



بررسی کارایی فرمولاسیون پودری یک کنسرسیوم باکتریایی تجزیه‌کننده آلاینده‌های هیدروکربنی در مقیاس پایلوت میدانی

علی ابوالحسنی سورکی^{۱*}، مهناز مظاهری اسدی^۱ و سید امید رعنائی سیادت^۲

^۱ پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران
^۲ مرکز تحقیقات پروتئین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۶/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۷/۰۸

ابوالحسنی سورکی، ع.، م. مظاهری اسدی و س.ا. رعنائی سیادت. ۱۳۹۸. بررسی کارایی فرمولاسیون پودری یک کنسرسیوم باکتریایی تجزیه‌کننده آلاینده‌های هیدروکربنی در مقیاس پایلوت میدانی. فصلنامه علوم محیطی. ۱۷(۲): ۶۸-۵۸.

سابقه و هدف: آلودگی‌های نفتی می‌توانند سبب آسیب‌های جدی و بلندمدت بر محیط‌زیست و سلامت جامعه‌های انسانی شوند. ترکیب‌های هیدروکربنی می‌توانند در طبیعت به مدت طولانی باقی‌مانده و تبدیل به آلاینده‌های محیط‌زیستی شوند. پاک‌سازی آلودگی‌های هیدروکربنی همچنان موضوعی چالشی برای پژوهشگران رشته‌های مختلف می‌باشد. زیست‌پالایی، نوعی بیوتکنولوژی است که می‌تواند برای رفع این آلودگی‌ها مورد استفاده قرار گیرد. با این وجود بیشتر یافته‌های موجود در مورد ارزیابی عامل‌های مؤثر بر زیست‌پالایی هیدروکربن‌های نفتی از مطالعات آزمایشگاهی به دست آمده است و پژوهش‌ها در این زمینه در مقیاس پایلوت یا مطالعات میدانی بسیار محدود است. مطالعات نشان می‌دهد که عامل‌های اصلاح بیولوژیکی که در شرایط آزمایشگاهی مؤثرند ممکن است بطور قابل‌ملاحظه‌ای در مقیاس وسیع دارای اثربخشی کمتری باشند. بنابراین پژوهش‌ها و کاربردهای میدانی، آزمون‌های قانع‌کننده نهایی برای میزان کارایی این محصول‌ها می‌باشند. هدف از انجام این پژوهش ارزیابی عملکرد یک کنسرسیوم باکتریایی تجزیه‌کننده آلاینده‌های هیدروکربنی در شرایط طبیعی و در مقیاس پایلوت میدانی بود.

مواد و روش‌ها: برای اجرای این پژوهش، کنسرسیوم باکتریایی تجزیه‌کننده آلودگی نفتی شامل ۵ سویه باکتری *Alcanivorax dieselolei*، *Gracilibacillus dipsosauri*، *Rhodococcus ruber*، *Thalassospira xianheensis* و *Microbacterium sp*. در فرمانتور نیمه صنعتی در حجم ۵۰۰ لیتر تکثیر گردید. سپس سلول‌های میکروبی بعد از ته‌نشینی در فرمانتور به روش spray-drying خشک و با نشانیدن بر روی پودر دیاتومه بعنوان بستر تثبیت، تبدیل به پودر شدند. با مخلوط‌سازی پودر خالص میکروبی با افزاینده‌های مغذی مناسب، فرمولاسیون نهایی پودر میکروبی تجزیه‌کننده آلودگی نفتی تولید شد. آزمون میدانی ارزیابی عملکرد این پودر میکروبی بر روی خاک‌های آلوده به نفت خام در جزیره خارک صورت گرفت. برای این منظور خاک‌های آلوده به نفت سنگین در دو بلوک مجزا شامل یک بلوک شاهد و یک بلوک تیمار به روش زیست‌افزایی مورد آزمون تجزیه‌زیستی مواد نفتی قرار گرفت و غلظت هیدروکربن‌های نفتی کل و تغییرات دمای خاک در دوره آزمون سنجش شد.

نتایج و بحث: میانگین میزان TPH در روز اول در نمونه‌های شاهد و مورد آزمایش ۳۴۱ میلی‌گرم در هر گرم خاک بود. در نمونه شاهد کاهش هیدروکربن‌های نفتی بعد از دوره ۱۴ روزه آزمایش به میزان ۱۴/۲٪ بود که می‌تواند به دلیل فعالیت جمعیت باکتری‌های بومی خاک و یا به سبب

* Corresponding Author: Email Address: a_abolhasani@sbu.ac.ir

فرآیندهای فیزیکی و شیمیایی مانند تبخیر و فتواکسیداسیون باشد. در مقابل در خاک تیمار شده با فرمولاسیون پودری کنسرسیوم میکروبی تجزیه‌کننده آلودگی نفتی غلظت هیدروکربن‌های نفتی در پایان دوره آزمون با ۶/۷٪ کاهش به ۹۹ (mg/g) رسید. این نتایج نشان‌دهنده عملکرد بسیار سریع این کنسرسیوم میکروبی در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی می‌باشد. همچنین به دلیل افزایش فعالیت باکتری‌ها و تجزیه هیدروکربن‌های نفتی دمای خاک در بلوک تیمار شده با پودر میکروبی با افزایشی معادل ۱۱ درجه سانتی‌گراد همراه شد. افزایش دمای خاک بویژه در منطقه‌های سردسیر یا در فصل‌های سرد سال در نتیجه فعالیت باکتری‌ها خود می‌تواند سبب بالا رفتن متابولیسم جمعیت‌های میکروبی خاک و افزایش راندمان زیست‌پالایی شود. این موضوع بویژه در مورد آلودگی‌های نفتی در منطقه‌های قطبی اهمیت دوچندانی دارد.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از کنسرسیوم میکروبی برای زیست‌پالایی خاک‌های آلوده به غلظت‌های بسیار زیاد هیدروکربن‌های نفتی مانند آنچه در زمان نشت نفت خام از خطوط انتقال نفت ایجاد می‌شود، می‌تواند نتیجه‌بخش باشد. همچنین کاربرد محصول‌های پودری بدلیل سهولت انجام عملیات و عدم نیاز به تجهیزهای پیچیده و گران‌قیمت یک راهکار مؤثر بحساب می‌آید. افزون بر این افزودن کنسرسیوم میکروبی بدلیل جمعیت اولیه مناسب باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت می‌تواند سبب افزایش دمای خاک شده و فعالیت جمعیت‌های بومی خاک را نیز افزایش دهد.

واژه‌های کلیدی: زیست‌پالایی، آزمون پایلوت میدانی، کنسرسیوم میکروبی، فرمولاسیون پودری.

مقدمه

سوخت‌وساز میکروارگانیسم‌ها یک روش در حال تحول و توسعه است که می‌تواند برای حذف و تجزیه بسیاری از آلاینده‌های محیط زیستی از جمله محصول‌های نفتی بکار برود. افزون بر این در این روش سعی بر این است که فن‌آوری کم‌هزینه باشد. تجزیه بیولوژیکی توسط جمعیت‌های مختلف میکروارگانیسم‌ها یک مکانیسم پایه است که از این طریق نفت و هیدروکربن‌های آلاینده دیگر می‌توانند از محیط حذف شوند.

محیط‌های کشت میکروبیولوژیکی، آنزیم‌ها و مواد مغذی افزودنی که ضمن افزایش قابل توجه بیولوژیکی، هزینه‌های تحمیلی را کاهش می‌دهند بعنوان عامل‌های اصلاح بیولوژیکی از سوی U.S.EPA در نظر گرفته می‌شوند (Nichols, 2001). سازمان حفاظت محیط‌زیست آمریکا با یک لیست از ۱۵ عامل اصلاح بیولوژیکی که توسط قانون آب پاک، قانون آلودگی نفتی و NCP مورد نیاز در نظر گرفته شده است، تأیید کرد (U.S.EPA, 2010).

با این وجود بیشتر یافته‌های موجود در مورد ارزیابی عامل‌های مؤثر بر زیست‌پالایی نفت از مطالعات آزمایشگاهی به دست آمده است و یافته‌های متقاعدکننده از این تکنولوژی در مقیاس پایلوت یا مطالعات میدانی فقط توسط تعداد محدودی از مطالعات فراهم شده است (Swannell et al., 1996). مطالعات نشان می‌دهد که عامل‌های اصلاح بیولوژیکی که در شرایط آزمایشگاهی مؤثرند ممکن است به‌طور قابل ملاحظه‌ای در مقیاس وسیع

آلودگی‌های نفتی می‌توانند سبب آسیب‌های جدی و بلندمدت بر محیط‌زیست و سلامت جامعه‌های انسانی شوند (Winkler and Agapova, 2010). هیدروکربن‌ها که ساختار اصلی تشکیل‌دهنده نفت خام هستند، غالباً فاقد گروه‌های عاملی روی مولکول‌های خود بوده و حلالیت بسیار پایینی در آب دارند. بیشتر این ترکیب‌ها در طبیعت به مدت طولانی باقی مانده و بعنوان آلاینده‌های محیط زیستی بحساب می‌آیند (Labinger and Bercaw, 2002). پاک‌سازی آلودگی‌های هیدروکربنی همچنان موضوعی چالشی برای پژوهشگران رشته‌های مختلف می‌باشد.

زیست‌پالایی نوعی بیوتکنولوژی است که می‌تواند برای رفع این آلودگی‌ها مورد استفاده قرار گیرد. در این تکنیک، از باکتری‌های نفت‌خوار و دیگر میکروارگانیسم‌ها بمنظور تجزیه مواد آلاینده نفتی به ترکیب‌های بی‌خطر، بهره برده می‌شود (Adams et al., 2015). فناوری تصفیه بیولوژیکی، برتری‌های بسیاری از جمله سازگاری کامل با محیط‌زیست، ارزان بودن و امکان کاربرد درجا، نسبت به دیگر روش‌های رفع آلودگی‌های نفتی دارا می‌باشد. در فرآیند تجزیه بیولوژیکی، باکتری‌های نفت‌خوار، ترکیب‌های نفتی را هضم نموده و برای کسب انرژی مورد نیاز خود، آن‌ها را به H_2O و CO_2 تبدیل می‌کند. استفاده از میکروارگانیسم‌ها برای سم‌زدایی یا حذف آلاینده‌ها، بخاطر قابلیت‌ها و تنوع در

سانتی‌گراد، شوری (ppt) ۰ تا ۱۲۰ و pH ۶ تا ۹ را دارا بود.

تولید فرمولاسیون پودری کنسرسیون میکروبی تجزیه‌کننده آلودگی نفتی

فرآیند تولید پودر میکروبی تجزیه‌کننده آلودگی نفتی در این مطالعه با استفاده از پایلوت فرماتور پژوهشکده زیست‌فناوری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران انجام شد. تکثیر باکتری‌ها بصورت کشت غیرمداوم در فرماتور ۷۵۰ لیتری با حجم عملیاتی ۵۰۰ لیتر صورت گرفت. بمنظور تهیه کشت استارتر برای فرماتور دو مرحله کشت مقدماتی شامل کشت آزمایشگاهی در حجم ۰/۵ لیتر در ارلن و بر روی شیکر، و کشت در حجم ۵ لیتر در فرماتور ۷/۵ لیتری صورت گرفت. محیط کشت مورد استفاده در تهیه کشت استارتر و همچنین در فرماتورها شامل ملاس چغندر قند (شرکت قند هگمتانه) با غلظت ۴٪ و مایع آب استیپ ذرت (شرکت گلوکوزان) با غلظت ۵٪ بود. روغن مایع خوراکی بعنوان عامل ضدکف در فرماتور استفاده شد. pH اولیه محیط کشت صنعتی روی ۷/۵ تنظیم شد. دمای محیط کشت و هوادهی در طول دوره تکثیر باکتری‌ها در فرماتورهای صنعتی بر اساس نتایج حاصل از بهینه‌سازی رشد و تکثیر باکتری‌ها در فرماتور آزمایشگاهی، بترتیب روی ۳۵ درجه سانتی‌گراد و ۷۷m^۱ تنظیم شد. از محیط کشت در طول دوره کشت نمونه‌برداری صورت گرفت و کدورت سلولی بوسیله اسپکتروفتومتر باسنجش جذب در ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

فرآیند خشک کردن کشت تکثیر یافته باکتری‌ها و تبدیل به پودر با استفاده از دستگاه spray-drier صورت گرفت. محصول فرماتور بعد از رسیدن به فاز سکون رشد، از طریق شیلنگ مخصوص به پمپ دور متغیر اسپری-درایر انتقال داده شد. این پمپ سوسپانسیون باکتریایی را از طریق یک نازل به صورت پاششی به درون محفظه خشک‌کن اسپری نمود. قطره‌های میکروسکوپی در این محفظه در دمای ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد در کسری از ثانیه خشک شدند. دمای نهفته^۵ تبخیر آب سبب جلوگیری از آسیب به سلول‌های باکتریایی در مرکز قطره‌های میکروسکوپی شده و باکتری‌ها بصورت زنده خشک شدند. سپس پودر خالص باکتریایی از طریق یک سیکلون به یک مخزن استیل

دارای اثربخشی کمتری باشند. این موضوع به خاطر این است که مطالعات آزمایشگاهی همیشه نمی‌تواند شرایط پیچیده جهان واقعی را مانند ناهمگونی فضایی، فعل و انفعالات بیولوژیکی، اثر های آب و هوایی، و محدودیت‌های دسترسی به مواد مغذی معدنی را شبیه‌سازی نماید، بنابراین مطالعات و کاربردهای میدانی، آزمون‌های قانع‌کننده نهایی برای ارزیابی میزان کارایی این محصول‌ها می‌باشند.

در این پژوهش عملکرد یک کنسرسیون باکتریایی تجزیه‌کننده آلاینده‌های هیدروکربنی در شرایط طبیعی و در مقیاس پایلوت میدانی مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور ابتدا سویه های میکروبی در فرماتور نیمه صنعتی تکثیر شدند. سپس با خشک کردن و مخلوط سازی با افزایه‌های مورد نیاز باکتری‌ها، فرمولاسیون پودری از محصول ایجاد شد. در پایان با انجام آزمون پایلوت میدانی زیست‌پالایی پسماندهای آلوده به نفت خام در جزیره خارک، میزان کارایی محصول در شرایط واقعی و طبیعی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد و محیط‌های کشت

کلیه مواد آزمایشگاهی مورد استفاده در این پروژه از درجه خلوص آنالیتیکی برخوردار بودند. کلیه محیط‌های کشت آزمایشگاهی از شرکت مرک (آلمان) خریداری شد.

کنسرسیون میکروبی تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های نفتی

کنسرسیون باکتریایی تجزیه‌کننده آلودگی نفتی مورد استفاده شامل ۵ سویه باکتری بود که از خاک‌های آلوده به مواد نفتی در جزیره خارک و منطقه نفت خیز مارون خوزستان جداسازی و به روش تاگوچی بهینه‌سازی شده بود (در حال انتشار مقاله). این کنسرسیون میکروبی شامل سویه‌های منتخب باکتری تجزیه‌کننده نفت در این کنسرسیون میکروبی متعلق به جنس و گونه‌های *Alcanivorax dieselolei*، *Thalassospira xianheensis*، *Rhodococcus ruber*، *Gracilibacillus* و *lus dipsosauri* بودند. این کنسرسیون میکروبی قابلیت فعالیت در دامنه دمایی ۱۰ تا ۵۵ درجه

تغییرات دمایی خاک مورد زیست‌پالایی و شاهد ثبت شد.

سنجش هیدروکربن‌های نفتی با استفاده از GC-MS
 برای اندازه‌گیری هیدروکربن‌های نفتی کلز روش کروماتوگرافی گازی استفاده شد. برای استخراج مواد نفتی از نمونه‌های خاک برای تزریق به دستگاه GC، ابتدا نمونه خاک در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب خشک شد تا رطوبت خاک خارج شود. سپس به ۱ گرم خاک خشک شده داخل میکروویال ۱ میلی‌لیتر حلال n-هگزان اضافه و پس از ورتکس کردن، در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲/۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی شامل مواد هیدروکربنی به یک لوله آزمایش منتقل شد. این عمل ۳ بار تکرار شد تا هیدروکربن‌های موجود در خاک بطور کامل استخراج گردد. سپس به عصاره حاصل ۰/۱ گرم سولفات سدیم بدون آب اضافه شد تا رطوبت آن بطور کامل جذب شود و دوباره در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲/۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. عصاره حاصل سپس به ویال دیگر منتقل شد و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا حلال موجود در آن تبخیر گردد. قبل از تزریق به دستگاه GC به هر ویال ۱ میلی‌لیتر n-هگزان اضافه شد.

دستگاه گاز کروماتوگراف مورد استفاده مدل GC-Shimadzu (15A) و با دتکتور FID بود. ستون مورد استفاده برای اندازه‌گیری هیدروکربن‌های نفتی از نوع RTX-5MS 30 m بود. دمای Injector و Detector بر روی ۳۲۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد و میزان تزریق ۱ میکرولیتر بود. برنامه زمانی دستگاه گاز کروماتوگراف برای آنالیز هیدروکربن‌های نفتی شامل ۱ دقیقه در ۲۰ درجه سانتی‌گراد، به دنبال آن افزایش دما تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد با نرخ ۲ درجه در دقیقه و نگهداری در دمای ۵۰ درجه به مدت ۳ دقیقه، سپس افزایش دما تا ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد با نرخ ۵ درجه در دقیقه و نگهداری در دمای ۱۲۰ درجه به مدت ۱ دقیقه و در نهایت افزایش دما تا ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد با نرخ ۳ درجه در دقیقه و نگهداری در دمای ۲۹۰ درجه به مدت ۲۰ دقیقه بود.

نتایج و بحث

ویژگی‌های خاک آلوده

خاک آلوده به نفت که از نوع رسوب‌های ساحلی بود که بدلیل

منتقل شد. دمای پودر باکتریایی در این مخزن ۷۵-۸۰°C حدود بود که به سرعت به دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد رسانده شد. در پایان پودر تولیدشده مورد شمارش سلول‌های زنده قرار گرفت. در آخرین مرحله از فرآیند تولید پودر میکروبی تجزیه‌کننده آلودگی نفتی، پودر خالص باکتری‌ها روی بستر پودر دیاتومه تثبیت و با نوترینت‌های ازته و فسفات مناسب مخلوط شد.

آزمون پایلوت میدانی زیست‌پالایی خاک آلوده به نفت خام در شرایط طبیعی

برای بررسی کارایی زیست‌پالایی آلودگی نفتی خاک با استفاده از پودر میکروبی تجزیه‌کننده آلودگی نفتی، آزمون پایلوت میدانی زیست‌پالایی خاک آلوده به نفت خام در شرایط طبیعی در جزیره خارک انجام شد. برای انتخاب محل اجرای آزمون پایلوت، پارامترهایی شامل امکان دسترسی به محل، دسترسی به آب صنعتی و نوع و میزان آلودگی نفتی محل معیار انتخاب بود. بر این اساس در زمان گفتگوهای صورت گرفته با مسئولین اداره عملیات صادرات شرکت پایانه‌های نفتی ایران، آلودگی نفتی ناشی از نشت خط لوله انتقال نفت در مجاورت تأسیسات میترینگ آذرپاد آن شرکت برای اجرای آزمون پایلوت پاک‌سازی خاک آلوده به نفت خام انتخاب گردید. با نمونه‌برداری از خاک آلوده در محل موردنظر میزان و نوع آلودگی‌های نفتی در نمونه خاک به روش گراویمتری تعیین گردید. پس از انتخاب محل، حجمی معادل حدود ۵/۲ مترمکعب از ماسه‌های ساحلی آلوده به نفت جمع‌آوری و مخلوط گردید و در دو قطعه با ابعاد ۲×۳×۰/۲ متر توزیع گردید که یکی برای انجام آزمون نمونه پودری و دیگری بعنوان شاهد در نظر گرفته شد. سپس یک کیلوگرم نمونه پودری روی خاک آلوده در قطعه آزمون پخش شد. شکل ۱ عکس مرحله‌های اجرایی را نشان می‌دهد. رطوبت خاک به مدت ۱۴ روز با آب‌پاشی روزانه روی بلوک زیست‌پالایی و کنترل روی حدود ۵۰٪ اشباع نگهداری شد. روزانه به صورت تصادفی از سه عمق مختلف سطحی، ۱۰ سانتی‌متر و ۲۰ سانتی‌متر از خاک مورد آزمایش در دو بلوک مجزا نمونه‌برداری شد. نمونه‌های مربوط به هر بلوک سپس با هم مخلوط و الک شد و سه نمونه در حدود ۱۰۰ گرمی از هر کدام برای اندازه‌گیری هیدروکربن‌های نفتی داخل ظرف‌های شیشه‌ای استریل به آزمایشگاه منتقل شد. همچنین روزانه



شکل ۱- اجرای عملیات آزمون پایلوت میدانی زیست پالایی خاک‌های آلوده به نفت خام با استفاده از نمونه پودری کنسرسیون میکروبی تجزیه کننده آلاینده‌های هیدروکربنی

Fig. 1- Field test operation conducted to evaluate the performance of petroleum-degrading microbial powder on crude oil contaminated soils

جدول ۱- ویژگی‌های نفت خام منشأ آلودگی نفتی خاک مورد آزمایش

Table 1. Characteristics of the crude oil which was the source of contamination of the tested soil

Iranian heavy crude oil	
0.8814	Specific gravity (kg/l)
29.0	API gravity (degrees)
1.96	Sulfur (wt%)
0.21	Nitrogen (wt%)
88.0	Vanadium (ppm)
24.0	Nickel (ppm)
-14	Pour point (°C)
	Viscosity (cSt)
21.52	At 20 °C
10.43	At 40 °C

زمان نمونه برداری که از خاک آلوده به نفت قبل از اجرای آزمون پایلوت زیست پالایی صورت گرفت ویژگی های خاک آلوده از لحاظ دما، pH، شوری و غلظت هیدروکربن های نفتی در نمونه خاک اندازه گیری گردید که نتایج آن در جدول زیر نشان داده شده است.

نشت نفت از یک خط لوله کمابیش به طور کامل اشباع از نفت بود به طوری که در هنگام جابجایی خاک نفت خام از خاک تراوش می نمود. نوع نفت منشأ آلودگی از نوع نفت سنگین ایران بود که ویژگی های آن در جدول نشان داده شده است:

جدول ۲- ویژگی های خاک آلوده به نفت خام در محمولور دنظر برای انجام آزمون پایلوت زیست پالایی

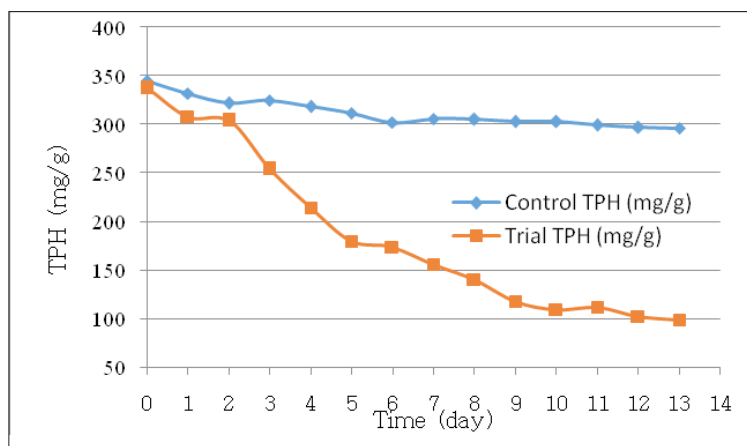
Table 2. Specifications of the soil contaminated with crude oil at the site of a bioremediation pilot test

غلظت هیدروکربنهای نفتی کل Total petroleum hydrocarbons (ppm)	دمای خاک Soil temperature (° C)	pH	شوری خاک Salinity (ppt)	محل نمونه برداری Sampling location
341.000	19	7.35	59	آلودگی نفتی مجاور تأسیسات میترینگ آذریاد در جزیره خارک Oil pollution near Azarpad Metering Facilities

وشیمیایی مانند تبخیر و فتواکسیداسیون باشد. در مقابل در خاک تیمار شده با فرمولاسیون پودریکنسرسیوم میکروبی تجزیه کننده آلودگی نفتی غلظت هیدروکربن های نفتی در پایان دوره ۱۴ روزه آزمون با ۷۰/۶٪ کاهش به ۹۹ (mg/g) رسید. این نتایج نشان دهنده عملکرد بسیار سریع این کنسرسیوم میکروبی در تجزیه هیدروکربن های نفتی می باشد. Sanushi *et al.* (2016) با استفاده از تکنیک بهینه سازی فرآیند تجزیه هیدروکربن های نفتی موفق شدند خاک آلوده به ۳٪ دیزل را در یک دوره زمانی ۷۲ روزه به میزان ۸۵/۵٪ در یک آزمون پایلوت مورد تجزیه زیستی قرار دهند (Sanusi *et al.*, 2016). همچنین در آزمون پایلوت دیگری که توسط Murygina *et al.* (2016) انجام

نتایج آزمون پایلوت زیست پالایی

روند در کاهش میزان هیدروکربن های نفتی در خاک تیمار شده با فرمولاسیون پودری کنسرسیوم میکروبی تجزیه کننده آلودگی نفتی به روشنی قابل مشاهده بود (شکل ۲). غلظت هیدروکربن ها در نمونه کنترل نیز کاهش یافت، هرچند این کاهش نسبت به نمونه تیمار شده بسیار کمتر بود. همان گونه که مشاهده می شود میانگین مقدار TPH در روز اول در نمونه های شاهد و مورد آزمایش ۳۴۱ میلی گرم در هر گرم خاک بود. در نمونه شاهد کاهش هیدروکربن های نفتی بعد از دوره ۱۴ روزه آزمایش تنها ۱۴/۲٪ بود. این کاهش می تواند دلیل فعالیت جمعیت باکتری های بومی خاک و یا به سبب فرآیندهای فیزیکی



شکل ۲- نمودار تغییرات هیدروکربن های نفتی خاک در خاک مورد زیست پالایی به وسیله پودر میکروبی تجزیه کننده آلودگی نفتی و خاک شاهد

Fig. 2- Chart of oil hydrocarbon changes in the soil bioremediated by microbial powder and in the control soil



شکل ۳- عکس از نمونه شاهد (چپ) و نمونه مورد آزمایش (راست) در روز اول (بالا) و روز چهاردهم (پایین). تغییر رنگ خاک آلوده در نمونه مورد آزمایش نشان از تجزیه هیدروکربن‌های نفتی موجود در آن می‌باشد

Fig. 3- Photos of the control block (left) and the bioremediated block (right) on the first day (on the top) and on the fourteenth day (bottom). The change in the color of the contaminated soil in the test sample shows the degradation of the petroleum hydrocarbons

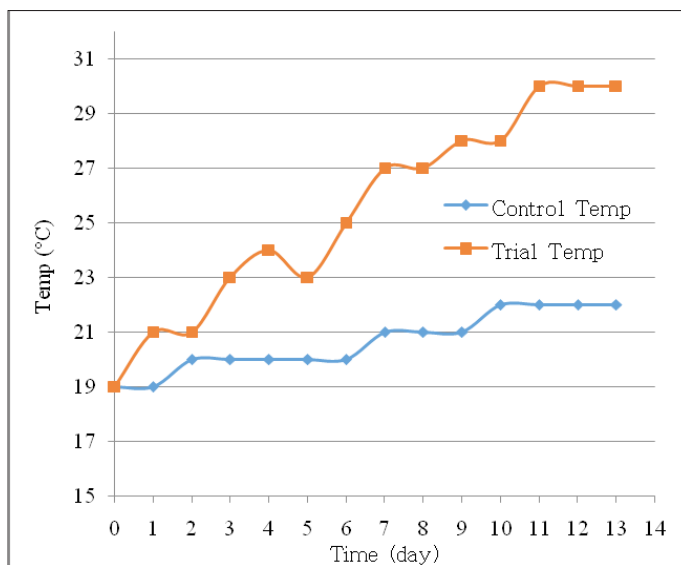
شکل ۳ تغییر رنگ خاک آلوده را قبل و بعد از روز چهاردهم نشان می‌دهد. همان‌گونه که مشاهده می‌شود کاهش غلظت هیدروکربن‌های نفتی در خاک آلوده سبب روشن شدن رنگ خاک نسبت به نمونه کنترل شده است. شکل ۴ نمودار تغییرات دمای خاک را در دوره ۱۴ روزه آزمون پودر میکروبی نشان می‌دهد. همان‌گونه که ملاحظه می‌شود در شروع آزمایش دمای خاک در بلوک‌های شاهد و مورد آزمایش برابر و ۱۹ درجه سانتی‌گراد بود. با ادامه فرآیند

شد میزان کاهش TPH در لایه سطحی (۰ تا ۱۰ سانتی متر) ۲۳٪ و در لایه غیراشباع زیرسطحی (۱۰ تا ۲۵ سانتی متر) ۷۲/۶٪ مشاهده شد (Murygina et al., 2016).

شکل ۳ تغییر رنگ خاک آلوده را قبل و بعد از روز چهاردهم نشان شد میزان کاهش TPH در لایه سطحی (۰ تا ۱۰ سانتی متر) ۲۳٪ و در لایه غیراشباع زیرسطحی (۱۰ تا ۲۵ سانتی متر) ۷۲/۶٪ مشاهده شد (Murygina et al., 2016).

در فصل های سرد سال در نتیجه فعالیت باکتری ها خود می تواند موجب بالا رفتن متابولیسم جمعیت های میکروبی خاک و افزایش راندمان زیست پالایی شود. این موضوع بویژه در مورد آلودگی های نفتی در منطقه های قطبی اهمیت دوچندانی دارد (Mohn et al., 2001).

دمای شاهد به طور اندکی افزایش یافت که تابعی از دمای هوا می باشد. ولی در نمونه مورد آزمایش همان گونه که پیشتر بیان شد بدلیل افزایش فعالیت باکتری ها و تجزیه هیدروکربن های نفتی دمای خاک با افزایشی معادل ۱۱ درجه سانتی گراد رسید. افزایش دمای خاک بویژه در منطقه های سردسیر یا



شکل ۴- نمودار تغییرات دمای خاک در بلوک زیست پالایی به وسیله پودر میکروبی تجزیه کننده آلودگی نفتی و بلوک شاهد
 Fig. 4- Chart of soil temperature changes in soil bioremediation by petroleum-degrading microbial powder and in control block soil

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی و عملیاتی شرکت پایانه های نفتی ایران و پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی صورت گرفته است.

پی نوشت ها

- ¹ Bioremediation
- ² Bioaugmentation
- ³ Total Petroleum Hydrocarbons (TPH)
- ⁴ in situ
- ⁵ Latent heat

منابع

Adams G.O., Fufeyin P.T., Okoro S.E. and Ehinomen I., 2015. Bioremediation, bio-stimulation and bioaugmentation: A review. *International Journal of Environmental Bioremediation and Biodegradation*. 3, 28-39.

Labinger J.A. and Bercaw J.E., 2002. Understanding and

نتیجه گیری

در این پژوهش فرمولاسیون پودری یک کنسرسیون میکروبی از باکتری های طبیعی تجزیه کننده هیدروکربن های نفتی جدا شده از پسماندهای آلوده به مواد نفتی منطقه های نفت خیز ایران تولید شد. میزان کارایی این پودر میکروبی با انجام یک آزمون پایلوت میدانی در جزیره خارک مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از کنسرسیون میکروبی برای زیست پالایی خاک های آلوده به غلظت های بسیار زیاد هیدروکربن های نفتی مانند آنچه در زمان نشت نفت خام از لوله های انتقال نفت ایجاد می شود، می تواند نتیجه بخش باشد. همچنین کاربرد محصول های پودری بدلیل سهولت انجام عملیات و عدم نیاز به تجهیزات پیچیده و گران قیمت یک راهکار مؤثر بحساب می آید. افزون بر این افزودن کنسرسیون میکروبی بدلیل جمعیت اولیه مناسب باکتری های تجزیه کننده نفت می تواند موجب افزایش دمای خاک شده و فعالیت جمعیت های بومی خاک را نیز افزایش دهد.

exploiting C–H bond activation. *Nature*. 417, 507.

Mohn W., Radziminski C., Fortin M.C. and Reimer K., 2001. On site bioremediation of hydrocarbon-contaminated Arctic tundra soils in inoculated biopiles. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 57, 242-247.

Murygina V., Gaydamaka S., Gladchenko M. and Zubaydullin A., 2016. Method of aerobic-anaerobic bioremediation of a raised bog in Western Siberia affected by old oil pollution. A pilot test. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 114, 150-156.

Nichols W.J., 2001. The U.S. Environmental Protection Agency: National Oil and Hazardous Substances Pollution Contingency Plan, Subpart J Product Schedule (40 CFR 300.900), American Petroleum Institute, Washington, DC, USA.

Sanusi S.N.A., Halmi M.I.E., Abdullah S.R.S., Hassan H.A., Hamzah F.M. and Idris M., 2016. Comparative

process optimization of pilot-scale total petroleum hydrocarbon (TPH) degradation by *Paspalum scrobiculatum* L. Hack using response surface methodology (RSM) and artificial neural networks (ANNs). *Ecological Engineering*. 97, 524-534.

Swannell R.P.J., Lee K. and McDonagh M., 1996. Field evaluations of marine oil spill bioremediation. *Microbiological Reviews*. 60, 342–365.

U.S.EPA, 2010. GUIDE TO USING THENCP PRODUCT SCHEDULE NOTEBOOK. ((OEM) O.o.E.M., ed.) p.^pp. 215. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.

Winkler, I. and Agapova, N., 2010. Determination of water pollution by the oil products through UV photometry. *Environmental Monitoring and Assessment*. 168, 115-119.





Pilot-scale evaluation of bioremediation efficiency by powder formulation of a consortium of hydrocarbon-degrading bacteria

Ali Abolhasani Soorki,¹ Mahnaz Mazaheri Assadi^{1*} and Seyed Omid Ranaei Siadat²

¹Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran

² Protein Research Center, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Received: 2018.09.03 Accepted: 2019.09.30

Abolhasani Soorki, A., Mazaheri Assadi, M. and Ranaei Siadat, S.O., 2019. Pilot-scale evaluation of bioremediation efficiency by powder formulation of a consortium of hydrocarbon-degrading bacteria. *Environmental Sciences*. 17(2): 58-68.

Introduction: Oil pollution can cause serious and long-term damage to the environment and the health of human communities. Hydrocarbon compounds can remain in nature for a long period and become environmental pollutants. The elimination of hydrocarbon contamination is still a challenge for researchers of different disciplines. Bioremediation is a branch of biotechnology that can be used to eliminate these contaminants. However, most findings on the evaluation of factors affecting oil bioremediation are obtained from laboratory studies, and research in this area is very limited in pilot or field scale studies. Studies show that bioremediation agents that are effective in vitro may be significantly less effective on a large scale because laboratory studies cannot always simulate the real world's conditions due to spatial heterogeneity, biological interactions, weather effects, and restrictions on access to mineral nutrients. In this study, the performance and effectiveness of a consortium of hydrocarbon-degrading bacteria were evaluated under natural conditions in a pilot scale.

Material and methods: To conduct this research, a bacterial consortium of five strains of bacteria including *Alcanivorax dieselolei*, *Thalassospira xianheensis*, *Rhodococcus ruber*, *Gracilibacillus dipsosauri* and a *Microbacterium sp.* were proliferated in a 500-liters semi-industrial fermenter. Then, the microbial cells were dried by the spray-drying method after sedimentation in the fermenter and formulated on the diatomaceous powder as a stabilizing bed. By blending this microbial powder with appropriate nutrient supplements, the final formulation of the oil-degrading microbial powder was produced. A field test was conducted to evaluate the performance of this microbial powder on crude oil contaminated soils in Kharg Island. For this purpose, soils contaminated by heavy crude oil resulting from oil pipeline leakage were examined for 14 days in two separate blocks, including a control block and a bioaugmentation block treated by the petroleum-degrading microbial powder. Reduction of total petroleum hydrocarbons concentration and soil temperature changes were measured during the test period.

*Corresponding Author: Email Address: a_abolhasani@sbu.ac.ir

Results and discussion: The mean of TPH in the first day was 341 mg per gram soil. In the control block, the reduction of petroleum hydrocarbons after 14 days of the experiment was 14.2%, which could be due to the activity of the population of native soil bacteria or due to physico-chemical processes such as evaporation and photo-oxidation. In contrast, in the soil treated with the petroleum-degrading microbial powder, the concentration of hydrocarbons at the end of the test period was reduced by 70.6% to 99 mg per gram soil. These results indicate the very rapid performance of this microbial consortium in the decomposition of hydrocarbons. Also, due to the increased activity of bacteria and degradation of hydrocarbons, soil temperature was increased about 11 degrees Celsius in the block treated with microbial powder. Increasing the temperature of the soil as a result of the activity of bacteria, especially in cold regions or in the cold seasons, can lead to the further increase of soil microbial population's metabolism and increase the biodegradation efficiency. This is especially important in the case of oil pollution in Polar regions.

Conclusion: The results of this study showed that the use of a microbial consortium for the biological treatment of contaminated soils with very high concentrations of petroleum hydrocarbons, such as crude oil spill from oil pipelines, could be beneficial. Also, the use of powdered products is an effective solution due to the ease of operation and independency from complex and expensive equipment. In addition, due to the high level of early population of bacteria that can degrade the oil, the addition of a microbial consortium can increase the temperature of the soil and increase the activity of native soil populations.

Keywords: Bioremediation, Pilot test, Microbial consortium, Powder formulation.