مقایسه روش‌های زیستی و شیمیایی در پالایش یک خاک آلوده به نفت خام

محبوبه ورناصری قندعلی[۱]، *عبدالامیر معزی[۲] و نعیمه عنایتی‌ضمیر [۳]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه مهندسی علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز

۲-دانشیار گروه مهندسی علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز

۳- استادیار گروه مهندسی علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۳/۰۹/۱۵

پذیرش نهایی: ۱۳۹۴/۰۶/۱۷

کلمات کلیدی:

آلودگی،

باکتری،

زیست پالایی،

سورفکتانت،

هیدروکربن‌های نفتی

*** عهده دار مکاتبات**

E-mail: moezzi251@gmail.com

چکیده

بخاطر گستردگی توزیع، سمیت و سرطان‌زایی، هیدروکربن‌های نفتی جز آلاینده‌های خطرناک بوده و حذف این آلاینده‌ها از خاک یک چالش بزرگ محسوب می شود. بر این اساس هدف از این پژوهش بررسی روش‌های شیمیایی و بیولوژیکی به منظور حذف نفت خام از خاکی با آلودگی مصنوعی است. در این مطالعه اثر باکتری‌های سودوموناس پوتیدا و باسیلوس لاتروسپروس به صورت کشت خالص و مخلوط($۱۰^{۸}$ باکتری در هر گرم خاک) و همچنین سورفکتانت غیریونی توئین ۲۰(دو درصد وزنی) بر حذف نفت خام(دو درصد وزنی/وزنی)از خاک بررسی شد. نتایج نشان داد تیمار شاهد با ۲/٤ درصد و تیمار کنسرسیوم میکروبی+توین ۲۰ با ۷۸ درصد حذف نفت خام به ترتیب کمترین و بیشترین میزان حذف را به خود اختصاص دادند. همچنین مشخص شد که کنسرسیوم باکتریهای سودوموناس پوتیدا و باسیلوس لاتروسپروس از کشت خالص این باکتری‌ها با ٦٥ درصد حذف نفت خام، کارآمدتر است. بر اساس نتایج به دست آمده باکتری سودوموناس پوتیدا نسبت به باکتری باسیلوس لاتروسپروس توانایی بیشتری در حذف نفت خام دارد. همبستگی مثبت و معنی داری در سطح یک‌درصد بین مقادیر تنفس و کربن زیست‌توده میکروبی‌خاک با درصد حذف نفت خام به دست آمد. بالاترین میزان کربن زیست توده و تنفس خاک به ترتیب با میانگین $mgCgdm^{-1}$ ۰/٦۳۰ و $mgCO_2/g.day$ ۰/۵۳٦ درتیمار کنسرسیوم میکروبی و سورفکتانت و کمترین مقدار تنفس و کربن زیست توده میکروبی به ترتیب با $mgCO_2/g.day$ ۰/۱۷۲ و $mgCgdm^{-1}$ ۰/۱۱۸ مربوط به تیمار شاهد بود. بر اساس نتایج حاصل از این آزمایش روش زیست پالایی نسبت به روش شیمیایی بر حذف هیدروکربن‌های نفتی موثرتر است.

مقدمه

جامعه پیشرفته امروز هم چنان به استفاده از هیدروکربن های نفت خام برای تولید انرژی مورد نیاز تکیه دارد. با وجود پیشرفت های اخیر فن‌آوری، آلودگی خاک در اثر نشت تصادفی نفت خام و محصولات تصفیه شده آن به طور مکرر در طی عملیات معمول استخراج، حمل و نقل، ذخیره سازی، پالایش و توزیع رخ می دهد(۴۶). بنابراین آلودگی محیط زیست توسط نفت خام و مشتقات آن یک مشکل جدی در سراسر جهان است. به طورکلی تجمع آلاینده ها در خاک می تواند اثرات مخربی بر محیط زیست و سلامت انسان داشته باشد .آلاینده های موجود در خاک می توانند وارد زنجیره غذایی شده و سلامت حیوان و انسان را با خطر جدی مواجه سازد(۲۰). به نقل از محسن-زاده و همکاران روش‌های متعددی برای از بین بردن آلودگی نفتی به کار برده شده است. 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 زیست توده و...) می‌باشند(۲۳). خاک‌شویی با سورفکتانت از روش‌های شیمیایی است که برای تصفیه خاک‌های آلوده به فلزات سنگین،هیدروکربن‌های ارماتیک چندحلقه‌ای[1]، آفت کشها، مواد آلی نیمه فرار و PCB_S[2] کاربرد دارد(۱۸). سورفکتانت‌ها معمولا ترکیبات‌آلی هستند که دارای گروه‌های هیدروفوبیک (دم) و هیدروفیلیک(سر) می‌باشند. این خاصیت آنها باعث می‌شود هم با آب و هم با حلال آلی ترکیب شوند(۲۴). توین[3]۲۰ و توین۸۰ از سورفکتانتهای غیریونی به ترتیب با فرمول شیمیایی $C_{64}H_{124}O_{26}$ و $C_{58}H_{114}O_{26}$ هستند. توین۸۰ از اسیداولوئیک و پلی‌اتوکسیلات و توین۲۰ از اسیدلوریک و پلی‌اتوکسیلات مشتق شده‌اند. این سورفکتانت‌ها مایعی زرد رنگ با ویسکوزیته بالا هستند که قابل حل در آب بوده(۱۳) و در صنایع مختلفی مانند تهیه لوازم آرایشی و بهداشتی کاربرد وسیعی دارند(۴۲). همچنین به دلیل پایداری بالا و نسبتا غیرسمی بودن در تحقیقات حذف مواد آلی به روش خاک‌شویی مورد توجه بوده‌اند(۱۳،۳۵،۳۷). یه[4] و همکاران(۴۳) با بررسی سمیت و قابلیت تجزیه‌زیستی برخی-سورفکتانت‌های غیریونی مانند توین۲۰، توین۶۰، توین۸۰، تریتون۱۰۰ و... به‌این نتیجه رسیدند که سورفکتانت توین۲۰ دارای حداقل بازدارندگی برای ریزموجودات بوده و قابل تجزیه می‌باشد. با توجه به محدودیت‌ها و معضلات روش‌های فیزیکی و شیمیایی مرسوم برای حذف و یا کاهش غلظت آلاینده‌های نفتی در خاک، استفاده از روش‌های زیستی که با محیط‌زیست سازگار هستند، توصیه شده است(۳۶). زیست پالایی (کنترل، کاهش یا حذف آلودگی از محیط‌زیست با استفاده از فعالیت‌های بیولوژیکی)، روشی مفید و مؤثر در اصلاح این عارضه است. در این روش ریزجانداران از مواد هیدروکربنی به‌عنوان منبع کربن و انرژی استفاده کرده و آن‌ها را به آب و دی اکسید کربن تبدیل می‌نماید، حاصل این فرایند کاهش کل هیدروکربن‌های نفتی موجود در خاک است(۶).

اصولاً ریزجانداران با کمک ۳ فرآورده اصلی قادر به تجزیه هیدروکربن‌های نفتی می‌باشند. ریزجانداران با تولید آنزیم‌های چون مونواکسیژناز و دی اکسیژنازها قادر به تجزیه تجزیه هیدروکربن‌های نفتی هستند. فرآورده‌های حاصل از فعالیت این آنزیم‌ها بر روی هیدروکربن‌های نفتی، الکل‌ها هستند، که با سنجش میزان الکل‌ها می‌توان به مقدار تجزیه هیدروکربن‌های نفتی پی برد. بسیاری از ریزجانداران قادرند با استفاده از هیدروکربن‌ها به‌عنوان منبع کربن و انرژی، اسیدها و حلال‌های مختلف نظیر استون، بنزن و اسید اگزالواستیک تولید کنند که باعث حل شدن هیدروکربن‌های‌نفتی می‌شوند.

از دیگر ابزارهای کارامد ریزجانداران در استفاده از هیدروکربن‌های نفتی به‌عنوان سوبسترا، تولید بیوسورفکتانت جهت افزایش قابلیت‌دسترسی بیولوژیکی این آلودگی‌ها است(۳۹). بر این اساس هدف از پژوهش حاضر پالایش

1- Polycyclic aromtic hydrocarbons
2- Polychlorinated biphenyls
3- Tween(Polyoxyethylene sorbitan monolaurate)
4- Yeh

خاک آلوده به نفت خام با روش‌های زیستی و شیمیایی و مقایسه کارایی این روشها در حذف نفت خام از خاک است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و آماده‌سازی خاک

نمونه‌برداری از عمق ۳۰-۰ سانتی‌متری خاک اطراف میدان نفتی مارون اهواز که آلوده به نفت نبود، انجام و نمونه ها پس از هواخشک کردن و عبور از الک دو میلی‌متری با مقادیر ۲ درصد وزنی نفت خام چاه شماره۶۹ میدان نفتی مارون، به‌طور مصنوعی آلوده شدند. نفت خام با نسبت ۵:۱ در استون حل و بر روی خاک اسپری گردید. برای توزیع یکنواخت و جذب سطحی آلاینده‌ها نمونه‌ها به مدت دو هفته در دمای آزمایشگاه نگهداری و طی این مدت خاک‌ها در حد ۶۵ درصد رطوبت زراعی نگهداری و کاملاً به هم زده شدند.

اندازه‌گیری خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک

بافت خاک به روش هیدرومتری(۱۲)، واکنش خاک با استفاده از دستگاه pH متر درگل اشباع (۳۸)، هدایت الکتریکی درعصاره اشباع (EC_e) توسط دستگاه هدایت‌سنج اندازه‌گیری شد(۳۲). نیتروژن کل به روش کجلدال(۴)، فسفرقابل جذب به روش اولسن (۱۱)، مقدار ماده آلی به روش والکی و بلاک (۴۱)،زیست‌توده میکروبی خاک به روش تدخین-انکوباسیون(۴۰) و تنفس میکروبی خاک به روش تیتراسیون با اسید (۲)تعیین شد.

ریزجانداران مورد استفاده

باکتری‌های مورد استفاده در این پژوهش(باسیلوس لاتروسپروس[1] و سودوموناس پوتیدا[2]۱۶۹۴) به ترتیب از کلکسیون میکروبی گروه بیولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز و سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند.

آماده کردن مایه تلقیح باکتری‌های سودوموناس پوتیدا و باسیلوس لاتروسپروس

به منظور تهیه مایه تلقیح ابتدا از هرکدام از باکتریهای-سودوموناس پوتیدا و باسیلوس لاتروسپروس بطور جداگانه در ارلن های حاوی محیط کشت مایع مغذی تلقیح و به مدت ۱۸ساعت در شیکرانکوباتور با دور rpm ۲۵۰ و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. سپس ۵ درصد از محیط کشت حاوی باکتری‌های مذکور به محیط کشت جدید (به‌منظور جوان‌سازی باکتری‌ها) منتقل شدند. از مرحله رشد نمایی باکتریها جهت تلقیح به خاک استفاده شد.

آماده‌سازی تیمارها و تلقیح باکتری‌ها

آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد.

فاکتورهای مورد بررسی شامل چهار سطح تلقیح میکروبی(سودوموناس پوتیدا، باسیلوس لاتروسپروس، کنسرسیومسودوموناس پوتیدا و باسیلوس لاتروسپروس و شاهد بدون تلقیح میکروبی) و دو سطح سورفکتانت شیمیایی توین ۲۰ (صفر و دو درصد وزنی/ وزنی) بود. صدگرم خاک‌آلوده‌ی نفتی را به درون ظروف تمیز ریخته و هرکدام از باکتری‌های سودوموناس پوتیدا و باسیلوس لاتروسپروس، به مقداری به هر تیمار اضافه شد که جمعیت میکروبی در حدود 10^8 باکتری در گرم‌خاک باشد. برای تیمار سورفکتانت، به میزان ۲ درصد (وزنی/وزنی) توئین ۲۰ به ۱۰۰ گرم خاک اضافه شد. برای تیمار کنسرسیوم میکروبی، باکتریهای سودوموناس پوتیدا و باسیلوس‌لاتروسپروس به نسبتی باهم مخلوط شدند که درمجموع جمعیت آن‌ها به 10^8 باکتری در گرم خاک رسید. تیمارها به مدت ۴۵ روز در دمای ۲۷-۲۵درجه‌سلسیوس قرار گرفتند. در این مدت خاک‌ها هر چند روز یک‌بار هوادهی و با آب مقطر آبیاری شدند به‌طوری‌که میزان رطوبت خاک در حد ۶۵ درصد ظرفیت زراعی نگه‌داری شد.

بررسی میزان حذف کل هیدروکربن‌های نفتی (TPHs[3])

به منظور تعیین مجموع هیدروکربن‌های نفتی (TPHs) باقی‌مانده، ۱ گرم خاک با ۱۰ میلی‌لیتر دی کلرومتان مخلوط

1- Bacillus laterosporous
2- Psedoumonas putida1694
3- Total Petroleum Hydrocarbons

و به مدت ۵ دقیقه تکان داده شد. سپس به مدت ۵ دقیقه باشدت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید.

از محلول رویی یک میلی‌لیتر برداشت و به ظرف شیشه‌ای منتقل گردید و ۴۸ ساعت در هوای آزمایشگاه قرار داده شد تا دی کلرومتان تبخیر گردد. پس از ۴۸ ساعت، مقدار باقی‌مانده در ظرف توزین و به‌عنوان TPHs برحسب میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک‌مشخص گردید(۹). تنفس و کربن زیست توده میکروبی خاک در ابتدا و انتهای آزمایش اندازه گیری شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌های آزمایش بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی توسط نرم افزار SASنسخه ۹/۱ تجزیه و مقایسه میانگین با آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه‌ی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاکی که با ۲ درصد وزنی نفت آلوده شده بود(قبل از اعمال تیمار میکروبی و شیمیایی) در جدول ۱ آمده است.

نتایج حاصل از تجزیه آماری و جدول تجزیه واریانس(جدول۲) نشان داد که اثرباکتری، سورفکتانت و برهمکنش آنها برحذف هیدروکربن‌های نفتی، تنفس و کربن زیست‌توده میکروبی‌خاک در سطح احتمال یک درصد معنی دار است.

مقایسه میانگین(شکل۱) اثر تیمارهای مختلف بر زیست پالایی خاک آلوده‌ی نفتی نشان داد که - تیمارکنسرسیوم‌میکروبی+سورفکتانت با حذف ۷۸ درصد از کل هیدروکربن‌های نفتی بیشترین اثر را بر زیست پالایی خاک داشته است که اختلاف معنی داری با سایر تیمارها داشت. تیمار شاهد با ۲/۴ درصد کمترین میزان حذف را در بین تیمارها نشان داد.

جدول(۱) برخی خصوصیات خاک مورد مطالعه
Table (1) The selected properties of the experimental soil

بافت خاک (Soil texture)	Sandy clay loam
EC (dS/m)	8.02
pH	7.65
OC (%)	6.08
TN (%)	0.52
C/N	11.69
فسفر قابل دسترس P_{ava} (ppm)	2.7
کربن ریست‌توده میکروبی (Microbial biomass Carbon) ($mgCgdm^{-1}$)	0.091
تنفس خاک (Soil respiration) ($mgCO_2/day.g$)	0.163

همچنین نتایج نشان داد تیمار کنسرسیوم میکروبی باکتری‌های سودوموناس پوتیدا و باسیلوس لاتروسپروس با ۶۵ درصد حذف TPH اختلاف معنی داری نسبت به تلقیح جداگانه هر کدام از این باکتریها و شاهد داشت، بعد ازکنسرسیوم میکروبی، تلقیح جداگانه هر کدام از باکتریهای سودوموناس‌پوتیدا و باسیلوس‌لاتروسپروس به ترتیب با ۵۹ و ۵۲ درصد حذف در رتبه های بعدی قرار گرفتند و سورفکتانت با ۳۳ درصد حذف TPH رتبه آخر را به خود اختصاص داد. بر اساس نتایج بدست آمده تیمار سورفکتانت+کشت‌خالص هرکدام از باکتریهای سودوموناس‌پوتیدا و باسیلوس لاتروسپروس به ترتیب با ۷۱ و ۶۸ درصد حذف اثر معنی‌داری بر تجزیه زیستی داشتند و در سطح احتمال یک درصد با شاهد اختلاف معنی دار نشان دادند. نتایج این آزمایش نشان داد که تلقیح باکتری به خاک-آلوده‌نفتی، اثرمعنی‌داری بر حذف هیدروکربن‌های‌نفتی دارد. باکتری‌های تجزیه‌کننده می‌توانند از طریق افزایش حلالیت بخش غیرقابل دسترس آلاینده‌ها به واسطه ترشح بیوسورفکتانت‌ها باعث افزایش تجزیه آلاینده شوند(۲۰). نتایج بدست آمده حاکی از توانایی تیمار باکتری سودوموناس پوتیدا در تجزیه و کاهش آلودگی نفتی(TPHs) است. جنسسودموناس از معمول باکتری‌هایی است که در اغلب گزارش‌های مربوط به تجزیه‌ی‌زیستی وجود دارد(۲۱). در واقع باکتری‌های بسیاری با قدرت تجزیه ترکیبات نفتی جداسازی شده‌اند، ولی گونه‌های سودوموناس به به عنوان توانمندترین گونه‌های برجسته و شاخص شناخته شده‌اند و حضور آنها در اغلب شرایط محیطی، عامل مهمی است که استفاده از آنها را در اغلب محیط‌ها ممکن می‌سازد(۲۷ و ۲۸). این باکتری‌ها در حضور اکسیژن(به عنوان پذیرنده الکترونی) و از راه‌های بیوشیمیایی، مواد آلی را تجزیه می‌کنند. چرخه‌ی تنفسی این باکتری‌ها شامل سیتوکروم های مختلف و انواع گوناگون اکسیدازهای انتقالی متصل به اکسیژن است(۲۲). کیوسروا[1] و فکو (۱۴) با نمونه برداری از خاک آلوده به ترکیبات پلی آروماتیک گونه سودوموناس پوتیدا را جداسازی کرد و با انجام آزمایش‌های تجزیه زیستی متوجه شد که این باکتری پس از یک ماه انکوباسیون ۸۱ درصد از این ترکیبات را ازمحیط کشت حذف کرد. موکرد[2] و همکاران(۲۵)، با جداسازی باکتری سودوموناس پوتیدا از فاضلاب پالایشگاه نفت ترنگانو به این نتیجه رسیدندکه‌این-جدایه‌قادراست۹۶درصداز هیدروکربن‌های موجود در محیط کشت را مورد تجزیه قرار دهد. توانایی باکتری های جنس سودوموناس به دلیل وجود تنوع و نیز تولید تعداد زیادی آنزیم‌های مورد نیاز کاتابولیکی و از آن مهم تر به دلیل توانایی ذاتی بسیار خوب آنها در سازگاری با شرایط مختلف محیطی است(۳۴). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که باکتری سودوموناس پوتیدا در مقایسه با باکتری باسیلوس لاتروسپروس از توانایی بیشتری در حذف ترکیبات نفتی برخوردار است. مطالعات رحمان[3] و همکاران(۳۰) در خاک‌های آلوده نشان داد که باکتری‌های تجزیه کننده نفت عمدتا به جنس‌های باسیلوس، میکروکوکوس، موکسلا، استینوباکتر و سودوموناس تعلق دارند. قابل ذکر است که باکتری سودوموناس پوتیدا ۱۶۹۴ از مناطق آلوده‌ی نفتی و باکتری باسیلوس لاتروسپروس از پساب شهری جداسازی شدند لذا تفاوت در توانایی حذف TPH می تواند ناشی از محل جداسازی این باکتریها باشد.

بر اساس نتایج بدست آمده از این تحقیق کنسرسیوم-سودوموناس‌پوتیدا و باسیلوس لاتروسپروس توانایی بیشتری نسبت به کشت خالص این باکتری‌ها در حذف کل هیدروکربن‌های نفتی داشتند. استفاده ترکیبی گونه‌های مختلف با هم ممکن است همدیگر را تقویت کرده و یک کنسرسیوم موثر و کارامدتر را ایجاد کنند(۱۵).پژوهشگران معتقدند تجزیه زیستی تنها با حضور مخلوطی از گونه‌های کارامد امکان‌پذیر است و قدرت تجزیه زیستی گونه‌های مجزا و خالص محدود می باشد(۳۳). تحقیقات لبلوند[4] و همکاران(۱۷) نشان داد که پیمودن مسیر بیوشیمیایی تجزیه

1- Kucerova

2- Mukred *et al*.
3- Rahman *et al*.
4- Leblond *et al*.

جدول(۲) میانگین مربعات اثر تیمارها بر حذف نفت خام، تنفس و کربن زیست‌توده خاک
Table (2) Mean squares of treatments effect on crude oil removal, soil respiration and microbial biomass carbon

منابع تغییرات (Source of variations)	درجه آزادی (df)	حذف نفت (Oil removal)	تنفس میکروبی (Microbial respiration)	کربن زیست‌توده میکروبی (Microbial biomass carbon)
سورفکتانت (Surfactant)	1	1922.46**	0.0722703**	0.1432215**
باکتری (Bacterium)	3	3596.56**	0.0713733**	0.1407775**
سورفکتانت*باکتری (Surfactant*Bacterium)	3	95.26**	0.0053723**	0.0125815**
خطا (Error)	16	3.004	0.0053723**	0.0000041
ضریب تغییرات(٪) (CV)		3.25	0.91	0.58

** معنی داری در سطح یک درصد ** Significant at 1 % level

توسط باکتری به دشواری انجام می شود و گاه غیرممکن است در حالی‌که با حضور مخلوط چند باکتری، ترکیبات واسطه‌ای که در مسیر تجزیه تولید می شوند، توسط باکتری‌های دیگر تجزیه می شوند.کاسزورک و اولزانوسکی[1] (۱۰) در مطالعه آزمایشگاهی تجزیه‌زیستی روغن دیزل به میزان دو درصدوزنی به این نتیجه رسیدند تلقیح یک گونه باکتری گرم‌مثبت باسیلوس به محیط حاوی باکتری گرم‌منفی سودوموناس پوتیدا باعث افزایش تجزیه از ۳۲ درصد به ۵۷ درصد شد.

افشار ابراهیمی(۱)درتحقیقی بر روی کنسرسیوم باسیلوس‌ها در تجزیه تولوئن نشان داد که کنسرسیوم باسیلوس‌ها در تجزیه تولوئن تاثیر چشم‌گیرتری دارد.

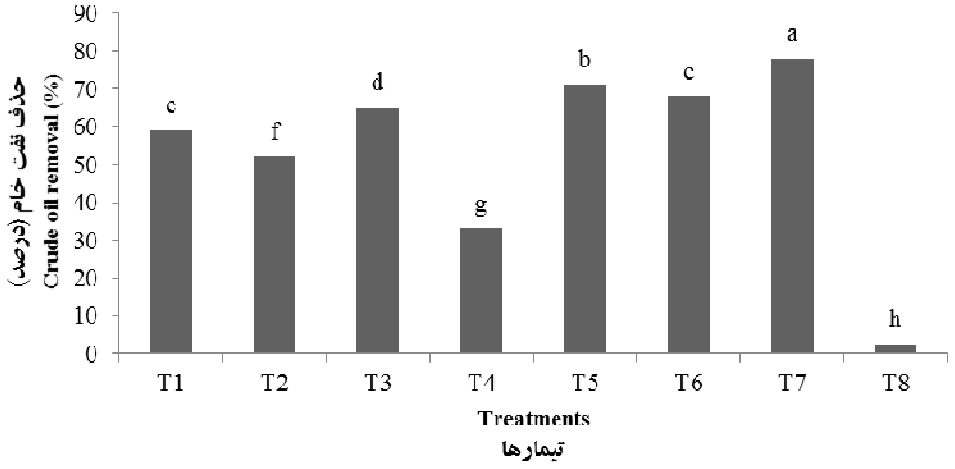
نتایج پژوهش حاضر نشان داد که سورفکتانت غیریونی توئین ۲۰ قادر به حذف هیدروکربن‌های نفتی از خاک آلوده بود. هیدروکربن‌ها دارای طبیعتی آب گریز هستند، از این رو، تمایل آنها به حل شدن در آب کم است و این امر، علت اصلی راندمان پایین فرآیند خاک‌شویی‌مبتنی‌برآب برای این آلاینده‌هاست(۲۶). سورفکتانت‌های شیمیایی اضافه شده به خاک آلوده نفتی، خروج هیدروکربن‌های نفتی را از خاک یا سطوح جامد افزایش می دهند. در عمل سورفکتانت‌ها کشش سطحی و بین سطحی را در سیستم‌های دوفازی آب- نفت، آب- هوا و آب- خاک کاهش داده و در تماس با سیستم خاک- نفت زاویه تماس را افزایش و نیروی موئینگی نگهدارنده خاک و نفت را در نتیجه‌ی کاهش نیروی تماسی کاهش می‌دهند(۴۴).

دم‌های آبگریز سورفکتانت، به درون آلاینده نفوذ کرده و سرهای آبدوست آنها، با کشیدن آلاینده به سمت آب، سبب جدا شدن آن از دانه‌های خاک می گردد(۲۶). کوکالیس و همکاران[2](۱۳) طی بررسی حذف ترکیبات پلی‌کلرینه بی‌فنیل از خاک آلوده با استفاده ازسورفکتانت توین۸۰ و توین۲۰ به میزان ۰/۵ درصد وزنی به این نتیجه رسیدند که هیچکدام از سوفکتانت بکار برده شده توانایی حذف این ترکیبات را ندارند. سوبرینهو و همکاران(۳۵) از توین۲۰(یک درصد وزنی) و بیوسورفکتانت حاصل از مخمر کاندیدا اسفاریکا[3] برای حذف آلودگی نفتی از خاک استفاده کردند.

1- Kaczorek and Olszanowski

2- Kokkalis *et al.*

3- Candida sphaerica



شکل (۱) اثر تیمارهای مختلف بر حذف نفت خام (میانگین‌های با حروف متفاوت، در سطح ۵ درصد آزمون دانکن دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند)

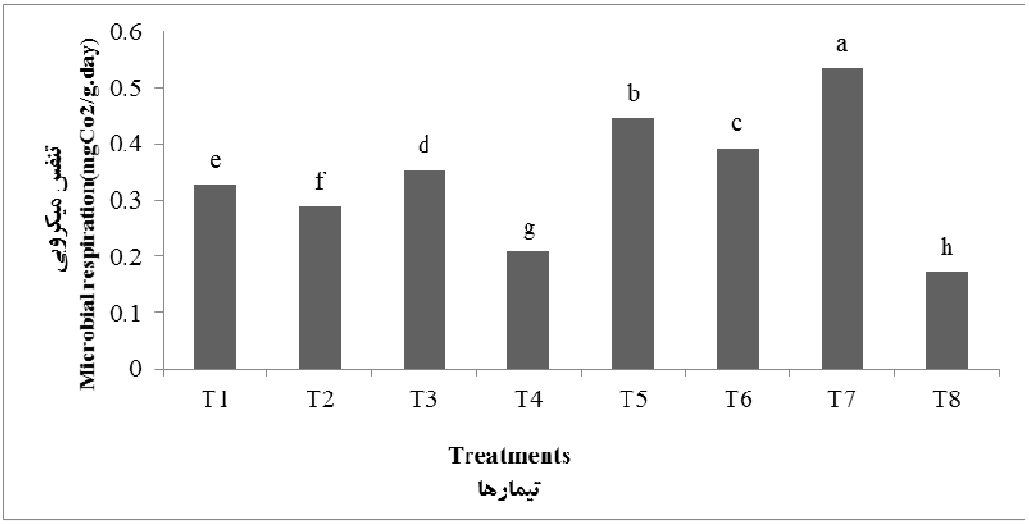
Figure (1) Effect of treatments on crude oil removal. Means followed by different letters are significant at $p<0.05$.

T1: *Psedoumonas putida,* T2: *Bacillus laterosporous*, T3: Microbial consortium, T4: Tween20 (2%w/w), T5: P.putida+Tween20, T6: B. laterosporous+Tween20, T7: Microbial consortium+Tween20, T8: Control (without Tween and bacteria).

نتایج آنها نشان داد که بیوسورفکتانت و توین ۲۰ به ترتیب قادر به حذف ۸۶ و ۳۴ درصد آلودگی از خاک است. زینلی (۴۵) در خاک‌های آلوده به گازوئیل نشان دادند که سورفکتانت توئین ۸۰ قادر است ۸۷ درصد از این ترکیبات را حذف کند. سلیمانی و همکاران(۳۷) با اضافه‌کردن توئین ۸۰(۰/۵ درصدحجمی/وزنی) به‌خاک-آلوده‌نفتی(۱۳۰۰۰میلی‌گرم در کیلوگرم خاک)نشان دادند که این سورفکتانت قادر به حذف ۳۰ درصد از کل هیدروکربن‌های نفتی است. براساس نتایج حاصل از پژوهش حاضر، تیمارهای باکتریای همراه با سورفکتانت در بین تیمارهای بکار رفته بیشترین اثر را در حذف هیدروکربن‌های نفتی داشتند. پنگ و همکاران(۲۹) در بررسی غلظت سورفکتانت در پساب خاکشویی نشان دادند که با افزایش غلظت سورفکتانت درصد حذف PAH افزایش می‌یابد. فنگ و همکاران(۷) به تحقیقاتی در مورد اثرات توئین ۸۰ در صورت تخلیه به محیط زیست پرداختند. آنها نشان دادند که خاصیت تجزیه زیستی‌سولفورهای موجود در خاک‌های‌آلوده به روغن‌های‌دیزلی‌درحضور رودوکوکوس‌اریتروپولیس[1] و سورفکتانت توئین ۸۰ افزایش می‌یابد. درویشی و همکاران(۵) به این نتیجه رسیدند تجزیه نفت خام توسط انتروباکترکلوسه[2] با اضافه کردن توئین ۸۰ کاهش یافته و به عنوان یک ممانعت کننده عمل کرده است که با نتایج پژوهش حاضر همخوانی نداشت. این در حالیست به عقیده باتیستا[3] و همکاران(۳) توانایی و قابلیت استفاده از سورفکتانت‌توئین ۸۰توسط بسیاری از میکروارگانیسم‌ها در افزایش رشد آنها و در نتیجه در افزایش تجزیه زیستی ترکیبات پلی‌هیدروکسی‌آروماتیک موثر بوده است و دلیل رشد کمتر میکروارگانیسم ها در نمونه های کنترل(بدون سورفکتانت) را به کاهش حلالیت ترکیبات پلی‌هیدروکسی‌آروماتیک و فراهمی زیستی کمتر این

1- Rhodococcus erythropolis
2- Enterobacter cloacae
3- Butista *et al*.

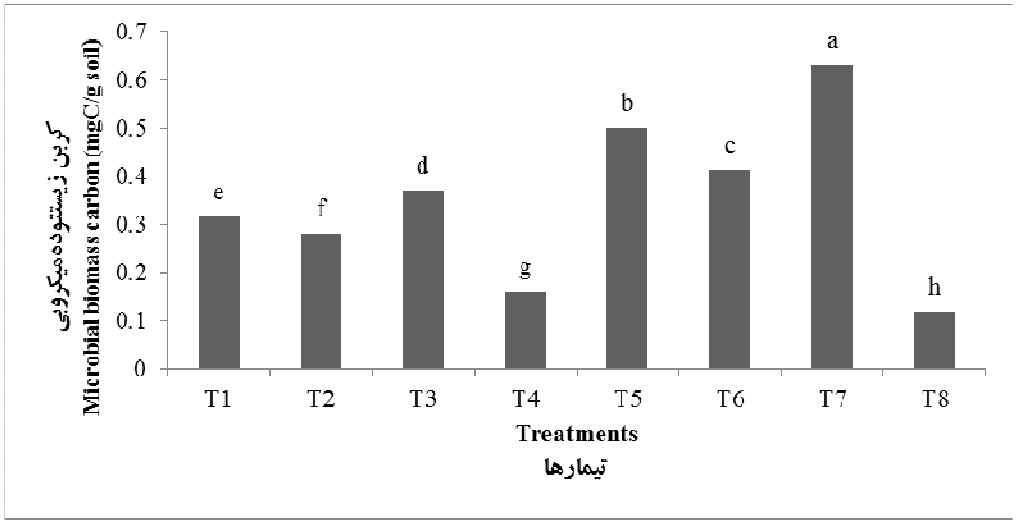
ترکیبات در عدم حضور سورفکتانت نسبت دادند. نتایج مقایسه میانگین داده‌های تنفس و کربن زیست توده میکروبی خاک نشان داد (شکل۲ و۳) بالاترین میزان کربن زیست توده‌میکروبی و تنفس خاک به ترتیب با میانگین $mgCgdm^{-1}$ ۰/۶۳۰ و $mgCO_2/g.day$ ۰/۵۳۶ در تیمار کنسرسیوم میکروبی و سورفکتانت بود که بیشترین حذف هیدروکربن از خاک را به خود اختصاص داد. کمترین مقدار تنفس و کربن زیتوده میکروبی به ترتیب با $mgCO_2/g.day$ ۰/۱۷۲ و $mgCgdm^{-1}$ ۰/۱۱۸ مربوط به تیمار شاهد بود که کمترین راندمان حذف هیدروکربنی را داشت. تیمار جداگانه هر کدام از باکتریها به همراه توین ۲۰ تنفس و کربن زیست‌توده بالاتری را نسبت به تیمار جداگانه هر کدام از باکتریها داشت و این در حالی است که اثر باکتری سودوموناس پوتیدا در حذف نفت خام از خاک بیشتر از باکتری باسیلوس لاتروسپروس بود که نتایج مربوط به تنفس و کربن زیست‌توده میکروبی (شکل ۲ و۳) این امر را تایید می‌کند. از آنجایی که تنفس و کربن زیست توده میکروبی خاک یک معیار جهانی برای کل فعالیت‌های میکروبی است می تواند برای ارزیابی فعالیت میکروبی و بهره‌وری زیست‌پالایی در یک خاک آلوده استفاده شود(۱۶). تغییر در پارامترهای بیولوژیکی(تنفس و کربن زیست‌توده میکروبی) نتایج حاصل از حذف هیدروکربن‌های نفتی را از خاک آلوده تایید کرد. بین درصد حذف نفت خام با تنفس میکروبی و کربن زیست‌توده میکروبی‌خاک به ترتیب ۹۸ و ۹۷ درصد همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود داشت(جدول۳).



شکل(۲) اثر تیمارهای مختلف بر تنفس میکروبی خاک (میانگین‌های با حروف متفاوت، در سطح ۵ درصد آزمون دانکن دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند).

Figure (2) Effect of treatments on soil microbial respiration. Means followed by different letters are significant at *p*<0.05.

T1**:** *Psedoumonasputida,* T2: *Bacillus laterosporous*, T3: Microbial consortium, T4: Tween20 (2%w/w), T5: P.putida+Tween20, T6: *B. laterosporous*+Tween20, T7: Microbial consortium+Tween20, T8: Control (without Tween and bacteria).



شکل (۳) اثر تیمارهای مختلف بر کربن زیست‌توده میکروبی‌خاک (میانگین‌های با حروف متفاوت، در سطح ۵ درصد آزمون دانکن دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند).

Figure (3) Effect of treatments on microbial biomass carbon Means followed by different letters are significant at *p*<0.05.

T1**:** *Psedoumonasputida,* T2: *Bacillus laterosporous*, T3: Microbial consortium, T4: Tween20 (2%w/w), T5: P.putida+Tween20, T6: *B. laterosporous*+Tween20, T7: Microbial consortium+Tween20, T8: Control (without Tween and bacteria).

جدول(۳) همبستگی‌پیرسون بین میزان حذف نفت‌خام،تنفس و کربن زیست‌توده میکروبی‌خاک

Table (3) Pearson Correlation between crude oil removal, soil respiration and microbial biomass carbon

کربن زیست توده میکروبی (Microbial biomass carbon)	تنفس میکروبی‌خاک (Soil microbial respiration)	حذف نفت‌خام (Crude oil removal)	
0.89**	0.90**	1**	حذف نفت‌خام (Crude oil removal)
0.99**	1**	0.90**	تنفس میکروبی خاک (Soil microbial respiration)
1**	0.99**	0.89**	کربن زیست توده میکروبی (Microbial biomass carbon)

**Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed). **معنی‌داری در سطح یک درصد

براساس نتایج بدست آمده در تیمارهای با راندمان بالاتر حذف نفت، تنفس و کربن‌زیست‌توده میکروبی خاک به طور معنی داری بیشتر بود. رامرز[1] و همکاران(۳۱) نشان دادند بین میزان TPH تجزیه شده و کربن زیست‌توده میکروبی در انتهای آزمایش همبستگی مثبت و معنی داری وجود دارد. قطعا یکی از شرایط اولیه و لازم برای تجزیه هیدروکربن‌ها کافی بودن توده زنده میکروبی برای تجزیه این ترکیبات می باشد. مارگزین[2] و همکاران(۱۹) و فرانکو[3] و همکاران(۸) گزارش کرده اند که شاخص‌هایی مانند کربن زیست‌توده میکروبی با تجزیه هیدروکربن در خاک همبستگی مثبت دارد. رامرز و همکاران(۳۱) نشان دادند که بین میزان تولید CO_2 درخاک‌آلوده به هیدروکربن‌های نفتی ارتباط وجود دارد و آنرا به عنوان ویژگی مناسب برای پی بردن به میزان و یا سرعت تجزیه زیستی معرفی کردند.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج بدست آمده در این آزمایش روش تجزیه بیولوژیکی به تنهایی قادر بود در مدت ۴۵ روز بین ۵۲ تا ۶۵ درصد آلاینده‌های نفتی را از خاک کاهش دهد. در حالی‌که روش خاک‌شویی با سورفکتانت توانست ۳۳ درصد از کل هیدروکربن‌های نفتی را از خاک حذف کند. استفاده از مخلوط میکروبی نسبت به کاربرد جداگانه باکتریها نتایج بهتری در حذف نفت خام داشت. کاربرد توبین ۲۰ به همراه باکتریها با افزایش انحلال و رهاسازی نفت از سطح ذرات خاک و همچنین افزودن آبگریزی سطح سلول باعث افزایش کارایی باکتریها در حذف نفت شد. بطورکلی استفاده از روش زیستی برای پاک‌سازی هیدروکربن‌های نفتی در خاک به دلیل سادگی اجرا، توانایی کاربرد در بسیاری از مناطق، دوستدار محیط زیست بودن، مقرون به صرفه بودن و حذف بخش اعظم آلودگی بسیار موثر است. با توجه به اینکه بیوسورفکتانت های میکروبی نقشی مشابه سورفکتانت شیمیایی دارند، تحقیقات بعدی در راستای استفاده از بیوسورفکتانت ها به‌دلیل دوستدار محیط زیست بودن برای پاک‌سازی هیدروکربن‌های نفتی از خاک توصیه می‌شود.

سپاس‌گزاری

نویسندگان از معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه شهید چمران اهواز به لحاظ فراهم نمودن اعتبار پژوهشی این تحقیق در قالب پایان نامه کارشناسی ارشد تقدیر و تشکر می‌نمایند.

1- Ramerz *et al*.
2- Margesin *et al*.
3- Franco *et al*.

منابع:

1. Afshar Ebrahimi, F. 2010. Consideration the effect of *Bacillus* spp. Consortium on toluene degradation in contaminated soils in Esfahan Petrochemical complex [MSc thesis]. School of Biological Science, Islamic Azad University, North Tehran Branch. (In Persian with English abstract).

2. Anderson, J.P.E. 1982. Soil respiration. Methods of Soil Analysis, Part2: Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller, and D.R. Keeney (eds), Agronomy Monogram No. 9, WI.pp:837–871.

3. Bautista, L., Sanz, R., Carmen Molina, M., González, N., and Sánchez, D. 2009. Effect of different non-ionic surfactants on the biodegradation of PAHs by diverse aerobic bacteria. International Biodeterioration and Biodegradation, 63(7): 913-922.

4. Bremner, J.M. 1996. Nitrogen-total. Method of soil analysis. Part3: chemical methods, In: Sparks, D.L., Page, A.L., Helmke, P.A., and Loeppert, R.H(eds), SSSA Book Series 5, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, pp:1085-1122.

5. Darvishi, P., Ayatollahi, S., Mowla, D., and Niazi, A. 2011. Biosurfactant production under extreme environmental conditions by an efficient microbial consortium. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 84(2):292-300.

6. Espinoza Y.R., and Dendooven L. 2003. Dynamics of carbon, nitrogen and hydrocarbons in diesel-contaminated soil amended with biosolids and maze. Chemosphere, 54:379- 386.

7. Feng, J., Zeng, Y., Ma, C., Cai, X., Zhang, Q., Tong, M., and Xu, P. 2006. The surfactant tween 80 enhances biodesulfurization. Applied and Environmental Microbiology, 72(11): 7390-7393.

8. Franco, I., Contin M., Bragato, G., and De Nobili, M. 2004. Microbiological resilience of soils contaminated with crude oil. Geoderma, 121:17-30.

9. Hutchinson, S.L., Schwab, A.P., and Banks, M.K. 2001. Phytoremediation of aged petroleum sludge: Effect of irrigation techniques and scheduling. Journal of Environmental Quality, 30:1516-1522.

10. Kaczeorek, E., and Olszanowski, A. 2011.Uptake of hydrocarbon by *Pseudomonas fluorescens* (P1) and *Pseudomonas putida* (K1) strains in the presence of surfactants: A Cell Surface Modification. Water Air Soil Pollution, 214:451–459.

11. Kao, S. 1996. Phosphorus., In: Sparks, Sparks, D.L., Page, A.L., Helmke, P.A. and Loeppert, R.H. Method of soil analysis published by: Soil Science Society of America, Inc. American Society of agronomy. Inc: Madison,Washington, USA. pp: 869-920.

12. Klute, A. 1986. Methods of Soil Analysis, Part 1: Physical and Mineralogical Methods. Soil Science Society of America and American Society of Agronomy, Madison, WI, USA. pp: 413-423.

13. Kokkalis, E., Kouimtzis, TH., Samara, C., and Anastopoulos, A. 2003. Removal of PCBs from polluted and spiked soils and sediments using surfactants.8th International conference on environmental science and technology lemnos island, Greece, 8 – 10 September 2003.

14. Kucerova, R., and Fecko, P. 2006. Biodegradation of PAU, PCB, and NEL soil samples from the hazardous waste dump in Pozd'átky (Czech Republic). Physicochemical Problems of Mineral Processing, 40: 203-210.

15. Kumar, M., Leon, V., Materano, A.D.S., Ilzins, O.A., Galindo-Castro, I., and Fuenmayor, S.L. 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by biosurfactant-producing Pseudomonas sp. IR1. Zeitschrift fur Naturforschung C-Journal of Biosciences, 61(3-4): 203-212.

16. Lamy, E., Tran, T.C., Mottelet, S., Pauss, A., and Schoefs, O. 2013. Relationships of respiratory quotient to microbial biomass and hydrocarbon contaminant degradation during soil bioremediation. International Biodeterioration and Biodegradation, 83: 85-91.

17. Leblond, J.D., Wayne Schultz, T., and Sayler, G.S. 2001. Observations on the preferential biodegradation of selected components of polyaromatic hydrocarbon mixtures. Chemosphere, 42(4): 333-343.

18. Mann, M.J. 1999. Full-scale and pilot-scale soil washing. Journal of Hazardous Materials, 66(1):119-36.

19. Margesin, R., Hämmerle, M., and Tscherko, D. 2007. Microbial activity and community composition during bioremediation of diesel-oil-contaminated soil: effects of hydrocarbon concentration, fertilizers, and incubation time. Microbial Ecology, 53(2): 259-269.

20. Merkel, N., Schultze-Kraft, R., and Infante, C. 2004. Phytoremediation in the tropics—the effect of crude oil on the growth of tropical plants. Bioremediation Journal, 8(4): 177-184.

21. Minoui, S., Minai-Tehrani, D., Eslami, G., and Sobhani-Damavandifar, Z. 2009. Change in cytochromes content of pseudomonas sp in the medium containing petroleum, Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 3(3): 1512-1516.

22. Minoui,S., Minai-tehrani, D., Zare, A., and Ahmadi, Sh. 2008. Effect of heavy crude oil on the pattern of respiratory chain of *Pseudomonas sp.* Terrestrial and aquatic Environmental Toxicology, 2(1): 34-37.

23. 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 12th Conference on Environmental Health of Iran, University Medical sciences of Shahid Beheshti, Tehran, Iran, pp: 442-451.

24. Mouton, J., Mercier, G., and Blais, J.F. 2009. Amphoteric surfactants for PAH and lead polluted-soil treatment using flotation. Water Air and Soil Pollution, 197(1-4):381-93.

25. Mukred, A.M., Hamid, A.A., Hamzah, A., and Yusoff, W.M.W. 2008. Development of three bacteria consortium for the bioremediation of crude petroleum-oil in contaminated water. Online Journal of Biological Sciences, 8(4): 73.

26. Mulligan, C.N., Yong, R.N., and Gibbs, B.F. 2001. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. Engineering Geology, 60(1): 371-380.

27. Nnamchi, C.I., Obeta, J.A.N., and Ezeogu, L.I. 2006. Isolation and characterization of some polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria from Nsukka soils in Nigeria. International Journal of Environmental Science and Technology, 3(2): 181-190.

28. Okoh, A. I. 2003. Biodegradation of Bonny light crude oil in soil microcosm by some bacterial strains isolated from crude oil flow stations saver pits in Nigeria. African Journal of Biotechnology, 2(5): 104-108.

29. Peng, S., Wu, W., and Chen, J. 2011. Removal of PAHs with surfactant-enhanced soil washing: influencing factors and removal effectiveness. Chemosphere, 82(8): 1173-1177.

30. Rahman, K.S.M., Rahman, T.J., Marchant, R., and Banat, I.M. 2003. The potential of bacterial isolates for emulsification with a range of hydrocarbons. Acta Biotechnologica, 23(4): 335-345.

31. Ramırez, M.E., Zapien, B., Zegarra, H.G., Rojas, N.G., and Fernandez, L.C. 2009. Assessment of hydrocarbon biodegradability in clayed and weathered polluted soils, International Biodeterioration and Biodegradation, 63:347-353.

32. Rhoades, J. 1996. Electrical conductivity and total dissolved solids. In: Sparks, D.L., Page, A.L., Helmke, P.A. and Loeppert, R.H. Method of soil analysis published by: Soil Science Society of America, Inc. American Society of agronomy. Inc: Madison, Washington, USA. pp: 417-436.

33. Ringelberg, D.B., Talley, J.W., Perkins, E.J., Tucker, S.G., Luthy, R.G., Bouwer, E.J., and Fredrickson, H.L. 2001. Succession of phenotypic, genotypic, and metabolic community characteristics during in vitro bioslurry treatment of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated sediments. Applied and Environmental Microbiology, 67(4): 1542-1550.

34. Safahieh, E., Mojodi, F., and Zolgharnin, H. 2011. Assessment and comparison the ability of Khoor Moosa indigenous *Pseudomonas* bacteria to remove the ring aromatic compounds. Journal of Environmental Studies, 58:149-158. (In Persian).

35. Sobrinho, H.B., Luna, J.M., Rufino, R.D., and Sarubbo, L.A. 2013. Application of biosurfactant from *Candida sphaerica* UCP 0995 in removal of petroleum derivative from soil and sea water. Journal of Life Sciences, 7(6):.559-569.

36. Soleimani, M., Afyuni, M., Hajabbasi, M.A., Nourbakhsh, F., Sabzalian, M.R., and Christensen, J.H. 2010. Phytoremediation of an aged petroleum contaminated soil using endophyte infected and non-infected grasses. Chemosphere, 81: 1084-1090.

37. Soleimani, M., Farhoudi, M., and Christensen, J. H. 2013. Chemometric assessment of enhanced bioremediation of oil contaminated soils. Journal of Hazardous Materials, 254: 372-381.

38. Thomas, G.W. 1996. Soil pH and soil acidity. In: Sparks, D.L., Page, A.L., Helmke, P.A. and Loeppert, R.H. Method of soil analysis published by: Soil Science Society of America, Inc. American Society of agronomy. Inc:Madison, Washington, USA. pp: 475-490.

39. Van Hamme, J.D., Singh, A., and Ward, O.P. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 67(4):503-549.

40. Vance, W.H., Brookes, P.C., and Jenkinson, D.J. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. Soil Biology and Biochemistry, 19:703–707.

41. Walkley, A. and Black, I.A. 1934. An examination of the digestion method for determining organic carbon in soils: Effect of variations in digestion conditions and of inorganic soil constituents. Soil Science, 63:251-263.

42. Wenninger, J.A. 1980. Cosmetic safety issues— FDA re-search and regulatory programs. Assoc. Food Drug Officials Q. Bull, 44:145–152.

43. Yeh, D.H., Pennehh, K.D., and Pavlostathis, G.1998.Toxicity and biodegradability screening of nonionic surfactants using sediment-derived methanogenic consortia. Water Science and Technology, 38(7): 55-62.

44. Yeung, A.T. and Gu, Y.Y. 2011. A review on techniques to enhance electrochemical remediation of contaminated soils. Journal of Hazardous Materials, 195: 11-29.

45. Zeinali Dehlaj, M. 2011. Clean up of gasoline contaminated soil by soil leaching. [MSc thesis]. Engineering Faculty, K.N.Toosi University of Technology. (In Persian with English abstract).

46. Zhou, X., Venosa, A.D., Suidan, M.T., and Lee, K. 2001. Guidelines for the Bioremediation of Marine Schorelins and Freshwater Wetlands. US Environmental Protection Agency.