

## دینامیک کربن در خاک شنی آلوده به نفت خام در حضور اشکال مختلف نیتروژن

سمائه نمازی<sup>۱\*</sup>، فایز رئیسی و شجاع قربانی دشتکی

دانش آموخته کارشناسی ارشد بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک - دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد؛ sama\_namazi@yahoo.com

دانشیار گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد؛ f\_raiesi@yahoo.com

استادیار گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد؛ ghorbanish@gmail.com

### چکیده

هدف این تحقیق بررسی اثر مصرف همزمان نفت خام و شکل‌های نیتروژن بر دینامیک کربن و تعیین تأثیر ویژگی‌های خاک شنی بر روند آن بود. آزمایش به صورت فاکتوریل (۳×۴) و در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار و در شرایط آزمایشگاهی طی ۱۲۶ روز انجام شد. برای این منظور، ابتدا نمونه‌های خاک شنی توسط سطوح صفر، ۵ و ۱۰ درصد نفت خام آلوده شده و سپس از نمک‌های نیتروژن‌دار نیترات پتاسیم، کلرید آمونیوم و مخلوطی از این دو نمک استفاده گردید. نمونه‌ها تا پایان آزمایش در دمای  $25 \pm 1$  درجه سلسیوس در داخل انکوباتور نگهداری شدند. سپس هر هفت روز یکبار نمونه‌های خاک به منظور انجام آزمایش تنفس میکروبی مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج نشان داد افزودن نیتروژن به خاک شنی سبب تحریک جوامع میکروبی خاک می‌شود. افزودن همزمان نفت خام و نیتروژن به خاک، اثرات تحریک‌کنندگی زیادی بر معدنی شدن کربن خاک داشت به طوری که تیمار  $NH_4$  و سطح ۱۰٪ نفت خام بیشترین میزان معدنی شدن کربن را به خود اختصاص دادند. به طور خلاصه، نفت خام پس از اضافه شدن به خاک با جامعه خاکزیان اثرات متقابل مثبت و منفی برقرار می‌کند. با این حال، کاربرد نیتروژن در شکل مناسب در خاک‌های آلوده به نفت خام ممکن است سبب کاهش اثرات مضر ترکیبات هیدروکربنی بر جامعه ریزجانداران خاک گردد.

واژه‌های کلیدی: آلودگی خاک، تنفس میکروبی، شکل نیتروژن، فعالیت میکروبی خاک، نفت خام

### مقدمه

شدت مستعد تجمع انواع آلاینده‌ها با ترکیبات سمی گوناگون در غلظت‌های نسبتاً بالا می‌باشند، ویژگی‌های گوناگون شیمیایی و بیولوژیکی خاک عمیقاً تغییر یافته و تنوع زیستی و عملکرد خاک را تحت تأثیر قرار می‌دهد (فرانکو و همکاران، ۲۰۰۴؛ سینگ و همکاران، ۲۰۰۹). برخی مشتقات نفتی به لحاظ وجود ترکیبات سمی مانند هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای، بنزن و مشتقات آن، سیکلوآلکان‌ها، اسیدهای والریک، استئاریک و

فعالیت‌های صورت گرفته در صنعت نفت، از قبیل اکتشاف و تولید نفت، حمل و نقل، پالایش و مدیریت فرآورده‌های نفتی و کنترل ضایعات آن منابع بالقوه برای آلودگی آب، خاک و هوا به شمار می‌آیند. نشت نفت خام طی مراحل حمل و نقل و نیز ضایعات فرآیند پالایش، تهدید جدی برای محیط زیست می‌باشد و منجر به کاهش تدریجی کیفیت محیط شده است (شاینو و همکاران، ۲۰۰۵؛ سینگ و همکاران، ۲۰۰۹). از آنجا که خاک‌ها به

<sup>۱</sup> نویسنده مسئول، آدرس: استان فارس، شیراز، بولوار پاسداران، خیابان شهید کلاهدوز، کوچه ۱۴، ساختمان نوربخش، واحد ۳

\* دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۰ و پذیرش: دی ۱۳۹۰

یک خاک شنی است. در این مطالعه فرضیه بر این بود که نفت خام موجب کاهش فعالیت‌های میکروبی خاک در خاک‌های آلوده با این ترکیب می‌شود و مصرف کودهای نیتروژن‌دار در خاک‌های آلوده ممکن است سبب کاهش اثرات سوء نفت خام بر جوامع و فعالیت میکروبی خاک گردد.

### مواد و روش‌ها

این تحقیق به منظور بررسی اثرات متقابل نفت خام و شکل‌های مختلف نیتروژن بر دینامیک کربن در یک خاک شنی تحت شرایط انکوباسیون آزمایشگاهی اجرا شد. فاکتورهای آزمایش شامل سطوح صفر، ۵ و ۱۰ درصد نفت خام به ترتیب معادل صفر، ۲۹۸۸۰ و ۵۹۷۶۰ میلی‌گرم کربن نفت خام بر کیلوگرم خاک (دانسیته نفت خام معادل ۰/۸۳ گرم بر سانتیمتر مکعب است) و شکل‌های مختلف نیتروژن شامل نیترا، آمونیوم، نیترا+آمونومی (۳۰ کیلوگرم در هکتار نیتروژن معادل، برابر با ۱۰/۷ میلی‌گرم نیتروژن نمک بر کیلوگرم خاک) و بدون نیتروژن بودند. آزمایش به صورت فاکتوریل (۳×۴) و در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام گردید. پس از نمونه‌برداری از عمق صفر تا ۲۰ سانتی‌متری یک نمونه خاک شنی و انتقال به آزمایشگاه، خاک هواخشک و از الک دو میلیمتری عبور داده شد و سپس خصوصیات فیزیکی و شیمیایی نظیر نیتروژن کل به روش کج‌دال (جعفری حقیقی، ۱۳۸۲)، فسفر به روش اولسن (غازان‌شاهی، ۱۳۷۶)، درصد کربن آلی به روش اکسایش تر با اسید سولفوریک و تیتراسیون برگشتی با سولفات فرو آمونیاکی (اسکم‌استد و بالداک، ۲۰۰۸)، pH و قابلیت هدایت الکتریکی عصاره اشباع به ترتیب با استفاده از pH متر و EC متر (کلوت، ۱۹۸۶)، کربنات کلسیم معادل به روش تیتراسیون برگشتی با سود (غازان‌شاهی، ۱۳۷۶) و بافت خاک به روش هیدرومتری (گی و بادر، ۱۹۸۶) اندازه‌گیری شدند. نفت خام مورد آزمایش از پالایشگاه نفت اصفهان تأمین و نتایج تجزیه شیمیایی آن برای بررسی انواع مشتقات نفتی از پالایشگاه دریافت شد. همچنین مقادیر C، N و C:N خاک اولیه، نفت خام و خاک تیمار شده با نفت و نمک‌های نیتروژن‌دار نیز محاسبه شدند.

به منظور آزمون تنفس میکروبی، مقدار ۱۰۰ گرم خاک خشک (۱۰۵ درجه سانتیگراد) در ظروف (جار) پلاستیکی یک لیتری ریخته شد. سپس معادل ۳۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار (برابر با ۱۰/۷ میلی‌گرم نیتروژن بر کیلوگرم خاک) از نمک‌های نیتروژن‌دار نترات پتاسیم، کلرید آمونیوم و مخلوطی از نترات پتاسیم و کلرید آمونیوم برای ۱۰۰ گرم خاک مورد آزمایش استفاده گردید.

اسیدهای مشتق شده از سیکلوپنتان و سیکلوهگزان و نیز عناصر سمی مانند نیکل و وانادیم ممکن است اثر بازدارندگی بر رشد و فعالیت میکروبی داشته باشند (لابود و همکاران، ۲۰۰۷). در این میان، زیست‌فراهمی عناصر غذایی در خاک‌های آلوده نفتی بسیار حائز اهمیت است (جکسون و پارو، ۱۹۹۹؛ مارزسین و همکاران، ۲۰۰۷؛ مینایی تهرانی و حرفت‌منش، ۲۰۰۷) و افزودن عناصر غذایی به طور صحیح (در شکل و غلظت مناسب) موجب افزایش فعالیت ریزجانداران خاک می‌شود (جکسون و پارو، ۱۹۹۹) زیرا ورود نفت خام به خاک با برهم زدن تعادل C:N، سبب کاهش قابلیت دسترسی عناصر غذایی به ویژه نیتروژن و فسفر می‌شود (مارزسین و همکاران، ۲۰۰۷؛ لکزیان، ۱۳۸۷).

نیتروژن، به علت زیست - شیمی پیچیده و پر مصرف بودن آن توسط گیاه، در مقایسه با سایر عناصر غذایی، جایگاه بی‌نظیری در میان عناصر موجود در خاک دارد. در اکثر اکوسیستم‌های خاکی، نیتروژن عنصر غذایی محدود کننده رشد گیاه می‌باشد (گیسلر و هوروات، ۲۰۰۸). مصرف کودهای نیتروژنه در شکل و غلظت مناسب در خاک‌های آلوده به نفت خام ممکن است سبب کاهش اثرات سوء این ترکیب بر فعالیت ریزجانداران خاک شود. علی‌رغم اینکه هر دو شکل نیتروژن ( $\text{NO}_3$  و  $\text{NH}_4$ ) در غلظت‌های مناسب سبب افزایش فعالیت میکروبی می‌شوند، اما آمونیوم و سایر شکل‌های احیایی مشابه، نسبت به نترات و یا سایر شکل‌های اکسایشی نیتروژن برتری دارد (جکسون و پارو، ۱۹۹۹) و از نظر میزان مصرف انرژی ریزجانداران جذب آمونیوم را ترجیح می‌دهند (پاول و کلارک، ۱۹۹۶؛ لکزیان، ۱۳۸۷). با این حال، اثر کودهای نیتروژنه بر دینامیک کربن خاک ممکن است متغیر بوده و می‌تواند سبب افزایش، کاهش (فوگ، ۱۹۸۸) یا بدون هیچ تغییری (ون‌وورن و ون‌دراردن، ۱۹۹۲؛ ماتیس، ۱۹۹۴؛ هسینک، ۱۹۹۵) در تجزیه کربن شود.

به طور کلی، اندازه‌گیری پارامترهای میکروبی نظیر تنفس خاک و سایر شاخص‌های بیولوژیکی به عنوان شاخص مناسب برای بیان اثر آلودگی بر سلامت خاک به کار گرفته می‌شوند و اطلاعاتی مربوط به حضور و فعالیت ریزجانداران مقاوم به آلودگی و نیز شدت، نوع و مدت تأثیر آلودگی هیدروکربنی بر فعالیت متابولیکی خاک را فراهم می‌نمایند. از سوی دیگر آلاینده‌ها منابع خوبی از نظر کربن و انرژی بوده و جوامع میکروبی تجزیه کننده نفت در اکثر اکوسیستم‌های آلوده مشاهده شده‌اند (لابود و همکاران، ۲۰۰۷). هدف از این تحقیق ارزیابی اثرات متقابل نفت خام و برخی شکل‌های نیتروژن بر دینامیک کربن در

متقابل آنها بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده، ابتدا تست نرمال بودن (Normality Test) با استفاده از نرم افزار Minitab 14 به روش Ryan-Joiner بر روی داده‌های آزمایش در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت. سپس برای اطمینان از همگن بودن واریانس‌ها تست لون (Leven's test) با استفاده از نرم افزار مذکور در سطح احتمال ۵ درصد صورت پذیرفت. اغلب داده‌ها دارای توزیع نرمال و واریانس همگن بودند به استثناء پتانسیل معدنی شدن کربن خاک شنی که پس از تبدیل به شکل لگاریتمی تجزیه و تحلیل آماری انجام شد. در نهایت میانگین داده‌ها به همراه خطای استاندارد (SE) به صورت جدول گزارش شدند. جدول تجزیه واریانس دوطرفه (Two-Way ANOVA) داده‌ها به کمک نرم افزار SigmaStat 3.5 محاسبه شد. سپس مقایسه میانگین اثرات ساده و متقابل تیمارها به روش LSD فیشر در سطح احتمال ۵ درصد انجام گردید. برای مطالعه و برآورد پتانسیل معدنی شدن کربن از معادله یک جزئی مرتبه اول، طبق گزارش استانفورد و اسمیت (۱۹۷۲) استفاده گردید:

$$C_t = C_0(1 - e^{-k_t t})$$

که در آن:

- $C_t$ : کربن معدنی شده در زمان  $t$  (بر حسب میلی گرم کربن در کیلوگرم خاک)؛  
 $C_0$ : پتانسیل معدنی شدن کربن (بر حسب میلی گرم کربن در کیلوگرم خاک) و  
 $k_t$ : ضریب ثابت معدنی شدن کربن (بر حسب  $\text{day}^{-1}$ ) است.

ضرایب این معادله با برازش داده‌های معدنی شدن تجمعی کربن ( $C_t$ ) در مراحل مختلف انکوباسیون ( $t$ ) توسط نرم افزار SigmaPlot 10.0 برآورد شدند. در واقع مقدار  $r^2$  بیشتر و SEE (خطای استاندارد برآورد) کمتر مبنای تناسب این مدل بودند.

برای اندازه‌گیری کربن بیوماس میکروبی، روش تدخین - انکوباسیون گزارش شده توسط جنکینسون و پائولسون (۱۹۷۶) و جنکینسون و لاد (۱۹۸۱) مورد آزمایش قرار گرفت.

### نتایج

خصوصیات اولیه خاک و نفت خام مورد آزمایش به ترتیب در جداول ۱ و ۲ نشان داده شده است. همچنین مقادیر  $C:N$  و  $N$  خاک اولیه، نفت خام و خاک تیمار شده با نفت و نمک‌های نیتروژن‌دار در جدول ۳ مشاهده می‌شود.

مقدار محاسبه شده نیتروژن معادل  $7/737$  میلی گرم نمک نترات پتاسیم،  $4/094$  میلی گرم نمک کلرید آمونیوم، و برای نمک مخلوط، معادل  $3/868$  میلی گرم نمک نترات پتاسیم و  $2/047$  میلی گرم نمک کلرید آمونیوم بود (وزن یک هکتار خاک معادل  $2800$  تن و وزن مخصوص ظاهری خاک شنی  $1/6$  گرم بر سانتیمتر مکعب منظور گردید). مقادیر ذکر شده در  $12$  سی سی آب -جهت تنظیم رطوبت خاک در حدود  $70\%$  ظرفیت مزرعه- حل و به محتوی جارها اضافه و به طور کامل مخلوط شدند. این رطوبت تا پایان آزمایش با توزین کردن متوالی کنترل گردید. در نهایت، میزان  $5\%$  و  $10\%$  (v/w) از نفت خام (معادل  $5$  سی سی و  $10$  سی سی از این ماده برای  $100$  گرم خاک) به نمونه‌ها اضافه شد. چندین نمونه خاک اما بدون افزودن نیتروژن و نفت خام و نیز چند قوطی خالی با شرایطی مشابه با شرایط نمونه‌ها به عنوان شاهد در آزمایش لحاظ گردید. به منظور انجام آزمایش بیوماس (زیست‌توده) میکروبی (MBC) معادل  $300$  گرم خاک خشک ( $105$  درجه سانتیگراد) پس از توزین دقیق به ظروف پلاستیکی یک لیتری انتقال داده و سپس تیمارهای مختلف، مشابه روش ذکر شده برای آزمون تنفس میکروبی بر آنها اعمال شدند. لازم به ذکر است که رطوبت خاک در حدود  $70$  درصد ظرفیت مزرعه تا پایان آزمایش با توزین کردن کنترل گردید. پس از بستن درب قوطی‌ها، نمونه‌ها در دمای  $25-30$  درجه سانتیگراد به مدت  $24$  ساعت به حالت پیش انکوباسیون قرار گرفتند و در پایان پیش انکوباسیون نمونه‌ها تا انتهای آزمایش در انکوباتور و در دمای  $25-30$  درجه سانتیگراد نگهداری شدند. برای آزمون تنفس میکروبی از روش اندازه‌گیری میزان دی‌اکسیدکربن حاصل از تنفس میکروبی از طریق تیتراسیون برگشتی سود باقیمانده (آندرسون، ۱۹۸۲) استفاده گردید. همچنین، به دلیل متفاوت بودن میزان کربن اضافه شده به خاک در تیمارهای مختلف نفت خام، معدنی شدن کربن به صورت نسبی یعنی نسبت کل کربن معدنی شده ( $CO_2-C$ ) به کربن آلی ( $C_{org}$ ) موجود در خاک ( $CO_2-C/C_{org}$  یا  $qM$ ) نیز محاسبه و بر حسب درصد بیان شد. این نسبت اغلب برای مقایسه سرعت معدنی شدن کربن آلی در خاک-هایی که اساساً مقدار ماده آلی متفاوت دارند، استفاده می‌شود. متوسط زمان ماندگاری کربن (MRT) در خاک نیز به صورت  $1/qM$  گزارش شده توسط دیای و همکاران (۲۰۰۰) مورد محاسبه قرار گرفت و بر حسب سال بیان گردید.

در این تحقیق برای پی بردن به منابع تغییرات و اثرات ساده سطح نفت خام و شکل نیتروژن و اثرات

### روند معدنی شدن کربن

شکل ۱ روند معدنی شدن تجمع‌ی کربن را در خاک شنی آلوده با سطوح مختلف نفت خام (صفر، ۵ و ۱۰ درصد) طی ۱۲۶ روز انکوباسیون نشان می‌دهد. با توجه به شکل ۱، مشاهده می‌گردد که کمترین و بیشترین مقدار کربن آلی معدنی شده به ترتیب در سطح صفر و ۱۰٪ می‌باشد. اختلاف بین سطح صفر نفت خام با دو سطح دیگر (۵٪ و ۱۰٪) از ابتدای انکوباسیون آشکار است در حالی که اختلاف بین سطح ۵٪ و ۱۰٪ نفت خام تا ۲۸ روز پس از انکوباسیون نامحسوس بوده و پس از آن اختلاف بین این دو تیمار آشکار می‌شود. روند معدنی شدن تجمع‌ی کربن در بین تیمارهای مختلف نفت خام طی ۱۲۶ روز انکوباسیون به صورت زیر می‌باشد:

سطح صفر نفت خام > سطح ۵ نفت خام > سطح ۱۰ نفت خام  
در شکل ۲-A اثر شکل نیتروژن (بدون نیتروژن،  $\text{NH}_4$ ،  $\text{NO}_3$  و  $\text{NH}_4+\text{NO}_3$ ) بر روند معدنی شدن تجمع‌ی کربن در خاک شنی تیمار شده با سطح صفر نفت خام (شاهد) طی ۱۲۶ روز انکوباسیون نشان داده شده است. با افزودن نیتروژن به خاک شنی غیر آلوده، میزان معدنی شدن کربن نسبت به تیمار بدون نیتروژن تغییر نکرده است. روند معدنی شدن تجمع‌ی کربن در بین تیمارهای نیتروژن در انتهای ۱۲۶ روز انکوباسیون به صورت زیر است:

بدون نیتروژن =  $\text{NH}_4 = \text{NO}_3 = \text{NH}_4+\text{NO}_3$

شکل ۲-B اثر شکل‌های نیتروژن را در خاک شنی آلوده به سطح ۵٪ نفت خام بر روند معدنی شدن تجمع‌ی کربن نشان می‌دهد. همان‌طور که مشخص است، در ابتدای دوره انکوباسیون اختلاف بین تیمارهای نیتروژن نامحسوس بوده ولی پس از گذشت ۴۰ روز انکوباسیون، افزودن نیتروژن به خاک آلوده به سطح ۵٪ نفت خام بر میزان معدنی شدن کربن نسبت به تیمار بدون نیتروژن می‌افزاید ولی بین اشکال مختلف نیتروژن تفاوتی مشاهده نمی‌شود. این روند به صورت زیر است:

بدون نیتروژن >  $\text{NH}_4+\text{NO}_3 = \text{NH}_4 = \text{NO}_3$

شکل ۲-C اثر شکل‌های نیتروژن را بر روند معدنی شدن تجمع‌ی کربن در خاک شنی آلوده به سطح ۱۰٪ نفت خام نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، در ابتدای انکوباسیون بین تیمار بدون نیتروژن و سایر تیمارها تفاوت به وضوح آشکار است اما اختلاف بین همه تیمارهای نیتروژن از هفته هفتم انکوباسیون آغاز شده است. در سطح ۱۰٪ نفت خام، بیشترین میزان کربن معدنی شده تجمع‌ی در تیمار  $\text{NH}_4$  و کمترین آن در تیمار بدون نیتروژن است که با تیمار  $\text{NO}_3$  تفاوتی مشاهده نمی‌شود. بین تیمارهای  $\text{NO}_3$  و  $\text{NH}_4+\text{NO}_3$  نیز تفاوتی وجود ندارد،

لذا نمی‌توان روند معینی جهت معدنی شدن تجمع‌ی کربن در نظر گرفت.

### کل معدنی شدن کربن یا تنفس میکروبی ( $\text{CO}_2\text{-C}$ )

اثر شکل نیتروژن، سطح نفت و اثرات متقابل نفت خام و شکل نیتروژن بر معدنی شدن کل کربن طی ۱۲۶ روز انکوباسیون بسیار معنی‌دار ( $P < 0.001$ ) بود (جدول ۴). میانگین کل کربن معدنی شده در تیمارهای مختلف نیتروژن از  $1486 \text{ mgC/kg}$  در تیمار خاک بدون نیتروژن (شاهد) تا  $1732 \text{ mg C/kg}$  در خاک تیمار شده با  $\text{NH}_4$  متغیر بوده است (جدول ۵). این اثر حاکی از آن است که با افزودن نیتروژن به خاک شنی میزان تنفس میکروبی یا میزان  $\text{CO}_2\text{-C}$  متصاعد شده افزایش می‌یابد که این میزان افزایش در مقایسه با تیمار بدون نیتروژن به ترتیب ۶/۵٪، ۹/۱٪ و ۱۶/۶٪ در تیمارهای  $\text{NO}_3$ ،  $\text{NH}_4$  و  $\text{NH}_4+\text{NO}_3$  بود.

میانگین کل کربن معدنی شده در خاک‌های تیمار شده با سطوح مختلف نفت خام در دامنه بین  $354 \text{ mg C/kg}$  و  $2619 \text{ mg C/kg}$  به ترتیب برای تیمار شاهد و سطح ۱۰٪ نفت متغیر بود (جدول ۵). همچنین مقایسه میانگین‌های اثر متقابل نفت خام و نیتروژن بر معدنی شدن کل کربن (جدول ۵) نشان داد که تیمار بدون نفت خام و نیتروژن، کمترین ( $327 \text{ mg C/kg}$ ) و تیمار  $\text{NH}_4$  و سطح ۱۰٪ نفت خام بیشترین ( $2901 \text{ mg C/kg}$ ) میزان معدنی شدن کربن را دارند زیرا هر دو عنصر کربن و نیتروژن عامل محدود کننده فعالیت میکروبی هستند.

### درصد کربن معدنی شده به کل کربن خاک ( $\text{CO}_2\text{-C}/\text{C}_{\text{Org}}$ )

اثر شکل نیتروژن بر این نسبت بسیار معنی‌دار ( $P < 0.001$ ) بود (جدول ۴). میانگین کل  $\text{CO}_2\text{-C}/\text{C}_{\text{Org}}$  در بین تیمارهای مختلف نیتروژن (جدول ۵) طی ۱۲۶ روز انکوباسیون، در دامنه ۲۳٪ و ۲۷/۵٪ به ترتیب برای تیمارهای بدون نیتروژن (و  $\text{NO}_3$ ) و  $\text{NH}_4+\text{NO}_3$  بود. جدول ۴ نشان داد اثر سطح نفت نیز بر این نسبت بسیار معنی‌دار ( $P < 0.001$ ) است. مقایسه میانگین سطوح مختلف نفت (جدول ۵) نشان می‌دهد که با افزایش نفت خام به خاک نسبت  $\text{CO}_2\text{-C}/\text{C}_{\text{Org}}$  کاهش معنی‌دار داشته به طوری که این میزان کاهش برای تیمارهای ۵٪ و ۱۰٪ به ترتیب ۹۰٪ و ۹۳٪ نسبت به تیمار شاهد بوده است. اثر متقابل نفت خام و شکل نیتروژن نیز بسیار معنی‌دار ( $P < 0.001$ ) بود (جدول ۴). نتایج مقایسه میانگین‌ها (جدول ۵) نشان داد که تمام تیمارهای نیتروژن و سطح ۱۰٪ نفت خام کمترین مقدار (حدود ۴٪) و تیمار  $\text{NH}_4+\text{NO}_3$  و بدون نفت بیشترین مقدار (۷۲٪) این نسبت را دادند.

## متوسط زمان ماندگاری کربن در خاک (MRT)

اثر شکل نیتروژن، نفت خام و اثر متقابل نفت خام و شکل نیتروژن بر MRT بسیار معنی‌دار ( $P < 0/001$ ) بود (جدول ۴). میانگین کل MRT در بین تیمارهای مختلف نیتروژن (جدول ۵) در دامنه ۰/۳۸ و ۰/۴۳ سال به ترتیب برای تیمارهای  $NH_4$  و تیمار بدون نیتروژن بوده است. نتایج مقایسه میانگین‌ها (جدول ۵) نشان داد که افزایش نفت خام از سطح صفر به ۱۰٪ سبب افزایش MRT شده است. همچنین، تمام شکل‌های نیتروژن و سطح صفر نفت خام کمترین (به طور میانگین ۰/۰۴۵ سال) و تیمار بدون نیتروژن و سطح ۱۰٪ نفت خام بیشترین (۰/۷ سال) مقدار MRT را نشان دادند.

پتانسیل معدنی شدن کربن ( $C_0$ )

داده‌های معدنی شدن کربن طی ۱۲۶ روز انکوباسیون به کمک معادله سینتیک مرتبه اول استانفورد و اسمیت (۱۹۷۲) با استفاده از نرم‌افزار *SigmaPlot* برازش داده شدند و ضرایب معادله به دست آمد. سپس این ضرایب مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند که نتایج تجزیه واریانس آنها در جدول ۴ آمده است.

اثر شکل نیتروژن بر پتانسیل معدنی شدن کربن معنی‌دار بود (جدول ۴). میانگین  $C_0$  در تیمارهای مختلف نیتروژن بین ۹۹۲۹ mg C/kg برای تیمار بدون نیتروژن و ۶۳۵۳ mg C/kg برای تیمار  $NO_3$  متغیر بود. هرچند تفاوت بین تیمارهای شاهد،  $NH_4$  و  $NH_4+NO_3$  معنی‌دار نبود (جدول ۶). تیمار  $NO_3$  سبب کاهش پتانسیل معدنی شدن کربن به میزان ۳۶٪ نسبت به تیمار شاهد شد. اثر سطوح مختلف نفت خام نیز بر پتانسیل معدنی شدن کربن بسیار معنی‌دار ( $P < 0/001$ ) بود (جدول ۴). میانگین  $C_0$  در سطوح مختلف نفت خام در دامنه ۷۰۴ mg C/kg برای سطح صفر و ۱۹۳۲۵ mg C/kg برای سطح ۱۰٪ نفت خام متغیر بوده است (جدول ۶).

اثر متقابل نفت خام و شکل نیتروژن بر پتانسیل معدنی شدن کربن بسیار معنی‌دار ( $P < 0/001$ ) بود (جدول ۴). مقایسه میانگین‌های این اثر (جدول ۶) نشان داد که در بین تیمارها، سطح صفر نفت خام و بدون نیتروژن کمترین (۴۹۶ mg C/kg) و سطح ۱۰٪ نفت خام و بدون نیتروژن بیشترین (۲۴۲۰۲ mg C/kg) میزان پتانسیل معدنی شدن کربن را دارا هستند. جدول ۶ نشان داد افزودن نفت خام در همه تیمارها روند مشخصی را دنبال می‌کند به طوری که افزایش نفت خام از سطح صفر به ۱۰٪ در تمام تیمارهای شکل نیتروژن سبب افزایش پتانسیل معدنی شدن کربن شده است. در خاک غیر آلوده (سطح صفر نفت خام)، اضافه شدن نیتروژن به ویژه در شکل  $NH_4+NO_3$

سبب افزایش پتانسیل معدنی شدن کربن شد. این میزان افزایش نسبت به تیمار شاهد، ۱۱۲٪ بود. تیمارهای  $NH_4$  و  $NO_3$  که با یکدیگر تفاوت معنی‌دار نداشتند به طور میانگین سبب افزایش ۲۸ درصدی پتانسیل معدنی شدن کربن نسبت به تیمار شاهد شدند. در سطح متوسط آلاینده (سطح ۵٪ نفت خام) افزودن نیتروژن تأثیری بر پتانسیل معدنی شدن کربن نداشت و در سطح بالای آلاینده (سطح ۱۰٪ نفت خام) افزودن نیتروژن سبب کاهش پتانسیل معدنی شدن کربن شد. میزان این کاهش برای تیمار  $NO_3$  نسبت به تیمار شاهد بیشتر (۴۷٪) بود. تیمارهای  $NH_4$  و  $NO_3$  با یکدیگر تفاوت معنی‌دار نداشتند به طور میانگین سبب کاهش ۱۷ درصدی پتانسیل معدنی شدن کربن نسبت به تیمار شاهد شدند.

ثابت معدنی شدن کربن (ضریب تجزیه،  $k_c$ )

با توجه به نتایج تجزیه واریانس در جدول ۴ مشاهده می‌شود که اثر نیتروژن بر ثابت معدنی شدن کربن معنی‌دار نیست. میانگین کل  $k_c$  در تیمارهای مختلف نیتروژن (جدول ۶) بین ۰/۰۰۴۳ و ۰/۰۰۳۸ در روز به ترتیب برای تیمارهای  $NH_4$  (که با تیمار بدون نیتروژن تفاوت معنی‌دار ندارد) و تیمار  $NH_4+NO_3$  (که با تیمار  $NO_3$  تفاوت معنی‌دار ندارد) بوده است.

اثر نفت خام و اثر متقابل نفت خام و شکل نیتروژن بر ثابت معدنی شدن کربن بسیار معنی‌دار ( $P < 0/001$ ) بود (جدول ۴). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که با افزایش نفت خام از سطح صفر به سطح ۱۰٪، این ضریب کاهش یافته است. همچنین، تیمار بدون نیتروژن و سطح صفر نفت خام (خاک شاهد) بیشترین (۰/۰۰۸۹ در روز) و تیمار بدون نیتروژن و سطح ۱۰٪ نفت خام کمترین (۰/۰۰۰۹ در روز) مقدار  $k_c$  را نشان دادند (جدول ۶).

اضافه شدن نیتروژن به خاک غیر آلوده یعنی سطح صفر نفت خام سبب کاهش ثابت سرعت تجزیه شد به طوری که این کاهش در مقایسه با تیمار شاهد به ترتیب ۱۹٪، ۳۱/۵٪ و ۵۶٪ برای تیمارهای  $NO_3$ ،  $NH_4$  و  $NH_4+NO_3$  بوده است. با افزایش سطح نفت خام از صفر به ۵٪ دو شکل  $NH_4$  و  $NH_4+NO_3$  سبب افزایش ثابت سرعت تجزیه شدند در حالی که بین  $NO_3$  و تیمار شاهد تفاوت معنی‌دار وجود نداشت. در سطح بالای آلاینده (سطح ۱۰٪) اضافه شدن نیتروژن سبب افزایش ناچیز ثابت سرعت تجزیه شد.

## کربن بیوماس میکروبی (MBC)

کربن بیوماس میکروبی، اندازه کل جامعه میکروبی یا توده ریزجانداران را به عنوان یک جزء زنده ماده آلی خاک نشان می‌دهد (فرانکو و همکاران، ۲۰۰۴).

شکل  $\text{NH}_4$  نیتروژن مؤثرترین شکل در افزایش روند معدنی شدن تجمعی کربن بوده است. این مطلب، تمایل بیشتر ریزجانداران خاک را در جذب  $\text{NH}_4\text{-N}$  نسبت به سایر شکل‌های نیتروژن نشان می‌دهد.

#### کل معدنی شدن کربن یا تنفس میکروبی ( $\text{CO}_2\text{-C}$ )

همان‌طور که در جدول ۵ مشاهده می‌گردد، افزودن نیتروژن به خاک شنی میزان  $\text{CO}_2\text{-C}$  متصاعد شده یا تنفس میکروبی را افزایش می‌دهد. با این حال، ون وورن و ون در اردن (۱۹۹۲)، ماتیسوس (۱۹۹۴)، هسینک (۱۹۹۵) و نمازی (۱۳۸۹) در مطالعات خود عدم تأثیر کوددهی نیتروژن بر میزان تجزیه کربن برخی خاک‌ها (نه صرفاً خاک‌های شنی) را به اثبات رساندند. رئیسی (۲۰۰۴) گزارش کرد که پاسخ‌های مختلف دینامیک کربن به افزایش کودهای نیتروژن منعکس کننده شرایط محیطی متفاوت می‌باشد. به عقیده واکسمن و استیونس (۱۹۲۹) علت این که افزودن نیتروژن در برخی شرایط افزایشی در میزان  $\text{CO}_2$  متصاعد شده حاصل نمی‌کند این است که نیتروژن عامل محدود کننده در فعالیت ریزجانداران نیست. برادبنت و نرمن (۱۹۴۷)، الکساندر (۱۹۷۷)، فوگ (۱۹۸۸)، ونس و چاپین (۲۰۰۱) نیز در گزارش‌های خود این نتیجه را بارها مورد تأیید قرار دادند. با این حال، شیمل و وینتراب (۲۰۰۳) گزارش کردند که چنین استدلالی با مطالعات دینامیک نیتروژن که به طور قطعی بیان می‌دارند میکروب‌ها در خاک‌های طبیعی معمولاً با محدودیت نیتروژن مواجه هستند مغایرت دارد. برای مثال، گیلین و همکاران (۱۹۹۱) و پلگلاس و همکاران (۱۹۹۲) در بسیاری از پژوهش‌های مزرعه‌ای و آزمایشگاهی غیر متحرک شدن خالص نیتروژن را گزارش نمودند. در برخی مطالعات که توسط جکسون و همکاران (۱۹۸۹)، هارت و همکاران (۱۹۹۴) و چن و استارک (۲۰۰۰) صورت گرفت، جذب  $\text{NO}_3^-$  در حضور  $\text{NH}_4^+$  قابل اندازه‌گیری به اثبات رسید. شیمل و فایراستون (۱۹۸۹) نیز گزارش کردند که ریزجانداران خاک برای جذب  $\text{NH}_4^+$  گلوتامین سنتتاز را به کار می‌گیرند. شیمل و وینتراب (۲۰۰۳) گزارش کردند تمام این مطالعات شواهدی مبنی بر محدودیت نیتروژن جهت دسترسی و استفاده میکروبی - حتی در خاک‌هایی که غیر متحرک شدن نیتروژن رخ می‌دهد - می‌باشد.

با توجه به جدول ۵ می‌توان دریافت که محدودیت کربن (ونس و چاپین، ۲۰۰۱) در خاک شنی سبب می‌شود با افزودن نفت خام به خاک فعالیت میکروبی و به تبع آن معدنی شدن تجمعی کربن افزایش یابد. لابود و همکاران (۲۰۰۷) نیز گزارش کردند نفت خام سبب افزایش تنفس میکروبی در خاک شنی می‌شود. از جهت

بیوماس میکروبی خاک یکی از اجزاء ضروری اغلب اکوسیستم‌های خاکی بوده و در تنظیم چرخه عناصر غذایی نقش دارد. از آنجایی که بیوماس میکروبی به عنوان منابع سهل‌الوصول عناصر غذایی برای گیاهان به شمار می‌رود، می‌تواند بیان کننده حاصلخیزی اولیه اکوسیستم باشد (جنکینسون و لاد، ۱۹۸۱).

این آزمایش به روش تدخین - انکوباسیون گزارش شده توسط جنکینسون و پائولسون (۱۹۷۶) و جنکینسون و لاد (۱۹۸۱) انجام گرفت. لازم به ذکر است که کاربرد این روش، به خاک‌هایی با pH بزرگتر از ۵ و خاک‌هایی که حاوی منابع کربن سهل‌التجزیه نیستند، محدود می‌شود. بنابراین مارتینز (۱۹۹۵) گزارش کرد چنانچه به این محدودیت‌ها توجه نشود، مقادیر بیوماس بسیار پایین و یا گاهی منفی مشاهده می‌شود.

پس از انجام آزمایش MBC مشخص شد که اعداد به دست آمده منطقی نیستند. لذا، به دلیل عدم وجود توجیه قابل قبول در بسیاری از مقالات داخل و خارج کشور مبنی بر به دست آمدن اعداد غیر منطقی، طی تماس شخصی با جناب آقای پروفیسور فیلیپ بروکس، استاد دانشگاه و رئیس سازمان علوم خاک انگلستان، این نتیجه حاصل شد که با توجه به مشخصات اولیه خاک (جدول ۱) میزان کربن آلی (OC) خاک شنی بسیار ناچیز و برابر با ۰/۰۵۵٪ می‌باشد. در نتیجه مقدار بیوماس این خاک بسیار اندک و پایین‌تر از حد تعیین به روش انتخاب شده (تدخین - انکوباسیون) در این تحقیق بوده است. لذا روش‌های دیگر نظیر ATP برای اندازه‌گیری کربن بیوماس میکروبی در این خاک پیشنهاد می‌گردد که نیازمند تجهیزات و مهارت‌های پیشرفته می‌باشد.

#### بحث و نتیجه‌گیری

##### روند معدنی شدن کربن

همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، با افزودن نفت خام به خاک شنی میزان معدنی شدن کربن افزایش قابل ملاحظه‌ای یافت. این روند افزایشی به دلیل ورود منابع جدید کربن قابل دسترس و سهل‌التجزیه بوده زیرا نفت خام سوبسترای حاوی مخازن کربن و انرژی می‌باشد. اما با گذشت زمان به علت مصرف کربن سهل‌التجزیه، میزان معدنی شدن کاهش یافته است. همچنین، در شکل ۲-B افزایش سرعت تجزیه نفت خام و معدنی شدن کربن آلی آن بر اثر افزودن نیتروژن به خاک در نتیجه کاهش نسبت C:N و افزایش فعالیت میکروبی است. افزودن نیتروژن در خاک آلوده سبب تعدیل مقدار کربن محیط خاک شده و از این رو بر معدنی شدن آن افزوده می‌گردد. شکل ۲-C نشان می‌دهد که در سطح بالای آلاینده (۱۰٪)

دارد. برای مثال، ریورا اسپینوزا و دندون (۲۰۰۴) گزارش کردند که در خاک آلوده به فنانترین افزایش سریع تنفس خاک مشاهده شد در حالی که در خاک آلوده با نفتالین و پیرین تنفس میکروبی کاهش یافت.

#### درصد کربن معدنی شده به کل کربن خاک ( $\text{CO}_2$ -C/C<sub>Org</sub>)

این نسبت نشان‌دهنده این است که چه مقدار از کربن آلی موجود در خاک (کربن خاک و کربن سوبسترا) طی یک مدت زمان معین (مثلاً یک دوره انکوباسیون) به کربن معدنی تبدیل می‌شود. با اضافه شدن نیتروژن به خاک نسبت C:N کاهش یافته و با افزایش فعالیت ریزجانداران میزان کربن آلی بیشتری معدنی شده است. این در حالی است که با افزایش نفت خام به خاک با نسبت بسیار بالای C:N (جدول ۲) میزان کربن آلی به شدت افزایش می‌یابد که این سبب کاهش نسبت فوق می‌شود (جدول ۵).

#### متوسط زمان ماندگاری کربن در خاک (MRT)

با توجه به آنچه که در جدول ۵ مشاهده می‌شود و به طور کلی، افزودن نیتروژن به خاک شنی در همه اشکال سبب کاهش معنی‌دار متوسط زمان ماندگاری کربن در خاک شد؛ زیرا با افزودن نیتروژن به خاک سرعت معدنی شدن کربن آلی خاک افزایش می‌یابد و در نتیجه  $\text{CO}_2$  بیشتری متصاعد می‌شود. همچنین، افزایش نفت خام از سطح صفر به ۱۰٪ به علت افزایش قابل ملاحظه کربن آلی سبب افزایش MRT شده است.

#### پتانسیل معدنی شدن کربن ( $\text{C}_0$ )

پتانسیل معدنی شدن کربن ( $\text{C}_0$ ) حداکثر کربن قابل تجزیه موجود در سوبسترا است که در یک زمان مشخص توانایی معدنی شدن را دارد و تحت تأثیر عوامل متفاوتی مانند شرایط محیطی، خصوصیات خاک و کیفیت سوبسترا قرار می‌گیرد (جعفری، ۱۳۸۷). با این حال، اجوا و طباطبایی (۱۹۹۴) گزارش کردند که بالا بودن  $\text{C}_0$  در یک خاک دلیل بر بالا بودن کربن معدنی شده در یک دوره زمانی کوتاه نیست. به عبارت دیگر، با دانستن مقدار کربن معدنی شده در دو خاک در شرایط یکسان نمی‌توان نسبت به پتانسیل معدنی آنها قضاوت کرد.

نتایج ارائه شده در جدول ۶ بیان‌کننده این مطلب است که افزایش نیتروژن البته در شکل و میزان مناسب، سبب تحریک فعالیت میکروبی و افزایش تغییر و تبدیلات کربن (C turnover) شده و میزان کربن قابل تجزیه خاک که در یک مدت زمان معین توانایی معدنی شدن دارند را افزایش می‌دهد. در نتیجه عناصر غذایی بیشتری برای رشد میکروب و گیاه آزاد می‌شود. علاوه بر این، با افزودن سطوح مختلف نفت خام به خاک، این

دیگر، افزودن همزمان نفت خام و نیتروژن به خاک، اثرات تحریک‌کنندگی زیادی بر ویژگی‌های میکروبیولوژی از جمله معدنی شدن کربن خاک دارد. اضافه شدن کودهای نیتروژن جهت متعادل کردن میزان کربن وارد شده از طریق نفت خام و زیست‌فراهمی آنها نقش مهمی در سازگاری میکروب‌ها به آلودگی هیدروکربنی و افزایش فعالیت آنها دارد. مارژسین و همکاران (۲۰۰۷) نیز گزارش کردند که میزان فعالیت تنفسی ریزجانداران تحت تأثیر میزان هیدروکربن‌های نفتی و کوددهی و سپس اثر متقابل این دو فاکتور قرار گرفت. هرچند اسکوتزینز و مک‌دونالد (۱۹۸۵) عدم تأثیر کوددهی نیتروژن را در تجزیه نفت به اثبات رساندند.

به طور کلی در خاک غیر آلوده تفاوتی بین تیمارهای نیتروژن و تیمار شاهد وجود نداشت. این در حالی است که در خاک تیمار شده با سطح متوسط آلاینده تمام اشکال نیتروژن سبب افزایش معدنی شدن کربن شدند اما تأثیر آنها در معدنی شدن کربن خاک یکسان بوده و تفاوت معنی‌دار بین آنها مشاهده نشده است. به عبارت دیگر، در سطح متوسط آلودگی تنها اضافه کردن نیتروژن مؤثر بوده و شکل آن از اهمیت خاصی برخوردار نیست. این نشان می‌دهد که با آلوده شدن خاک در سطح متوسط نفت خام، افزایش نیتروژن سبب کاهش نسبت C:N خاک و افزایش راندمان معدنی شدن کربن شده است. در خاک تیمار شده با سطح بالای آلاینده، شکل  $\text{NH}_4$  و  $\text{NH}_4+\text{NO}_3$  نسبت به تیمار بدون نیتروژن، به ترتیب ۱۸/۶٪ و ۷٪ سبب افزایش معدنی شدن کربن شدند و تیمار  $\text{NO}_3$  نیز با تیمار شاهد تفاوت معنی‌دار نداشت. به بیان دیگر، در سطح بالای آلودگی نه تنها افزودن نیتروژن در معدنی شدن کربن مؤثر واقع شده، بلکه شکل این عنصر نیز اهمیت ویژه‌ای دارد. این موضوع جذب ترجیحی آمونیوم را توسط ریزجانداران به اثبات می‌رساند. جکسون و پارو (۱۹۹۹) نیز گزارش کردند علی‌رغم اینکه هر دو شکل نیتروژن ( $\text{NH}_4$  و  $\text{NO}_3$ ) در غلظت‌های مناسب سبب افزایش فعالیت میکروبی شدند، اما آمونیوم و سایر شکل‌های احیایی مشابه نسبت به نیترات و یا سایر شکل‌های اکسایشی نیتروژن برتری دارد. مک‌گیل و نایبورگ (۱۹۷۵) در مطالعه خود در ارتباط با تخریب زیستی نفت در یک خاک لوم رسی گزارش کردند که کاربرد نیتروژن به ویژه به شکل  $\text{NO}_3$ -N نسبت به  $\text{NH}_4$ -N سبب افزایش میزان معدنی شدن کربن گردید. به طور کلی در خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی می‌توان شاهد هم‌اثر بازدارندگی و هم‌اثر تحریک‌کنندگی فعالیت میکروبی بود که این موضوع به نوع و سطح هیدروکربن از یک سو و بافت خاک از سوی دیگر بستگی

موسکاتلی و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که همبستگی منفی بین  $k_c$  با پتانسیل معدنی شدن کربن ( $C_0$ ) و میزان تجزیه مواد آلی ( $CO_2-C$ ) وجود دارد که نشان دهنده ارتباط ثابت سرعت تجزیه با ذخایر کربن موجود در خاک می باشد. رئیسی (۲۰۰۴) نیز در مطالعه خود درباره اثرات کاربرد نیتروژن بر فعالیت‌های میکروبی گزارش کرد که افزودن کود نیتروژنه به خاک‌های مورد مطالعه سبب کاهش  $C_0$  و  $k_c$  شد و پیشنهاد نمود که نیتروژن یک عامل محدود کننده تغییرات کربن در خاک می باشد.

به طور کلی، نتایج این تحقیق نشان می دهد که تیمار  $NH_4$  و سطح ۱۰٪ نفت خام بیشترین میزان معدنی شدن کربن در خاک شنی را موجب شدند زیرا هر دو عنصر کربن و نیتروژن در این خاک عامل محدود کننده فعالیت میکروبی هستند. همچنین تمام تیمارهای نیتروژن و سطح ۱۰٪ نفت خام کمترین مقدار نسبت  $CO_2-C/C_{org}$  و بیشترین مقدار  $MRT$  را نشان دادند. تیمار  $NO_3$  سبب کاهش پتانسیل معدنی شدن کربن نسبت به تیمار شاهد شد و با افزودن سطوح مختلف نفت خام به خاک، این پارامتر در مقایسه با خاک بدون نفت افزایش قابل توجه یافت. همچنین کاهش  $k_c$  در تیمار  $NH_4+NO_3$  و  $NO_3$  نشان می دهد که این اشکال نیتروژن عامل محدودکننده تغییر و تحولات کربن در خاک هستند.

در نهایت، از آنجایی که ایران حدود ۹ درصد از منابع نفتی جهان را دارا است و مقادیر عظیمی از مشتقات نفتی سالانه توسط این کشور تولید، تصفیه و انتقال می یابد، خاک‌ها به شدت در معرض آلودگی تدریجی ترکیبات هیدروکربنی قرار دارند. خاک‌های آلوده به ترکیبات هیدروکربنی به شدت در معرض فقر عناصر غذایی جهت استفاده میکروبی قرار می گیرند، لذا دستیابی به نتایج حاصل از کاربرد عناصر تغذیه‌ای از جمله نیتروژن، فسفر و پتاسیم با تأکید بر شکل و غلظت مناسب ضروری به نظر می رسد.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از حمایت‌های مالی دانشگاه شهرکرد تقدیر به عمل می آید. همچنین از راهنمایی‌های مکرر جناب آقای پروفیسور بروکس در طی این تحقیق بی نهایت سپاسگزاری می گردد. از مدیر عامل محترم پالایشگاه نفت اصفهان جناب آقای مهندس آقائزاد نیز به خاطر همکاری در فراهم نمودن نفت خام مورد استفاده در این تحقیق تشکر و قدردانی می شود.

پارامتر در مقایسه با خاک بدون نفت افزایش قابل توجه یافته است. این موضوع دگرباره سهل الوصول بودن کربن موجود در نفت خام جهت استفاده میکروبی را به اثبات می رساند. در مطالعه‌ای که توسط نمازی (۱۳۸۹) بر روی خاک رسی انجام گردید نیز نتایج مشابهی به دست آمد. در خاک غیر آلوده، اضافه شدن نیتروژن به ویژه در شکل  $NH_4+NO_3$  پتانسیل معدنی شدن کربن را افزایش داده است. ممکن است که این شکل از نیتروژن سبب تحریک تجزیه حتی برخی اجزاء مقاوم به حمله میکروبی از جمله لیگنین‌ها و پلی فل‌ها شده باشد. این در حالی است که در سطح بالای آلاینده (سطح ۱۰٪ نفت خام) افزودن نیتروژن سبب کاهش پتانسیل معدنی شدن کربن شد. به طور کلی، چنانچه افزایش نیتروژن به خاک سبب کاهش معنی دار پتانسیل معدنی شدن کربن شود، نیتروژن یک عامل محدود کننده  $C$  turnover است (رئیسی، ۲۰۰۴).

### ثابت معدنی شدن کربن (ضریب تجزیه، $k_c$ )

ثابت معدنی شدن یا ضریب تجزیه در معادله سینتیکی مرتبه اول معدنی شدن کربن بیان کننده سرعت معدنی شدن این عنصر است. این ضریب که سرعت تجزیه هم نامیده می شود، تحت تأثیر عواملی از جمله شرایط محیطی، کیفیت سوسترا و تنوع جمعیت میکروبی تجزیه کننده می باشد (موسکاتلی و همکاران، ۲۰۰۷).

کاهش  $k_c$  در تیمار  $NH_4+NO_3$  و  $NO_3$  (جدول ۶) نشان می دهد که این اشکال نیتروژن عامل محدودکننده تغییر و تحولات کربن ( $C$  turnover) می باشند. همچنین جدول ۶ نشان می دهد که افزودن نفت خام سبب کاهش این ضریب شده است. علی رغم اینکه توپاند و همکاران (۱۹۹۹) گزارشی از عدم همبستگی بین سرعت تجزیه و غلظت اولیه نفت ارائه دادند، اما پیتر و چودوبا (۱۹۹۰) گزارش کردند که به نظر می رسد بیوماس تنها در یک حد آستانه‌ای ویژه توانایی فراهم آوردن سیستم آنزیمی مناسب جهت تجزیه هیدروکربن‌ها را داراست. با این حال در گزارش رحمان و همکاران (۲۰۰۲) با افزایش غلظت نفت خام از ۱ تا ۱۰٪ تجزیه نفت خام در مدت زمان مشابه از ۷۸٪ به ۵۲٪ کاهش یافت. نمازی (۱۳۸۹) نیز در مطالعه خود به روندی مشابه خاک شنی دست یافت و بیان نمود با افزایش میزان نفت خام این ضریب کاهش می یابد. این در حالی است که اوکو و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند سرعت و میزان تجزیه نفت خام سنگین با افزایش غلظت نفت اولیه تا ۰/۶٪ افزایش یافت.



جدول ۱- مشخصات اولیه خاک مورد آزمایش

کلاس بافت خاک	مشخصات
شن	
۳۶	رس (%)
۴۴	سیلت (%)
۹۲۰	شن (%)
۱۱/۱	کربنات کلسیم معادل (%)
۷/۳	فسفر (ppm)
۰/۰۲۵	نیتروژن کل (%)
۰/۰۵۵	کربن آلی (%)
۲/۲	C:N
۰/۴۶	شوری ( $\text{dS m}^{-1}$ )
۷/۸	pH

جدول ۲- مشخصات نفت خام مورد آزمایش

برخی اجزاء نفت خام			
مقادیر	سایر ترکیبات نفت خام	درصد وزنی	هیدروکربن‌های نفتی
۱/۵۲	گوگرد (WT%)*	-	متان
<۱	سولفید هیدروژن (ppm)	۰/۰۱	اتان
۰/۱۲	نیتروژن کل (WT%)	۰/۴۴	پروپان
۳۷	نمک (PTB)*	۰/۲۲	ایزو- بوتان
۰/۹	قیح (WT%)	۰/۷۷	ان- بوتان
۵/۹۳	واکس (WT%)	۰/۰۹۵	ایزو- پنتان
۷۲	کربن آلی (WT%)	۰/۰۲۵	ان- پنتان
۰/۰۱	خاکستر (WT%)	ناچیز	۲- متیل پنتان
۹/۵	نیکل (ppm)	ناچیز	۳- متیل پنتان
۲۹	وانادیم (ppm)	ناچیز	ان- هگزان
۱/۷۵	آهن (ppm)	-	ایزو- هپتان
<۱	سرب (ppm)	-	ان- هپتان

\*Weight percent

\*Pounds of salt per Thousand Barrels of crude oil

جدول ۳- مقادیر C، N و C:N خاک اولیه، نفت خام و خاک تیمار شده با نفت و نمک‌های نیتروژن دار\*

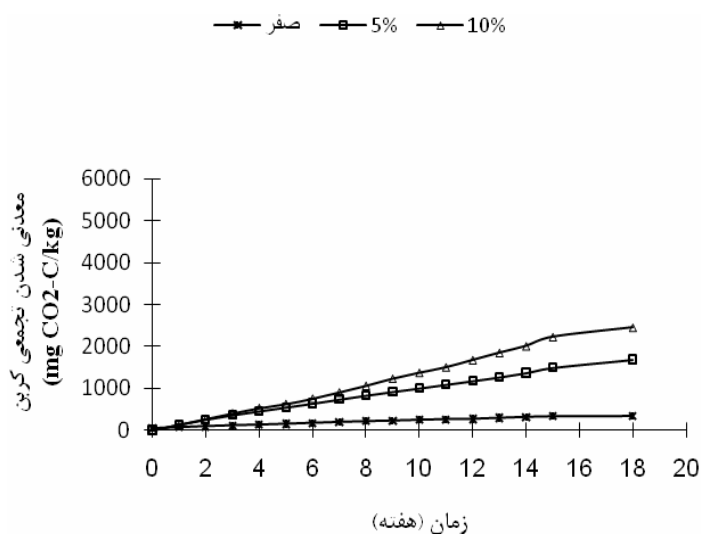
خاک اولیه (mg kg <sup>-1</sup> )			نفت خام (mg kg <sup>-1</sup> )				خاک تیمار شده (mg kg <sup>-1</sup> )		
C:N	N	C	C:N	N	C	سطح نفت	C:N	N	C
۲/۱	۲۶۰/۷	۵۵۰	-	-	-	صفر	-	-	-
۹۸	۳۱۰/۵	۳۰۴۳۰	۶۰۰	۴۹/۸	۲۹۸۸۰	۵٪	۲/۲۰	۲۵۰	۵۵۰
۱۶۷	۳۶۰/۳	۶۰۳۱۰	۱۰٪	۹۹/۶	۵۹۷۶۰	۱۰٪	-	-	-

\* ۳۰ kgN/ha معادل ۱۰/۷ mgN/kg به خاک اضافه شده است.

جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس اثر ساده شکل نیتروژن، سطح نفت و اثرات متقابل آنها بر شاخص‌های بیوبایی کربن و برخی شاخص‌های بیولوژیک در خاک شنی (اعداد جدول آماره F هستند)

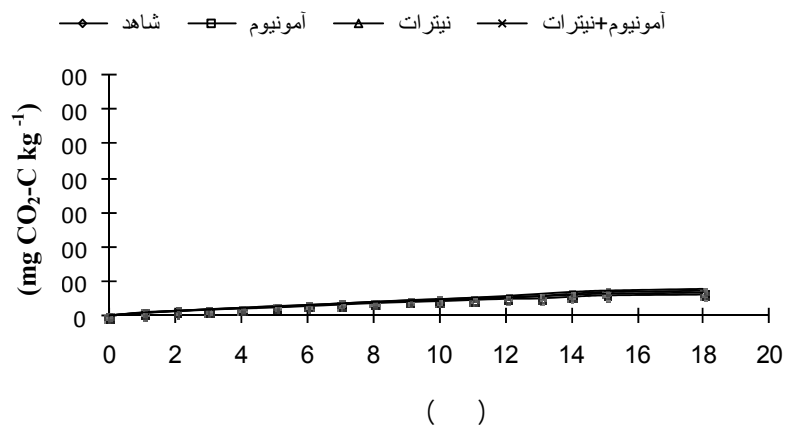
منبع تغییر	df	CO <sub>2</sub> -C	C <sub>0</sub>	k <sub>c</sub>	MRT	CO <sub>2</sub> -C/C <sub>org</sub>
شکل نیتروژن (N)	۳	۲۸/۶***	۴/۶**	۲/۷ <sup>ns</sup>	۲۵/۶***	۲۸/۷***
سطح نفت (P)	۲	۴۸۸۵***	۵۹۸***	۳۸۷***	۵۴۵۱***	۱۱۵۶۴***
(N×P)	۶	۱۰***	۳۴***	۴/۴***	۹***	۲۴/۶***

\*\*\* و \*\* به ترتیب به مفهوم معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ و ۰/۱٪ می‌باشد. CO<sub>2</sub>-C، تنفس میکروبی طی ۱۲۶ روز انکوباسیون؛ C<sub>0</sub>، پتانسیل معدنی شدن کربن؛ k<sub>c</sub>، ثابت سرعت معدنی شدن کربن؛ MRT، متوسط زمان ماندگاری کربن در سال؛ CO<sub>2</sub>-C/C<sub>org</sub>، نسبت کل کربن معدنی شده به کربن آلی خاک طی ۱۲۶ روز انکوباسیون؛

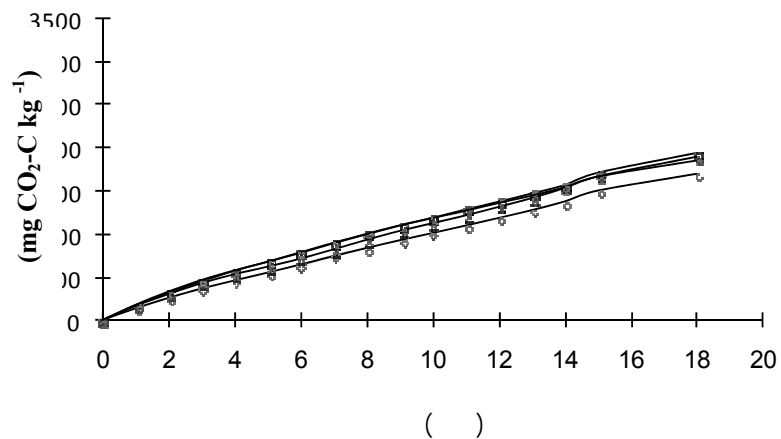


شکل ۱- اثر سطوح صفر، ۵ و ۱۰ درصد نفت خام بر روند معدنی شدن کربن در خاک شنی

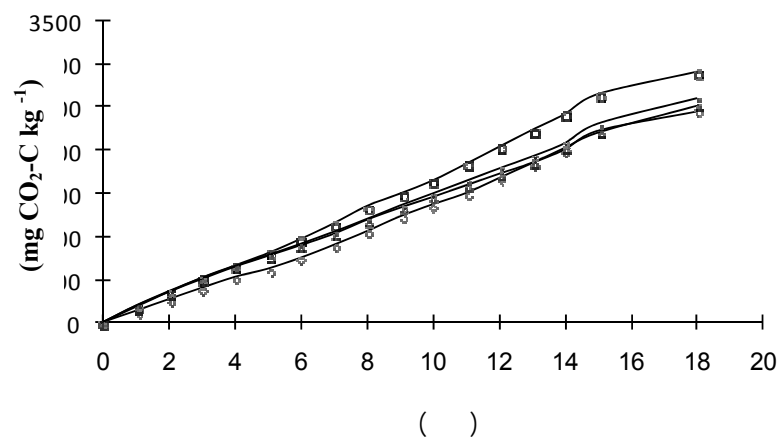
**A**



**B**



**C**



شکل ۲- اثر آمونیوم، نیترات و آمونیوم+نیترات بر روند معدنی شدن تجمعی کربن در خاک شنی تیمار شده با سطوح مختلف نفت خام (A، شاهد؛ B، 5% نفت خام؛ C، 10% نفت خام)

جدول ۵- مقایسه میانگین (n=۳) اثرات متقابل سطوح نفت خام و شکل‌های نیتروژن بر کل CO<sub>2</sub>-C (بر حسب mgkg<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub>-C/C<sub>org</sub>)، (بر حسب % و MRT (بر حسب سال). اعداد داخل پرانتز مقدار SE را نشان می‌دهند

LSD <sub>0.05</sub>	میانگین	شکل نیتروژن			سطح نفت (%)	
		NH <sub>4</sub> +NO <sub>3</sub>	NO <sub>3</sub>	NH <sub>4</sub>		
<b>CO<sub>2</sub>-C (LSD<sub>0.05</sub>=۹.۶)</b>						
	۳۵۴ (۵/۷)C	۳۹۶(۲/۲)C <sup>a</sup>	۳۳۶(۵/۷۰)C <sup>a</sup>	۳۵۷ (۷/۳۰)C <sup>a</sup>	۳۲۷ (۷/۴۰)C <sup>a</sup>	۰
	۱۸۴۴ (۲۶/۸)B	۱۸۶۱ (۳۹/۳)B <sup>a</sup>	۱۸۹۱ (۲۹/۳)B <sup>a</sup>	۱۹۳۸ (۱۹/۵)B <sup>a</sup>	۱۶۸۷ (۱۹/۲)B <sup>b</sup>	۵
	۲۶۱۹ (۴۸)A	۲۶۰۷ (۴۴/۸)A <sup>b</sup>	۲۵۲۱(۴۲/۸)A <sup>bc</sup>	۲۹۰۱ (۳۷/۸)A <sup>a</sup>	۲۴۴۶ (۶۶/۷)A <sup>c</sup>	۱۰
۵۶	-	۱۶۲۱ (۲۸/۸)b	۱۵۸۲ (۲۶/۰)b	۱۷۳۲ (۲۱/۵)a	۱۴۸۶ (۳۱/۰.۸)c	میانگین
۴۸						LSD <sub>0.05</sub>
<b>CO<sub>2</sub>-C/C<sub>org</sub> (LSD<sub>0.05</sub>=۱/۹)</b>						
	۶۴/۴(۱/۰.۲)A	۷۲ (۰/۴۰)A <sup>a</sup>	۶۱ (۱/۰.۴)A <sup>c</sup>	۶۵ (۱/۳۰)A <sup>b</sup>	۵۹/۴ (۱/۳)A <sup>c</sup>	۰
	۶/۱(۰/۰.۹)B	۶/۱ (۰/۱۳)B <sup>a</sup>	۶/۲ (۰/۰.۹)B <sup>a</sup>	۶/۴ (۰/۰.۶)B <sup>a</sup>	۵/۵ (۰/۰.۶)B <sup>a</sup>	۵
	۴/۳ (۰/۰.۸)C	۴/۳ (۰/۰.۷)B <sup>a</sup>	۴/۲ (۰/۰.۷)C <sup>a</sup>	۴/۸ (۰/۰.۶)B <sup>a</sup>	۴/۰ (۰/۱۱)B <sup>a</sup>	۱۰
۱/۱	-	۲۷/۵ (۰/۲)a	۲۳/۸ (۰/۴)c	۲۵/۴ (۰/۴۷)b	۲۳ (۰/۵۰۰)c	میانگین
۰/۹						LSD <sub>0.05</sub>
<b>MRT (LSD<sub>0.05</sub>=۰/۰.۲۶)</b>						
	۰/۰.۴۵ (۰/۰.۰۰۷)C	۰/۰.۴ (۰/۰.۰۰۲)C <sup>a</sup>	۰/۰.۵ (۰/۰.۰۰۸)C <sup>a</sup>	۰/۰.۴ (۰/۰.۰۰۹)C <sup>a</sup>	۰/۰.۵ (۰/۰.۰۱)C <sup>a</sup>	۰
	۰/۴۸ (۰/۰.۰۷۰)B	۰/۴۷ (۰/۰.۱۰۰)B <sup>b</sup>	۰/۴۷ (۰/۰.۰۷۰)B <sup>b</sup>	۰/۴۵ (۰/۰.۰۵۰)B <sup>b</sup>	۰/۵۲ (۰/۰.۰۶)B <sup>a</sup>	۵
	۰/۶۷ (۰/۰.۱)A	۰/۷۰ (۰/۰.۱۰۰)A <sup>b</sup>	۰/۷۰ (۰/۰.۱۰)A <sup>ab</sup>	۰/۶۰ (۰/۰.۰۸۰)A <sup>c</sup>	۰/۷۰ (۰/۰.۲۰)A <sup>a</sup>	۱۰
۰/۰.۱۷	-	۰/۴۰ (۰/۰.۰۷۰)b	۰/۴۰ (۰/۰.۰۶۰)b	۰/۳۸ (۰/۰.۰۵۰)c	۰/۴۳ (۰/۰.۰۹)a	میانگین
۰/۰.۱۳						LSD <sub>0.05</sub>

مقایسه بین تیمارها در هر ستون با حروف بزرگ و در هر ردیف با حروف کوچک نشان داده شده است. اعداد با حداقل یک حرف مشترک فاقد تفاوت معنی دار بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ می باشند

جدول ۶- مقایسه میانگین (n=۳) اثرات متقابل سطوح نفت خام و شکل‌های نیتروژن بر C<sub>0</sub> (بر حسب mgkg<sup>-1</sup>) و k<sub>c</sub> (بر حسب day<sup>-1</sup>). اعداد داخل پرانتز مقدار SE را نشان می‌دهند.

LSD <sub>0.05</sub>	میانگین	شکل نیتروژن			شاهد	سطح نفت (%)
		NH <sub>4</sub> +NO <sub>3</sub>	NO <sub>3</sub>	NH <sub>4</sub>		
		C <sub>0</sub> †				
	۷۰۴ (۲۵/۳)C	۱۰۵۴(۶۶)C <sup>a</sup>	۵۸۳(۱۱)C <sup>b</sup>	۶۸۴(۳۳/۵)C <sup>b</sup>	۴۹۶ (۰/۶۷)C <sup>c</sup>	۰
	۴۴۴۳ (۱۳۷)B	۳۳۷۴ (۵۶)B <sup>a</sup>	۵۵۶۲ (۸۴)B <sup>a</sup>	۳۷۴۵ (۱۰)B <sup>a</sup>	۵۰۹۱(۳۹۷)B <sup>a</sup>	۵
	۱۹۳۲۵ (۵۹۹)A	۱۸۷۷۹ (۲/۳)A <sup>b</sup>	۱۲۹۱۵ (۱۶۱۵)A <sup>c</sup>	۲۱۴۰۶ (۵۶۲)A <sup>b</sup>	۲۴۲۰۲(۲۱۵)A <sup>a</sup>	۱۰
۸۶۲	-	۷۷۳۶ (۴۱/۴)a	۶۳۵۳ (۵۷۰)b	۸۶۱۲ (۱۹۸)a	۹۹۳۹ (۲۰۴)a	میانگین
	۷۴۷					LSD <sub>0.05</sub>
		k <sub>c</sub> (LSD <sub>0.05</sub> =۰/۰۰۰۸)				
	۰/۰۰۶۵(۰/۰۰۰۴)A	۰/۰۰۳۹(۰/۰۰۰۳)A <sup>d</sup>	۰/۰۰۷۲(۰/۰۰۰۴)A <sup>b</sup>	۰/۰۰۶۱(۰/۰۰۰۵)A <sup>c</sup>	۰۰۸۹(۰/۰۰۰۳)A <sup>a</sup>	۰
	۰/۰۰۴۶ (۰/۰۰۰۲)B	۰/۰۰۶۲(۰/۰۰۰۳)B <sup>a</sup>	۰/۰۰۳۴(۰/۰۰۰۱)B <sup>b</sup>	۰/۰۰۵۷(۰/۰۰۰۳)A <sup>a</sup>	۰/۰۰۳۳(۰/۰۰۰۳)B <sup>b</sup>	۵
	۰/۰۰۱۳ (۰/۰۰۰۰۹)C	۰/۰۰۱۲ (۰/۰۰)C <sup>ab</sup>	۰/۰۰۱۸(۰/۰۰۰۳)C <sup>a</sup>	۰/۰۰۱۲(۰/۰۰۰۰۳)B <sup>ab</sup>	۰/۰۰۰۹(۰/۰۰۰۰۲)C <sup>b</sup>	۱۰
۰/۰۰۰۵	-	۰/۰۰۳۸ (۰/۰۰۰۲)b	۰۰۴۱۰ (۰/۰۰۰۳)ab	۰/۰۰۴۳ (۰/۰۰۰۲)a	۰/۰۰۴۳ (۰/۰۰۰۲)a	میانگین
	۰/۰۰۰۴					LSD <sub>0.05</sub>

† لازم به ذکر است که داده‌های پتانسیل معدنی شدن کربن به دلیل غیر نرمال بودن و عدم داشتن واریانس‌های همگن تغییر شکل لگاریتمی شدند. مقایسه بین تیمارها در هر ستون با حروف بزرگ و در هر ردیف با حروف کوچک نشان داده شده است. اعداد با حداقل یک حرف مشترک فاقد تفاوت معنی دار بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ می‌باشند.

### فهرست منابع:

- جعفری س. ۱۳۸۷. اثرات متقابل بقایای گیاهی و گوگرد بر فعالیت میکروبی و آنزیمی یک خاک آهکی. پایان نامه کارشناسی ارشد مهندسی علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد.
- جعفری حقیقی م. ۱۳۸۲. روش‌های تجزیه خاک، نمونه‌برداری و تجزیه‌های مهم فیزیکی و شیمیایی با تأکید بر اصول تئوری و کاربردی. انتشارات ندای ضحی.
- غازان‌شاهی ج. ۱۳۷۶. آنالیز خاک و گیاه. انتشارات مترجم.
- لکزیان ا. ۱۳۸۷. میکروبیولوژی خاک. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.
- نمازی س، ۱۳۸۹. اثرات متقابل نفت خام و شکل‌های مختلف نیتروژن بر تنفس و بیوماس میکروبی و فعالیت آنزیمی خاک‌های رسی و شنی. پایان نامه کارشناسی ارشد مهندسی علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد.
- Ajwa, H.A., and M.A. Tabatabaie. 1994. Decomposition of different organic materials in soils. *Biol. Fertil. Soils* 18:175-182.
- Alexander, M. 1977. *Introduction to soil microbiology*. (2<sup>st</sup> ed.). Krieger Publishing Co. Wiley, New York. 480 pp.
- Anderson, J.P.E. 1982. Soil respiration. p. 831-871. In A.L. Page et al. (eds) *Methods of soil analysis. Part 2. chemical and microbiological properties*. Agron. Monogr. ASA and SSSA, Madison, WI.
- Broadbent, F.E., and A.G. Norman. 1947. Some factors affecting the availability of organic nitrogen in soil-a preliminary report. *Am. Soil. Sci. Soc J.* 11: 264-267.
- Chaineau, C.H., G. Rougeux., C. Yepremian., and J. Oudot. 2005. Effects of nutrient concentration on biodegradation of crude oil and associated microbial populations in the soil. *Soil Biol. Biochem.* 37:1490-1497.

11. Chen, J., and J.M. Stark. 2000. Plant species effects and carbon and nitrogen cycling in a sagebrush-crested wheatgrass soil. *Soil Biol. Biochem.* 32: 47-57.
12. Fogg, K. 1988. The effect of added nitrogen on the rate of decomposition of organic matter. *Biol Rev* 63:433-462.
13. Franco, I., M. Contin., G. Bragato., and M. De Nobili. 2004. Microbiological resilience of soils contaminated with crude oil. *Geoderma* 121:17-30.
14. Gee, G.W., and J.W. Bauder. 1986. Particle size analysis. p. 383-411. In A. Klute (ed.) *Methods of soil analysis. Part 1. Physical and mineralogical methods.* Agron. Madison, WI.
15. Geisseler, D., and W.R. Horwath. 2008. Regulation of extracellular protease activity in soil in response to different sources and concentrations of nitrogen and carbon. *Soil Biol. Biochem.* 40:3040-3048.
16. Giblin, A.E., K.J. Nadelhoffer., G.R. Shaver., J.A. Laundre., and A.J. McKerrow. 1991. Biogeochemical diversity along a riverside toposequence in arctic Alaska. *Ecological Monographs* 61: 415-435.
17. Hart, S.C., G.E. Nason., D.D. Myrold., and D.A. Perry. 1994. Dynamics of gross nitrogen transformations in an old-growth forest: the carbon connection. *Ecol.* 75: 880-891.
18. Hassink, J. 1995. Organic matter dynamics and N mineralization in grassland soils. PhD thesis. Wageningen Agricultural University, The Netherlands. 250 pp.
19. Jackson, L.E., J.P. Schimel., and M.K. Firestone. 1989. Short-term partitioning of nitrate and ammonium between plants and microbial biomass in annual grassland. *Soil Biol. Biochem.* 21: 409-415.
20. Jackson, W.A., and J.H. Pardue. 1999. Potential for enhancement of biodegradation of crude oil in Louisiana salt marshes using nutrient amendments. *Water Air Soil Pollut.* 109:343-355.
21. Jenkinson, D.S., and J.N. Ladd. 1981. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. In: Paul E.A. and Ladd J.N. (Eds). *Soil Biochem*, vol. 5, Dekker, New York. pp. 415-471.
22. Jenkinson, D.S., and D.S. Powelson. 1976. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. V. A method for measuring soil biomass. *Soil Biol. Biochem.* 8: 209-213.
23. Klute, A. 1986. *Methods of Soil Analysis part 1, Physical and Mineralogical.* Am. Agron. Soc-Am Soil Sci. pp. 413-423.
24. Labud, V., C. Garcia., and T. Hernandez. 2007. Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. *Chemosphere* 66:1863-1871.
25. Margesin, R., M. Hammerle., and D. Tschерko. 2007. Microbial activity and community composition during bioremediation of diesel-oil-contaminated soil: Effects of hydrocarbon concentration, fertilizers, and incubation time. *Microb Ecol* 53:259-269.
26. Martens, R. 1995. Current methods for measuring microbial biomass C in soil: Potentials and limitations. *Biol. Fertil. Soils* 19: 87-99.
27. Matus, F.J. 1994. Crop residue decomposition, residual soil organic matter and nitrogen mineralization in arable soils with contrasting textures. PhD thesis. Wageningen Agricultural University, The Netherlands. 141 pp.
28. McGill, W.B., and M. Nyborg. 1975. Reclamation of wet forested soils subjected to oil spills. Contract OSP3-0073 for Northern forest research center, Edmonton, Alberta Institute of Pedology. University of Alberta, Edmonton, Canada. Publication No. 6-75-1.
29. Minai-Tehrani, D., and A. Herfatmanesh. 2007. Biodegradation of aliphatic and aromatic fractions of heavy crude oil-contaminated soil: A pilot study. *Biorem. J.* 11:71-76.
30. Moscatelli, C., A.Di. Tizio., S. Marinari., and S. Grego. 2007. Microbial indicators related to soil carbon in Mediterranean land use systems. *Soil. Till. Res* 97:51-59.

31. Ndiaye, E.L., J.M. Sandeno., D. McGrath., and R.P. Dick. 2000. Integrative biological indicators for detecting change in soil quality. *Am J Alternative Agr* 15:20-36.
32. Okoh, A.I. 2006. Biodegradation alternative in the cleanup of petroleum hydrocarbon pollutants. *Biotechnology and Molecular Biol. Rev* 1:38-50.
33. Paul, E.A., and F.E. Clark. 1996. *Soil microb. biochem.* 2nd ed. Academic. New York. 340 pp.
34. Pitter, P., and J. Chudoba. 1990. Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. CRC Press. Boca Raton. Florida. USA. p.7-83.
35. Polglase, P.J., P.M. Attiwill., and M.A. Adams. 1992. Nitrogen and phosphorus cycling in relation to stand age of *Eucalyptus regnans*. *Plant and Soil* 142:167-176.
36. Rahman, K.S.M., J.Thahira-Rahman., P.Lakshmanaperumalsamy., and I.M. Banat. 2002. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioremed. Technol* 85:257-261.
37. Raiesi, F. 2004. Soil properties and N application effects on microbial activities in two winter wheat cropping systems. *Biol. Fertil. Soils* 40:88-92.
38. Rivera-Espinoza, Y., and L. Dendooven. 2004. Dynamics of carbon, nitrogen and hydrocarbons in diesel-contaminated soil amended with biosolids and maize. *Chemosphere* 54:379-386.
39. Schimel, J.P., and M.K. Firestone. 1989. Inorganic nitrogen incorporation by coniferous forest floor material. *Soil Biol. Biochem.* 21: 41-46.
40. Schimel, J.P. and M.N. Weintraub. 2003. The implications of exoenzyme activity on microbial carbon and nitrogen limitation in soil: a theoretical model. *Soil Biol. Biochem.* 35: 549-563.
41. Singh, A., R.C. Kuhad., and O.P. Ward. 2009. *Advances in Applied Bioremediation.* Soil Biol. Volume 17. p. 365.
42. Skjemstad, J.O., and J.A. Baldock. 2008. Total and organic carbon. p. 225-238 In M.R. Carter et al. (ed.) *Soil Sampling and Methods of Analysis.* 2nd ed. Can. Soil Sci. Soc. CRC Press (Taylor and Francis Group).
43. Skujins, J., and S.O. McDonald. 1985. Waste oil biodegradation and changes in microbial populations in a semiarid soil. p. 549. In D.E. Caldwell et al. (eds.) *Planetary Ecology,* Van Nostrand Reinhold Co., New York.
44. Stanford G. and Smith S.J. 1972. Nitrogen mineralization potential of soils. *Am. Soil Sci. Soc J.* 36: 456-472
45. Thouand, G., P. Bauda., J. Oudot., G. Kirsch., C. Sutton., and J.F. Vidalie. 1999. Laboratory evaluation of crude oil biodegradation with commercial or natural microbial inocula. *Can J Microbiol* 45:106-115.
46. Vance, E.D., and F.S. III. Chapin. 2001. Substrate limitations to microbial activity in taiga forest floors. *Soil Biol. Biochem.* 33:173-188.
47. Van Vuuren, M.M.I., and L.J. Van der Eerden. 1992. Effects of three rates of atmospheric nitrogen deposition enriched with <sup>15</sup>N on litter decomposition in a peatland. *Soil Biol. Biochem* 24:527-532.
48. Waksman, S.A., and K.R. Stevens. 1929. Contribution to the chemical composition of peat: V. The role of microorganisms in peat formation and decomposition. *Soil Sci.* 28: 315-340.