

علوم و تکنولوژی محیط زیست، دوره بیست و هفت، شماره یک، فروردین ماه ۱۴۰۴ (۲۳-۳۵)

بهینه‌سازی زنده‌مانی باکتری غیر بومی تجزیه‌گر موثر نفت خام در حامل‌های

مختلف

مهران سلیمی بجزستانی^۱

سهیلا ابراهیمی^{۲*}

Sohebrahimi@gmail.com

رضا قربانی نصرآبادی^۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۲۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۵

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 به منظور نگهداشت باکتری‌های مورد نظر انجام شد.

روش بررسی: بدین منظور سه حامل پیت، سبوس و بیوجار 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 بیوجار) 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 بیوجار 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 و نتیجه گیری: استاندارد جهانی حامل مناسب، وجود جمعیت باکتریایی به میزان 10^9-10^7 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. * (مسئول 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.

Optimizing exotic effective oil-hydrolyzing bacteria survival in different carriers

Mehran Salimi Bajestani¹

Soheila Ebrahimi^{2*}

sohebrahimi@gmail.com

Reza Ghorbani Nasrabadi³

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 depredeating 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 10⁷ to 10⁹ 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 (۴ و 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، وسیله‌ای 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 حرارت در هنگام خیس شدن، فاقد ترکیبات سمی برای باکتری و گیاه، دارای pH تقریباً خنثی یا قابل تنظیم، ظرفیت تبادل کاتیونی و ظرفیت بافری بالا، خواص فیزیکی و شیمیایی یکنواخت، EC پائین، قابلیت تامین عناصر غذایی، بدون عوارض آلاینده‌گی محیط زیست، قابلیت فرآیند پودرسازی، بسته‌بندی و مخلوط‌سازی آسان، قابل دسترس به مقدار کافی برای تولید انبوه مایه تلقیح و ارزان قیمت، سطح تماس کافی و استاندارد، سهولت آزادسازی باکتری در خاک و ترجیحاً مناسب برای همه گونه‌های باکتری می‌باشد (۷-۱۱).

در نهایت، ماده حامل باید تامین‌کننده رشد باکتری و حفظ جمعیت استاندارد آن برای مدت ۳-۶ ماه باشد (۱۲ و ۱۳). 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. پژوهش‌های 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 متخلخل به عنوان یک حامل موثر برای رشد باکتری‌ها عمل می‌کند (۱۷ و ۱۸). از دیگر حامل‌های مورد استفاده سبوس گندم است که عموماً 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

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 سری-های رقت دهدهی (۲۵) جمعیت سوسپانسیون $5/5 \times 10^9$ 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 $70\%FC$ 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 28 ± 3 درجه سلسیوس کلنی‌های موجود در پلیت‌ها شمارش شده و جمعیت باکتری در هر حامل تعیین گردید. کد تیمارها به شرح ذیل می‌باشد:

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 (10^9-10^7) 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 روش‌ها

در این پژوهش، حامل مناسب باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت خام بر اساس مطالعات پیشین پیت، بیوچار و سیوس 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 ($0/05$ 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)، فسفر قابل جذب (روش اولسن)، سدیم (استات آمونیوم نرمال)، پتاسیم (استات آمونیوم نرمال)، نیتروژن (روش کجلدال) و جرم مخصوص ظاهری (روشن استوانه) اندازه‌گیری شد (۸). برای تنظیم pH حامل‌ها از کربنات کلسیم و اسید سولفوریک ۲ مولار استفاده شد به این ترتیب که تمام حامل‌ها روی $pH=7$ تنظیم شدند. سپس هر یک از آن‌ها در کیسه‌ای پلاستیکی (25×35) سانتی‌متر ریخته و درب آن‌ها دوخته شد. سپس بسته‌های حامل در دستگاه

جدول ۱- کد تیمارهای آزمایشی

Table 1. Experimental treatment codes

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

گرفت و رسم نمودارها هم با نرم افزار 2013 EXCEL انجام شد.

نتایج

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

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

جدول ۲- خصوصیات فیزیکوشیمیایی حامل‌های پیت، سبوس و بیوچار

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

نام ماده حامل			ویژگی مورد نظر
بیوچار	سبوس	پیت	
۰/۰۴۱	۰/۰۸۹	۰/۰۸۱	نیتروژن (%)
۰/۰۰۸	۰/۰۸۳	۰/۰۰۶	سدیم (%)

۰/۸۵	۱/۱	۰/۷۱	پتاسیم (/.)
۱/۰۳	۰/۴۷	۰/۲۲	فسفر (/.)
۱۷/۷۴۵	۵/۸۵	۳۲/۷۶	کربن آلی (/.)
۹/۵۹	۵/۵	۶/۷۵	pH عصاره اشباع
۷/۴۴	۶/۳۹	۰/۷	EC عصاره اشباع (dS/m)
۰/۱۶۹	۰/۲۶۰	۰/۴۲۶	جرم مخصوص ظاهری (gr/cm ³)
۱۵۸/۴	۱۶۸/۵	۱۷۹/۶	رطوبت ظرفیت زراعی (%)

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.

جدول ۳- تجزیه واریانس حامل‌های آزمایشی

Table 3. Analysis of variance for experimental carriers

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

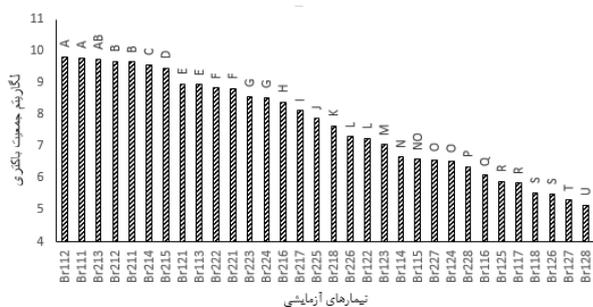
* معنی‌دار در سطح ۰/۰۵

رطوبت FC ۷۰٪، در زمان ۱۸۰ روز) با جمعیت 7×10^6 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 $6/5 \times 10^9$ باکتری در هر گرم از ماده حامل که با تیمارهای ۱۱۱، ۲۱۳ در

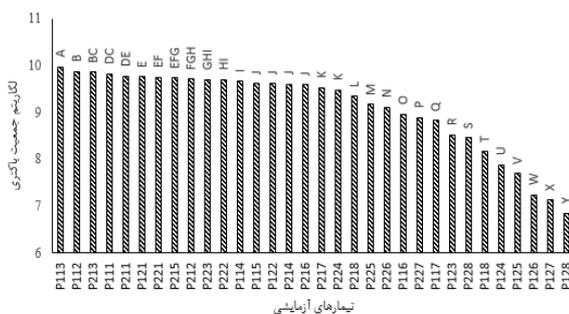
نتایج مقایسه میانگین حامل پیت نشان داد که بیشترین میزان جمعیت باکتری مربوط به تیمار پیت ۱۱۳ (دمای ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت FC، در زمان ۳۰ روز) با جمعیت $9/1 \times 10^9$ باکتری در هر گرم از ماده حامل و همچنین کمترین میزان جمعیت مربوط به تیمار پیت ۱۲۸ (دمای ۲۵ درجه سلسیوس،

سلسیوس، رطوبت FC، در زمان ۱۴ روز) با جمعیت $4/5 \times 10^9$ 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 FC ۷۰٪، در زمان ۱۸۰ روز) با جمعیت 7×10^5 باکتری در هر گرم از ماده حامل می‌باشد (شکل ج).

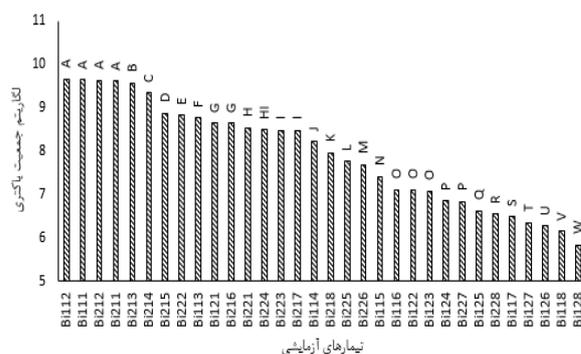
یک گروه آماری قرار گرفتند. همچنین کمترین میزان جمعیت باکتری مربوط به تیمار ۱۲۸ (دمای ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت FC ۷۰٪، در زمان ۱۸۰ روز) با جمعیت $1/39 \times 10^5$ باکتری در هر گرم از ماده حامل بود. (شکل ب). نتایج مقایسه میانگین حامل بیوچار نشان داد که بیشترین میزان جمعیت باکتری مربوط به تیمار ۱۱۲ (دمای ۲۵ درجه



(ب) (b)



(الف) (a)



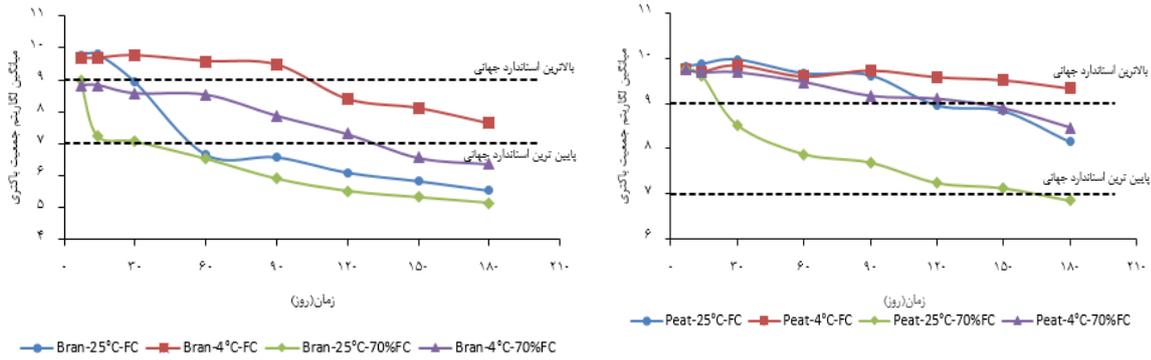
(ج) (c)

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)

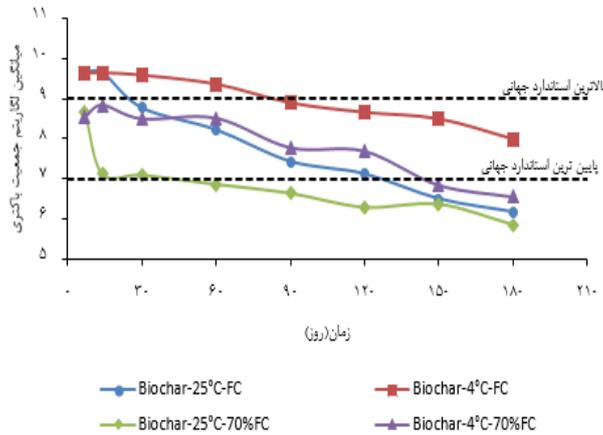
مقدار باکتری را در حد قابل قبول از نظر استانداردهای جهانی در مدت ۶ ماه نگهداری حفظ کرده است و جمعیت باکتری سایر تیمارها در طول دوره انکوباسیون به پایین تر از حد استاندارد جهانی رسیده است. در حامل بیوچار (شکل ج) فقط در دمای ۴ درجه سلسیوس و رطوبت FC مقدار باکتری را در حد قابل قبول از نظر استانداردهای جهانی در مدت ۶ ماه نگهداری حفظ کرده است، و جمعیت باکتری سایر تیمارها در طول دوره انکوباسیون به پایین تر از حد استاندارد جهانی رسیده است.

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 دمای ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت FC ۷۰٪ 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



(ب) (ب)

(الف) (ا)



(ج) (ج)

شکل ۲- روند تغییر جمعیت باکتری در حامل‌های مختلف؛ حامل پیت (الف)، حامل سیوس (ب) و حامل بیوچار (ج)
Figure 2. Changes in bacteria population in different carriers; peat carrier (a), bran carrier (b) and biochar carrier (c)

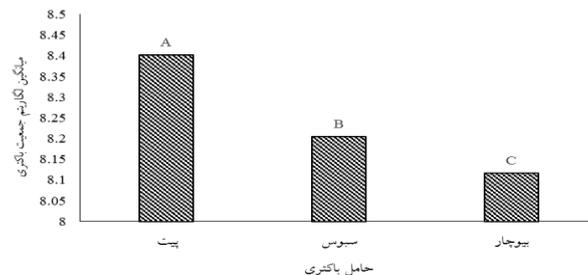
اثر حامل‌ها بر جمعیت باکتریایی

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



شکل ۳- نمودار مقایسه میانگین حامل‌های آزمایشی

Figure 3. Comparison of means histogram for experimental carriers

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 میکروارگانسیم-ها را در بر داشتند. بررسی پژوهشگران نشان داد که جمعیت باکتری در حامل پیت به علت ماده آلی فراوان، ظرفیت نگهداری رطوبت مناسب، در دوره‌های زمانی کوتاه مدت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس بیشتر از ۴ درجه سلسیوس است. که با نتایج حاضر در این پژوهش مطابقت دارد (۲۶). دلیل اصلی کاهش جمعیت ممکن است به دلیل هتروتروف بودن باکتری 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 استریلیزاسیون، نوع حامل و دمای نگهداری می‌باشد (۱۹).

از سویی دیگر، افزایش زمان انکوباسیون 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 شده که این امر باکتری را وارد فاز رشد لگاریتمی می‌کند. در این صورت اگر مواد غذایی در حامل‌های نگهداری باکتری در حد مطلوبی نباشد، حامل دچار کمبود مواد غذایی شده و این موضوع سبب کاهش جمعیت باکتری می‌شود. همچنین از دیگر دلایل کاهش جمعیت باکتری، افزایش غلظت برخی گازهای بازدارنده در دمای ۲۵ درجه سلسیوس 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

مقایسه میانگین جمعیت باکتری در حامل‌های مختلف نشان داد که به ترتیب پیت، سبوس و بیوچار با مقادیر $8.4/0.2$ ، $8.2/0.5$ و $8.1/0.6$ بیشترین میزان زنده‌مانی جمعیت باکتری را از خود نشان دادند.

بحث و نتیجه‌گیری

ایران از مهمترین کشورهای نفت خیز دنیا بشمار میرود و در بسیاری از مناطقی که دچار آلاینده‌گی هیدروکربنی زیرزمینی آب و خاک گردیده، با گذشت 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 کارآمد غیربومی تجزیه‌گر، بخصوص در زمان‌های وقوع آلاینده‌گی و ایجاد شرایط مناسب می‌تواند سرعت کاهش آلاینده‌گی را سبب گردد. اساس این پژوهش بر بهینه سازی بسته‌های حامل باکتری‌های کارآمد 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 سنجی کاربرد حامل مناسب (پیت، سبوس و بیوچار) برای باکتری تجزیه‌گر نفت مورد استفاده 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 سبوس 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

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 کاملاً مشهود بوده است. در مورد حامل‌های سبوس و بیوچار، دمای ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت $70\%FC$ 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,

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 (۱۸ و ۲۸-۲۶). همچنین بررسی‌های 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 جمعیت‌های میکروبی است. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که میزان جمعیت باکتری در رطوبت FC در مقایسه با $70\%FC$ مطلوب‌تر بود. رطوبت بهینه برای باکتری‌ها در بسته‌های حامل در محدوده رطوبتی FC می‌باشد که احتمالاً 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. پژوهش‌های پیشین در مورد بررسی رطوبت بهینه برای نگهداشت حامل مناسب در زمان در محدوده پتانسیل ۳۰- کیلوپاسکال یا رطوبت ظرفیت زراعی (FC) بوده است و کاهش دمای انکوباسیون سبب کاهش از دست رفتن آب می‌شود که منجر به حفظ بیشتر باکتری در زمان‌های طولانی می‌گردد، که با نتایج حاضر در این پژوهش مطابقت دارد (۲۳ و 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 احتمالاً منجر به ایجاد شرایط تهویه‌ای نامناسب برای باکتری‌های تحت شرایط آزمایشی شده است. نتایج حاصل از

- 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, Tahvonon 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.
 - 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. Comparison 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. In Soil Science Society of America* 1982 (Vol. 1159).
 9. Romero J, Palomares A, Gallavdo F, Olivares J. Survival and preservation of effectiveness of *Rhizobium meliloti* in inoculants prepared with a natural-alkalin peat as carrier. *Anales De Edafologia Agrobiologia*. 1987: 37: 551-560.
 10. Seyed Alikhani S, Shorafa M, Tavassoli A, Ebrahimi SS. The effect

- 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, Yasmeeen 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, Santamaria C, Rodriguez-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.
 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