محیط شناسی، سال سی و هشتم، شمارهٔ ۶۱، بهار ۹۱، صفحهٔ ۱-۸

استفاده از میکروارگانیسم‌های بومی در کاهش آلودگی نفتی در خاک پالایشگاه تهران

مریم فراهانی[1*]، سیداحمد میرباقری[2]

۱-استادیار گروه محیط زیست، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رودهن

۲-استاد گروه عمران محیط زیست، دانشگاه صنعتی خواجه نصیر الدین طوسی bagheri@kntu.ac.ir

تاریخ دریافت : ۸۹/۱۰/۷ تاریخ پذیرش: ۹۰/۵/۲۵

چکیده

هیدروکربن‌های نفتی از عمده‌ترین آلاینده‌های اکوسیستم‌های آبی و خاکی در سراسر دنیا محسوب می‌شوند. در تحقیق حاضر برای کاهش هیدروکربن‌های نفتی در خاک آلوده پالایشگاه تهران مطالعه‌ای بر روی روش تجزیه بیولوژیکی صورت گرفت. در نتیجهٔ جداسازی میکرب‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های نفتی از خاک منطقه صورت گرفته و در ادامه، بهینه‌سازی شرایط فیزیکوشیمیایی مؤثر بر تجزیهٔ بیولوژیکی با استفاده از غلظت‌های مختلف سوبسترای نفتی و تغییر مشخصه‌های دما، pH و مواد غذایی انجام شد. در خاتمه نیز با تلقیح میکروارگانیسم‌های جداسازی شده به خاک و تغییر مشخصه‌های محیطی، میزان حذف بیولوژیکی هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای در خاک مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج آزمایش‌ها نشان داد : حداکثر رشد باکتریایی در نسبت ۲۰ درصد آلاینده نفتی، pH ۷/۵ و دمای ۳۰ درجه سانتیگراد مشاهده می‌شود. همچنین با آزمایش بر روی منابع متعدد غذایی مشخص شد؛ بهترین نسبت C:N:P برای اوره، نیترات آمونیوم و سولفات آمونیوم به ترتیب ۱: ۵: ۱۰۰، ۱: ۵ : ۱۰۰ و ۱: ۱۰: ۱۰۰ است. همچنین نتایج نشان داد، روش تجزیهٔ بیولوژیکی قادر است در تیمارهای مورد آزمایش در مدت ۴ هفته بین۳۲/۱٪ تا ۷۰/۵٪ روند کاهش آلاینده‌های نفتی در خاک را بهبود بخشد. بنابراین، استفاده از روش بیولوژیکی برای پاکسازی هیدروکربن‌های نفتی در خاک به دلیل سادگی اجرا، مقرون به صرفه بودن و حذف کامل آلودگی بسیار مناسب بوده و با توجه به تنوع این هیدروکربن‌ها در خاکهای آلوده به مواد نفتی، پیشنهاد می‌شود، تحقیقات مشابه‌ای در سایر پالایشگاههای نفتی انجام گیرد.

کلید واژه

تجزیهٔ بیولوژیکی، هیدروکربورهای نفتی، پالایشگاه تهران، ترکیبات PAH، خاک

سرآغاز

هیدروکربن‌های نفتی از عمده‌ترین آلاینده‌های اکوسیستم‌های آبی و خاکی در سراسر دنیا محسوب می‌شوند. هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای که اختصاصاً PAHs[1] نامیده می‌شوند، گروهی از ترکیبات آلی هستند که دارای ۲ یا چند حلقه بنزن و در بعضی مواقع حلقه‌های آروماتیک هستند. حلقه‌های مجاور توسط دو کربن مشترک با یکدیگر اتصال دارند. منشاء ترکیبات PAH در محیط زیست ناشی از عوامل طبیعی و انسانی است. از آنجایی که ترکیبات PAH دارای خاصیت سرطانزایی و جهش‌زایی بوده و سلامت جامعه را تهدید می‌کنند، حذف آنها از خاک امری ضروری است (Cheney, et al., 2009; Shojaosadati and Hashemi Najafabadi, 2002). پاکسازی آلودگی نفتی خاک به روشهای فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی انجام می پذیرد. روشهای متعددی برای کاهش آثار زیست محیطی آلودگی نفتی توسعه یافته است، ولی مطالعه بر روی روشهای ساده، سریع و ارزانقیمت در این زمینه ضروری است. یکی از بهترین روشهای احیای خاکهای آلوده استفاده از توانایی میکروارگانیسم‌ها در تجزیه ترکیبات سمی، طی فرایند پاکسازی بیولوژیکی است. روش بیولوژیکی به‌صورت طبیعی[2]، تحریک میکربی[3]، تهویه زیستی[4]، افزایش میکربی[5]، مزرعه‌ای[6]، کوددهی[7] و گیاه پالایی[8] قابل انجام است. پاکسازی بیولوژیکی نفت در خاک را می‌توان به‌وسیله تحریک میکروارگانیسم‌های بومی[9]، افزایش مواد غذایی و اکسیژن به خاک یا تلقیح کنسرسیوم‌های میکربی غنی شده[10] به خاک بهبود بخشید. برای بهینه‌سازی شرایط تجزیه زیستی، می‌باید خصوصیات منطقهٔ آلوده قبل از انجام عملیات

نویسنده مسئول: تلفن:۰۹۱۲۶۸۷۶۷۴۴ E-Mail:m_farahani_5@yahoo.com

تصفیه شناسایی شوند. اطلاعات پایه‌ای نظیر: غلظت نفت، دانسیته جمعیت میکروارگانیسم‌های نفت خوار و پتانسیل تجزیه بیولوژیکی جزء عوامل مهمی هستند که می‌باید برای منطقه آلوده به ترکیبات نفتی اندازه‌گیری شوند. عوامل دیگری که در بازدهی این روش مؤثر هستند، عبارتند از: تخلخل زمین، مقدار اکسیژن موجود در حفره‌ها، مواد مغذی برای رشد میکروارگانیسم‌ها (فسفر و نیتروژن)، دمای محیط و pH محیط است. بنابراین در تحقیق حاضر در راستای بررسی فرایندهای مؤثر بر کاهش آلودگی نفتی در ستون خاک و بهینه سازی این فرایندها ، مطالعه بر روی روش تجزیه بیولوژیکی صورت گرفته و با جداسازی میکرب‌های تجزیهٔ ترکیبات PAH از خاک منطقه پالایشگاه تهران و انتخاب کنسرسیوم میکربی مناسب و استفاده از مواد غذایی مختلف، عملیات بهینه سازی انجام گرفت. پالایشگاه تهران واقع در محله باقرشهر در شهرری در جنوب تهران واقع شده است. با توجه به نقشه ۲۵۰۰۰ : ۱ شهر ری، شرکت پالایش نفت تهران حدوداً در موقعیت جغرافیایی ۱۰ ۲۵ ۵۱ طول شرقی و ۳۰ ۳۲ ۳۵ عرض شمالی قرار دارد. در گذشته این بخش در میان روستاهای اطراف که در تأمین مایحتاج کشاورزی آن نقش داشتند، موقعیت ممتازی داشت.

در حال حاضر کوره‌پزخانه‌ها ، کارگاههای سنگ‌بری و تولید مصالح ساختمانی، انبارهای وسیع و بزرگ کالاهای وارداتی، توقفگاهها و تعمیرگاهها، واحدهای کوچک صنایع مصرفی و مجتمع‌های بزرگ صنعتی مانند پالایشگاه نفت و کارخانه سیمان در محل مزارع سابق وجود دارند (ریاحی، ۱۳۷۶). در تحقیق حاضر برای کاربرد روشهای مقرون به صرفه، ساده و با بازدهی بالا برای کاهش هیدروکربورهای نفتی در خاک آلوده پالایشگاه تهران مطالعه‌ای بر روی روش تجزیهٔ بیولوژیکی صورت گرفت.

مواد و روش بررسی

نمونه برداری از خاک و بررسی خصوصیات فیزیکو شیمیایی خاک منطقه

عملیات نمونه برداری از خاک زمین پشت پمپ بنزین پالایشگاه تهران با استفاده از دستکش و قاشقک استریل از خاک سطحی در عمق ۰- ۲۰ سانتیمتری به روش مرکب انجام گرفته و نمونه ها در فانل‌های استریل بر روی یخ در کمتر از ۲ ساعت به آزمایشگاه منتقل شد. شایان ذکر است؛ از آنجایی که زمین مورد نظر دارای بافت هتروژنی است، عملیات نمونه برداری در ۴ جهت مختلف جغرافیایی و مرکز این زمین صورت گرفت و مشخصات ایستگاههای نمونه برداری با استفاده از دستگاه GPS مشخص شد. سپس در آزمایشگاه نمونه‌ها را پس از خشک شدن، با الکی ۲ میلی‌متری الک کرده و بر روی کلیه آنها با ۳ تکرار، آزمایش‌هایی برای اندازه‌گیری مقادیر مشخصه‌های pH، درصد رطوبت اشباع، CEC، موادآلی، بافت خاک، درصد تخلخل، نیتروژن کل و فسفر انجام گرفت (مرکز تحقیقات آب و خاک، ۱۳۸۰).

جداسازی و اندازه‌گیری ترکیبات PAHs در نمونه ها

برای اندازه‌گیری میزان ترکیبات PAH در نمونه‌ها، ابتدا این ترکیبات به‌وسیلهٔ عملیات استخراج با حلال دی‌کلرومتان و استفاده از دکانتوردر مورد نمونه‌های پساب، و دستگاه اولتراسونیک در مورد نمونه‌های خاک، جدا شد.

ترکیبات جداشده در مرحله قبل برای جداسازی حلال و تغلیظ نمونه‌ها، درون روتاری به‌وسیلهٔ خلاء خشک و تغلیظ شدند، سپس به روش کروماتوگرافی ستونی با استفاده از ستون سلیکاژل و آلومینا عملیات خالص‌سازی بر روی آنها انجام شد.

در خاتمه میزان۱۶ ترکیب مختلف از ترکیبات PAH شامل؛ نفتالین، اسنفتالین، اسنفتن، آنتراسن، دی بنز(a,h) آنتراسن، بنزو (a) آنتراسن، کرایزن، فلورن، فنانترن، فلورانتن، پیرن، بنزو (a) پیرن، بنزو (ghi) پیرن، بنزو (b) فلورانتن، بنزو (k) فلورانتین و ایندو (cd-۳،۲،۱) پیرن، در نمونه‌ها با دستگاه HPLC مدل ۵۱۰Waters مجهز به دتکتور فلورسانس و ستون Waters PAH C18 S-5 µm packing materials طبق استاندارد ISO اندازه‌گیری شد و مجموع آنها گزارش شد (Samimi, et al., 2009).

طرز تهیه آلاینده نفتی (سوبسترا)

آلاینده نفتی مورد نظر با استفاده از ته ماندهٔ خلاء در برج تقطیر[11] و نفت خام پالایشگاه تهران به نسبت ۵ درصد تهیه شده و برای انجام آزمایش‌های میکربیولوژیکی به مدت ۵ دقیقه در اتوکلاو استریل شد.

غنی‌سازی میکرب‌های نفت‌خوار در نمونه‌های خاک

برای جداسازی میکرب‌های تجزیه‌کنندهٔ ترکیبات PAH از خاک، ابتدا محیط کشت Oil broth که یک محیط کشت پایه معدنی و فاقد منبع کربن است و حاوی ترکیبات سولفات آمونیم ، سولفات منیزیم، کلرید آهن و عناصر کمیاب بوده و به‌وسیلهٔ بافر فسفاته میزانpH آن ۷ تنظیم می‌شود، تهیه شد (Nweke, et al., 2003). سپس ۴۵ میلی‌لیتر از آن در ارلن‌های ۲۵۰ سی سی ریخته

شده و در اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه استریل شد. در ادامه در شرایط کاملاً استریل ۵ گرم از نمونه‌های خاک به همراه ۵۰۰ میکرو لیتر از آلایندهٔ نفتی (سوبسترا) به آنها اضافه شد و به مدت ۴۸ ساعت در شیکر انکوباتور با دور ۱۸۰ دردقیقه و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد (Hilyard, et al., 2008 ; Meyer, et al.,1999).

بعد از ۴۸ ساعت نمونه‌ها ازشیکر انکوباتور خارج شده و در شرایط استریل یک میلی‌لیتر از آنها بر روی پلیت‌های حاوی محیط کشت Oil broth که با افزایش ۱/۵-۲ درصد اگار - اگار جامد شده بود به‌صورت پورپلیت کشت داده شد و سطح پلیت‌ها با سوبسترای نفتی اسپری شد.

پلیت‌ها برای رشد میکروارگانیسم‌ها بر روی آنها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت نمونه‌ها از انکوباتور خارج شد و برای ادامهٔ آزمایش‌ها خالص‌سازی میکربی استفاده شد.

شایان ذکر است برای غنی‌سازی میکربی یک میلی‌لیتر از باقیمانده محلول‌های داخل ارلن‌ها به ظروف جدید حاوی محیط کشت Oil broth و سوبسترای تازه اضافه و این عملیات تا ۳ مرحله ادامه داده شد (Hilyard, et.al., 2008 ; Meyer, et al.,1999).

درپایان با استفاده از تست‌های مختلف بیوشیمیایی شناسایی باکتری‌های خالص سازی شده صورت گرفت.

بهینه سازی شرایط مؤثر بر رشد میکروارگانیسم های نفت‌خوار

برای به‌دست آوردن شرایط بهینه برای رشد میکروارگانیسم‌های نفت‌خوار ابتدا باکتری‌های جداسازی شده از خاک به میزان 10^{-7} سلول در ارلن‌های جداگانه در حضور۱۰ میلی‌لیتر محیط پایهٔ معدنی استریل و نسبت‌های متفاوت سوبسترای نفتی شامل ۱٪، ۵٪، ۱۰٪، ۲۰٪، ۳۰٪ به مدت ۲۴ ساعت در شیکر انکوباتور در دمای۳۰ درجه سانتیگراد و دور ۱۸۰در دقیقه رشد داده شد و پس از جداسازی فاز نفتی به‌وسیلهٔ ۵ میلی‌لیتر هگزان نرمال میزان رشد میکروارگانیسم‌ها بر حسب دانسیته نوری[۱۲] با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. سپس ۵ عدد از باکتری‌هایی که بیشترین رشد را داشتند انتخاب شده و آزمایش‌های مذکور با تغییر در مشخصه‌های دما، pH تغییر در نوع ماده غذایی و نسبت C:N:P تکرار شد (Hilyard, et al., 2008). محدودهٔ مشخصه‌های مذکور به قرار زیر است:

دما: ۲۵ ، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتیگراد pH ؛ ۶ -۶/۵- ۷ -۷/۵- ۸ ، موادغذایی؛ منبع کربن از اوره ، نیترات آمونیوم و سولفات آمونیوم و منبع فسفر از پتاسیم دی هیدروژن فسفات به نسبت C:N:P : ۱ : ۱۰: ۱۰۰ ، ۵: ۱۰: ۱۰۰، ۱: ۵: ۱۰۰، ۰.۲: ۱: ۱۰۰. در پایان با مقایسهٔ میزان O.D. اندازه‌گیری شده بهترین شرایط برای تجزیهٔ بیولوژیکی ترکیبات PAH با میکروارگانیسم‌های مذکور به‌دست آمد.

تیمارهای مورد آزمایش در تجزیهٔ بیولوژیکی نمونه‌های خاکهای آلودهٔ پالایشگاه تهران

در این بخش سه تیمار مختلف به همراه یک کنترل برای مقایسهٔ روش بیولوژیکی به‌صورت طبیعی (شاهد)، تحریک میکربی و افزایش میکربی تهیه شد. بنابراین در ابتدا از آنجایی که آلودگی در منطقهٔ مورد مطالعه قدیمی بود، خاکهای مورد آزمایش با سوبسترای نفتی به میزان مشخص اسپری شده، به‌طوری که میزان کل کربن آلی در خاک به میزان ۲ درصد رسید.

سپس ۵۰۰ گرم از نمونه‌های خاک در بشرهای استریل یک لیتری ریخته شد و تیمار تحریک میکربی با افزایش سولفات آمونیوم و پتاسیم دی‌هیدروژن‌فسفات به نسبت C:N:P ۱:۱۰:۱۰۰ و تیمار افزایش میکربی علاوه بر شرایط فوق کنسرسیوم میکربی از ۵ عدد از باکتری‌هایی که بیشترین رشد را داشتند نیز تلقیح شد. به‌طوری‌که جمعیت میکربی در خاک این تیمار به میزان 10^{8} باکتری در گرم خاک رسید.

تیمار شاهد نیز بدون افزایش مواد غذایی و میکروارگانیسم به‌منظور بررسی روش بیولوژیکی به‌صورت طبیعی تهیه شد. خاک نمونه کنترل نیز سه مرتبه در اتوکلاو ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه استریل شد. در بشرهای با فویل آلومینیومی استریل بسته شده و تیمارها به مدت ۴ هفته در انکوباتور ۳۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. هر هفته با زیر و رو کردن خاک، نمونه‌ها هوادهی شده و با افزایش ۲۰ میلی لیتر آب مقطر استریل در حد ۶۰ درصد اشباع تنظیم شدند. خاک تیمارها هر هفته به مدت ۴ هفته برای اندازه‌گیری جمعیت میکربی و میزان ترکیبات PAH در آنها نمونه‌برداری شدند.

تجزیه‌وتحلیل‌های آماری

برای انجام تجزیه‌وتحلیل‌های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS از مدل آماری تحلیل واریانس یکطرفه (One-way ANOVA) و تست LSD استفاده شد تا بدین‌وسیله نتایج به‌دست آمده از آزمایش‌های مربوط به تیمارهای مورد بررسی با یکدیگر

مقایسه شده و بهترین تیمار انتخاب شود (Steel and Torrie., 1980).

نتایج

با توجه به نتایج حاصل از آزمایش‌های انجام شده برای اندازه‌گیری مشخصه‌های فیزیکوشیمیایی خاک منطقه که در جدول شمارهٔ (۱) مشاهده می‌شود، خاک مورد استفاده در مطالعات دارای بافت رسی، pH ۷/۴۱و رطوبت اشباع ۲۹/۹۶ است. میزان آلودگی اولیه خاک نسبت به ترکیبات PAH نیز ۴۰۶/۵میکروگرم بر کیلوگرم برآورد شده است. شایان ذکر است همان‌طور که قبلاً ذکر شد از آنجایی‌که آلودگی در منطقهٔ مورد مطالعه قدیمی بود، خاکهای مورد آزمایش با سوبسترای نفتی به میزان مشخص اسپری شد، به‌طوری که مجموع ترکیبات PAH در خاک مورد آزمایش در تیمارها به میزان ۲۱۱۱میکروگرم بر کیلوگرم رسید.

جدول شمارهٔ (۱): مقادیر میانگین حاصل از آزمایش‌ها تعیین خصوصیات فیزیکو شیمیایی خاک منطقه

شماره نمونه	فسفر mg/kg	ازت %	بافت خاک	CEC meq/l	مواد آلی %	رطوبت اشباع %	pH (1:1)
۱	۲۰/۳	۰/۱۴	رسی- لومی	۵۲/۳	۰/۶۰۷	۲۷/۶۸۶	۷/۲۲
۲	۱۹/۳	۰/۱۳	رسی- لومی	۵۱/۵	۱/۱۰۲	۳۰/۴۶۷	۷/۲۵
۳	۱۸/۲	۰/۱۳	رسی	۵۱/۱	۰/۸۰۲	۳۰/۷۶۹	۷/۴۲
۴	۱۵/۶	۰/۰۸	رسی	۵۲/۱	۰/۸۴۰	۳۰/۸۸۴	۷/۴۹
۵	۲۰/۳	۰/۱۳	رسی	۵۲/۴	۰/۵۸۱	۲۷/۳۶۴	۷/۶۴
مخلوط	۲۰/۱	۰/۱۳	رسی	۵۲/۱	۰/۷۳۴	۲۹/۹۶۸	۷/۴۱

عملیات غنی‌سازی تا سه مرحله انجام شد و افزایش کدورت در ارلن‌هایی که حاوی سوبسترای نفتی بودند در مقایسه با ارلن‌های کنترل نشانه رشد میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده ترکیبات PAH بود. پس از انتقال مجموعه‌های رقیق شده مربوط به نتایج غنی‌سازی بر روی پلیت‌های حاوی محیط کشت Oil broth و اسپری کردن آنها با سوبسترای نفتی، ملاحظه رشد کلنی‌های باکتریایی که دارای هالهٔ شفاف در اطراف خود بودند، در مقایسه با پلیت‌های کنترل، امکان انتخاب و جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ ترکیبات PAH فراهم شد.

کلنی‌هایی که دارای اشکال متفاوتی بودند در محیطهای مایع حاوی محیط کشت Oil broth وسوبسترای نفتی تلقیح شدند و اندازه‌گیری و افزایش در میزان O.D. نشان دهنده افزایش روند تجزیه ترکیبات PAH بود. ۵ عدد از باکتری‌هایی که بالاترین توانایی تجزیهٔ ترکیبات PAH را داشتند برای تهیهٔ کنسرسیوم میکربی و شناسایی، انتخاب شدند که نتایج تست‌های مختلف بیوشیمیایی نشان داد که گونه‌های باکتری‌های جداسازی شده متعلق به ۳ گونه مختلف از *Pseudomonas sp* و گونه‌های *Micrococcus sp* و *Bacillus sphaericus* هستند.

نمودار شماره (۱) نشان‌دهندهٔ تأثیر نسبت‌های متفاوت سوبسترای نفتی بر رشد میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده ترکیبات PAH بوده و نمودارهای شمارهٔ (۲) و (۳) نیز به ترتیب اثر دما و pH را بر رشد میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کنندهٔ ترکیبات PAH نشان می‌دهند. همچنین نمودارهای شمارهٔ (۴) الی (۶) اثر نسبت‌های مختلف C:N:P و منابع مختلف نیتروژن (اوره، سولفات آمونیوم و نیترات آمونیوم) بر رشد باکتریایی را نشان می‌دهند.

همان‌طور که قبلاً ذکر شد، با توجه به بهترین شرایط به‌دست آمده برای رشد میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کنندهٔ ترکیبات PAH ، تیمارهایی برای مقایسهٔ روش بیولوژیکی به‌صورت طبیعی (شاهد)، تحریک میکربی و افزایش میکربی طراحی شد، به‌طوری‌که مقایسه تغییرات درصد تجزیه بیولوژیکی ترکیبات PAH نسبت به زمان در این تیمارها در نمودار شماره (۷) و بررسی تغییرات جمعیت باکتری‌های نفتخوار نسبت به زمان در نمودار شمارهٔ (۸) به نمایش گذاشته شده است. بر اساس این نمودارها نتیجه‌گیری می‌شود حداکثر رشد باکتریایی در نسبت ۲۰ درصد آلایندهٔ نفتی مشاهده شده و افزایش بیشتر سوبسترای نفتی به علت ایجاد سمی‌بودن تأثیر منفی بر رشد این باکتری‌ها دارد.

بحث و نتیجه‌گیری

بهینه سازی شرایط مؤثر بر رشد میکروارگانیسم‌های نفت‌خوار

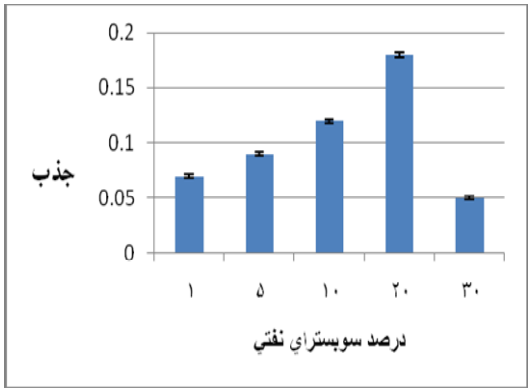
با توجه به نمودار شمارهٔ (۱) نتیجه‌گیری می‌شود حداکثر رشد باکتریایی در نسبت ۲۰ درصد آلایندهٔ نفتی مشاهده شده و افزایش بیشتر سوبسترای نفتی به علت ایجاد سمی‌بودن تأثیر منفی بر رشد این باکتری‌ها دارد. همچنین نمودار شمارهٔ (۲) نشان می‌دهدکه در

دمای ۳۰ درجه سانتیگراد بیشترین رشد باکتریایی مشاهده می‌شود. این نتایج تأییدی است بر یافته‌های محققان پیشین همچون Olivera و همکاران (Olivera, et al., 2003).

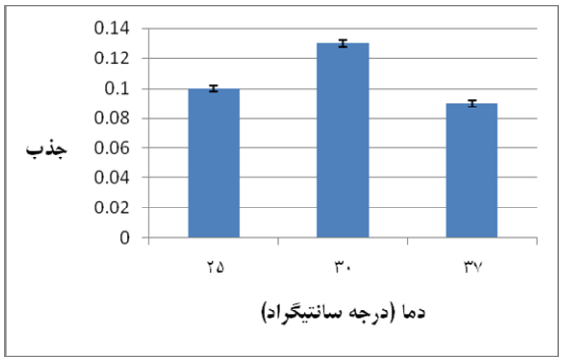
آنها عنوان کردند که ارتباط مستقیمی بین کاهش درصد تجزیهٔ بیولوژیکی و کاهش دما وجود دارد و این در حالی است که افزایش دما باعث افزایش نرخ سوخت‌وساز هیدروکربورها تا حداکثر می‌شود. بنابراین همچنان که قبلاً بیان شد؛ دما از طریق اثر بر روی طبیعت فیزیکی و شیمیایی نفت و نیز سرعت کاتابولیسم هیدروکربن و میزان اکسیژن بر تجزیه بیولوژیکی آلودگی نفتی اثر می‌گذارد (Dibble and Bartha , 1979).

در دماهای پایین فعالیت آنزیم‌ها بسیار کم می‌شود و با افزایش دما در محدودهٔ ۲۵ تا ۴۰ درجهٔ سانتیگراد متابولیسم هیدروکربن‌ها افزایش یافته و باکتری‌های بسیاری در این محدوده قادر به رشد و تجزیه بیولوژیکی هیدروکربن‌ها هستند و در دماهای بالاتر به‌خاطر آثار سمی هیدروکربن‌ها روی غشای میکروارگانیسم‌ها، تجزیه آلودگی نفتی کاهش می‌یابد.

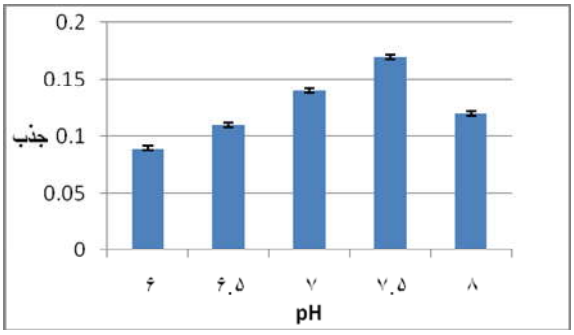
همان‌طور که قبلاً بیان شد، تعیین و کنترل pH خاک در بهینه سازی سرعت فرایند تجزیه بیولوژیکی با میکروارگانیسم‌ها ضروری است (Olivera, et al., 2003). با توجه به نمودارشمارهٔ (۳) که اثر تغییرات pH بر میزان رشد باکتریایی را نشان می‌دهد، مشخص می‌شود. حداکثر رشد باکتریایی در شرایط آزمایش‌ها انجام شده در pH ۷/۵ مشاهده می‌شود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت در pH حدود خنثی، فعالیت میکروارگانیسم‌های فوق بهتر صورت می‌گیرد.



نمودار شمارهٔ (۱): بررسی اثر میزان آلاینده‌های نفتی بر رشد باکتریایی (منبع: نگارندگان)



نمودار شمارهٔ (۲): بررسی اثر دما بر رشد باکتریایی



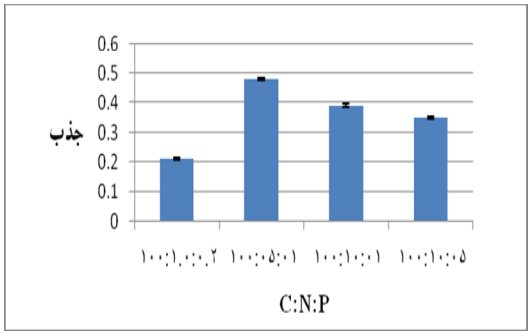
نمودار شمارهٔ (۳): بررسی اثر میزان pH بر رشد باکتریایی

(منبع: نگارندگان)

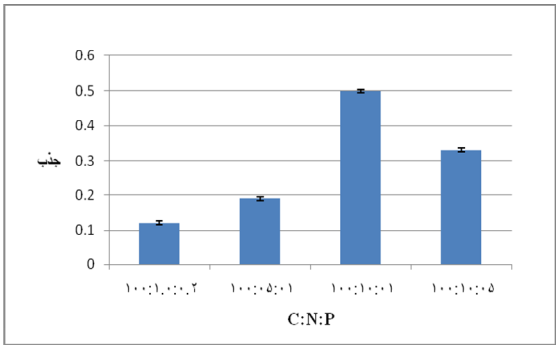
همان‌طور که متذکر شدیم، هیدروکربن‌های نفتی دارای غلظت‌های بسیار کمی از ترکیبات معدنی هستند و با وارد شدن آنها به خاک نسبت کربن به نیتروژن و کربن به فسفر تا حدی زیاد می‌شود و در نتیجهٔ رشد میکروارگانیسم‌ها در این شرایط محدود می‌شود. تنظیم و تعدیل نسبت کربن به نیتروژن و کربن به فسفر به فرم تقویت‌کننده‌ها نظیر اوره، سولفات آمونیوم، پتاسیم هیدروژن فسفات و .... که سبب تحریک و افزایش تجزیه بیولوژیکی نفت خام و هیدروکربن‌های اختصاصی دیگر می‌شود، بستگی دارد (Dibble and Bartha , 1979). به هر حال استفاده از مواد تقویت‌کننده برای حذف آلودگی نفتی مؤثر و مفید بوده و بهینه‌سازی نوع و مقدار مواد افزودنی که از نظر اقتصادی مقرون به صرفه باشد، مبحثی است که محققان باید بررسی و تکمیل کنند (Zhou and Crawford, 1995; Ting, et. al., 1999; Sarkar, et al., 2005).

با مروری بر تحقیقات گذشته مشخص می شود که محققان مختلف نسبت‌های متفاوتی را برای نسبتN:P: ارائه داده‌اند، و در این زمینه توافق نظر کاملاً مشخصی وجود ندارد. پس از آنجایی که ارگانیسم‌های مختلف، نوع و میزان متفاوتی از نیتروژن و فسفر را نیاز دارند، لازم است در بررسی فرایند تجزیهٔ بیولوژیکی نسبت و

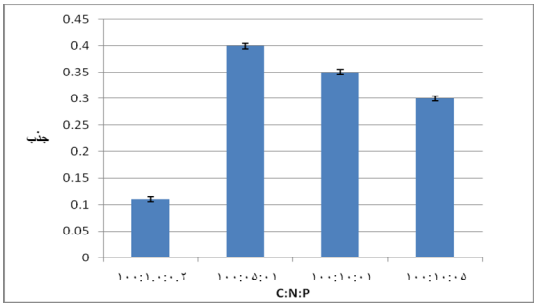
نوع ماده غذایی بهینه مورد بررسی قرار گیرد (Zhou and Crawford, 1995; Ting, et al., 1999; Sarkar, et al., 2005). باتوجه به نمودارهای شمارهٔ (۴ تا ۶) که اثر نسبت‌های مختلف C:N:P و منابع مختلف نیتروژن (اوره، سولفات آمونیوم ونیترات آمونیوم) بر رشد باکتریایی را نشان می‌دهد، مشخص می‌شود؛ بهترین نسبت C:N:P برای اوره، نیترات آمونیوم و سولفات آمونیوم به ترتیب ۱: ۵: ۱۰۰، ۱: ۵ : ۱۰۰ و ۱: ۱۰: ۱۰۰ است. بنابراین سولفات آمونیوم و پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات به نسبت C:N:P ۱ : ۱۰: ۱۰۰ به‌عنوان منبع نیتروژن و فسفر در تیمارهای مورد بررسی اعمال شد.



نمودار شمارهٔ (۴): بررسی اثر میزان مواد غذایی (اوره) بر رشد باکتریایی (منبع: نگارندگان)



نمودار شمارهٔ (۵): بررسی اثر میزان مواد غذایی (سولفات آمونیوم) بر رشد باکتریایی (منبع: نگارندگان)



نمودار شمارهٔ (۶): بررسی اثر میزان مواد غذایی (نیترات آمونیوم) بر رشد باکتریایی (منبع: نگارندگان)

الگوی تجزیهٔ بیولوژیکی ترکیباتPAH در تیمارهای مورد بررسی

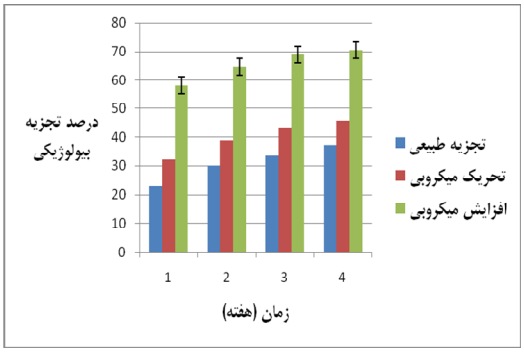
بااستفاده از رابطهٔ زیر درصد تجزیهٔ بیولوژیکی در تیمارهای مختلف محاسبه شد؛

[(میزان ترکیباتPAH در نمونهٔ کنترل – میزان ترکیبات PAH در تیمار مورد بررسی) / میزان ترکیباتPAH در نمونه کنترل] x ۱۰۰

مقایسهٔ تغییرات درصد تجزیهٔ بیولوژیکی ترکیبات PAH نسبت به زمان در تیمارهای مورد بررسی در نمودار شمارهٔ (۷) به نمایش گذاشته شده است. بر اساس این نتایج میزان تجزیه بیولوژیکی ترکیبات PAH ، زمانی که از تجزیهٔ بیولوژیکی به روش افزایش میکربی استفاده شده است بین ۵۸/۲ تا ۷۰/۵ درصد مشاهده شده است. این در حالی است که تأثیر روش تحریک میکربی بین ۳۲/۱ تا ۴۵/۷ و اثر تجزیهٔ بیولوژیکی به روش طبیعی بین ۲۲/۹ تا ۳۷/۲ درصد بوده است. همچنین با توجه به این نمودار میزان تجزیه بیولوژیکی ترکیبات PAH در تمامی تیمارها با توجه به افزایش زمان انکوباسیون افزایش یافته و حداکثر تجزیهٔ بیولوژیکی این ترکیبات در هفته چهارم در تیمار افزایش میکربی ۷۰/۵ درصد و در تحریک میکربی ۴۵/۷ درصد و در روش تیمار شاهد (طبیعی) ۳۷/۲ درصد بوده است. همچنان‌که قبلاً ذکر شد، برای انجام تجزیه‌وتحلیل‌های آماری از مدل آماری تحلیل واریانس یکطرفه استفاده شد تا تفاوت بین روند تغییرات غلظت ترکیبات PAH و توانایی حذف این ترکیبات در خاک در تیمارهای مختلف با یکدیگر مقایسه شده و بهترین تیمار انتخاب شود.

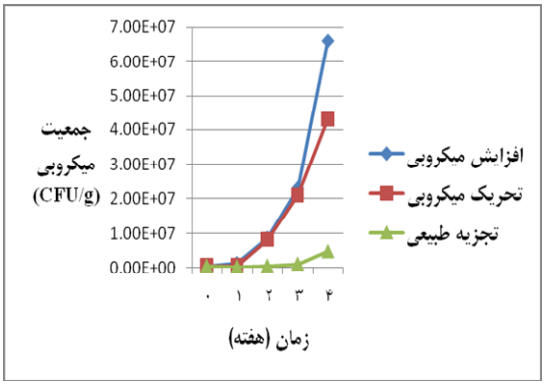
با توجه به نتایج آزمون آماری مشخص شد، در سطح معنی‌داری ۰/۰۵و احتمال ۹۵ درصد ($p<0.05$) اختلاف معنی‌داری بین تیمار افزایش میکربی و دو تیماردیگر وجود دارد که نشان‌دهندهٔ آن است که افزایش کنسرسیوم باکتری‌های انتخاب شده سرعت تجزیه بیولوژیکی ترکیبات PAH در خاک را افزایش می‌دهد. شایان ذکر است این نتایج با نتایج تحقیقات سایر پژوهشگران قبلی همچون Sarkar و همکاران (2005); (Bento, et al., 2005) (Cheney, et al., 2009 که در سال ۲۰۰۹ انجام یافته است، مطابقت داشته و مبین آن است که روش تأثیر افزایش همزمان مواد غذایی و تلقیح جمعیت میکربی مناسب به خاکهای آلوده به مواد نفتی مؤثرتر از افزایش مواد غذایی مورد نیاز میکروارگانیسم‌هاست. همچنین نتایج تجزیه‌وتحلیل‌های آماری نشان داد که تفاوت

معنی‌داری ($p<0.05$) بین سرعت تجزیهٔ بیولوژیکی ترکیبات PAH در تیمار تحریک میکربی و تجزیه بیولوژیکی طبیعی وجود ندارد، به این مفهوم که ؛ افزایش مواد غذایی بتنهایی اثر معنی‌داری بر سرعت تجزیهٔ بیولوژیکی ترکیبات PAH در خاک ندارد. همچنین نمودار شمارهٔ (۷) نشان‌دهندهٔ آن است که اگرچه میزان تجزیه بیولوژیکی ترکیبات PAH در تمامی تیمارها، با توجه به افزایش زمان انکوباسیون افزایش یافته است ولی بیشترین سرعت تجزیهٔ بیولوژیکی این ترکیبات در هفته اول مشاهده شده است. این مطلب را می‌توان این‌طور توجیه کرد که ابتدا میکروارگانیسم‌های نفت‌خوار مصرف تجزیهٔ ترکیبات آلی سبک‌تر افزایش یافته سرعت تجزیهٔ بیولوژیکی بالایی در پی دارد و با گذشت زمان و کاهش در ترکیبات PAH سبک‌تر، روند تجزیهٔ بیولوژیکی آلاینده نیز کاهش می‌یابد. این مطلب با توجه به بررسی تغییرات جمعیت باکتری‌های نفتخوار نسبت به زمان که در نمودار شمارهٔ (۸) ارائه شده است تأیید می‌شود. نتایج تجزیه‌وتحلیل‌های آماری نیز مبین آن است که در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ و احتمال ۹۵ درصد ($p<0.05$) اختلاف معنی‌داری بین جمعیت باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ ترکیبات PAH در تیمار افزایش میکربی و دو تیمار دیگر وجود داشته اما اختلاف جمعیت باکتریایی بین تیمار تحریک میکربی و تیمار شاهد معنی‌دار نیست. همچنین با توجه به نمودار شمارهٔ (۸) بیشترین سرعت رشد باکتریایی در هفتهٔ اوّل انکوباسیون مشاهده شده و این در حالی است که در تیماری که از تجزیهٔ بیولوژیکی به روش افزایش میکربی استفاده شده است، حداکثر جمعیت باکتریایی مشاهده می‌شود. در مجموع نتایج نشان‌دهندهٔ آن است که افزایش جمعیت باکتریایی با کاهش غلظت ترکیبات PAH به‌طور همزمان، در ارتباط بوده است.



نمودار شمارهٔ (۷): مقایسهٔ تغییرات درصد تجزیه بیولوژیکی ترکیبات PAH نسبت به زمان در تیمارهای مختلف

(منبع: نگارندگان)



نمودار شمارهٔ (۸): مقایسه تغییرات جمعیت باکتری‌های نفت‌خوار نسبت به زمان در تیمارهای مختلف (منبع: نگارندگان)

با توجه به نتایج تحقیق حاضر مشخص شد حداکثر رشد باکتریایی در نسبت ۲۰ درصد آلایندهٔ نفتی، pH ۷/۵ و دمای ۳۰ درجه سانتیگراد مشاهده می‌شود. همچنین با آزمایش بر روی منابع متعدد غذایی و نسبت‌های مختلف C:N:P مشخص شد بهترین نسبت C:N:P برای اوره ، نیترات آمونیوم و سولفات آمونیوم به ترتیب ۱: ۵: ۱۰۰، ۱: ۵ : ۱۰۰ و ۱: ۱۰: ۱۰۰ است. همچنین نتایج نشان داد، روش تجزیهٔ بیولوژیکی قادر است در تیمارهای مورد آزمایش در مدت ۴ هفته بین ۳۲/۱ تا ۷۰/۵ درصد روند کاهش آلاینده‌های نفتی را در خاک بهبود بخشد. بنابراین، استفاده از روش بیولوژیکی برای پاکسازی هیدروکربن‌های نفتی در خاک به دلیل سادگی اجرا، توانایی کاربرد در بسیاری از مناطق، مقرون به صرفه بودن و حذف کامل آلودگی بسیار مناسب بوده و با توجه به تنوع هیدروکربن‌های نفتی در خاکهای آلوده، پیشنهاد می‌شود، تحقیقات مشابه‌ای در سایر پالایشگاههای نفتی بر روی جداسازی و بهینه‌سازی شرایط کشت میکروارگانیسم‌های طبیعی که توانایی آنزیمی بیشتری از میکروارگانیسم‌های دیگر دارند، انجام گیرد.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر از نظر مالی به‌وسیلهٔ شرکت پالایش نفت تهران حمایت شده است و نویسندگان بدین‌وسیله از مدیریت عامل محترم این شرکت و مدیر محترم اداره پژوهش و توسعه این شرکت و سایر پرسنل محترم این اداره کمال تشکر و قدردانی را به‌عمل می‌آورند.

یادداشت‌ها

1-Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)
2-Natural Attenuation
3-Biostimulation
4-Bioventing
5-Bioaugmentation
6-Landfarming

10-Bioaugmentation
11-Vacuum bottom
12-Optical density (OD)

7-Composting
8-Phytoremediation
9-Biostimulation

منابع مورد استفاده

ریاحی، م.ع.۱۳۷۶. تشخیص محل آلودگی نفتی خاک و اثرگذاری آن روی منبع آب منطقهٔ کهریزک تهران، سمینار حفاظت از منابع آب آشامیدنی.

مرکز تحقیقات آب و خاک. ۱۳۸۰. دستور کار آزمایش‌های خاک .

Bento,F.M., et al .2005. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation., Bioresource Technol. 96: 1049-1055.

Cheney,M.A., et al .2009. A comparative study on the uptake of poly aromatic hydrocarbons by Anodonta californiensis., Environ. Pollut. 157: 601-608

Dibble,J.T. , R.,Bartha .1979. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge., Appl. and Environ. Micro. 37: 729-739.

Hilyard,E.J., et al .2008. Enrichment, Isolation, and Phylogenetic Identification of Poly Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacteria from Elizabeth River Sediments., Appl. Environ. Micro. 74: 1176-1182.

Meyer,S., et al .1999. Differential detection of key enzymes of poly aromatic-hydrocarbon-degrading bacteria using PCR and gene probs., Microbiology. 145: 1731-1741.

Nweke,C.O., G.C.,Okpokwasili, .2003. Drilling fluid base oil biodegradation potential of a soil Staphylococcus species. Afr J Biotechnol. 2 (9): 293-295.

Olivera,N. L., et al .2003. Microbial characterization and hydrocarbon biodegradation potential of natural bilge waste microflora., J. Ind. Microbiol. Biotechnol .30(9): 542-548

Samimi,S.V., R.,Akbari Rad, and F.,Ghanizadeh .2009. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons contamination level in collected samples from vicinity of a highway., Iran. J. Environ. Health. Sci. Eng. 6(1): 41-52.

Sarkar,D., et al .2005. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: Comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation., Environ. Pollut. 136: 187-195.

Shojaosadati,S.A., S.,Hashemi Najafabadi .2002. Bioremediation of Hydrocarbon Polluted Soil., Int. J. Eng. Sci. 13-18

Steel,R.G., J.H.,Torrie .1980. Principle and procedures of statistics, McGraw-Hill Book Co., New York,.

Ting,Y.P., et al .1999. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in soil microcosms. Resource. Environ. Biotechnol, 2: 197-218.

Zhou,E. , R.,Crawford. 1995. Effect of oxygen, nitrogen, and temperature on gasoline biodegradation in soil., Biodegradation. 6: 127-140.