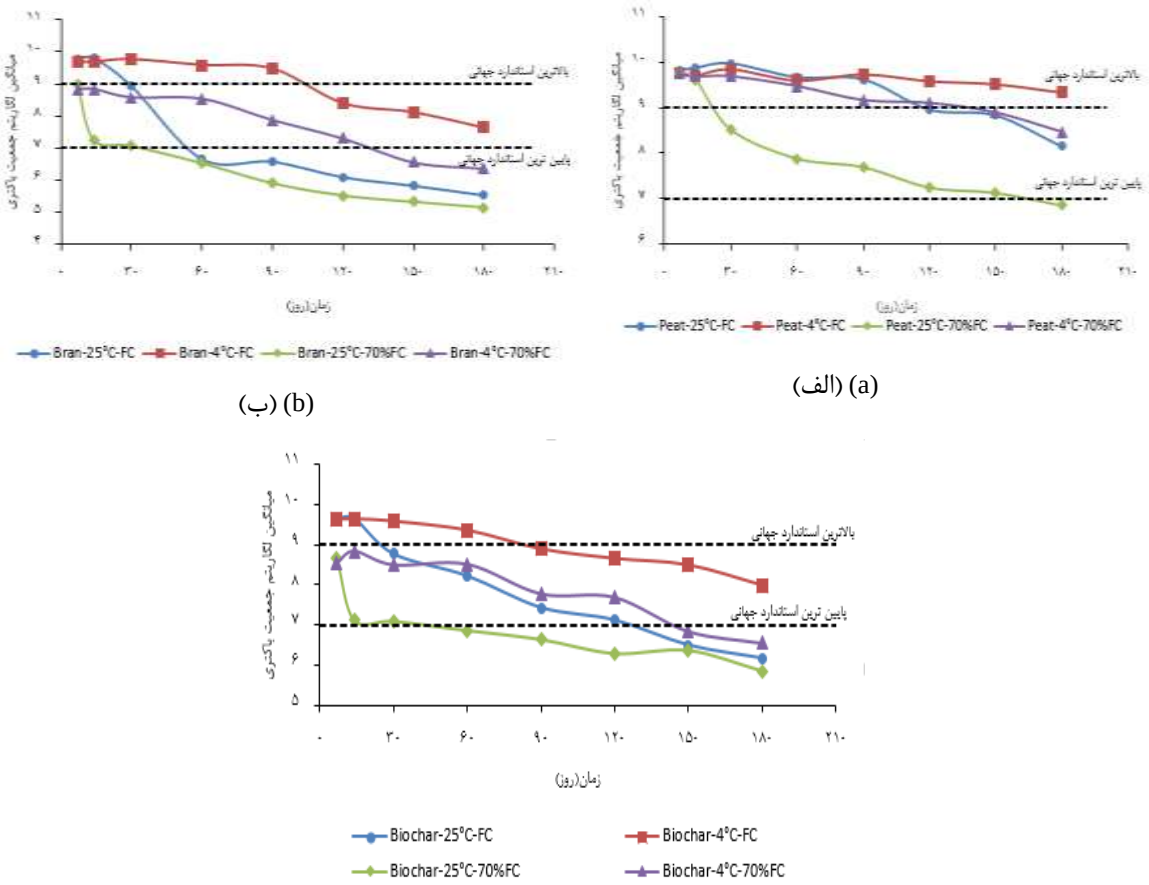
(ب) (b)

(ج) (c)

شکل ۱- مقایسه میانگین حامل‌های مختلف؛ حامل پیت (الف)، حامل سبوس (ب) و حامل بیوچار(ج)

Figure 1. Comparison of means for different carriers; peat carrier (a), bran carrier (b) and biochar carrier (c)

روند تغییر جمعیت باکتری در حامل‌های آزمایشی در شرایط رطوبتی و دمایی مختلف در طی دوره آزمایشی در شکل ۲ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود از بین شرایط رطوبتی و دمایی اعمال شده، در حامل پیت (شکل الف) فقط در در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت ۷۰٪FC تعداد باکتری در محدوده استاندارد جهانی قرار نگرفته است، و جمعیت باکتری سایر تیمارها در طول دوره انکوباسیون در حد قابل قبول از نظر استانداردهای جهانی بوده است. در حامل سبوس (شکل ب) فقط دمای ۴ درجه سلسیوس و رطوبت FC مقدار باکتری را در حد قابل قبول از نظر استانداردهای جهانی در مدت ۶ ماه نگهداری حفظ کرده است و جمعیت باکتری سایر تیمارها در طول دوره انکوباسیون در حد قابل قبول از نظر استانداردهای جهانی در مدت ۶ ماه نگهداری حفظ کرده است. در حامل بیوچار (شکل ج) فقط در دمای ۴ درجه سلسیوس و رطوبت FC مقدار باکتری را در حد قابل قبول از نظر استاندارد-های جهانی در مدت ۶ ماه نگهداری حفظ کرده است، و جمعیت باکتری سایر تیمارها در طول دوره انکوباسیون به پایین تر از حد استاندارد جهانی رسیده است.



(الف) (a)

(ب) (b)

(ج) (c)

شکل ۲- روند تغییر جمعیت باکتری در حامل‌های مختلف؛ حامل پیت (الف)، حامل سبوس (ب) و حامل بیوچار(ج)

Figure 2. Changes in bacteria population in different carriers; peat carrier (a), bran carrier (b) and biochar carrier (c)

اثر حامل‌ها بر جمعیت باکتریایی

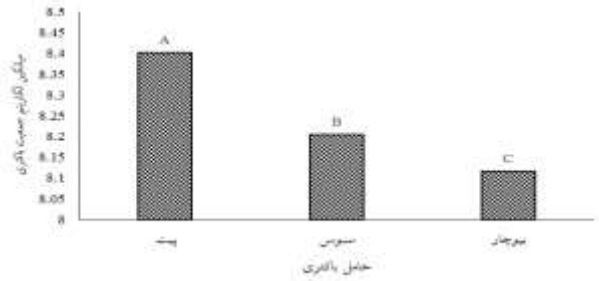
تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر اصلی حامل بر جمعیت

باکتریایی در سطح ۵ درصد معنی دار شد (جدول ۴).

جدول ۴- تجزیه واریانس اثر حامل‌ها

Table 4. Analysis of variance for carrier effect

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
حامل	۲	۰/۰۶*
خطا	۶	۰/۰۰۰۴
ضریب تغییرات		۰/۲۴۵



شکل۳- نمودار مقایسه میانگین حامل‌های آزمایشی

Figure 3. Comparison of means histogram for experimental carriers

مقایسه میانگین جمعیت باکتری در حامل‌های مختلف نشان داد که به ترتیب پیت، سبوس و بیوچار با مقادیر ۸/۴۰۲، ۸/۲۰۵ و ۸/۱۱۶ (logCFU/g)بیشترین میزان زنده‌مانی جمعیت باکتری را از خود نشان دادند.

بحث و نتیجه‌گیری

ایران از مهمترین کشـــورهای نفت خیز دنیا بشـــمار میرود و در بســـیاری از مناطقی که دچار آلایندگی هیدروکربنی زیرزمینی آب و خاک گردیده، با گذشـــت زمان دارای باکتری‌های تجزیه کننده بومی مستقر شده و شرایط تجزیه زیستی به‌کندی انجام می‌شود، لیکن با توجه به شرایط نامساعد زیستی موجود، اضافه کردن ریز اندام‌های موثر و کارامد غیربومی تجزیه‌گر، بخصـــوص در زمان‌های وقوع آلایندگی و ایجاد شـــرایط مناســـب می‌تواند بسرعت کاهش آلایندگی را سبب گردد. اساس این پژوهش بر بهینه سازی بسته‌های حامل باکتری‌های کارامد تجزیه‌گر نفت خام و امکان ارایه آن‌ها در زمان مطلوب در هر مکان (با توجه شرایط بهینه نگهداشت آنها بمدت ۶ ماه) انجام گردید.

امکان ســـنجی کاربرد حامل مناســـب (پیت، ســـبوس و بیوچار) برای باکتری تجزیه‌گر نفت مورد اســـتفاده در این پژوهش در دوره ۶ ماه نتایج متفاوتی نشان داد. در ۳۰ روز نخست، بیشترین میزان جمعیت باکتریایی برای حامل پیت و تیمار ۲۵ درجه سلسیوس رطوبت FC بدست آمد. همچنین بیشترین جمعیت باکتریایی در حامل ســـبوس و بیوچار در تیمار ۲۵ درجه سلسیوس رطوبت FC و زمان ۱۴ روز به دست آمد. بدینسان ابتدا در تیمار دمایی بالاتر افزایش جمعیت در همه حامل‌ها اتفاق افتاد و لیکن بعد از دوره‌های مذکور، روند جمعیت ریز اندام‌های موثر با شیب بیشتری کاهش یافته و با ادامه زمان در تمام ماه‌های آتی موید آن بود که در تیمار دمایی پایین‌تر همه حامل‌های مورد مطالعه جمعیت‌های بالاتری از میکروارگانیسم‌ها را در بر داشـــتند. بررســـی پژوهشـــگران نشـــان داد که جمعیت باکتری در حامل پیت به علت ماده آلی فراوان، ظرفیت نگهداری رطوبت مناســـب، در دوره‌های زمانی کوتاه مدت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس بیشتر از ۴ درجه سلسیوس است. که با نتایج حاضـــر در این پژوهش مطابقت دارد(۲۶). دلیل اصـــلی کاهش جمعیـت ممکن اســـت بـه دلیـل هتروتروف بودن بـاکتری سودوموناس آئروژینوزا و کمبود مواد آلی در حامل‌های بیوچار و سبوس در مقایسه با پیت باشد. زنده‌مانی باکتری در طی زمان نگهداری تحت تاثیر روش‌های اســـتریلیزاســـیون، نوع حامل و دمای نگهداری می‌باشد (۱۹).

از ســـویی دیگر، افزایش زمان انکوباســـیون در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، سبب کاهش جمعیت باکتری در حامل‌های مختلف گردید که روند کاهش جمعیت باکتری در حامل‌ها متفاوت بود. به نظر می‌رسد، دمای ۲۵ درجه سلسیوس باعث رشد و تکثیر باکتری شـــده که این امر باکتری را وارد فاز رشـــد لگاریتمی می‌کند. در این صـــورت اگر موادغذایی در حامل‌های نگهداری باکتری در حد مطلوبی نباشـــد، حامل دچار کمبود موادغذایی شـــده و این موضـــوع ســـبب کاهش جمعیت باکتری می‌شـــود. همچنین از دیگر دلایل کاهش جمعیت باکتری، افزایش غلظت برخی گازهای بازدارنده در دمای ۲۵ درجه ســـلســـیوس به علت دمای زیاد می‌باشد که با انتقال مایه تلقیح‌ها به داخل یخچال و

نگهداری آن‌ها در دمای ۴ درجه سلسیوس شرایط بهتری برای رشد و ماندگاری باکتری‌ها فراهم می‌شود. پژوهش‌ها نشان داده است که دمای بالا اگر چه باعث رشد و افزایش جمعیت باکتری‌ها می‌شود، ولی باعث تولید مواد زائد شده که این مواد زائد علاوه بر سمی بودن برای باکتری، سبب تغییر pH محیط حامل نگه‌دارنده باکتری شده که این موضوع منجر به کاهش جمعیت باکتری در حامل می‌شود. بررسی‌های انجام شده به وسیله سایر پژوهشگران نشان می‌دهد که تغییرات pH و رطوبت در دمای پایین کمتر است (۱۸و ۲۸-۲۶). همچنین بررسی های دیگر بیانگر این بود که هنگامی که باکتری در دماهای پایین‌تر نگه‌داری می‌شود عمر مفید و زنده‌مانی آن بیشتر می‌شود که با نتایج حاضر در این پژوهش مطابقت دارد(۲۹).

رطوبت از عوامل موثر بر جمعیت های میکروبی است. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که میزان جمعیت باکتری در رطوبت FC در مقایسه با ۷۰٪FC مطلوب‌تر بود. رطوبت بهینه برای باکتری‌ها در بسته‌های حامل در محدوده رطوبتی FC می‌باشد که احتمالا ضمن تامین رطوبت مناسب باعث ایجاد حالت پودری در حامل گردیده و در نتیجه شرایط تهویه‌ای مناسبی را برای رشد و تکثیر باکتری فراهم کرده است. پژوهش های پیشین در مورد بررسی رطو بت بهی نه برای نگهداشت حامل مناسب در زمان در محدوده پتانسیل ۳۰- کیلوپاسکال یا رطوبت ظرفیت زراعی (FC) بوده است و کاهش دمای انکوبا سیون سبب کاهش از د ست رفتن آب می شود که منجر به حفظ بیشتر باکتری در زمان‌های طولانی می‌گردد، که با نتایج حاضر در این پژوهش مطابقت دارد (۲۳و ۲۵).

نتایج مقایسه میانگین جمعیت باکتری در حامل‌های مختلف نشان داد که به ترتیب پیت، سبوس، بیوچار بیشترین میزان جمعیت باکتری را داشتند. پیت به علت داشتن خصوصیات فیزیکی و شیمیایی مناسب از جمله ظرفیت نگهداری آب بالا، pH خنثی، هدایت الکتریکی پایین، سطح جذبی بالا و ... دارای بیشترین تعداد باکتری در هر گرم مایه تلقیح بود. نتایج این تحقیق نشان داد که سبوس به رغم داشتن ظرفیت بالای نگهداری آب، پس از جذب آب حالت خمیری و چسبناک پیدا کرده و احتمالا منجر به ایجاد شرایط تهویه‌ای نامناسب برای باکتری‌های تحت شرایط آزمایشی شده است. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که بیوچار در صورتی می‌تواند به عنوان حامل مطلوب برای زنده‌مانی باکتری در طولانی مدت استفاده شود که شرایط دمایی و رطوبتی آن به ترتیب ۴ درجه سلسیوس و رطوبت ظرفیت زراعی باشد. در حالی که با افزایش دمای نگهداری و کاهش رطوبت میزان زنده‌مانی باکتری به شدت کاهش یافته و به پایین‌تر از حد استاندارد جهانی می‌رسد.

با توجه به نتایج به دست آمده، تاثیر نوع حامل، دما و رطوبت در طی دوره‌ی نگهداری کاملا مشهود بوده است. در مورد حامل‌های سبوس و بیوچار، دمای ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت ۷۰٪FC منجر به کاهش تعداد جمعیت باکتری مورد استفاده به پایین‌تر از حد استاندارد جهانی در طی دوره زمانی کوتاهی شده است، که این بازه زمانی در مورد حامل سبوس بسیار کوتاه بوده است. همچنین بدون توجه به نوع حامل، بهترین تیمار دمایی و رطوبتی، دمای ۴ درجه سلسیوس و رطوبت FC بوده است. جمعیت باکتریایی تحت شرایط رطوبتی و دمایی مذکور در محدوده استاندارد جهانی در طی دوره آزمایشی بوده است. لذا نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که جمعیت باکتریایی مورد استفاده بیشتر متاثر از شرایط نگهداشت آن می‌باشد.

References

1. Karimpoor R, Ebrahimi S, Malekzadeh E. Assessment of petroleum sludge pollution risk on some characteristics of active carbon-treated soil. Environmental Resources Research. 2024 Jul 1;12(1):167-82.
2. Taghdisi, R., Ebrahimi, S., Ghorbani Nasrabadi, R., & Khormali, F. (2025). The influence of inorganic nitrogen modifiers on bioremediation of hydrocarbon pollutants in a diesel-contaminated soil. *Journal of Environmental Science Studies*, *9*(4), 9404-9390.
3. Akhavan S, Ebrahimi S, Navabian M, Shabanpour M, Mojtahedi A,

Movahedi Naeini A. Significance of physicochemical factors in the transmission of Escherichia coli and chloride. Environmental Health Engineering and Management Journal. 2018 May 10;5(2):115-22 (In Persian).
4. Das K, Mukherjee AK. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of Bacillus subtilis and Pseudomonas aeruginosa strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. Bioresource technology. 2007 May 1; 98(7):1339-45.
5. Rosenberg E, Ron EZ. Bioremediation of petroleum contamination. Biotechnology Research Series. 1996; 6:100-24.
6. Asghari SM, Aliasgharzadeh N. Comparision of Five Carriers of Sinorhizobium meliloti to Produce Alfalfa Inoculant. JWSS-Isfahan University of Technology. 2005 Jan 15;8(4):63-75. (In Persian)
7. Strijdom BW, Deschodt CC. 13. Carriers of rhizobia and the effects of prior treatment on the survival of rhizobia. Symbiotic nitrogen fixation in plants. 1976 Feb 26;7(30):151.
8. Page AL, Miller RH, Keeney DR. Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties. American Society of Agronomy. InSoil Science Society of America 1982 (Vol. 1159).
9. Romero J, Palomares A, Gallavdo F, Olivares J. Survival and preservation of effectivness of *Rhizobium meliloti* in inoculants prepared with a netural-alkalin peat as carrier. Anales De Edafologia Agrobiologia. 1987: 37: 551-560.
10. Seyed Alikhani S, Shorafa M, Tavassoli A, Ebrahimi SS. The effect of plants' growth at different densities on soil petroleum hydrocarbons remediation. Water and Soil. 2011 Dec 22; 25(5).
11. Somasegaran P, Hoben HJ. Handbook for rhizobia: methods in Legume-Rhizobium technology. Springer Science & Business Media; 2012 Dec 6.
12. Pazhmaan AJ, Ebrahimi S, Kiani F, Rashidi H. Pollution assessment, spatial distribution and exposure of Cd and Pb in surface soils of abandoned landfill site in Gorgan, north of Iran. Environmental Resources Research. 2021;9(1):69-78.
13. BNF Bulletin. Volume X, Number 1, university of Hawaii, NIFTAL project, paia, Hawaii. 1991
14. Smith RS. Legume inoculant formulation and application. Canadian Journal of Microbiology. 1992 Jun 1;38(6):485-92.
15. Albareda M, Rodríguez-Navarro DN, Camacho M, Temprano FJ. Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: solid and liquid formulations. Soil Biology and Biochemistry. 2008 Nov 1; 40(11): 2771-9.
16. Hale L, Luth M, Crowley D. Biochar characteristics relate to its utility as an alternative soil inoculum carrier to peat and vermiculite. Soil Biology and Biochemistry. 2015 Feb 1; 81:228-35.
17. Soininen L, Roslund MI, Tahvonen O, Manninen J, Hui N, Sinkkonen A. Forestry-and agriculture-derived materials as potential bacterial supplements in immunomodulatory urban greening. Urban Forestry & Urban Greening. 2024 Nov 1; 101:128492.

18. Abdi DE, Beasley J, Fields J. Reducing Phosphorus Loss in Short-Cycle Horticultural Production Using Activated Aluminum-Amended Substrates and Modified Fertigation Practices. Plants. 2024 Sep 4;13(17):2473.
19. El-Fattah DA, Eweda WE, Zayed MS, Hassanein MK. Effect of carrier materials, sterilization method, and storage temperature on survival and biological activities of Azotobacter chroococcum inoculant. Annals of Agricultural Sciences. 2013 Dec 1;58(2):111-8.
20. Cheng Z, Lu L, Kennes C, Ye J, Yu J, Chen D, Chen J. A composite microbial agent containing bacterial and fungal species: Optimization of the preparation process, analysis of characteristics, and use in the purification for volatile organic compounds. Bioresource technology. 2016 Oct 1; 218:751-60.
21. Hashemi M, Ebrahimi S, Ghorbani Nasrabadi R, Movahedi Naeini S. Changes in The Hydrocarbon Pollution Rate of Soil Containing Biochar Modifier (Case Study: Soil Around Shiraz Refinery). Agricultural Engineering. 2023 march 45(4): 409-423. (In Persian)
22. Khavarezi K, Rejali F. Use of some inexpensive materials as carriers of Bradyrhizobium japonicum. Soil and Water. 2000:14 (1): 36-45.
23. Griffith GW, Roughley RJ. The effect of moisture potential on growth and survival of root nodule bacteria in peat culture and on seed. Journal of Applied Microbiology. 1992 Jul 1;73(1):7-13.
24. Ebadi A, Olamaee M, Sima NA, Nasrabadi RG, Hashemi M. Isolation and characterization of biosurfactant producing and crude oil degrading bacteria from oil contaminated soils. Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science. 2017:1-8.
25. Bazilah AB, Sariah M, Abidin MZ, Yasmeen S. Effect of carrier and temperature on the viability of Burkholderia sp.(UPMB3) and Pseudomonas sp.(UPMP3) during storage. Int J Agric Biol. 2011 Mar 1; 13:198-202.
26. Kaljeet S, Keyeo F, Amir HG. Influence of carrier materials and storage temperature on survivability of Rhizobial inoculant. Asian journal of plant sciences. 2011;10(6):331.
27. Daza A, Santamarıa C, Rodrıguez-Navarro DN, Camacho M, Orive R, Temprano F. Perlite as a carrier for bacterial inoculants. Soil Biology and Biochemistry. 2000 Apr 1;32(4):567-72.
28. Basharati Kallayeh H, Saleh Rastin N, Aliizadeh A. The study of the ability of the Thiobacillus bacteria to survive on different types of carriers. 2004. (In Persian)
29. Cigdem K, Merih K. Effect of formulation on the viability of biocontrol agent, Trichoderma harzianum conidia. Afr J Biotechnol. 2005; 85:483-6.