نشریه پژوهش‌های حفاظت آب و خاک
جلد بیستم، شماره چهارم، ۱۳۹۲
http://jwsc.gau.ac.ir

بهینه‌سازی شرایط تجزیه زیستی هیدروکربن‌های نفتی به‌وسیله میکرواورگانیسم‌های بومی و غیربومی

*مریم دوستکی[۱]، سهیلا ابراهیمی[۲]، سیدعلیرضا موحدی‌نائینی[۳] و محسن علمائی[۲]
[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه خاکشناسی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۲]استادیار گروه خاکشناسی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۳]دانشیار گروه خاکشناسی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۷ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۱/۹/۲۰

چکیده

استحصال نفت هر روز در ایران، سبب پخش و گسترش آن به محیط، در مراحل مختلف بهره‌برداری و ذخیره‌سازی این ترکیبات هیدروکربنی می‌شود. همین امر، ضرورت اعمال روش‌های کارآمد برای پاک‌سازی آلودگی، ولی سازگار با محیط زیست و مناسب هر منطقه را اجتناب‌ناپذیر می‌سازد. هدف از این پژوهش بررسی شرایط بهینه برای تحریک میکرواورگانیسم‌های بومی خاک به‌منظور تجزیه کل هیدروکربن‌های نفتی، واکنش باکتری‌ها در شرایط متفاوت اعمال شده، روش‌های تجزیه زیستی و نرخ یا روند تغییر میزان آلودگی هیدروکربنی با زمان بوده است. به این منظور از خاک آلوده نفتی اطراف پالایشگاه ری با میزان کل آلاینده هیدروکربنی ۳۸ درصد استفاده و ۱۳ تیمار از جمله کودهای شیمیایی، حیوانی، خاک‌اره و تلقیح کمپلکسی از باکتری‌های باسیلوس سابتیلیس، باسیلوس مگاتریوم، سودوموناس پوتیدا در طی ۱۳ زمان (هر ۲ هفته) بر این خاک اعمال شد. نتایج نشان داد، با گذشت زمان تیمارهای باکتری + خاک‌اره و باکتری به‌ترتیب با بیش‌ترین تأثیر باعث کاهش ۳۵ درصد و ۳٤ درصد آلودگی نفتی خاک مورد مطالعه شدند و تیمار خاک خشک (بدون هیچ‌گونه مواد افزودنی به‌جز هوادهی) با ۱۸ درصد کاهش، کم‌ترین تأثیر را نسبت به بقیه تیمارها در تجزیه میزان نفت داشته‌اند. نتایج این پژوهش بیانگر این بود که در صورت فعال بودن میکرواورگانیسم‌های بومی و با بهبود شرایط محیطی از جمله هوادهی، اضافه کردن مواد مغذی،

* مسئول مکاتبه: m.doustaky@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

رطوبت می‌توان تجزیه هیدروکربن‌های نفتی را سرعت بخشید ولی اگر فعالیت ریزاندام‌های بومی کم باشد، مخلوط کردن موادی مثل خاک‌اره، کود حیوانی به همراه تلقیح ریزموجودات غیربومی از جمله باکتری‌های فعال نفت‌خوار روند کاهش آلاینده‌های نفتی، را افزایش خواهد داد.

واژه‌های کلیدی: باکتری، پالایش، خاک آلوده به ترکیبات نفتی، میکروارگانیسم، نفت

مقدمه

امروزه عملیات استخراج، انتقال، پالایش، نشت مواد نفتی از لوله‌ها در هنگام جابه‌جایی، ترکیدن لوله‌ها و چاه‌های نفتی، انتشار پساب‌های صنعتی پالایشگاه‌ها و صنایع شیمیایی به آب و خاک، جهان را با تهدید جدی مواجه ساخته است. در کشورهای تولیدکننده نفت از جمله ایران (تولید روزانه ٤ میلیون بشکه نفت)، این مشکلات به‌طور جدی‌تری به چشم می‌خورند (احتشامی و احمدی‌نیا، ۲۰۰۷). نفت ترکیبی از هزاران ماده آلی می‌باشد که بخش اعظم آن را ترکیبات هیدروفوبیک تشکیل می‌دهد (مختاریان و همکاران، ۲۰۱۰). میزان آسیب محیط طبیعی ناشی از نشت هیدروکربن‌های نفتی، وابسته به سطح آلودگی ایجاد شده توسط مواد نفتی، ترکیب شیمیایی و عمق نشر آلاینده است (ولیکا و همکاران، ۲۰۰۹). سمیت یک آلاینده آلی به خصوصیات خاک نیز بستگی دارد. با بالا رفتن CEC خاک (افزایش مواد آلی و میزان رس)، جذب آلاینده‌های آلی افزایش می‌یابد و اثر سمیت آن‌ها را بر روی اکوسیستم کم می‌کند (لابود و همکاران، ۲۰۰۷). در این راستا، اعمال روش‌های پاک‌سازی کارآمد سازگار با محیط زیست و مناسب برای رفع آلودگی هر منطقه لازم و ضروری است (ابراهیمی و همکاران، ۲۰۰۹). از دیرباز تاکنون، روش‌های متعددی برای از بین بردن آلودگی نفتی به‌کار برده شده است. در شرایط طبیعی پس از نشت آلودگی نفتی، عوامل طبیعی مانند فعالیت میکروارگانیسم‌های بومی خاک، با گذشت زمان منجر به حذف آلودگی می‌شود؛ ولی انباشت این آلاینده‌ها سبب می‌شود که عوامل طبیعی، قادر به حذف آلودگی نباشند (سیدعلیخانی و همکاران، ۲۰۰۹). دسته‌بندی روش‌های پالایش با توجه به مطالعات و پژوهش‌های انجام شده، شامل روش‌های فیزیکی (سوزاندن، ابزارهای جمع‌کننده و...)، شیمیایی (استخراج از طریق حلال‌ها و...) و زیستی (تهویه زیستی، افزایش زیست‌توده و...) می‌باشند. در دهه اخیر، تجزیه آلاینده‌های نفتی به‌وسیله روش‌های زیستی که از ارگانیسم‌های زنده برای حذف یا سم‌زدایی آلاینده‌های زیست‌محیطی استفاده می‌شود (محسن‌زاده و

Archive of SID

www.SID.ir

همکاران، ۲۰۰۹). روش‌های زیستی به‌دلیل سازگاری با زیست‌بوم، سرعت بخشیدن به روند تجزیه، امکان استفاده هم‌زمان با روش‌های فیزیکی و شیمیایی، مقرون به صرفه بودن و تجزیه نهایی آلاینده‌های هیدروکربنی به مواد غیرسمی مثل آب و دی‌اکسیدکربن، از مهم‌ترین راه‌کارهای مدیریتی به‌شمار می‌روند. انواع روش‌های زیست‌پالایی عبارت از روند طبیعی تجزیه زیستی، بهبود شرایط محیطی و وارد کردن میکرواورگانیسم‌های غیربومی می‌باشند.

قدمت کاربرد زیست‌پالایی، به ۶۰۰ سال قبل از میلاد برمی‌گردد (ابراهیمی، ۲۰۰۹). باکتری‌ها و قارچ‌ها تنها گونه‌های بیولوژیکی دارای توانایی متابولیکی برای استفاده از کربن نفت در سنتز سلولی خود هستند. هیدروکربن‌های نفتی ۵۰-۱۳ درصد توسط باکتری‌ها و ۸۲-۶ درصد توسط قارچ‌ها تجزیه می‌شوند اما برای پاک‌سازی خاک‌ها از باکتری‌ها به‌علت فراوانی زیاد، افزایش سرعت رشد و استفاده از طیف وسیعی از هیدروکربن‌ها، بیش‌تر استفاده می‌شود (ولیکا و همکاران، ۲۰۰۹). اندازه جامعه وابسته به هیدروکربن‌های نفتی به‌عنوان منبع تامین کربنی، وابسته به فاکتورهای زیستی و غیرزیستی موجود و ظرفیت سازش میکرواورگانیسم‌ها است (روبرتو و همکاران، ۲۰۰۳). با توجه به اهمیت جدی انگاشتن خطر نشر و گسترش روزافزون آلاینده‌های هیدروکربنی و تهدید جدی برای سلامت خاک و آب و در نهایت امنیت و سلامت موجودات زنده و انسان، هدف از انجام این پژوهش تعریف شد. این مطالعه بر روی خاک آلوده پالایشگاه ری با آلودگی اولیه ۳۸ درصد طی ۱۳ زمان متوالی، صورت گرفت و اثر ۱۳ تیمار مختلف برای تامین شرایط محیطی مورد نیاز برای رشد میکرواورگانیسم‌های بومی احتمالی، از جمله کودهای آلی و شیمیایی و همچنین برای افزایش روند تجزیه هیدروکربن‌های نفتی از باکتری‌های *باسیلوس مگاتریوم*[1]، *باسیلوس سابتیلیس*[2] و *سودوموناس پوتیدا*[3] استفاده شد. هدف از این پژوهش بررسی شرایط بهینه برای تحریک میکرواورگانیسم‌های بومی خاک به‌منظور تجزیه کل هیدروکربن‌های نفتی، بررسی واکنش باکتری‌ها در شرایط متفاوت اعمال شده و تعیین بهترین عملکرد و سرانجام نرخ یا روند تغییر میزان آلودگی هیدروکربنی با زمان در شرایط متفاوت بود.

1- *Bacillus Megaterium*
2- *Bacillus Subtilis*
3- *Psudomonasputida*

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش‌ها

سایت موردنظر برای جمع‌آوری خاک آلوده هیدروکربنی، ناحیه‌ای در اطراف پالایشگاه تهران واقع در شهرستان ری بود. نمونه خاک جمع‌آوری شده، پس از ۲ روز هوا خشک شده، کوبیده و از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شدند. این پژوهش در گلدان‌هایی و با اعمال ۷۰۰ گرم خاک درون هر گلدان و به‌کار بردن تیمارهای مختلف انجام شد که عبارتند از:

۱- خاک خشک (خاک آلوده بدون آب و همراه با هوادهی)

۲- خاک مرطوب (خاک آلوده بدون هوادهی و همراه با آب)

۳- مخلوطی از کودهای اوره، کلرید پتاسیم و سوپر فسفات تریپل با نسبت ۲۰:۵:۱ به‌منظور تامین NPK

٤- کود حیوانی با نسبت ۵ درصد

۵- خاک اره با نسبت ۱۰ درصد

٦- NPK + کود حیوانی

۷- NPK + خاک اره

۸- NPK + خاک اره + کود حیوانی

۹- کمپلکس باکتری

۱۰- باکتری + NPK

۱۱- باکتری + کود حیوانی

۱۲- باکتری + خاک اره

۱۳- باکتری + خاک اره + NPK

باکتری‌های *باسیلوس مگاتریوم*، *باسیلوس سابتیلیس* و *سودوموناس پوتیدا*، به‌صورت ایزوله خالص از آزمایشگاه بیولوژی گروه خاکشناسی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان تهیه شدند.

کشت باکتری‌های تهیه شده به‌منظور رسیدن به تعداد کافی برای تلقیح در تیمارها: طبق پژوهش‌های انجام شده، برای این‌که باکتری‌های تجزیه‌کننده بتوانند هیدروکربن‌های نفتی را تجزیه کنند باید حداقل تعداد آن‌ها ۲×۱۰^{۸} سلول در هر کیلوگرم خاک باشد (تاپا و همکاران، ۲۰۱۲؛ سیدعلیخانی و همکاران، ۲۰۰۹). این مقدار برای شرایط اپتیمم تجزیه مواد نفتی است که در این حالت میزان آلودگی ۱۰-۵ درصد وزن خشک خاک می‌باشد (تاپا و همکاران، ۲۰۱۲). اما از آن‌جایی‌که خاک مورد مطالعه ۳۸ درصد

Archive of SID

www.SID.ir

آلودگی داشت، تقریباً ۳ برابر این مقدار باکتری باید به خاک اضافه شود. به این منظور برای رسیدن به جمعیت مناسب، شمارش تعداد باکتری‌ها با استفاده از روش رقیق‌سازی و شمارش کلنی[1] انجام شد. به این صورت که ابتدا هر کدام از این باکتری‌ها در محیط کشت نوترینت آگار[2] کشت شدند سپس با شرایط کاملاً استریل و با کمک لوپ از کلنی‌های مربوط به هر کدام از باکتری‌ها برداشته و به لوله آزمایش‌های جداگانه، دارای ۵ سی‌سی محیط مایع نوترینت براس[3] تلقیح شد. بعد از ۲٤ ساعت، ۱ سی‌سی از هر کدام از لوله‌های شامل باکتری برداشته و از آن‌ها سری رقت تهیه شد و روی محیط نوترینت آگار کشت و درون انکوباتور قرار داده شدند. باکتری‌ها در زمان‌های ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت شمارش شدند. پس از محاسبه‌ها، تعداد باکتری‌ها در زمان ٤۸ ساعت به تعداد موردنظر رسید.

تلقیح باکتری‌ها به تیمارها: مقداری از کلنی (هر باکتری به‌صورت جداگانه) با لوپ برداشته و در شرایط استریل در محیط مایع نوترینت براس (۸۰ سی‌سی در ارلن) تلقیح شدند پس از ٤۸ ساعت، ۲ سی‌سی (در ۲ مرحله و هر بار ۲ سی‌سی) از ارلن‌ها برداشته و به خاک اسپری و کاملاً مخلوط شد تا باکتری‌ها در خاک به‌صوررت یکنواخت پخش شدند و ۱ هفته برای سازگاری باکتری‌ها در تیمارها در نظر گرفته شد. به همه تیمارها هر ۳ روز یک‌بار مقدار مشخصی آب داده شد (به‌جز خاک خشک) و همچنین هوادهی صورت گرفت (به‌جز خاک مرطوب). تعیین مقدار آب به‌کار برده شده برای گلدان‌ها برای تامین نیاز میکرواورگانیسم‌ها، معادل میزان ۷۰-٦۰ درصد ظرفیت نگهداری آب در خاک، در نظر گرفته شد. پس از اعمال تیمارها، به‌مدت ۱۰ روز برای سازگاری میکرواورگانیسم‌ها در نظر گرفته شد.

تعیین کل هیدروکربن‌های نفتی (TPH)[4]: مقدار ۲ گرم خاک آلوده از هر گلدان به‌صورت تصادفی و پس از کاملاً زیر و رو کردن خاک، برداشت، توزین و به آن ۱۰ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان اضافه گردید. مخلوط به‌شدت و برای مدت ۳۰ دقیقه تکان داده شده و سپس در دور ۳۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفوژ یخچالی قرار داده شد تا خاک آن رسوب کند. محلول رویی از خاک جدا شده و درون ظرف شیشه‌ای (دی‌کلرومتان باعث انحلال ظروف پلاستیکی می‌شود) که قبلاً وزن شده بود، ریخته شد. این مرحله ۲ بار تکرار شد. پس از ۲٤ ساعت که حلال دی‌کلرومتان در شرایط آزمایشگاهی کاملاً تبخیر شد، باقی‌مانده دوباره وزن شد که این وزن مقدار نفت موجود در خاک را مشخص می‌کرد

1- Plate Count
2- Nutrient Agar
3- Nutrient Broth
4- Total Petroleum Hydrocarbons

Archive of SID

www.SID.ir

(مارکوئز- روچا و همکاران، ۲۰۰۰). این عمل برای همه تیمارها و در ۱۳ زمان (هر ۲ هفته یک‌بار) انجام شد سپس کاهش میزان نفت در تیمارها مورد مقایسه قرار گرفت. آنالیزهای آماری با کمک نرم‌افزار SAS و در قالب آزمایش اسپیلیت پلات خرد شده در زمان[1] در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد و همچنین نمودارها با کمک نرم‌افزار Excel رسم شدند.

نتایج

نتایج سنجش خاک مورد آزمون نشان داد که رطوبت اولیه و ظرفیت نگهداری آب در خاک معادل ۲۲ و ۵/۸ درصد و pH و EC آن معادل ٦/٥٦ و ۵/۵۷ میلی‌زیمنس بر سانتی‌متر بود. برای سنجش و بررسی توان تجزیه هیدروکربن‌های نفتی در این پژوهش، لازم به ذکر است که برای تجزیه مواد نفتی توسط ریزاندام‌های بومی و غیربومی، شرایطی محیطی مانند رطوبت، دما و میزان آلاینده، بسیار مؤثر است. میزان اپتیمم آلودگی نفتی برای تجزیه توسط ریزاندام‌های بومی موجود در خاک ۱۰-۵ درصد وزن خشک خاک می‌باشد (تاپا و همکاران، ۲۰۱۲)، در صورتی‌که در این پژوهش خاک مورد مطالعه ۳۸ درصد آلودگی داشت و رنگ آن بسیار تیره بود. با این میزان آلودگی اولیه، بررسی چگونگی تأثیر ریزاندام‌های بومی موجود با بهبود شرایط محیطی موجود و یا اعمال انواع کارآمدتر برای کاهش و یا پالایش آن موردنظر قرار گرفت.

بررسی روش‌های تجزیه زیستی هیدروکربن‌های نفتی به‌کار برده شده در این پژوهش

روند طبیعی تجزیه زیستی: نتایج تجزیه نفت در تیمارهای ۱ و ۲ می‌تواند نشان‌دهنده اثر این روش بر روی تجزیه نفت در طی زمان می‌باشد. تیمار ۲ نسبت به تیمار ۱ کاهش بیش‌تری در مقدار نفت (آلودگی زیاد در خاک مورد مطالعه) داشت.

بهبود شرایط محیطی[2]: تیمارهای ۳ تا ۸ به‌منظور بهبود شرایط محیطی در کاهش هیدروکربن‌های نفتی موجود در خاک آلوده طراحی شدند. نتایج نشان داد، افزودن مواد مغذی در کاهش هیدروکربن‌های نفتی تأثیر معنی‌داری دارد. از بین مواد اضافه شده، خاک‌اره بیش‌ترین میزان کاهش در مقدار آلودگی نفتی نسبت به سایر مواد مغذی داشت.

1- Split Plate
2- Biostimulation

Archive of SID

www.SID.ir

ورود میکرواورگانیسم‌های غیربومی در تجزیه مواد نفتی[1]: تیمار ۹ برای بررسی تجزیه TPH با روش تجزیه زیستی ورود میکرواورگانیسم‌های کارآمد در تجزیه مواد نفتی، تعبیه شد. نتایج نشان داد تلقیح باکتری‌های *سودموناس پوتیدا*، *باسیلوس مگاتریوم* و *باسیلوس سابتیلیس* در تجزیه آلایندهای هیدروکربنی مفید بوده و تأثیر معنی‌داری در روند تجزیه داشته‌اند (داس و ماخرجی، ۲۰۰۶؛ میتال و سینگ، ۲۰۰۵).

ورود میکرواورگانیسم‌ها به همراه بهبود شرایط محیطی[2]: تیمارهای ۱۰ تا ۱۳ برای بررسی این مطلب بود که تلقیح باکتری‌های غیربومی و فراهم کردن شرایط بهینه برای رشد آن‌ها، ممکن بود در تجزیه کل آلاینده هیدروکربنی مؤثرتر باشد. تیمار ۱۲ بیش‌ترین درصد کاهش TPH را بعد از ۱۳ زمان در مقایسه با تیمارهای ۱۰، ۱۱، ۱۳ و سایر تیمارها نشان داد.

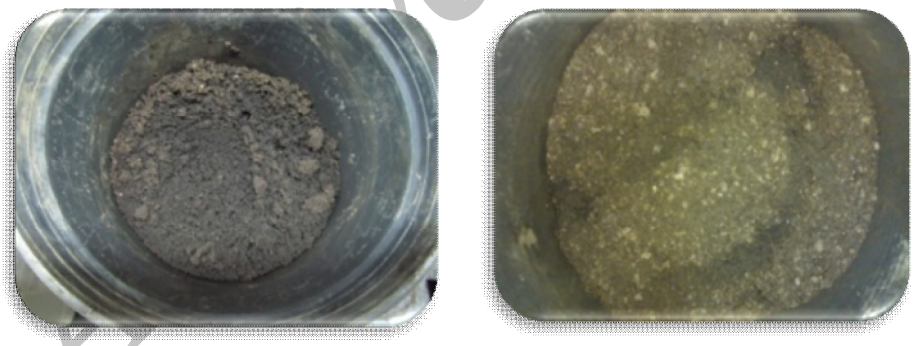
بررسی تغییرات ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک آلوده در طول زمان پالایش: در تیمار خاک خشک که هیچ‌گونه مواد مغذی و آب اضافه نشده بود و فقط هوادهی صورت می‌گرفت. این نمونه همچنین به این عنوان طراحی شد تا نقش اکسیژن را در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی بررسی شود. از آن‌جایی‌که تجزیه مواد نفتی در شرایط هوازی صورت می‌گیرد، در نتیجه باید اکسیژن برای فعالیت میکرواورگانیسم‌های تجزیه‌کننده فراهم شود (تاپا و همکاران، ۲۰۱۲). با هوادهی از طریق هم‌زدن می‌توان اکسیژن مورد نیاز برای تجزیه هیدروکربن‌های نفتی را فراهم کرد. در این تیمار بعد از ۱۳ زمان تقریباً ۱۸ درصد هیدروکربن‌های نفتی کاهش پیدا کردند. در اوایل آزمایش قابلیت نفوذ آب در تیمار خاک مرطوب (بدون مواد افزودنی، به همراه اضافه کردن آب) بسیار کم بود اما با گذشت زمان نفوذ آب در این تیمار به راحتی صورت گرفت. در نظر گرفتن این تیمار همچنین برای نشان دادن نقش رطوبت در تجزیه زیستی نفت (باعث کاهش ۳۱/۵ درصد کل هیدروکربن نفتی) بود. ریزاندام‌های موجود در خاک برای فعالیت خود نیاز به رطوبت دارند، در نتیجه در حضور رطوبت مناسب (۸۰-۲۵ درصد ظرفیت نگهداری آب در خاک) تعداد آن‌ها افزایش پیدا می‌کند که نقش مؤثری بر تجزیه نفت دارد (محسن‌زاده و همکاران، ۲۰۰۹؛ مینایی‌تهرانی و همکاران، ۲۰۰۶؛ تاپا و همکاران، ۲۰۱۲). در تیمار ۳ و سایر تیمارهایی که شامل NPK بود، آب به‌راحتی در خاک نفوذ می‌کرد. در این تیمارها در اوایل آزمایش رنگ خاک کاملاً تیره به‌نظر می‌رسید اما با گذشت زمان این تیرگی‌ها کاسته شد. البته این تغییر رنگ در همه تیمارها مشاهده شد (شکل ۱). در این تیمارها آب و هوادهی صورت گرفت تا

1- Bioaumentation
2- Bioaumentation-Biostimulation

Archive of SID

www.SID.ir

رطوبت، اکسیژن و مواد مغذی ریزاندام‌ها فراهم شود. کلوخگی در این تیمارها (به‌جز تیمارهای شامل کودهای شیمیایی به همراه خاک اره)، به مقدار کم مشاهده شد. همچنین در اواسط آزمایش در سطح و در زیر گلدان‌های دارای تیمارهای موردنظر، تجمعات کریستاله مانندی مشاهده شد که نشان‌دهنده تجمع نمک بود و انجام آزمایش این حقیقت را اثبات کرد. کودهای شیمیایی به‌کار گرفته شده در این آزمایش، باعث کاهش آلودگی شدند، اما این کاهش به نسبت بعضی از تیمارها مثل خاک‌اره و کود حیوانی چندان زیاد نبوده است. در تیمارهای شامل خاک‌اره اثری از کلوخگی مشاهده نشد و با زیرورو کردن، خاک به‌صورت کاملاً یکنواخت و نرم می‌شد. مواد آلی مثل خاک اره و کودهای حیوانی باعث بهبود ساختمان خاک می‌شوند (تاپا و همکاران، ۲۰۱۲؛ مینایی‌تهرانی و همکاران، ۲۰۰٦) در نتیجه به‌طور غیرمستقیم در تجزیه مواد نفتی مؤثر است. از طرفی ریزاندام می‌توانند از خاک‌اره به‌عنوان یک ماده مغذی استفاده کنند (جروه و همکاران، ۲۰۱۱) اما نفوذ آب نسبت به تیمارهای شامل کودهای شیمیایی به مقدار جزیی کم‌تر بود. در تیمارهای شامل باکتری به تنهایی، نفوذ آب به‌راحتی صورت گرفت، ولی کلوخگی در این تیمار مشاهده شد. در صورتی‌که در سایر تیمارهای باکتری به‌همراه کودهای شیمیایی و آلی تغییرات مشابه همان تیمارها بدون تلقیح باکتری بود.



(ب) (الف)

شکل ۱- تغییرات رنگ خاک آلوده نسبت به زمان (الف- در مراحل انتهایی و ب- در مراحل اولیه آزمایش).

نتایج تجزیه واریانس، تفاوت معنی‌داری در سطح ۱ درصد بین اثر تیمارهای مختلف و زمان بر روی مقدار کل هیدروکربن‌های اولیه نشان داد (جدول ۱).

Archive of SID

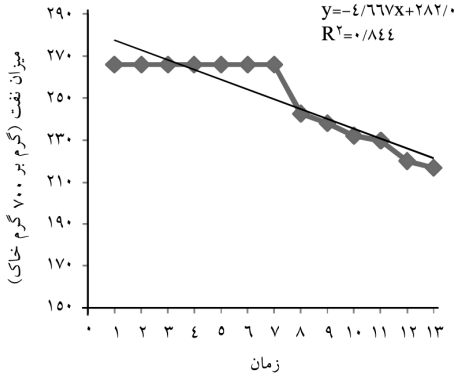
www.SID.ir

جدول ۱- تجزیه واریانس مربوط به مقدار نفت در تیمارهای مختلف با گذشت زمان.

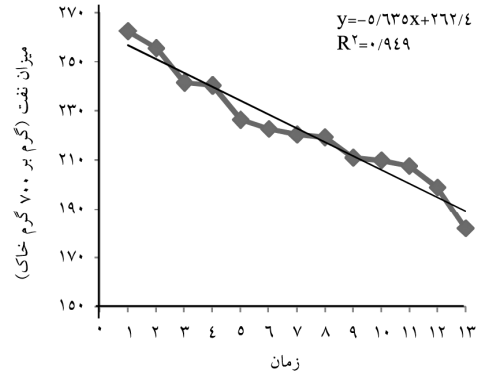
منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	مقدار F
تیمارها	۱۲	٤٨١٨٧/١٧٧	٤٠١٥/٥٩	٢٦/٧١**
زمان	۱۲	١٦٨٥٢٢/١٣	١٤٠٤٣٥١/٥١	٩٣/٤١**
تیمار × زمان	١٤٤	١٤٤٠٨/٠٢٣	١٠٠/٠٥	٦٧

** معنی‌دار بودن در سطح ۱ درصد.

همان‌طورکه در شکل ۲ مشاهده می‌شود، در طی زمان مقدار نفت در همه تیمارها کاهش یافته است با توجه به شکل ۳ و مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف بر تجزیه و درصد کاهش نفت نسبت به مقدار اولیه به روش LSD و در سطح ۵ درصد بیانگر تفاوت معنی‌دار بین برخی از تیمارها بود. در بعضی از تیمارهایی که شامل باکتری بودند از جمله تیمار باکتری + خاکاره (۱۲) و باکتری (۹)، درصد کاهش نفت به‌ترتیب، ۳۵ درصد و ۳٤ درصد بود که نسبت به بقیه، بیش‌ترین تأثیر را در تجزیه کل هیدروکربن نفتی داشته‌اند و کم‌ترین میزان کاهش نفت در تیمار خاک خشک با ۱۸ درصد کاهش مشاهده شد. نتایج نشان داد که تیمار شامل خاکاره (۳۲/۳ درصد) اختلاف معنی‌داری نسبت به تیمار باکتری + کود حیوانی (۳۲/٤ درصد) نداشت.

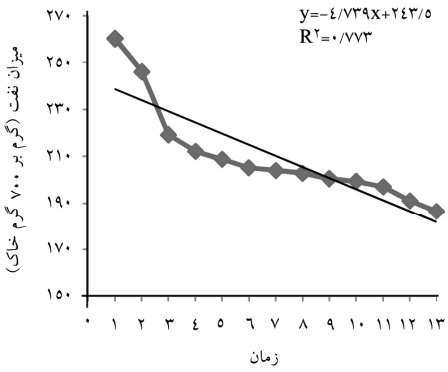


الف) روند کاهش نفت در تیمار خاک خشک

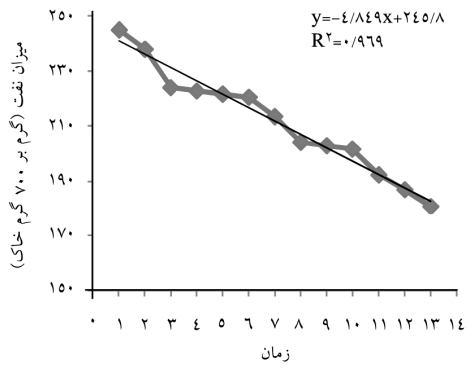


ب) روند کاهش نفت در تیمار خاک مرطوب

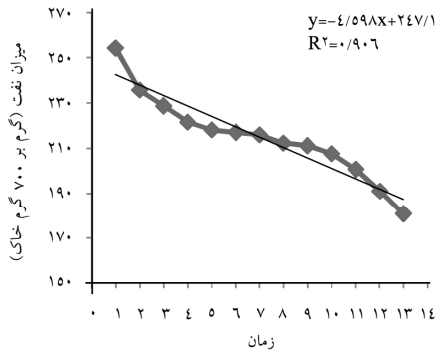
www.SID.ir



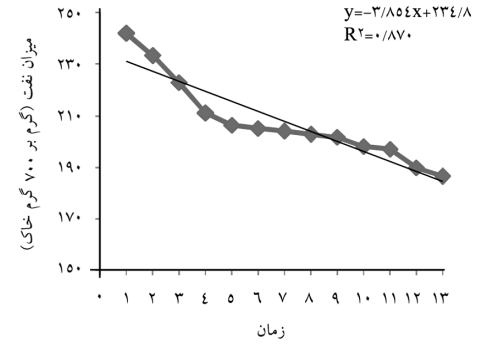
پ) روند کاهش نفت در تیمار NPK



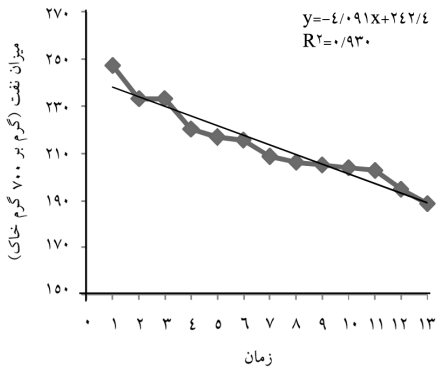
ت) روند کاهش نفت در تیمار کود حیوانی



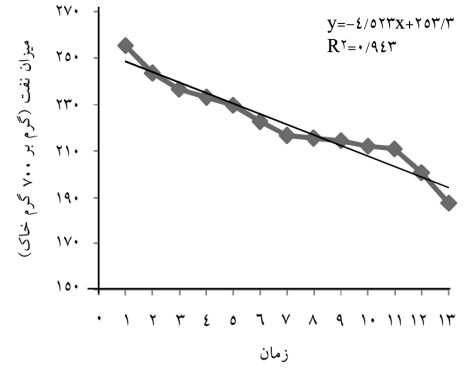
ث) روند کاهش نفت در تیمارخاک‌اره



ج) روند کاهش نفت در تیمار کود حیوانی+NPK

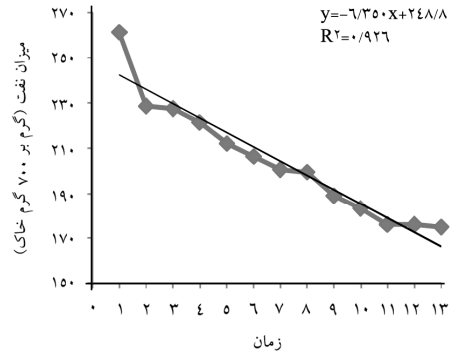


چ)روند کاهش نفت در تیمارخاک‌اره + NPK

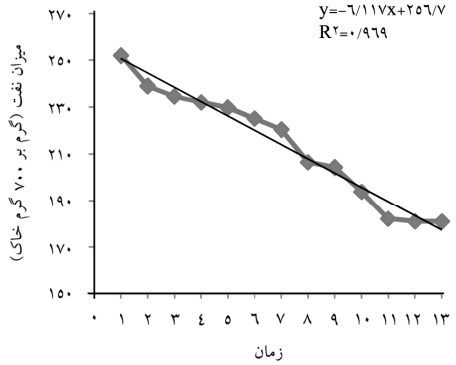


ح) روند کاهش نفت در تیمارخاک‌اره+ کود حیوانی + NPK

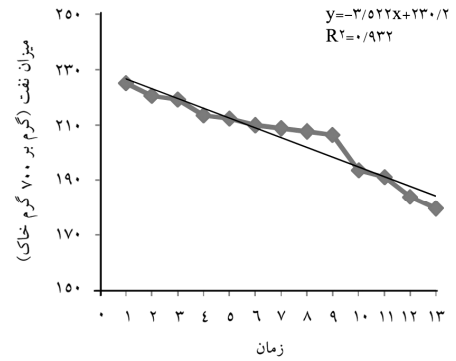
www.SID.ir



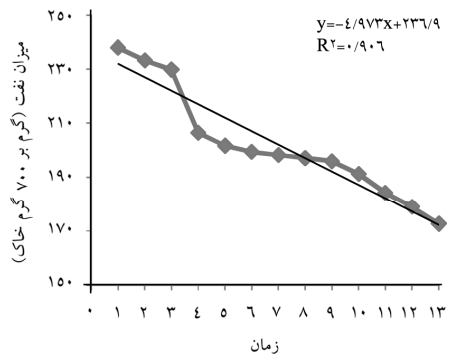
خ) روند کاهش نفت در تیمار باکتری



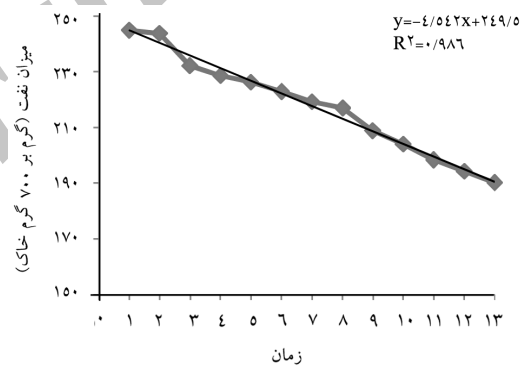
د) روند کاهش نفت در تیمار باکتری + NPK



ذ) روند کاهش نفت در تیمار کود حیوانی + باکتری



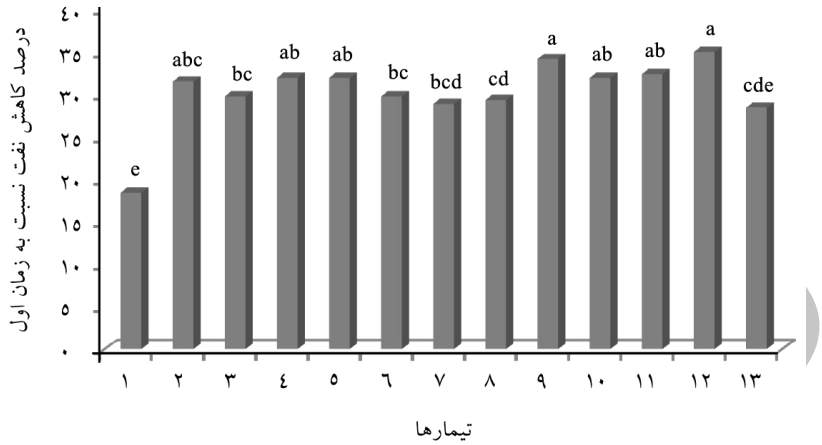
ر) روند کاهش نفت در تیمار باکتری + خاک‌اره



ز) روند کاهش نفت در تیمارباکتری+ کود حیوانی+ خاک‌اره + NPK

شکل ۲- روند کاهش نفت در طی ۱۳ زمان در همه تیمارها (الف- ز).

www.SID.ir



شکل ۳- مقایسه میانگین درصد کاهش نفت بعد از ۱۳ زمان نسبت به مقدار اولیه کل هیدروکربن نفتی در همه تیمار و گروه‌بندی تیمارها با روش LSD در سطح ۵ درصد.

در شکل ۲- الف، تا زمان ۷ تقریباً تغییری در میزان نفت در تیمار ۱ مشاهده نشد، ولی بعد از این زمان کاهش تدریجی در مقدار نفت مشاهده شد که نشان‌دهنده آن است که با هوادهی شرایط رشد برای بعضی از میکرواورگانیسم‌ها فراهم شده است و توانسته‌اند نفت را تجزیه کنند (ایرانمنش و همکاران، ۲۰۰۹). ولی در شکل ۲- ب، تیمار ۲ با این‌که هیچ ماده‌ای اضافه نشده بود و فقط آب‌دهی انجام می‌شد، از همان ابتدا کاهش تدریجی نفت دیده شد که سرعت بالا در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی، نشان‌دهنده توانایی بالای میکرواورگانیسم‌های بومی خاک می‌باشد که با فراهمی رطوبت مورد نیاز، تحریک شده و نفت را تجزیه کردند. این تیمار نسبت به تیمار خاک خشک تأثیر قابل‌توجهی در کاهش میزان آلودگی دربر داشت همچنین این تیمار (با ۳۱/۵ درصد کاهش) با تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌داری داشت. هوازدگی و تخریب توسط ریزاندام‌ها در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی از عوامل مهم به‌شمار می‌روند. وجود رطوبت، اکسیژن، نور سرعت هوازدگی را افزایش می‌دهد (مینایی‌تهرانی و همکاران، ۲۰۰٦؛ نیکودم، ۱۹۹۷).

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

بررسی اثر افزودن مواد مغذی اضافه شده به تیمارها

کودهای شیمیایی: کودهای شیمیایی به‌کار گرفته شده در این آزمایش، باعث کاهش آلودگی شدند، اما این کاهش به نسبت بعضی از تیمارهای شامل موادی مثل خاک‌اره و کود حیوانی، چندان زیاد نبوده است. برخی گزارش‌ها نیز بیانگر نبود تأثیر افزودنی‌های فسفاته و نیتراته در روند کاهش کل هیدروکربن‌های نفتی بوده‌اند (اسکلموا و همکاران، ۲۰۰۱). به‌طوری‌که ممکن است حتی اضافه کردن کودهای شیمیایی هیچ تأثیری در تجزیه مواد آلی نداشته باشد. همچنین نیتروژن معدنی، نمک نیترات و آمونیوم است که باعث افزایش غلظت نمک آب موجود در منافذ خاک، کم کردن پتانسیل اسمزی خاک و سرانجام مانع فعالیت میکرواورگانیسم‌ها شود (آسپری و همکاران، ۲۰۰۸). همچنین در این پژوهش EC خاک آلوده بالا بوده و استفاده از کودهای شیمیایی سبب شور شدن خاک شده و در نتیجه باعث کاهش فعالیت ریزموجودات بومی و غیربومی شده است.

خاک‌اره: تیمارهایی که به آن‌ها خاک‌اره اضافه شده بود (تیمارهای ۱۲ و ۵) عملکرد بیش‌تری را در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی داشتند هر چند که تیمار باکتری به همراه خاک‌اره بیش‌ترین کاهش را نفت را دارا بود اما تیمار خاک‌اره به تنهایی، نیز در روند تجزیه هیدروکربن‌های نفتی اثر چشم‌گیری داشت. خاک‌اره باعث تسهیل هوادهی، افزایش ظرفیت نگهداری آب در خاک، پوک کردن خاک (مانع کلوخگی) و حفظ رطوبت آب مورد نیاز میکرواورگانیسم‌های بومی و غیربومی خاک شده و در نتیجه تجزیه زیستی نفت را افزایش می‌دهد (جروه و همکاران، ۲۰۱۱؛ مینایی‌تهرانی و همکاران، ۲۰۰۶). از طرفی میکروارگانیسم‌ها با ترشح آنزیم، اسید و بیوسورفاکتانت، هیدروکربن‌های نفتی را تجزیه می‌کنند. بین فعالیت آنزیم‌های تولیدی در خاک با مقدار کربن آلی رابطه خطی برقرار است (جروه و همکاران، ۲۰۱۱). آلاینده‌های نفتی تغییراتی را در آنزیم‌های تجزیه‌کننده نشاسته ایجاد می‌کنند و در نتیجه تحت شرایط آلودگی، باعث کاهش سطح گلوکز و فعالیت آمیلاز در خاک می‌شوند (آچوبا، ۲۰۰۶). گلوکز یکی از عواملی است که در تجزیه مواد نفتی نقش مهمی دارد. گلوکز تولیدی، توسط میکروارگانیسم‌ها برای ایجاد انرژی لازم برای فعالیت‌های متابولیکی مختلف در جهت تجزیه کل هیدروکربن‌های نفتی، مصرف شده و سبب تقویت و پیشرفت تجزیه کل هیدروکربن‌های نفتی می‌شود. خاک‌اره باعث افزایش مقدار گلوکز مورد نیاز میکروارگانیسم‌ها می‌شود (جروه و همکاران، ۲۰۱۱) و در نتیجه با فراهمی گلوکز برای ریزموجودات، سرعت تجزیه هیدروکربن‌های نفتی افزایش

Archive of SID

www.SID.ir

می‌یابد. همچنین فعالیت آمیلاز به‌علت استفاده از خاک‌اره به‌عنوان یک عامل تجزیه زیستی افزایش می‌یابد. پس خاک‌اره می‌تواند به‌عنوان یک ماده برای تجزیه بهتر هیدروکربن‌های نفتی در خاک‌های آلوده، مورد استفاده قرار گیرد.

کود حیوانی: اضافه کردن کودهای حیوانی به‌دلیل بهبود خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک از جمله، بهبود ساختمان خاک، تسهیل ترابری اکسیژن، فراهم کردن انرژی برای میکروارگانیسم‌ها و در نتیجه تشدید فعالیت میکروبی بسیار مؤثر می‌باشد. در تیمارهایی که از کود حیوانی استفاده شد، پدیده گلوله شدن خاک کم‌تر به چشم خورد زیرا ماهیت و شکل فیزیکی کود حیوانی تا اندازه‌ای شبیه به تراشه چوب است. بنابراین حضور آن توانسته بود سبب پوک‌شدن خاک و مانع از گلوله شدن خاک مرطوب شود (مینایی‌تهرانی و همکاران، ۲۰۰٦).

نتیجه‌گیری کلی

روش‌های زیستی برای از حذف آلودگی‌های نفتی موجود در اکوسیستم، نسبت به سایر روش‌ها برتری دارند. از آن‌جایی‌که خاک اولیه ۳۸ درصد آلودگی داشت و به‌علت این‌که مدت زمان طولانی از آلوده شدن آن می‌گذشت، میکرواورگانیسم‌های موجود در آن با محیط سازگار شده بودند، ولی به‌دلیل افزایش نسبت C/N با ورود آلاینده‌های هیدروکربنی به خاک، فراهم نبودن شرایط بهینه برای رشد ریزموجودات، آن‌ها، قادر به تجزیه هیدروکربن‌های نفتی نمی‌باشند. پژوهشگران بیان کردند که اضافه کردن مواد آلی، مصرف آلاینده‌های هیدروکربنی را توسط میکرواورگانیسم‌ها افزایش می‌دهد (آیبکو و همکاران، ۲۰۰٦). پس مواد آلی مثل خاک‌اره و کودهای حیوانی سبب بهبود ساختمان خاک شده و در نهایت در تامین رطوبت، اکسیژن و مواد مغذی نقش مهمی دارد (تاپا و همکاران، ۲۰۱۲؛ مینایی‌تهرانی و همکاران، ۲۰۰٦). به همین دلیل نقش بسیار مؤثری در تجزیه کل هیدروکربن‌های نفتی ایفا می‌کند. همچنین در مواردی که غلظت آلاینده‌های نفتی خیلی‌زیاد و سمی باشند، ممکن است میکرواورگانیسم‌های بومی فعالیت زیادی برای تجزیه مواد نفتی نداشته باشند. به همین دلیل، برای تجزیه زیستی بهتر کل هیدروکربن‌های نفتی استفاده از باکتری‌های غیربومی کارا به همراه اضافه کردن مواد مغذی و بهبود شرایط محیطی ضروری می‌باشد .پس در صورت این‌که میکرواورگانیسم‌های بومی فعال باشند با بهبود شرایط محیطی از جمله هوادهی، اضافه کردن مواد مغذی، رطوبت و با در نظر گرفتن مقدار اولیه pH و EC، می‌توان تجزیه هیدروکربن‌های نفتی را سرعت بخشید و اگر فعالیت ریزاندام‌های بومی کم

Archive of SID

www.SID.ir

باشد، مخلوط کردن موادی مثل خاکاره، کود حیوانی به همراه تلقیح ریزاندام‌های غیربومی از جمله باکتری‌های فعال نفت‌خوار روند کاهش آلاینده‌های نفتی، را افزایش خواهد داد و به این صورت اضافه کردن مواد آلی تجزیه هیدروکربن‌ها را توسط میکرواورگانیسم‌های بومی و غیربومی افزایش می‌دهد.

سپاسگزاری

از آقایان مهندس قریشی، رئیس حفاظت محیط زیست پالایشگاه تهران و دکتر پهلوان، استاد گروه مهندسی آب دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، به‌خاطر همکاری و راهنمایی در این پروژه سپاسگزاریم.

منابع

1.Achuba, F.I. 2006. The effect of sub lethal concentrations of crude oil on the growth and metabolism of cowpea (*vibnaunguiculata*) seedlings. Environmentalist, 26: 17-20.

2.Aspray, Th., Gluszek, A., and Carvalho, D. 2008. Effect of nitrogen amendment on respiration and respiratory quotient (RQ) in three hydrocarbon contaminated soils of different type. Chemosphere. 72: 947-951.

3.Das, K., and Mukherjee, A. 2006. Crude petroleum-oil biodegradation eYciency of Bacillus subtilis and Pseudomonas aeruginosa strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. Biortechnol. 98: 1339-1345.

4.Ebrahimi, S. 2009. Review of place-time behavior of some hydrocarbon contaminants and chemical solvents in soils porous media. Ph.D. Thesis, University of Tarbiat Modares, Department of Agricultural Engineering, 150p.

5.Ebrahimi, S., Ladan, Sh., and Malekoti, M.J. 2009. Feasibility of Different Petroleum Pollutants Remediation in soil and an algorithm based on the type of pollutants. 11th Soil Science Congress of Iran, Gorgan, Iran, Pp: 21-23.

6.Ehteshami, M., and Ahmadinia, R. 2007. Modeling spills of petroleum hydrocarbon on soil groundwater resources. J. Environ. Sci. Technol. 29:47-57.

7.Ibekwe, V.I., Ubochi, K.C., and Ezeji, E.U. 2006. Effect of organic nutrient on microbial utilization of hydrocarbon on crude oil contamination soil. Afric. J. Biotechnol. 5: 983-986.

8.Iranmanesh, A., Amini, J., Ansari, M., and Faezighasemi, M. 2009. Biological soil conditioning to purpose elimination pollutant of gasoline by microorganisms. The twelfth Conference on Environmental Health of Iran, University Medical Sciences of Shahid Beheshti.

Archive of SID

www.SID.ir

9.Jeroh, E., Tonukari, N.J., and Anigboro, A. 2011. Glucose level and amylase activity in crude bioremediated with poultry manure and sawdust. Asi. J. Biol. Sci. 4: 4. 369-374.
10.Labud, V., Garcia, C., and Hernandez, T. 2007. Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. Chemosphere. 66: 1863-1871.
11.Marquez-Rocha, F.J., Hernandez-Rodriguez, V.Z., and Teresa Lamela, M.A. 2000. Biodegradation of diesel oil in soil by microbial consortium. Water, Air. Soil Pollut. 128: 313-320.
12.Minai-Tehrani, D., Herfatmanesh, A., and Azari-Dehkordi, F. 2006. Biodegradation of Heavy Crude Oil in Soil in a Pilot Scale. Environmental Sciences, 10: 71-81.
13.Mittal, A., and Singh, P. 2009. Isolation of hydrocarbon degrading bacteria from soils contaminated with crude oil spills. Ind. J. Exp. Boil. 47: 760-765.
14.Mohsnzadeh, F., Nasseri, S., Mesdaghinia, A., Nabizadeh, R., and Zafari, D. 2009. Study on the possibility of application of *Amaranthusretroflexus* L. and its rhizospheral fungi for bioremediation of petroleum polluted soils. The twelfth Conference on Environmental Health of Iran, University Medical Sciences of Shahid Beheshti, Tehran, Iran, Pp: 442-451.
15.Mokhtarian, N., Talaie, A.R., Jaafarzadeh, N., Talaie, M.R., and Beheshti, M. 2010. Producing Biosurfactants from Purified Microorganisms Obtained from Oil-contaminated Soil. J. Water and Wastewater. 3: 20-27.
16.Nicodem, D.E., Fernandes, M.C., Guedes, C.L.B., and Correa, R.J. 1997. Photochemical processes and the environmental impact of petroleum spills. Biogeochem. 39: 121-138.
17.Ruberto, L., Susana, C.V., Walter, P., and Mac, C. 2003. Eectiveness of the natural bacterial Flora, biostimulation and bioaugmentation on the bioremediation of hydrocarbon contaminated Antarctic Soil. Ibiod. 52: 115-125.
18.Seklemova, E., Pavlova, A., and Kovacheva, K. 2001. Biostimulation-based bioremediation of diesel fuel: field demonstration. Biodegradation. 12: 311-316.
19.Seyed Alikhani, S., Shorafa, M., and Asgharzade, A. 2009. Treatments efficiency of bacterial production internal on biological treated of hydrocarbon contaminated soil. National energy congress. Tehran, Iran, 7: E05104.
20.Thapa, B., Kumar, A., and Ghimire, A. 2012. A review on biormediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil. J. Nepjol. 8: 164-170.
21.Wolicka, D., Suszek, A., Borkowski, A., and Bielecka, A. 2009. Application of aerobic microorganisms in bioremediation in situ of soil contaminated by petroleum products. Biortech. 100: 3221-3227.

Archive of SID

www.SID.ir

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

J. of Water and Soil Conservation, Vol. 20(4), 2013
http://jwsc.gau.ac.ir

Optimization of petroleum hydrocarbon biodegradation by indigenous and non indigenous microorganisms

***M. Doustaky[1], S. Ebrahimi[2], S.A.R. Movahedi Naeini[3] and M. Olamaei[2]**

[1]M.Sc. Student, Dept. of Soil Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [2]Assistant Prof., Dept. of Soil Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [3]Associate Prof., Dept. of Soil Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Received: 05/27/2012; Accepted: 12/10/2012

Abstract

Obtaining oil per day in Iran often caused its distribution and emission to the environment in various stages of operation and transportation. Efficient methods to clean up soil pollution, but environmentally friendly and suitable is inevitable. The aim of this study was optimization of total petroleum hydrocarbons (TPH) biodegradation by indigenous and non indigenous microorganisms in different applied remediation methods. Then, the best performance and trend of hydrocarbon contamination decomposition in time series were determined. Hence Ray's refinery contaminated soil with 38% TPH was used and thirteen treatments including fertilizers, animal manure, sawdust and inoculation of bacteria's (*Bacillus subtilis*, *Bacillusmegaterium*, *Pseudomonasputida*) were applied in soil thirteen times (every 2 weeks). The results showed that, treatments of bacteria + sawdust and bacteria had the greatest impact respectively with 35% and 34% decrease, of oil pollution of this soil and treatment of dry soil (without any additives except aeration) with a 20% reduction, had less effective in the amount of oil, than other treatments. The results indicated that, by active indigenous microorganisms and improving environmental conditions including aeration, additional nutrients and moisture, decomposition rate of petroleum can be increased. If native microorganism activity has low level, mixing sawdust, animal manure with inoculated non-native microorganisms including oil-eating active bacteria, will increase the process of reducing petroleum pollution.

Keywords: Bacteria, Cleanup, Microorganisms, Oil contaminated soil, Petroleum

* Corresponding Author; Email: m.doustaky@gmail.com

Archive of SID

www.SID.ir