نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۶، شماره ۴، مهر – آبان ۱۳۹۱، ص. ۸۴۱-۸۳۲

Journal of Water and Soil
Vol. 26, No.4, Sept.-Oct. 2012, p. 832-841

بررسی نقش قارچ میکوریزا و باکتریهای تجزیه‌گر در افزایش گیاه‌پالایی ترکیبات نفتی در خاکهای آلوده به نفت خام

وحید سروی مغانلو[۱*]- مصطفی چرم[۲]- مرجان فلاح[۳]- حسین معتمدی[٤]

تاریخ دریافت:۸۹/۱۱/۲
تاریخ پذیرش:۹۱/۲/۱۰

چکیده

بخاطر کستردگی توزیع، سمیت و سرطانزایی هیدروکربن‌های جزء آلاینده‌های خطرناک محسوب می‌شوند و حذف این آلاینده‌ها از خاک یک چالش بزرگ محسوب می‌شود. استفاده از گیاهان و میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده ترکیبات نفتی بهترین تکنولوژی برای حذف این آلاینده‌ها از مکانهای آلوده محسوب می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر قارچ میکوریزا و باکتریهای تجزیه‌گر در افزایش گیاه پالایی ترکیبات نفتی بود. برای این منظور دو خاک الوده با سطح آلودگی ۱ و ۲ درصد آلوده به نفت خام آماده گردید و چهار تیمار گیاه شبدر (T_1)، گیاه شبدر همراه با مایه‌زنی قارچ میکوریز (T_2)، گیاه شبدر همراه با مایه‌زنی باکتری‌های تجزیه‌گر (T_3) و گیاه همراه با مایه‌زنی قارچ میکوریز و باکتری‌های تجزیه‌گر نفت (T_4) برای فرایند زیست پالایی خاک آلوده بکار گرفته شد. نتایج مطالعات نشان داد که با افزایش سطح آلودگی میزان ریشه و اندامهای هوایی کاهش می‌یابد. و درصد کلینیزاسیون در تیمارهای دریافت کننده قارچ میکوریزا کاهش معنی داری نداشت. با افزایش میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی میزان تجزیه ترکیبات نفتی در مقایسه با تیمار کشت گیاه به تنهایی در هر دو سطح آلودگی افزایش می‌یابد. بیشترین میزان تجزیه با مقدار ۸۵ درصد در تیمار دریافت کننده قارچ میکوریزا و باکتریهای تجزیه‌گر در سطح آلودگی ۲ درصد مشاهده شد. نتایج GC نیز نشان دهنده کاهش ۸۰-۴۰ درصدی نرمال آلکان‌ها و ایزوپروپانوئیدها همچون پریستان و فیتان در تمامی تیمارهای دریافت کننده میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده ترکیبات نفتی بود.

واژه های کلیدی: باکتریهای تجزیه‌گر، قارچ میکوریزا، نرمال آلکان‌ها، ایزوپروپانوئیدها

مقدمه

رشد روز افزون فعالیت‌های صنعتی از یک سو و رعایت نکردن الزامات زیست محیطی از سوی دیگر سبب شده است تا در چند دهه گذشته مقادیر زیادی از آلاینده‌های هیدروکربنی به واسطه عواملی مانند دفع نادرست فاضلابها و ضایعات مراکز صنعتی، پخش آلاینده از مخازن نفتی زیر زمینی و ایستگاه‌های سوخت گیری، تصادف تانکرها و نفتکش‌ها و غیره، وارد محیط زیست شوند (۹). وجود هیدروکربنهای نفتی در خاک می‌تواند سبب بروز سمیت برای انسان‌ها و سایر موجودات زنده شده و موجبات آلودگی منابع آب، ایجاد سمیت و بیماری برای انسان و سایر موجودات زنده را به دنبال دارد، باید به نحوی از محیط زیست حذف گردند (۱۲). فرایندهای بیولوژیک ناشی از مواد آلوده کننده موجب تقلیل در ذخایر عناصر غذایی و کاهش ظرفیت نگهداری آب در خاک می‌شود. نکته مهم که بایستی به آن اشاره کرد، تغذیه گیاه بطور کامل بستگی به فعالیت متابولیکی موجودات زندهٔ ذره‌بینی خاک دارد. بنابراین تغییرات در جامعه خاکزیان اثر مستقیم و غیر مستقیم بر سلامت و بقاء گیاهان و بالطبع آن جوامع بشری دارد (۱). در ضمن باکتری‌ها و سایر موجودات زندهٔ ذره-بینی خاک با ذخیره عناصر سنگین و ترکیبات سمی دیگر از تجمع بالای آن در گیاه و ورود آنها به سیستم بدن انسانی از مضرات ناشی آز آنها جلوگیری می‌کنند حال با کاهش شمار این موجودات زندهٔ ذره-بینی میزان تجمع عناصر سنگین و سمی در گیاه افزایش یافته و این می‌تواند تهدیدی برای زندگی بشر باشد (۱۴). روشهای متنوع شیمیایی، فیزیکی و بیولوژیکی برای حذف این آلاینده‌ها از محیط وجود دارد. درحال حاضر بهترین روش برای حذف آلودگی‌های نفتی

۱ و ۲- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز
(*-نویسنده مسئول: Email: vsarvi@gmail.com)
۳- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه محیط زیست، واحد علوم تحقیقات اهواز
۴- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه شهید چمران اهواز

Archive of SID
www.SID.ir

زیست‌پالایی می‌باشد، عامل کلیدی در زیست پالایی موجودات زندهٔ ذره‌بینی و باکتری‌ها که قادر به رشد وحیات با حداقل شرایط می‌باشد، است (۱۱). موجودات زندهٔ ذره‌بینی به عنوان ابزار مناسب برای تخریب آلاینده ها بوده، زیرا که آنها آنزیم‌هایی ترشح می‌کنند که به آنها اجازه می‌دهد که از آلاینده‌ها به عنوان منبع غذایی استفاده کنند از طرف دیگر نیز آنها بخاطر اندازه کوچک و سطح ویژه بالا براحتی با این آلاینده‌ها تماس پیدا می‌کنند. زیست پالایی می‌تواند بر حسب مورد، به دو صورت زیر انجام شود : ۱-زیست پالایی درجا: یعنی اصلاح آلودگی آب و خاک درمحیطی که شناسایی کرده‌ایم که شامل: تحریک بیولوژیکی، تلقیح بیولوژیکی. ۲-زیست پالایی خارج ازمحل: شامل انتقال آب یا خاک آلوده به محلی دیگر و سپس اصلاح آن است. که شامل کمپوست کردن، آیش و راکتورهای بالای زمین می‌باشد (۱۱). اکثر محققان اعتقاد دارند که زیست‌پالایی درجا بهترین روش است. بلک بورن (۴) نیز گزارش داد که روش زیست پالایی در جا یک روش با تکنولوژی دقیق و بزرگ مقیاس بوده که می‌تواند به عنوان یک تیمار اصلاحی در آینده ضرورت آن احساس شود و مزیت بزرگ آن کارائی نامحدود آن می‌باشد.

قارچ میکوریزا به عنوان قارچ همزیست گیاهان خانواده لگوم نقش مهمی را در جذب آب، فسفر و دیگر عناصر غذایی توسط گیاه ایفا می‌کند تحقیقات اخیر نشان دهنده نقش قارچ میکوریزا در گیاه پالایی به واسطه بهبود و تسریع رشد گیاه در خاکهای آلوده و افزایش نسبت تجزیه آلاینده‌ها است (۱۰). بنابراین هدف از این تحقیق بررسی نقش قارچ میکوریزا و باکتریهای تجزیه‌گر در افزایش زیست-پالایی آلاینده‌های نفتی در خاکهای آلوده به نفت اهواز می‌باشد.

مواد و روش ها

جهت انجام این پژوهش؛ خاک از لایه بالایی (عمق cm ۳۰-۰) از نزدیک‌ترین زمین‌های زراعی با خاک غیر آلوده به چاه‌های نفت مارون اهواز جمع آوری شد. خاک با مقادیر ۱و ۲ درصد وزنی از نفت خام که از نزدیکترین چاه به منطقه نمونه برداری شده بود، بطور مصنوعی آلوده شد. برای این منظور نفت خام با نسبت ۵:۱ در کلروفرم حل گردید و بر روی خاک با رطوبت ۱۰ درصد وزنی در روی ظروف شیشه‌ای مسطح اسپری گردید و برای توزیع یکنواخت و جذب سطحی آلاینده‌ها نمونه‌ها به مدت دو هفته در دمای آزمایشگاه نگهداری شدند و طی این مدت خاک‌ها در حد رطوبت ظرفیت زراعی آبیاری و کاملا زیرورو و مخلوط شدند.

برای زیست بهسازی خاک‌های آلوده از چهار تیمار بهره‌گیری شد که شامل: ۱-کشت گیاه شبدر (T_1) ۲-کشت گیاه شبدر همراه با مایه‌زنی قارچ میکوریز (T_2) ۳-کشت گیاه شبدر همراه با مایه‌زنی باکتری‌های تجزیه‌گر (T_3) ۴-کشت گیاه همراه با مایه‌زنی قارچ میکوریز و باکتری‌های تجزیه‌گر نفت (T_4) بودند.

در تیمارهای مایه‌زنی شده با باکتری‌های تجزیه‌گر نفت، باکتری-های تجزیه‌گر دو هفته پیش از کاشت گیاه به نمونه خاک‌های آلوده افزوده شد. در این پروژه از باکتریهای تجزیه‌گر بومی سودوموناس و مورکسلا که از خاک‌های مناطق آلوده جداسازی شده بودند، بهره-گیری گردید. بدین منظور ۵گرم از نمونه خاک با ۴۵ میلی‌لیتر از محیط کشت بوشنل هاس (سولفات منیزیم ۰/۲گرم بر لیتر، کلرید کلسیم ۰/۲ گرم بر لیتر، منوفسفات پتاسیم ۱ گرم بر لیتر، فسفات دی آمونیوم ۱ گرم بر لیتر، نیترات پتاسیم ۱ گرم بر لیتر، کلرید فریک ۰/۵ گرم بر لیتر، ۲ درصد وزنی کلرید سدیم با pH=۷/۲) مخلوط گردید وبمدت۳۰ دقیقه شیک شد (رقت$^{-۱}$۱۰) سپس رقت$^{-۳}$ ۱۰ از سوسپانسیون$^{-۱}$۱۰ تهیه شد، برای جداسازی باکتریهای تجزیه‌گر ۱۵ میلی‌لیتر از این رقت را در ارلن ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و ۰/۴ میلی لیتر از نفت خام استریل شده به آن اضافه شد و بمدت دو هفته در دمای۲۸°C در حال شیک مداوم انکوبه شد. پس از این دوره، نمونه را تا رقت ۵-۱۰رقیق کرده و از سه رقت آخری ۰/۱ میلی‌لیتر را به پتری دیش انتقال داده و ۲۰ میلی‌لیتر آگار مغذی غنی سازی شده با نفت خام به آن اضافه شد و بمدت ۴۸ ساعت در دمای۲۸°C انکوبه شد. بعد از این دوره کلونی‌های مجزا از لحاظ شکل و ریخت ظاهری برای خالص سازی به روش کشت چهارمنطقه‌ای بر روی محیط کشت جداگانه کشت داده و بمدت ۴۸ ساعت انکوبه می‌کنیم. بعد از خالص سازی از تستهای افتراقی برای شناسایی گونه باکتریهای تجزیه گر استفاده گردید (۲). باکتریهای شناسایی شده در محیط کشت مایع TSB به مدت یک هفته و دمای ۲۵°C تکثیر داده شدند. سپس ۱۰ میلی‌لیتر از این محیط با ۰/۵ =OD (میزان نور عبوری اندازه‌گیری شده با اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر) به ازای هرکیلوگرم خاک بر روی خاک آلوده اضافه گردید. و به همراه سایر نمونه خاکها در شرایط مشابه در گلخانه قرار داده شدند. پس از دو هفته در هر گلدان آزمایش که دارای ۵ کیلوگرم خاک بود، ۱۰ عدد بذر شبدر کاشته شد. در تیمارهای دارای قارچ میکوریزا (گروه *Arbescolar-vezicolar* جنس *Glomus* گونه *intraradices*) ۲۰گرم ازمایه آن در عمق ۳ سانتیمتری از سطح خاک به صورت یک لایه گذاشته شد. یک نمونه شاهد بدون هیچ تیمار با سطح آلودگی ۱/۵ درصد آماده شد ودر تمام مراحل آزمایش در شرایط مشابه با سایر نمونه‌ها نگهداری شد..

پس از پایان هشت هفته اندام‌های هوایی (ساقه و برگ) هر گلدان از قسمت طوقه جداشده و وزن تر آنها محاسبه گردید و برای جداسازی ریشه‌ها از خاک روش الک مرطوب استفاده شد. به اینصورت که خاک هر گلدان به همراه ریشه‌های موجود در آن خارج شده و درون الک درون ظرف آب تا جدا شدن کامل ذرات خاک تکان داده شد و سپس وزن آن محاسبه گردید. برای تعیین درصد

Archive of SID

www.SID.ir

کلینیزاسیون ریشه نیز از روش روشن سازی و رنگ‌امیزی استفاده گردید (۳).

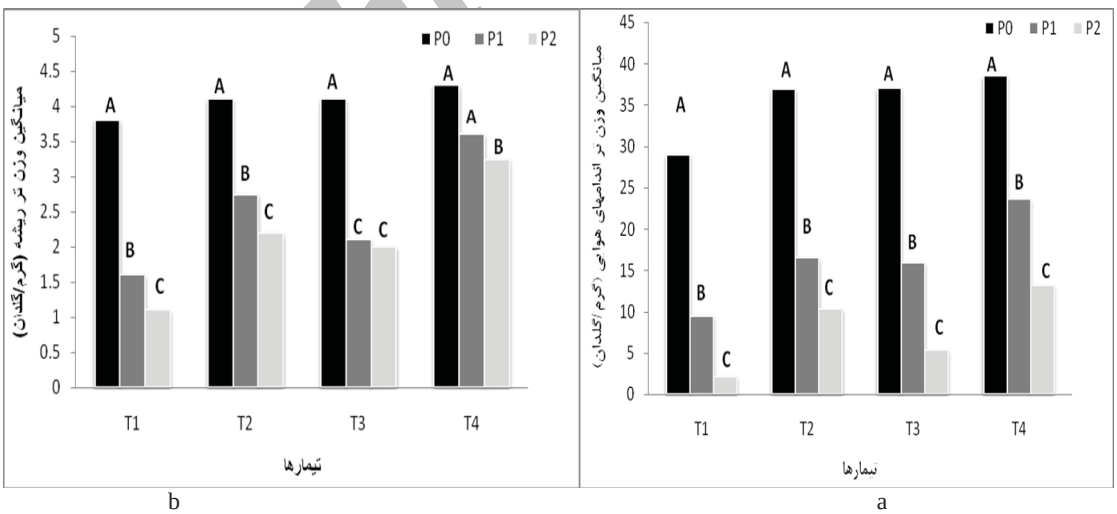
به منظور تعیین غلظت کل ترکیبات نفتی در خاک از روش عصاره‌گیری به روش سوکسیله با نسبت مساوی ان هگزان و دی کلرومتان (روش شماره ۸۱۰۰ سازمان حفاظت محیط زیست امریکا) استفاده شد (۵). و پس از آسفالتن‌گیری در مقادیر میکرولیتری به دستگاه کروماتوگرافی تزریق شد. دستگاه کروماتوگرافی مورد استفاده در این تحقیق ساخت شرکت vinci TEChnologies مدل ۲۰۱۰ بوده که شناسایی پیکها توسط آشکارگر FID انجام گرفته است. در این دستگاه ستون موئینه‌ای به طول ۲۵ متر تعبیه شده است. دمای اولیه ۵۰ درجه سانتی گراد و دمای نهایی آن ۳۲۰ درجه سانتی‌گراد بوده که با افزایش دما در آن به ازای هر دقیقه ۵ درجه سانتی‌گراد تنظیم شده است. گاز حامل هلیوم بوده و از هوای فشرده و گاز هیدروژن جهت شعله آشکارگر(FID) استفاده شده است (۷).

برای تجزیه آماری داده‌ها نیز از نرم‌افزار SPSS و آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه‌ای کاملا تصادفی و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن استفاده شد.

نتایج و بحث

بررسی وزن اندام هوایی نشان می‌دهد که با افزایش سطح آلودگی وزن اندام هوایی کاهش می‌یابد، و میان سطح آلودگی ۱و۲ درصد با تیمار شاهد تفاوت معنی داری در سطح ۵ درصد دیده شد، همچنین میان عملکرد هر چهار تیمار در دوسطح آلودگی ۱و ۲ درصد نیز تفاوت معنی داری در سطح ۵ درصد دیده شد (شکل۱a). در بین تیمارها نیز تیمار با مایه‌زنی قارچ میکوریزا و باکتری‌های تجزیه‌گر و تیمار با مایه زنی قارچ میکوریزا بیشترین عملکرد دیده شد، در واقع قارچ میکوریزا نقش خود را در افزایش عملکرد به واسطه افزایش جذب فسفر به دلیل توسعه ریشه و اثرات سینرژیسم بین باکتری‌های حل کننده فسفات با قارچ میکوریزا و افزایش تثبیت نیتروژن به دلیل اثر سینرژیسمی بین قارچهای میکوریزی VAM و باکتری‌های ریزوبیومی در تثبیت ازت و افزایش گرهکهای تثبیت کننده ازت ریشه‌ای دانست (۱۵). باکتری‌های تجزیه‌گر نیز با تجزیه ترکیبات آلاینده از میزان سمیت آنها برای رشد و جوانه‌زنی گیاه را تقلیل می‌دهد. به گونه‌ای که در تیمارهایی که کاهش قابل ملاحظه آلاینده‌ها صورت گرفته، میزان رشد و عملکرد گیاه بالا می‌باشد. بررسی وزن ریشه گیاه نیز نشان داد که در تیمارهای دریافت کننده مایه زنی قارچ میکوریزا بیشترین راندمان را داشتند و با افزایش سطح آلودگی وزن ریشه کاهش می‌یابد، و بین عملکرد هر چهار تیمار در هر دو سطح آلودگی تفاوت معنی داری در سطح ۵ درصد دیده شد (شکل۱b).

با توجه به اینکه در تیمارهای کشت گیاه با تلقیح باکتری و تیمار کشت گیاه درصد کلینیزاسیون ریشه تقریباً صفر بود به همین دلیل در (شکل ۲) درصد کلینیزاسیون تیمارهای کشت گیاه با تلقیح قارچ میکوریزا و کشت گیاه با تلقیح قارچ میکوریزا و باکتری‌های تجزیه‌گر نشان داده شده است.



b a

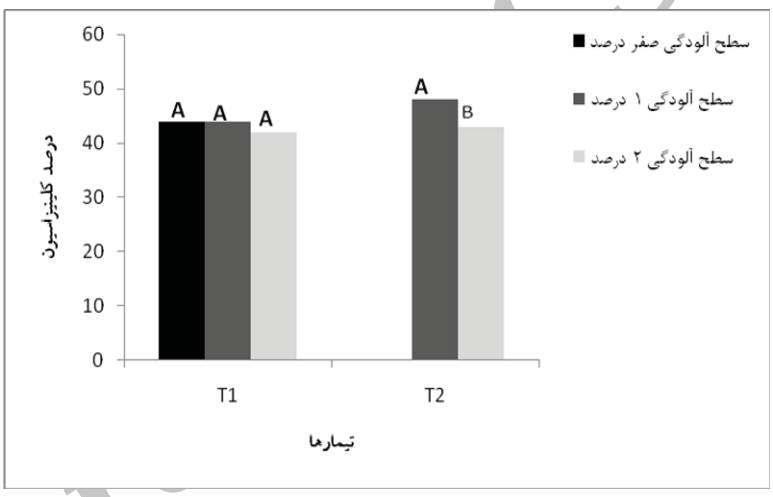
شکل ۱- میانگین وزن اندامهای هوایی و ریشه در T۱:تیمار کشت شبدر T۲:کشت شبدر با مایه زنی قارچ میکوریزا T۳:کشت شبدر با مایه زنی باکتری‌های تجزیه‌گر T٤:کشت شبدر با مایه زنی قارچ میکوریزا و باکتری‌های تجزیه‌گر در سطوح مختلف آلودگی

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج نشان می‌دهد، که درصد کلینیزاسیون در تیمار کشت گیاه با تلقیح قارچ میکوریزا در هر سه خاک شامل دو خاک آلوده با سطح آلودگی ۱و ۲ درصد و همچنین در خاک غیر آلوده تقریباً برابر بوده و اختلاف معنی داری بین این سه تیمار در سطح ۵ درصد وجود ندارد. در حالی‌که در بین تیمار کشت گیاه با تلقیح قارچ میکوریزا و باکتری-های تجزیه‌گر در دو سطح آلودگی تفاوت معنی داری در سطح ۵ درصد مشاهده می‌شود، همچنین مقدار درصد کلینیزاسیون در این تیمار در هر دو سطح آلودگی نسبت به تیمار تلقیح قارچ میکوریزا بالا بوده و تفاوت معنی داری بین این تیمارها در سطح ۵ درصد وجود دارد. نتایج حاصله را چنین می‌توان توجیه کرد، که در تیمار تلقیح قارچ میکوریزا با باکتری‌های تجزیه‌گر مصرف کننده عناصر غذایی از جمله فسفر به دلیل تلقیح باکتری‌های تجزیه‌گر افزایش می‌یابد و با توجه به اینکه موجودات زندهٔ ذره‌بینی دارای سطح ویژه بالا و Km (کمترین غلظت که میکروارگانیسم قادر به جذب و استفاده از یک ترکیب می باشد.) پایین برای جذب عناصر غذایی هستند، در اینصورت میزان فسفر قابل دسترس برای گیاه کاهش یافته و همین امر با افزایش توسعه و گسترش ریشه به واسطه افزایش درصد کلینیزاسیون ناشی از طبیعت قارچ میکوریزا که نقش تأمین عناصر غذایی مورد نیاز گیاه را بر عهده دارد، می‌شود (۳ و ۱۲).

بررسی نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد که که هر سه عامل سطح آلودگی، تلقیح قارچ میکوریزا و تلقیح باکتری‌های تجزیه‌گر تأثیر معنی داری سطح ۵ درصد در تجزیه ترکیبات نفتی می‌باشند، در ضمن اثر متقابل سطح آلودگی با تلقیح میکوریز و سطح آلودگی با تلقیح باکتری‌های تجزیه‌گر در تجزیه ترکیبات نفتی در سطح ۵ درصد معنی دار نمی‌باشد. این نکته نشان دهنده این می‌باشد، که قارچ میکوریزا و باکتری‌های تجزیه‌گر صرفنظر از میزان آلودگی نقش خود را در تجزیه ترکیبات نفتی به واسطه تحریک باکتریهای تجزیه گر بومی خاک ایفا می‌کنند، در حالی‌که سایر اثرات متقابل در سطح ۵ درصد دارای تاثیر معنی دار در تجزیه ترکیبات نفتی می‌باشند (جدول۱).



شکل۲- درصد کلینیزاسیون ریشه در تیمارهای دریافت کننده تلقیح قارچ میکوریزا در سطوح مختلف آلودگی

جدول۱- تجزیه واریانس اثر تیمارها بر تجزیه ترکیبات نفتی

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	ارزش F
سطح آلودگی	۱	۴۵/۳۷	۴۵/۳۷	۴۵/۳۷ *
مایه زنی قارچ میکوریز	۱	۸۲۸/۳۷	۸۲۸/۳۷	۳۸/۸۲۸*
مایه زنی باکتری	۱	۱۶۸۳/۳۷	۱۶۸۳/۳۷	۱۶۸۳/۳۷ *
سطح‌آلودگی×مایه زنی باکتری	۳	۳/۳۷	۰/۷۹	۳ /۳۷ ns
سطح‌آلودگی×مایه زنی قارچ میکوریز	۳	۱/۱۲۵	۰/۳۷۵	۰/۳۷۵ ns
مایه زنی باکتری ×قارچ میکوریز	۳	۱۹۸/۳۷	۶۶/۱۲۳	۱۹۸/۳۷*
مایه‌زنی‌باکتری×قارچمیکوریز×سطح آلودگی	۷	۴۵/۳۷	۱۵/۱۲	۴۵/۳۷*
خطای آزمایشی	۱۹	۱۹	۱	

*: تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد، ns: تفاوت غیر معنی‌دار

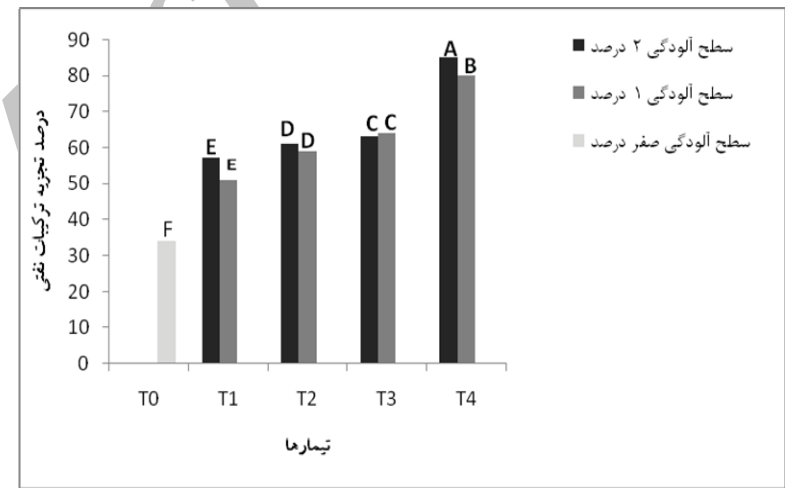
www.SID.ir

با بررسی نتایج بدست آمده از مقدار ترکیبات نفتی استخراج شده بوسیله سوکسیله چنین برداشت می‌شود که تیمار دریافت کننده مایه قارچ میکوریزا به همراه باکتری‌های تجزیه‌گر بیشترین بازدهی را در پالایش ترکیبات نفتی داشتند. به گونه‌ای که در سطح آلودگی ۱ درصد توسط این تیمار ۸۵ درصد تجزیه آلاینده‌های آلی دیده شد، در برابر آن در سطح آلودگی ۲ درصد میزان تجزیه توسط این تیمار ۷۹ درصد بود. میان تجزیه ترکیبات آلی در هر چهار تیمار در هردو سطح آلودگی نسبت به تیمارشاهد با میزان تجزیه ۲۴ درصد تفاوت معنی-داری درسطح ۵ درصد دیده شد (شکل۲). در واقع قارچ میکوریزا نقش خود را در افزایش تجزیه آلاینده‌های آلی از راه تغییر ساختار میکروبی ریزوسفر و میکوریزوسفر، ایجاد محیط مناسب برای فعالیت میکروارگانیسم‌ها بواسطه افزایش حجم ریشه و ریزوسفر و افزایش ترشحات ریشه اعمال می‌کند (۳). در این صورت حضور همزمان میکوریز با باکتری‌های تجزیه کننده می‌تواند میزان تجزیه و تخریب را افزایش دهد. حضور قارچ میکوریزا می‌تواند به عنوان عامل برطرف کننده محدودیت مایه زنی میکروارگانیسم‌های تجزیه‌گر، که شامل محدودیت اکسیژن و عناصر غذایی می‌باشد، عمل کند (۵). واز طرف دیگر اضافه شدن باکتری‌های تجزیه‌گر باعث افزایش حلالیت بخش غیر قابل دسترس آلاینده‌ها به واسطه ترشح بیوسورفکتانتها و بالطبع آن باعث افزایش تجزیه آلاینده می‌شود. قارچ میکوریزا با افزایش حجم میکوریزوسفر باعث افزایش محیط ایده‌ال برای فعالیت باکتری-ها و رفع محدودیت توزیع اکسیژن می‌شود، ولی در صورت پایین بودن جمعیت باکتری تجزیه‌گر میزان آلاینده حلال در ریزوسفر و میکوریزوسفر افزایش می‌یابد که در صورت بالا رفتن میزان آن می-تواند به عنوان عامل بازدارنده برای فعالیت موجودات زندهٔ ذره‌بینی دخیل در چرخه عناصر و کلینیزاسیون ریشه عمل کرده و باعث کاهش میزان تجزیه شود (۱۲). نتایج مطالعات آلرسون و همکاران (۳) نشان داد که در بین چهار تیمار بررسی شده مشابه با این پروژه تیمار دریافت کننده مایه باکتری و قارچ میکوریزا با ۵۹ درصد تخریب آلاینده‌های هیدروکربنی بیشترین بازدهی را در بین تیمارها داشته و میان میزان تجزیه هر چهار تیمار نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی-داری گزارش شد.

نمونه نفتی چاه شماره ۲۴۱ میدان نفتی مارون به که به عنوان آلاینده نفتی در این پروژه استفاده شد. پس از آسفالتن و گوگرد گیری بیتومین باقیمانده به دستگاه گاز کروماتوگرافی ترزیق شد. پس از ارائه پیک GC (شکل ۳) سطوح زیر منحنی هر کدام از نرمال آلکان‌ها بدست آمد (شکل ۴). در تعیین پیکها پریستان و فیتان به علت ساختمان ملکولی بسیار مقاوم در برابر تجزیه زیستی نسبت به نرمال آلکان‌های مجاورشان به عنوان استاندارهای داخلی استفاده شدند. پس از تعیین موقعیت پریستان و فیتان و کربنهای مجاورشان یعنی به ترتیب (C_{17} و C_{18}) موقعیت سایرکربنها نیز مشخص می‌شود. سپس بمنظور سهولت بررسی تغییرات نرمال آلکان‌ها آنها را در شش دسته به ترتیب زیر تقسیم بندی شدند (۶).

C_{13}>، C_{13}-C_{16}، C_{17}-C_{21}، C_{22}-C_{25}، C_{26}-C_{29} و C_{30}-C_{39}

دسته اول نرمال آلکان‌ها به دلیل عدم مشاهده شدن در هیچ یک از پیکهای بدست آمده در این نمودارها بررسی نشدند. سپس نتایج حاصله از نمودارهای هر یک از تیمارها با نمودارGC حاصله از نمونه نفت چاه شماره۲۴۱ و نمونه شاهد مقایسه‌گردید.

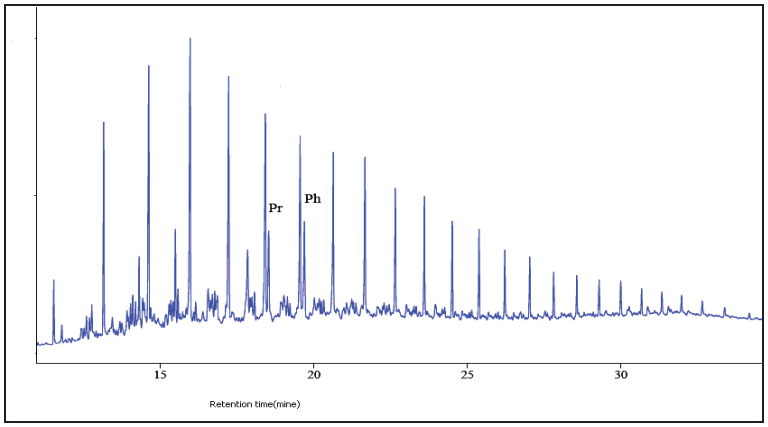


شکل ۳- راندمان تیمارهای T۰: تیمار شاهد T۱:تیمار کشت شبدر T۲:کشت شبدر با مایه زنی قارچ میکوریزا T۳:کشت شبدر با مایه زنی باکتری‌های تجزیه‌گر T٤:کشت شبدر با مایه زنی قارچ میکوریزا و باکتری‌های تجزیه‌گر برای تجزیه هیدروکربن‌های نفتی در سطوح مختلف

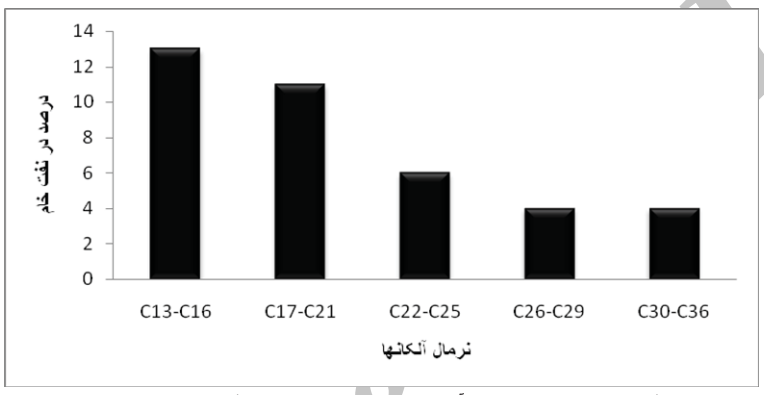
آلودگی. ستونهایی که دارای حروف مشترک هستند از نظر آزمون دانکن تفاوت معنی داری در سطح پنج درصد بین آنها وجود ندارد.

Archive of SID

www.SID.ir



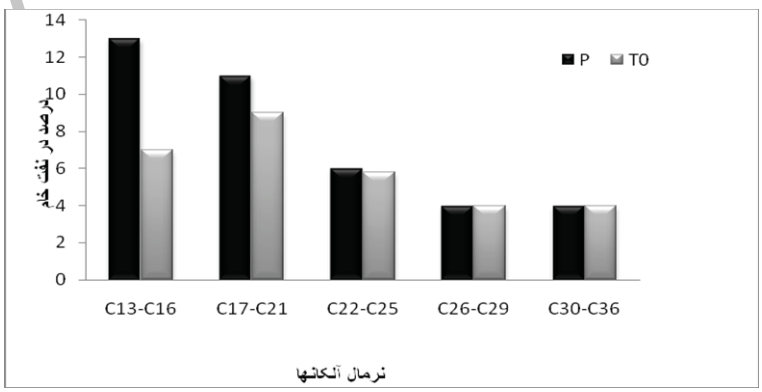
شکل ٤- کروماتوگرافی گازی نفت خام چاه شماره ۲٤۱ میدان نفتی مارون



شکل ٥- درصد نرمال آلکان‌ها در نفت خام چاه شماره ۲٤۱

مقایسه میزان تجزیه در نمونه شاهد با میزان ترکیبات نفت خام (شکل ۶) نشان می‌دهد که ۴۷ درصد ترکیبات C_{13}-C_{20} در نمونه شاهد تجزیه شده است. در حالی‌که میزان تجزیه ترکیبات C_{17}-C_{21}، C_{22}-C_{25}، C_{26}-C_{29} و C_{30}-C_{36} به ترتیب برابر با ۱۶، ۴، صفر و صفر درصد بود.

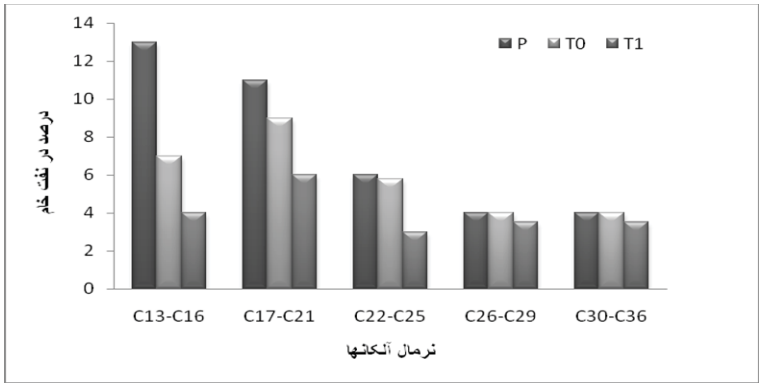
مقایسه میزان تجزیه در تیمار T_1 با میزان ترکیبات نفت خام نشان می‌دهد که ۷۰ درصد ترکیبات C_{13}-C_{16} تجزیه شده است در حالی‌که این میزان در مورد ترکیبات C_{17}-C_{21}، ۴۵ درصد می‌باشد. و در مورد ترکیبات C_{22}-C_{25}، C_{26}-C_{30} و C_{31}-C_{36} به ترتیب برابر با ۲۵، ۵۰ و ۵۰ درصد بود. در ضمن مقایسه این نمودار با نمونه شاهد نشان می‌دهد که میزان تجزیه ترکیبات C_{13}-C_{16}، C_{17}-C_{21}، C_{22}-C_{25}، C_{26}-C_{29} و C_{30}-C_{36} به ترتیب به میزان ۲۳، ۲۹، ۲۱، ۵۰ و ۵۰ درصد بیشتر بود (شکل ۷).



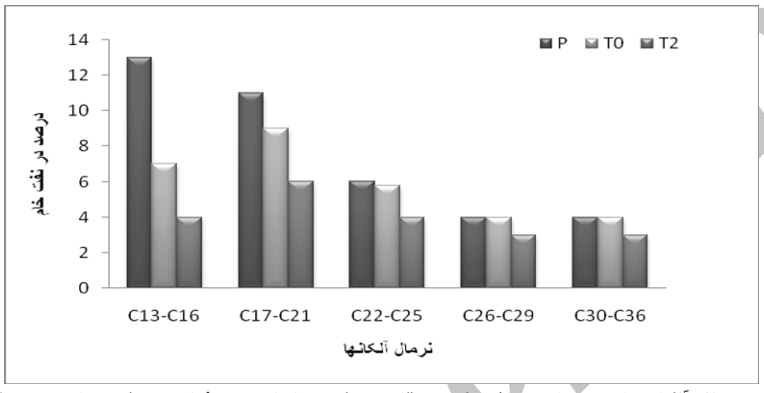
شکل ٦ - مقایسه درصد نرمال آلکان‌ها در نمونه شاهد با نفت خام

Archive of SID

www.SID.ir



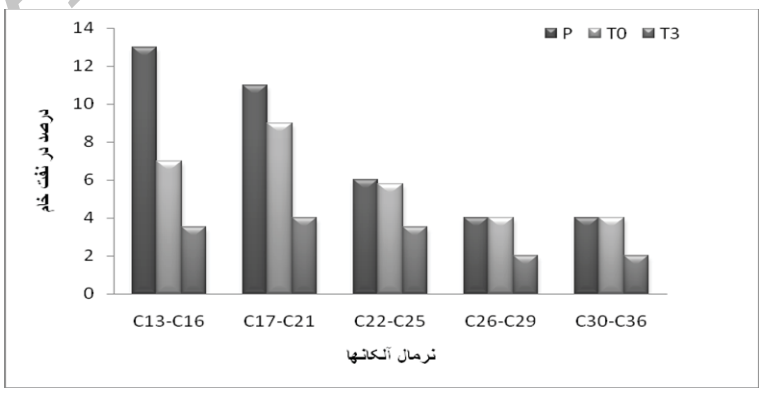
شکل ۷- مقایسه درصد نرمال آلکان‌ها در تیمار کشت گیاه با نمونه شاهد و نفت خام در سطح آلودگی ۱ درصد



شکل ۸- مقایسه درصد نرمال آلکان‌ها در تیمار دریافت کننده قارچ میکوریزا با نمونه شاهد و نفت خام در سطح آلودگی ۱ درصد

بررسی (شکل ۸) نشان می‌دهد که میزان تجزیه ترکیبات C_{13}-C_{16}، C_{17}-C_{21}، C_{22}-C_{25}، C_{26}-C_{29} و C_{30}-C_{36} در تیمار دریافت کننده مایه تلقیح قارچ میکوریزا در خاک با سطح آلودگی ۱ نسبت به نمونه شاهد به ترتیب ۲۳، ۴۴، ۲۹، ۵۲/۵ و ۵۰ درصد بیشتر بود در حالی‌که نسبت به نفت خام میزان تجزیه برابر با ۷۰، ۶۰، ۳۳، ۵۲ و ۵۰ درصد می‌باشد.

در تیمار دریافت کننده مایه تلقیح باکتریهای تجزیه‌گر در خاک با سطح الودگی ۱ درصد بالاترین میزان تجزیه در مقایسه یا تیمار شاهد مربوط به ترکیبات C_{26}-C_{29} و C_{30}-C_{36} می‌باشد، بطوری‌که میزان تجزیه این ترکیبات نسبت به نمونه شاهد به ترتیب ۵۲/۵ و ۵۰ درصد بیشتر می‌باشد. درحالیکه میزان تجزیه ترکیبات C_{13}-C_{16}، C_{17}-C_{21} و C_{22}-C_{25} به ترتیب ۲۷، ۴۴ و ۲۹ درصد بیشتر می‌باشد. مقایسه این نمودار با نمودار نفت خام نشان می‌دهد که تمامی ترکیبات بجز ترکیبات C_{22}-C_{25} بالای ۵۰ درصد تجزیه شده‌اند. بدست آمده است (شکل ۹).



شکل ۹- مقایسه درصد نرمال آلکان‌ها در تیمار دریافت کننده باکتریهای تجزیه‌گر با نمونه شاهد و نفت خام در سطح آلودگی۱ درصد

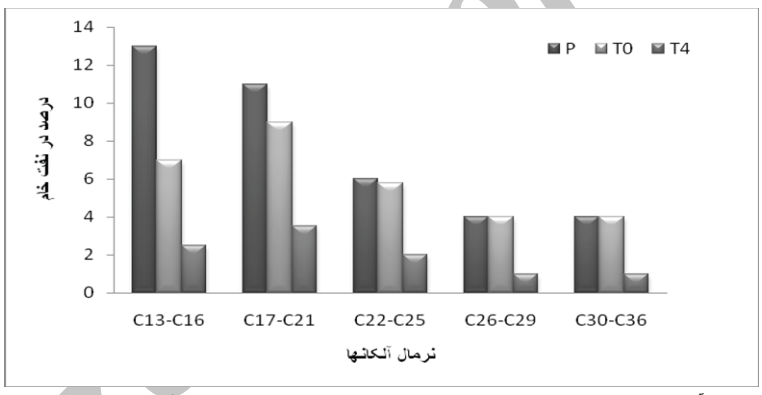
Archive of SID

www.SID.ir

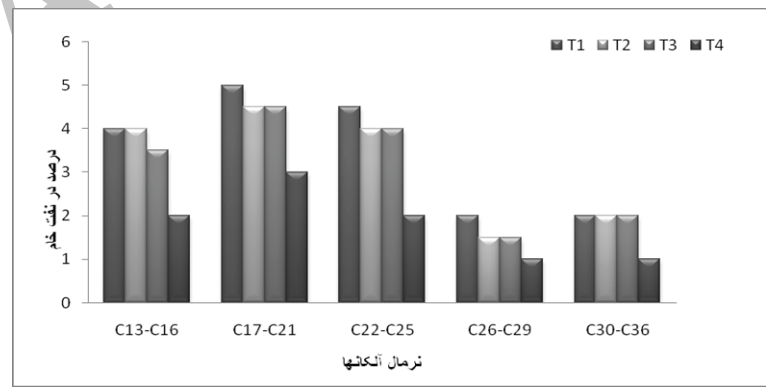
بررسی شکل ۱۰ نشان می‌دهد که در تیمار دریافت کننده مایه تلقیح قارچ میکوریزا و باکتریهای تجزیه‌گر تمامی ترکیبات بالای ۶۰ درصد تجزیه شده‌اند. بطوری‌که میزان تجزیه ترکیبات C_{13}-C_{16}، C_{17}-C_{21}، C_{22}-C_{25}، C_{26}-C_{29} و C_{30}-C_{36} به ترتیب ۳۷، ۵۶، ۶۳، ۷۵ و ۷۵ نسبت به نمونه شاهد بیشتر می‌باشد. درحالیکه مقایسه این نمودار با نمودار نفت خام نیز نشان می‌دهد که که میزان تجزیه ترکیبات C_{13}-C_{16}، C_{17}-C_{21} ، C_{22}-C_{25}، C_{26}-C_{29} و C_{30}-C_{36} نسبت به نفت خام برابر با ۸۴، ۷۲، ۶۷، ۷۵ و ۷۵درصد می‌باشد.

در خاک با سطح آلودگی ۲ درصد نیز نتایج تقریبا مشابهی در رابطه با میزان تجزیه ترکیبات نفتی بدست آمد. با بررسی شکل ۱۱ می‌توان به این نتیجه رسید که بیشترین میزان تجزیه ترکیبات مختلف نفتی در تیمار دریافت کننده مایه تلقیح قارچ میکوریزا و باکتریهای تجزیه‌گر مشاهده شد. در بین ترکیبات نیز در تمامی تیمارها بالاترین میزان تجزیه مربوط به C_{13}-C_{16} و کمترین میزان تجزیه نیز متعلق به ترکیبات C_{22}-C_{25} می‌باشد. تنها تفاوت مشاهده شده بین این دو سطح آلودگی پایین بودن میزان تجزیه ترکیبات C_{22}-C_{25} در سه تیمار کشت گیاه، دریافت کننده تلقیح قارچ میکوریزا و تیمار دریافت کننده باکتریهای تجزیه‌گر در سطح آلودگی ۱ درصد نسبت به تیمارهای مشابه در سطح آلودگی ۲ درصد می‌باشد. با این وجود این دسته نسبت به دسته کربنهای دیگر کمترین میزان تجزیه را دارد که نشانگر مصرف کم پارافینهای متوسط زنجیره بوسیله باکتریهای مورد مطالعه به سبب تجزیه کم نرمال آلکان‌های فرد در این دسته است، این نرمال آلکان‌ها با منشاء زمینی (گیاهان دم اسبی) به مقدار کم توسط باکتریهای تجزیه‌گر نفت مورد تجزیه قرار می‌گیرند (۱۳).

در تیمار دریافت کننده باکتریهای تجزیه‌گر، باکتری تجزیه‌گر بواسطه یکی از دو مکانیسم خود در تجزیه این ترکیبات یعنی تولید بیوسورفکتانت و یا جذب سطحی ترکیبات آلی باعث بالا رفتن میزان تجزیه ترکیبات آلی سنگین می‌شود. مطالعات گیلر و همکاران (۱۴) نشان داد که تقویت بیولوژیکی خاک آلوده به ترکیبات نفتی در تیمار شاهد ترکیبات C_{22}-C_{25} و C_{26}-C_{29} دارای تغییرات جزئی می‌باشد. در حالی‌که در تیمارهایی که در آن باکتریهای تجزیه‌گر به خاک آلوده اضافه شده‌اند میزان تجزیه این ترکیبات به بالای ۵۰ درصد افزایش یافته است (۷).



شکل ۱۰- مقایسه درصد نرمال آلکان‌ها در تیمار دریافت کننده باکتریهای تجزیه‌گر با نمونه شاهد و نفت خام در سطح آلودگی۱ درصد



شکل ۱۱- مقایسه درصد تجزیه نرمال آلکان‌ها بین چهار تیمار در خاک با سطح آلودگی ۲ درصد

Archive of SID

www.SID.ir

مارکریچ و همکاران (۲۰۰۷) نیز نتایج مشابهی در خصوص روند تجزیه نرمال آلکان‌ها در خاکهای آلوده بدست آورده بودند .

نتیجه گیری

نتایج نشان دهنده این نکته است با بهبود شرایط محیط خاک برای فعالیت میکروارگانیسم ها میزان تجزیه ترکیبات آلی افزایش می‌یابد. بنابراین می‌توان گفت قارچ میکوریزا به لحاظ بهبود شرایط خاک برای رشد گیاه و فعالیت میکروارگانیسم‌ها با توجه به رشد کم و پایین گیاهان مختلف در خاکهای آلوده به لحاظ سمیت این ترکیبات آلاینده در صورت کاربرد در موقع کشت گیاه در خاک‌های آلوده می‌تواند در تجزیه ترکیبات آلی آلاینده و افزایش رشد گیاه نقش موثری داشته باشد. از نتایج دیگر این مطالعه می‌توان به تاثیر تیمار با تلقیح قارچ میکوریزا و باکتری‌های تجزیه‌گر در افزایش زیست‌پالایی ترکیبات آلی آلاینده نسبت به تیمارهای دیگر اشاره کرد. بنابراین پیشنهاد می‌گردد که از مایه زنی خاک آلوده با باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت و قارچ میکوریزا در اصلاح خاک‌های آلوده به نفت استفاده شود.

سپاسگزاری

درپایان لازم می‌دانم از زحمات مهندس ترکمان اسدی به عنوان مشاور صنعتی و از حمایت مالی شرکت ملی مناطق نفت خیز جنوب (شهید تندگویان) از این طرح کمال تشکر و قدردانی را داشته باشم.

منابع

۱- شریفی حسینی س. ۱۳۸۷. بررسی اثرات کودهای شیمیایی و آلی در زیست پالایی خاکهای آلوده به نفت خام اهواز. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه شهید چمران اهواز.

۲- جمشیدیان م. ۱۳۸۰. راهنمای تشخیص باکتریایی و مایکولوژیکی درمانگاهی. انتشارات دانشگاه شهید چمران اهواز.

3- Alarcon A., Davies F.T., Autenneth R.L., and Zuberer D.A. 2008. Arbuscular Mycorrhiza and Petroleum-Degrading Microorganisms Enhance Phytoremediation of Petroleum-Contaminated Soil. International Journal of Phytoremediation, 10: 251-263.

4- Atlas R.M. 1981. Microbial degredation of petrolium hydrocarbon an enviromental . Perspective Microbial. 45:180-209.

5- Azcon-aguiler C. 1992. interaction between mycoohizal fungi and other rhizosphere microorganisms . in: Mycorrhizal unctioning, Allen Mf :163-198.

6- Bordenave M.L. 1993 .Applied petroleum geochemistry.Editions Technip, paris pp:160-165.

7- Christopher S., Hein P., Marsden J., and Shurleff A.S. 1988. Evaluation of methods 3540 (soxhlet) and 3550 (Sonication) for evaluation of appendix IX analyses from solid samples. S-CUBED, Report for EPA contract 68-03-33-75, work assignment No.03, Document No. SSS-R-88-9436.

8- Cheung K.C., Zhang J.Y., Deng H.H., Ou Y.K., Leung H.M., and Wong M.H. 2008. Interaction of higher plant (jute), electrofused bacteria and mycorrhiza on anthracene biodegradation. Bioresource Technology 99 :2148–2155.

9- Fine P., Graber E.R., Yaron B. 1997. Soil interactions with petroleum hydrocarbons: abiotic processes. Soil Technology. 10: 133– 153.

10- Harbhajan Singh. 2005. Mycoremediation. A John Wiley & Song, Inc., Publication.pp:283-285.

11- In Situ Bioremediation: When Does it Work**?.** 1993. Committee on In Situ Bioremediation Water Science and Technology Board Commission on Engineering and Technical Systems. National Research Council. 257.

12- Joner E.J., Leyval C., Colpaert J.V. 2006. Ectomycorrhizas impede phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) both within and beyond the rhizosphere. Environmental Pollution 142: 34-38.

13- Rajapakse S., and Miller J. 1991. Methods for studying vesicular–arbuscular mycorrhizal root colonization and related root physical properties. Methods Microbiology. 24: 301–316.

14- Riley M.A., Chavan M.A. 2007. Bacteriocins: Ecology and Evolution. Springer publisher. pp**:** 19-41.

15- Romero M.C., Cazau M.C., Giorgieri S., and Arambarri A.M. 1998. Phenanthrene degradation by microorganisms isolated from a contaminated stream Environment Pollution. 101: 355–359.

16- Smith S.E., and Read D.J. 2008. Mycorhizal symbiosis. Third edietion. Elsevier publisher. pp:15-35.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Water and Soil
Vol. 26, No.4, Sept.-Oct. 2012, p. 832-841

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۶، شماره ۴، مهر – آبان ۱۳۹۱، ص. ۸۴۱-۸۳۲

Evaluation the Effect of Myccorhiza and Degrading Bacteria in Enhancing Phytoremediation of Oil Compound in Oil Contaminated Soil

V. Sarvi Moghanlo[1]*- M. Chorom[2]- M. Falah[3]- H. Motamedy[4]

Received: 22-1-2011
Accepted: 29-4-2012

Abstract

Due to widespread distribution, hydrocarbon toxicity and mutagencity, PAHs are listed as hazardous pollutants, and remediation of soils contaminated with PAHs is a major challenge. The use of degrading microorganisms and plants for bioremediation of PAHs-contaminated environments seems to be a viable technology for restoration of polluted sites. The purpose of this research was investigation the effect of mycorrhiza and degrading bacteria in increasing pytoremediation. For this purpose, the soil deliberately contaminated with crude oil in 1 and 2 wt% rate and four treatments: plant multiflorum (T_1), plant multiflorum with mycorrhiza inoculation (T_2), plant multiflorum with oil degrading bacteria inoculation (T_3), plant multiflorum with mycorrhiza and oil degrading bacteria inoculation (T_4) were employed for bioremediation of oil contaminated soil. The study results showed that with increasing the level of pollution, shoots and roots yield was decreased. The percentage of AM colonization in mycorrhizal treatments did not significantly reduce the yield. Most importantly, degradation of oil components was significantly enhanced by the addition of oil-degrading microorganisms, compared to remediation of growing plants alone at both level of pollution. The highest oil degradation (85%) was observed with AMF + oil degrading bacteria in soil with pollution level of 2%., GC results indicated that all normal paraffin and isoperopanoids i.e. Phytane and Pristane decreased from 40 to 80 percent in treatments with oil-degrading microorganisms.

Keywords: Degrading bacteria, Myccorihza fungus, Normal paraffin, Isoperopanoids

Archive of SID

1,2- Former MSc Student and Associate Professor of Soil Science Department, College of Agriculture, Shahid Chamran Ahvaz University
(*-Corresponding Author Email: vsarvi@gmail.com)
3- MSc Student, Department of Environment, Science Research Unit Ahvaz
4- Assistant Professor, Department of Microbiology, Shahid Chamran Ahvaz University

www.SID.ir