علوم و تکنولوژی محیط زیست، دوره بیست و سوم، شماره یک، فروردین ماه ۱۴۰۰

بررسی تأثیر رطوبت و دمای خاک بر زیست پالایی نفت خام توسط باکتری *سودوموناس پوتیدا*

اکبر قویدل[۱]

سمیه ناجی راد[۲]*

Naji.rad@gmail.com

حسینعلی علیخانی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۷/۰۷ **تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۲/۲۶**

چکیده

زمینه و هدف: پالایش زیستی روشی است که در آن از توانایی ریزجانداران جهت افزایش میزان و سرعت تجزیه آلاینده‌ها و درنتیجه کاهش آلودگی‌های محیط‌زیست استفاده می‌گردد. رطوبت و دما از عوامل محیطی اصلی تأثیرگذار بر رشد و فعالیت ریزجانداران و بالطبع بر کارآیی تجزیه زیستی آلاینده‌های آلی می‌باشند.

روش بررسی: به‌منظور بررسی تأثیر این دو فاکتور یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. فاکتورهای مورد بررسی شامل؛ رطوبت در سه سطح (۳۰٪، ۵۵٪ و ۸۰٪ ظرفیت مزرعه)، دما در سه سطح (۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد) و تلقیح با باکتری در دو سطح (تلقیح شده با باکتری *سودوموناس پوتیدا* و بدون تلقیح با باکتری) بودند.

یافته ها: نتایج حاصل از تحقیق نشان داد که بیش‌ترین میزان تجزیه زیستی نفت خام در تیمار دارای شرایط رطوبت ۵۵٪ ظرفیت مزرعه، دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و تلقیح با *سودوموناس پوتیدا* مشاهده شد که معادل ۹۲/۸٪ و کم‌ترین تجزیه در تیمار رطوبت ۳۰٪ ظرفیت مزرعه، دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و بدون تلقیح با باکتری معادل ۴۲/۳٪ بود.

بحث و نتیجه گیری: این نتایج نشان می‌دهد که بهینه‌سازی عوامل محیطی در زیست پالایی می‌تواند سبب افزایش کارآیی پالایش تا ۵۰/۵ ٪ شود.

واژه‌های کلیدی: آلودگی نفتی، زیست پالایی، شرایط محیطی، *سودوموناس پوتیدا*

۱- استادیار گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۲- استادیار گروه علوم محیط زیست دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل، اردبیل، ایران *(مسئول مکاتبات)

۳- استاد گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه تهران، کرج، ایران

J. Env. Sci. Tech., Vol 23, No.1, April, 2021

The Investigation of Effect of Soil Moisture and Temperature on Crude Oil Bioremediation by *Pseudomonas Putida*

Akbar Ghavidel[1]

Sumayyah Naji Rad[2]*

Naji.rad@gmail.com

Hosein Ali Alikhani[3]

Accepted: 2017.05.16 Received: 2016.09.28

Abstract

Background and Objective: Bioremediation is an approach that exploits the ability of microorganisms to increase the rate and extent of degradation of pollutants and thereby removing pollutants from the environment. The moisture content and temperature are of the main environmental factors affecting growth and activity of microorganisms and accordingly affecting the efficiency of organic pollutant biodegradation.

Method: To study the effect of these two factors a factorial experiment was carried out as completely randomized design with three replications. The factors were moisture in three levels (30%, 55% and 80% of Field Capacity), temperature in three levels (25, 30 and 35 degrees of Celsius) and inoculation with bacteria in two levels (with and without inoculation by *Pseudomonas putida*) which were triplicated.

Findings: The results showed that highest biodegradation rate was observed in the treatment with the moisture content of 55% F.C, temperature of 30 degrees of Celsius and inoculation with *Pseudomonas putida* which was 92.8% and the lowest biodegradation rate was observed in the treatment with the moisture of 30% F.C, temperature of 30 degrees of Celsius and without inoculation which was 42.3%.

Discussion and Conclusion: These results shows that the optimization of the environmental conditions in bioremediation process may lead to 50.5% increase in the efficiency of removal.

Keywords: Crude Oil Contamination, Bioremediation, Environmental Conditions, *Pseudomonas Putida*

1- Assistant Prof., Department of Soil Science and Engineering, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

2- Assistant Prof., Department of Environmental Science, Islamic Azad University, Ardabil Branch, Ardabil, Iran * (Corresponding Author)

3- Professor, Department of Soil Science and Engineering, University of Tehran, Tehran, Iran

زمینه و هدف

مواد نفتی در خاک‌های آلوده، آب و رسوبات، خطر قابل‌توجهی برای محیط‌زیست و سلامت انسان ایجاد می‌کنند. ترکیبات هیدروکربنی، گروه بزرگ و متنوعی از مولکول‌های آلی دارای طیف گسترده‌ای از خواص متفاوت ازنظر وزن مولکولی، ساختار، حلالیت آبی، درجه فراربودن، ضریب جذب و غیره می‌باشند (۱). شایان‌ذکر است که تجمع این ترکیبات در محیط‌زیست، تهدیدی جدی برای سلامت انسان، موجودات زنده و اکوسیستم است. بدین ترتیب یکی از مهم‌ترین چالش‌هایی که در برابر سازمان‌های محیط‌زیست در اقصی نقاط دنیا قرار دارد، مبارزه با آلودگی منابع طبیعی از یک طرف و احیا و پاک‌سازی مکان‌های آلوده‌شده از طرف دیگر است (۲). اصطلاح پالایش زیستی، بیان‌کننده تجزیه آلاینده‌ها در محیط‌زیست به‌وسیله روش‌های زیستی است که بر مبنای پتانسیل متابولیکی ریزجانداران استوار است (۳). فنّاوری پالایش زیستی می‌تواند در مورد آلاینده‌های مختلف، در زیست‌بوم‌های مختلف و تحت شرایط مختلف زیست‌محیطی مورداستفاده قرار می‌گیرد (۳ و۴). پالایش زیستی روشی است که بر مبنای تخریب زیستی (تجزیه و تخریب زیستی) ذاتی و خودبه‌خودی ریزجانداران، همراه با کاهش محدودیت‌های زیست‌محیطی برای ریزجانداران تجزیه‌کننده، بنا نهاده شده است (۵). باکتری‌های *سودوموناس*، از شایع‌ترین باکتری‌هایی است که اغلب گزارش‌ها و تحقیقات دانشمندان در مورد تجزیه زیستی یا پالایش زیستی ترکیبات نفتی مربوط به آن‌هاست (۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰). ازاین‌رو، این باکتری‌ها به دفعات از انواع اکوسیستم‌های آبی و خاکی آلوده به ترکیبات نفتی، جداسازی شده‌اند (۱۱). دی مارتینو و همکاران (۱۲)، باکتری *سودوموناس پوتیدا* را به‌عنوان دسته‌ای از ریزجاندارانی که توانایی بالایی در پالایش زیستی هیدروکربن‌های نفتی دارند، اعلام کردند. تحقیقات ما و همکاران و شیم و همکاران (۱۳ و۱۴) نیز حاکی از توانایی این باکتری‌ها درتجزیه هیدروکربن‌های نفتی است. موفقیت عملیات زیست پالایی تا حدود زیادی بستگی به این مساله دارد که، مدیریت پروژه، بتواند شرایط محیطی را که سبب افزایش سرعت تجزیه زیستی آلاینده می‌شود، در طول عملیات مربوطه، کنترل و حفظ نماید. از آنجایی که عملیات زیست پالایی در رفع آلودگی مناطق آلوده، به‌وسیله تعدادی از پارامترهای زیست‌محیطی (از جمله، رطوبت و دما) محدود می‌شود، لذا هدف از این پژوهش بررسی میزان پالایش زیستی نفت خام، توسط باکتری گونه *سودوموناس پوتیدا* در سطوح مختلف رطوبت و دما می‌باشد.

روش بررسی

آماده‌سازی و اندازه‌گیری برخی پارامترهای فیزیکی و شیمیایی خاک: بدین منظور، یک نمونه خاک، از منطقه شهریار (تهران) از عمق ۳۰-۰ سانتی‌متری نمونه‌برداری و به آزمایشگاه منتقل گردید. نمونه‌ها در دمای آزمایشگاه، هوا خشک، کوبیده و از الک ۲ میلی‌متر عبور داده شد. سپس، برخی آزمایش‌ها و اندازه-گیری‌ها جهت تعیین برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک موردنظر انجام گرفت. این آزمایش‌ها شامل؛ تعیین pH با استفاده از دستگاه pH متر (Jenway 4230)، EC با استفاده از دستگاه EC متر (Orion 920)، درصد کربن آلی خاک (۱۵)، رطوبت ظرفیت مزرعه، درصد فسفر قابل‌جذب (۱۶)، درصد نیتروژن کلدال (۱۷)، میزان گچ خاک و آهک خاک (۱۷) و بافت (۱۷) بود.

تهیه و آماده‌سازی باکتری *سودوموناس پوتیدا*: باکتری‌های *سودوموناس پوتیدا* از «کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران» به‌صورت لیوفیلیزه تهیه گردید. درون دستگاه لامینار و با حفظ شرایط استریل به محیط کشت نوترینت براث انتقال یافته و رشد داده شدند. سپس به مدت ۲۴ ساعت در شرایط دمای آزمایشگاه در محدوده ۲ ± ۲۷ درجه سانتی‌گراد بر روی هم‌زن دورانی ۱۲۰ دور در دقیقه اینکوبه شدند. نهایتاً باکتری‌های فعال، ۴۸ ساعت پس از رشد بر روی محیط کشت مذکور و در فاز لگاریتمی با جمعیت cell/ ml ۳×۱۰۹ (بر اساس استاندارد مک‌فارلند) بر بسترهای خاک آلوده به نفت خام تلقیح شدند.

آزمایش زیست پالایی و اعمال تیمارها (سطوح مختلف رطوبتی، دمایی و باکتریایی): این پژوهش به صورت فاکتوریل در قالب

طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. فاکتورهای آن عبارت بودند از رطوبت در سه سطح (M1، M2 و M3 به ترتیب؛ ۳۰٪ ظرفیت مزرعه، ۵۵٪ ظرفیت مزرعه و ۸۰٪ ظرفیت مزرعه) دما در سه سطح (T1، T2 و T3 به ترتیب؛ ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد) تلقیح باکتری در دو سطح (تلقیح با باکتری *سودوموناس پوتیدا* (B1) و بدون تلقیح (B0)) که در سه تکرار و در مجموع ۵۴ واحد آزمایشی راه‌اندازی گردید. لذا ۵۴ ظرف پلاستیکی در ابعاد یکسان انتخاب گردید و ۵۰۰ گرم خاک توزین و درون هر ظرف ریخته شد. سپس با نفت خام (به میزان ۴٪ وزنی) آلوده گردید. بدین منظور در ابتدا ۱۰ درصد وزن کل خاک هر واحد آزمایشی در یک ظرف ریخته شده و مقدار نفت خام محاسبه شده بر اساس درصد وزنی با آن مخلوط گردیده و به طور کامل به هم زده شد. سپس این مقدار خاک با ۹۰ درصد باقی‌مانده از همان واحد آزمایشی به طور کامل مخلوط شده و به صورت دستی به هم زده شد. جهت کسب نتایج بهتر از تجزیه زیستی باکتری‌ها و بالطبع کارآیی پالایش زیستی، نسبت‌های C:N:P در خاک بایستی به ترتیب برابر با ۱۰۰:۵:۱ باشد (۱۸ و۱۹). لذا هر سه فاکتور ذکرشده، در بخش مقدماتی اندازه‌گیری شد و میزان کمبود آن‌ها در واحدهای آزمایشی با استفاده از دی پتاسیم هیدروژن فسفات (K_2HPO_4) به‌عنوان منبع فسفر و نیترات آمونیوم (NH_4NO_3) به‌عنوان منبع نیتروژن اضافه گردید. جهت تلقیح باکتری *سودوموناس پوتیدا* (در تیمارهای B1)، ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری که در محیط کشت نوترینت براث رشد کرده بود با جمعیت Cell/ ml ۳×۱۰۹ بر بسترهای آماده‌شده تلقیح گشتند. واحدهای آزمایشی بر اساس نوع تیمار آزمایشی مربوطه، درون انکوباتورهایی با دمای ثابت ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. تیمارهای آزمایشی به مدت ۵۰ روز درون انکوباتور قرار گرفتند و به‌طور روزانه فاکتور رطوبت در آن‌ها کنترل گردید. جهت حفظ فاکتورهای رطوبتی (۳۰٪ F.C، ۵۵٪ F.C و ۸۰٪ F.C)، واحدهای آزمایشی مربوطه روزانه با ترازوی حساس توزین شده و کمبود رطوبت آن‌ها با اضافه کردن آب مقطر به روش اسپری کردن تأمین گردید.

اندازه‌گیری میزان نفت خام باقی‌مانده در خاک: پس از طی مدت‌زمان ۵۰ روز، ۱۰ گرم از خاک بسترهای واحدهای آزمایشی توزین و میزان نفت خام باقی‌مانده در آن‌ها اندازه-گیری شد. به ازاء هر ۱۰ گرم بستر، ۵۰ میلی‌لیتر هگزان نرمال (حلال استخراج‌کننده نفت خام) به آن اضافه و به مدت ۲ ساعت با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه هم زده شدند و سپس به لوله‌های مخصوص سانتریفیوژ منتقل شدند. نمونه‌ها درون دستگاه سانتریفیوژ، به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه، قرار داده شدند. سپس، میزان نفت خام باقی‌مانده در نمونه‌ها، به روش EPA 413.1 و EPA 9071 اندازه‌گیری گردید (۱۹ و۲۰). تجزیه و تحلیل آماری نتایج با استفاده از نرم‌افزار SAS ویرایش ۹,۱ انجام شد. مقایسه میانگین تیمارها نیز با آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت.

یافته‌ها

جهت کنترل کلیه عوامل محیطی مؤثر بر کارآیی فرایند پالایش زیستی در تحقیق، برخی ویژگی‌ها و خصوصیات مهم خاک موردنظر به‌دست‌آمده است که در جدول ۱ ارایه شده است.

جدول ۱- برخی مشخصات فیزیکی و شیمیایی خاک

Table 1- Some of the soil physical and chemical properties

مشخصات خاک	بافت	pH	EC	فسفر اولسن	پتاسیم	کربن آلی	نیتروژن کلدال	گچ	آهک
			dS/m	میلی گرم بر کیلوگرم		درصد			
مقدار	لوم	۸/۲	۱/۲۲	۴۰/۴۶	۲۲۱	۰/۸۲	۰/۱۱۵	۰	۷/۳

نتایج تجزیه واریانس میزان نفت خام باقی‌مانده در داده‌های آزمایش (جدول ۲) نشان می‌دهد که بین تیمارهای مختلف آزمایش (سطوح‌مختلف دمایی، سطوح باکتری، سطوح مختلف رطوبتی) تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود دارد و نیز اثر متقابل دو به دو آن‌ها (دما و باکتری، دما و رطوبت، باکتری و رطوبت) در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شده است. همچنین اثر متقابل دما و باکتری و رطوبت در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است.

فاکتور تلقیح با *سودوموناس پوتیدا*: بین تیمارهای تلقیح شده با *سودوموناس پوتیدا* (B1) و تیمارهای بدون تلقیح (B0) اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد مشاهده می شود. این موضوع بر نقش مؤثر باکتری‌های *سودوموناس پوتیدا* در مصرف و تجزیه زیستی نفت خام دلالت دارد. میانگین میزان نفت خام باقی‌مانده پس از گذشت ۵۰ روز در تیمارهای حاوی باکتری *سودوموناس پوتیدا* (B1) و تیمارهای بدون باکتری (B0) به ترتیب برابر با؛ ۰/۱۵۶ و ۰/۳۶۷ گرم در ۱۰ گرم خاک خشک می‌باشد که در شکل ۱ نشان داده شده است. به‌عبارت‌دیگر، تلقیح باکتری *سودوموناس پوتیدا* در واحدهای آزمایشی آلوده به نفت خام، به‌صورت میانگین توانسته است میزان آلودگی نفت خام اولیه را از ۰/۴ گرم در ۱۰ گرم خاک خشک به میزان نفت خام نهایی ۰/۱۵۶ گرم در ۱۰ گرم خاک خشک کاهش دهد. درواقع تیمارهای حاوی باکتری *سودوموناس پوتیدا* به‌طور متوسط (تمام سطوح مختلف دمایی، عناصر غذایی و رطوبتی) در حدود ۵۷٪ از آلودگی نفتی را پالایش کرده‌اند. از طرفی نیز، این باکتری‌ها توانسته‌اند بیش‌ترین میزان درصد تجزیه زیستی نفت خام را، در تیمار T2B1M2 (دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، تلقیح با *سودوموناس پوتیدا* و رطوبت ۵۵٪ ظرفیت مزرعه) داشته باشند، به‌عبارت‌دیگر باکتری *سودوموناس پوتیدا* توانسته است در تیمار مذکور، یعنی بهترین شرایط بین همه حالت‌های تیماری موجود، طی مدت‌زمان ۵۰ روز، در حدود ۹۲/۸٪ از آلاینده را (نفت خام) حذف کند.

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر تلقیح، دما و رطوبت بر نفت خام باقی‌مانده در تیمارها

Table 2- Analysis of variance of the effect of inoculation, temperature and moisture on the residual crude oil in the treatments

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
مدل	۱۷	۰/۰۴۲۳**
باکتری	۱	۰/۶۰۲۹**
دما	۲	۰/۰۲۶۸**
رطوبت	۲	۰/۰۰۲۴**
باکتری × دما	۲	۰/۰۲۵۸**
باکتری × رطوبت	۲	۰/۰۰۱۲**
دما × رطوبت	۴	۰/۰۰۰۸**
باکتری × دما × رطوبت	۴	۰/۰۰۰۱**
خطا	۳۶	۰/۰۰۰۰۵

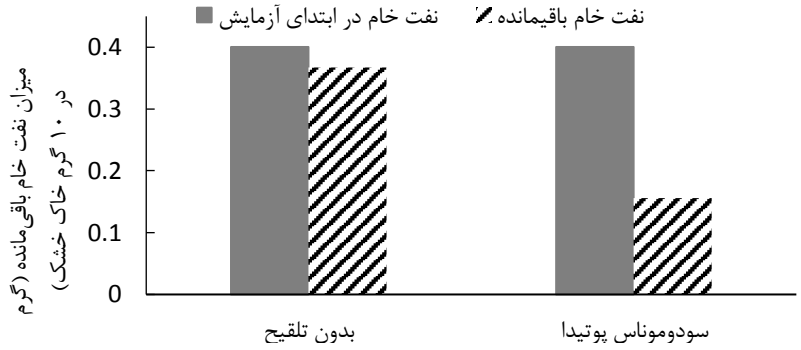
** معنی‌دار در سطح ۱ درصد ($P<0.01$) * معنی دار در سطح ۵ درصد ($P<0.05$)

جدول ۳- مقایسه میانگین میزان نفت باقی‌مانده در واحدهای مختلف آزمایشی پس از گذشت ۵۰ روز

Table 3- Mean comparison of residual crude oil in the experimental units after 50 days

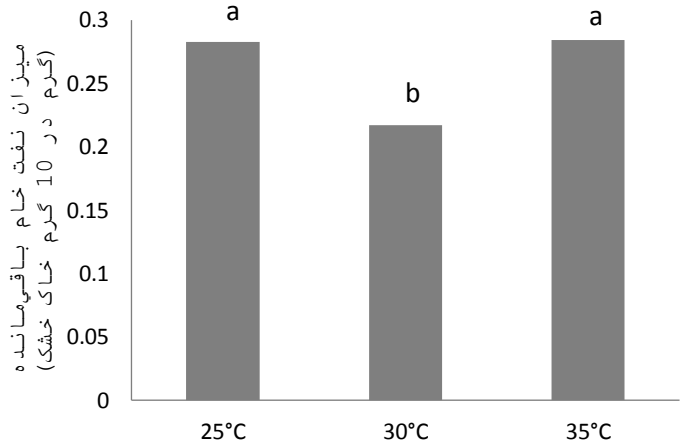
سطوح باکتری	سطوح دما	سطوح رطوبت	نفت خام باقی‌مانده (گرم در ۱۰ گرم خاک خشک)
تلقیح با باکتری *سودوموناس پوتیدا* (B_1)	(T_1) ۲۵° C	(M_1) ٪۳۰ FC	۰/۲۰۸^{d}
		(M_2) ٪۵۵ FC	۰/۱۸۸^{e}
		(M_3) ٪۸۰ FC	۰/۰۲۰۳^{d}
	(T_2) ۳۰°C	(M_1) ٪۳۰ FC	۰/۰۹۶^{f}
		(M_2) ٪۵۵ FC	۰/۰۲۵^{h}
		(M_3) ٪۸۰FC	۰/۰۸۲^{g}
	(T_3) ۳۵° C	(M_1) ٪۳۰ FC	۰/۲۱^{d}
		(M_2) ٪۵۵ FC	۰/۱۸۶^{e}
		(M_3) ٪۸۰FC	۰/۰۲۰۴^{d}
بدون تلقیح (B_0)	(T_1) ۲۵°C	(M_1) ٪۳۰ FC	۰/۳۶۳^{bc}
		(M_2) ٪۵۵ FC	۰/۰۳۶۷^{ab}
		(M_3) ٪۸۰FC	۰/۳۶۹^{ab}
	(T_2) ۳۰°C	(M_1) ٪۳۰ FC	۰/۳۷۹^{a}
		(M_2) ٪۵۵ FC	۰/۳۵۳^{c}
		(M_3) ٪۸۰FC	۰/۰۳۶۷^{ab}
	(T_3) ۳۵°C	(M_1) ٪۳۰ FC	۰/۰۳۶۴^{bc}
		(M_2) ٪۵۵ FC	۰/۳۷^{ab}
		(M_3) ٪۸۰FC	۰/۰۳۷۲^{ab}

فاکتور دما: جدول مقایسه میانگین با آزمون دانکن نشان می دهد (جدول ۳) که بین دمای T2 (دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد) با دماهای T1 (۲۵ درجه سانتی‌گراد) و T3 (۳۵ درجه سانتی گراد)، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۰۱ وجود دارد ولی بین دماهای T1 (۲۵ درجه سانتی‌گراد) و T3 (۳۵ درجه سانتی‌گراد) اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. شکل ۲ مقدار نفت خام باقی‌مانده در تیمارهای دمایی را نشان می‌دهد.



شکل ۱- میانگین مقدار نفت خام باقی‌مانده در تیمارهای تلقیح شده با باکتری *سودوموناس پوتیدا* و بدون تلقیح

Figure 1- Mean residual crude oil in the treatments inoculated with *Pseudomonas putida* and without inoculation



شکل ۲- مقایسه میانگین مقدار نفت خام باقی‌مانده در تیمارهای دمایی

Figure 2- Mean comparison of residual crude oil in the temperature treatments

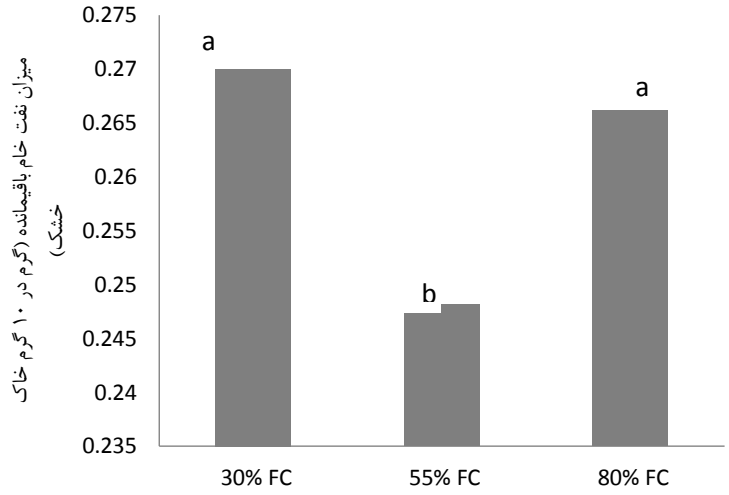
فاکتور رطوبت: جدول مقایسه میانگین رطوبت‌های مختلف با آزمون دانکن (جدول ۳) نشان می‌دهد که بین رطوبت M2 (رطوبت FC ۵۵٪) با رطوبت‌های M1 (رطوبتFC ۳۰٪) و M3 (رطوبت FC۸۰٪) اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود دارد ولی بین رطوبت‌های M1 (رطوبت FC ۳۰٪) و M3 (رطوبت FC ۸۰٪) اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. شکل ۳ مقایسه میانگین مقدار نفت خام باقیمانده در تیمارهای رطوبتی را نشان می‌دهد.

محاسبه درصد تجزیه زیستی نفت خام: درصد تجزیه زیستی نفت خام در هر یک از واحدهای آزمایشی تلقیح شده با باکتری *سودوموناس پوتیدا* توسط رابطه (۱) به دست می‌آید (۲۱)؛

رابطه (۱):

$$\text{درصد پالایش زیستی نفت خام} = \frac{Co - Ct}{Co} \times 100$$

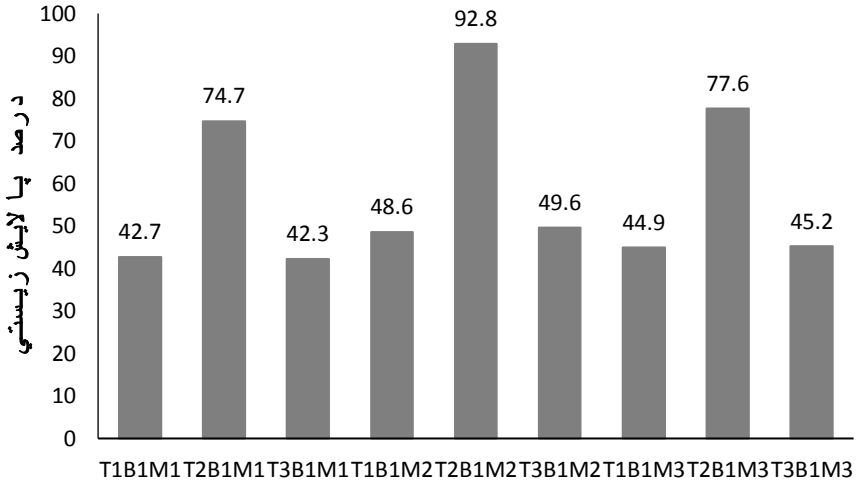
که در آن، Co؛ نفت خام باقی‌مانده در تیمار شاهد پس از گذشت ۵۰ روز و Ct؛ نفت خام باقی‌مانده در تیمار باکتری پس از گذشت ۵۰ روز می‌باشد.



شکل ۳- مقایسه میانگین مقدار نفت خام باقیمانده در تیمارهای رطوبتی

Figure 3- Mean comparison of residual crude oil in the moisture treatments

مثلاً تیمار T2B0M2 به‌عنوان شاهد برای تیمار باکتری T2B1M2 می‌باشد. همچنان که از فرمول استنباط می‌گردد اثرات تجزیه خود به خودی نفت خام حذف گردیده است. به عبارتی دیگر میزان کاهش جزئی نفت خام در تیمارهای مشابه ولی بدون تلقیح باکتری، از تیمارهای تلقیح شده با باکتری، کسر گردیده است. شکل ۴ کارآیی پالایش زیستی را در تیمارهای آزمایشی نشان می‌دهد.



شکل ۴- درصد پالایش زیستی نفت خام توسط باکتری *سودوموناس پوتیدا*

Figure 4- The biological removal percent by *Pseudomonas putida*

بحث و نتیجه گیری

نسبت واقعی C:N:P در خاک آلوده به ۴٪ وزنی نفت خام (میزان کربن کل در هر واحد آزمایشی شامل؛ کربن آلی خاک و کربن موجود در نفت خام می‌باشد) برابر با ۰/۰۹۶: ۲/۷: ۱۰۰ بود که توسط دی پتاسیم هیدروژن فسفات و نیترات آمونیوم به ۱۰۰:۵:۱ رسانده شد. پس از آن که میزان نفت خام باقی‌مانده در هر واحد آزمایشی (۵۴ واحد آزمایشی) اندازه‌گیری شدند، با

کسر مقدار آن از مقدار آلودگی نفت خام اولیه (۴٪ وزنی)، میزان کاهش و در واقع حذف بیولوژیکی آن به دست می‌آید.

از آنجا که در این روش، ۱۰ گرم از بستر واحدهای آزمایشی توزین شده و میزان نفت خام باقی‌مانده در آن اندازه‌گیری می‌شود، لذا آلودگی نفتی اولیه برای ۱۰ گرم بستر، برابر با ۰/۴ گرم است. انتظار داریم که در واحدهای آزمایشی تلقیح شده با باکتری *سودوموناس پوتیدا*، به دلیل تجزیه احتمالی نفت خام توسط باکتری، میزان نفت خام باقی‌مانده از ۰/۴ گرم کم‌تر شده باشد و نیز در تیمارهای بدون باکتری، میزان آن برابر با ۰/۴ گرم یا نزدیک به این مقدار باشد (جدول ۳). میزان کاهش نفت خام، به دلیل مصرف باکتری‌ها از نفت به‌عنوان منبع کربنی برای رشد آن‌هاست. البته قابل‌ذکر است که در تیمارهای بدون تلقیح با باکتری *سودوموناس پوتیدا* نیز بعد از گذشت مدت‌زمان ۵۰ روز، مقداری از نفت خام اولیه کاهش یافته است که نشان‌دهنده آن است که عوامل غیر بیولوژیکی تأثیر چندانی در حذف آلاینده ندارد و این مقدار کاهش اندک نیز، می‌تواند ناشی از تخریب خودبخودی نفت خام در اثر تبخیر در طی این مدت باشد که جهت برآورد میزان کارآیی پالایش زیستی می‌بایستی این مقدار از سایر تیمارها کسر شود. مشابه این نتایج، در تحقیقات صفاهیه و همکاران (۲۲) و نیز تحقیقات ناجی راد و همکاران (۲۳) اعلام شده است.

فاکتور تلقیح با *سودوموناس پوتیدا*: مشابه این نتایج در تحقیقات پیشین نیز گزارش‌شده است (۱۲، ۱۴ و ۲۴). مطالعات کوجروا و همکاران (۲۵) روی تجزیه زیستی مواد نفتی توسط *سودوموناس پوتیدا* نیز هم‌راستا با داده‌های این پژوهش می‌باشد. نتایج تحقیقات بیات و همکاران (۱۱) نیز بیان داشت که گونه‌های باکتریایی *سودوموناس پوتیدا* (که از خاک‌های آلوده به نفت خام جداسازی و خالص‌سازی شده بودند)، قادر به حذف و کاهش حدود ۵۰٪ از آلاینده نفت خام در طی مدت زمان ۲۰ روز بودند. همچنین صفاهیه و همکاران (۲۲)، نشان دادند که تجزیه زیستی مواد نفتی توسط باکتری *سودوموناس پوتیدا* در محیط کشت پایه معدنی پس از طی ۱۲۰ ساعت از تلقیح باکتری‌ها، حدود ۹۱ درصد بوده است.

فاکتور دما: نتایج حاصل از آزمایش نشان می‌دهد که شرایط دمایی بهینه و مطلوب برای پالایش زیستی باکتری‌های *سودوموناس پوتیدا*، در محدوده دمایی ۳۰ درجه سانتی‌گراد می باشد (شکل ۲). دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد ازیک‌طرف، برای رشد این باکتری بهینه می‌باشد ولی از طرف دیگر قابلیت دسترسی زیستی نفت خام را کاهش می‌دهد. دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد دقیقاً حالت عکس دارد؛ یعنی قابلیت دسترسی زیستی نفت خام را افزایش می‌دهد ولی از طرفی نیز از دمای بهینه رشد باکتری *سودوموناس پوتیدا* فاصله دارد (دمای بهینه رشد آن در حدود ۲۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشد). لذا بهبود شرایط تجزیه زیستی در تیمارهای دمایی ۳۰ درجه سانتی‌گراد، احتمالاً به دلیل برآیند این اثرات در این شرایط دمایی می‌باشد. میانگین نفت خام باقی‌مانده در واحدهای آزمایشی T1، T2 و T3 پس از گذشت مدت‌زمان ۵۰ روز به ترتیب برابر با؛ ۰/۲۸۳، ۰/۲۱۷ و ۰/۲۸۴ گرم در ۱۰ گرم خاک خشک می‌باشد.

فاکتور رطوبت: نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که بیش‌ترین میزان پالایش زیستی نفت خام توسط باکتری *سودوموناس پوتیدا*، در رطوبت ۵۵٪FC رخ داده است. می‌توان این‌گونه استنباط کرد که تأثیر رطوبت در عملیات پالایش زیستی از دو جنبه قابل‌بررسی است؛ الف) حضور رطوبت با قابلیت حرکت و رشد باکتری‌ها نسبت مستقیم دارد. حرکت باکتری‌ها در خاک، مستلزم وجود لایه آب در اطراف ذرات خاک است و در واقع حضور آب در خاک، قابلیت دسترسی زیستی عناصر غذایی و مواد نفتی را برای باکتری‌های *سودوموناس پوتیدا* افزایش می دهد (۲۶) و نیز در شرایط خشکی، باکتری‌ها تحرک کم‌تری نسبت به شرایط مرطوب دارند (۲۷ و ۲۸). از طرفی دیگر نیز، بیش از ۷۰ درصد سلول باکتری از آب تشکیل‌شده است و وجود رطوبت برای رشد و متابولیسم باکتری‌ها لازم و ضروری می‌باشد (۲۷) لذا حضور رطوبت کافی در محیط برای رشد و بقاء باکتری ضروری است (۵). ب) مقدار رطوبت خاک با امکان ایجاد شرایط هوازی جهت اکسیداسیون مواد نفتی توسط باکتری‌ها رابطه معکوس دارد (۲۹). مقدار اضافی آب در خاک، اثر منفی بر روی مقدار اکسیژن خاک و متعاقباً اثر منفی بر تجزیه هوازی آلاینده‌ی نفتی دارد (۲۹). با توجه به دو مورد

ذکر شده در بالا، بایستی نسبت بین رطوبت و تهویه در حد متعادل حفظ شود، لذا در تیمارهای رطوبتی ۳۰٪FC، شرایط هوازی و اکسیداسیون مناسب برای پالایش زیستی فراهم شده است ولی از طرف دیگر، احتمالاً رطوبت کم مانع از تحرک مناسب باکتری‌ها و درنتیجه کاهش فراهمی زیستی نفت خام برای باکتری شده است. این در حالی است که در تیمارهای رطوبتی ۸۰٪FC، شرایط عکس رخ می‌دهد. می‌توان اظهار داشت که در شرایط رطوبتی ۵۵٪FC، این اثرات یکدیگر را خنثی کرده‌اند و لذا شرایط بهینه را به وجود آورده‌اند. میزان نفت خام باقی‌مانده در واحدهای آزمایشی M1، M2 و M3 پس از گذشت مدت زمان ۵۰ روز به ترتیب برابر با؛ ۰/۲۷۰، ۰/۲۴۸ و ۰/۲۶۶ گرم در ۱۰ گرم خاک خشک می‌باشد. مشابه نتایج به دست آمده در این تحقیق را می‌توان در نتایج مطالعات پیشین نیز مشاهده کرد که محدوده رطوبتی ۵۰ تا ۷۰ درصد ظرفیت مزرعه را به عنوان شرایط رطوبتی مناسب خاک برای عملیات پالایش زیستی اعلام داشته‌اند (۱۸، ۳۰ و ۳۱).

درصد تجزیه زیستی نفت خام: چنان‌چه در شکل ۴ مشاهده می‌شود، بیش‌ترین درصد تجزیه زیستی نفت خام مربوط به تیمار T2B1M2 (دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، تلقیح باکتری *سودوموناس پوتیدا* و رطوبت ۵۵٪ ظرفیت مزرعه) می‌باشد که در آن باکتری توانسته است طی مدت زمان ۵۰ روز در حدود ۹۲/۸٪ از آلاینده را (نفت خام) تجزیه و حذف نمایند و کم‌ترین میزان درصد تجزیه زیستی نفت خام توسط باکتری‌های *سودوموناس پوتیدا*، مربوط به تیمار T3B1M1 (دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، تلقیح باکتری *سودوموناس پوتیدا* و رطوبت۳۰٪ ظرفیت مزرعه) می‌باشد که باکتری‌ها توانسته‌اند طی مدت‌زمان ۵۰ روز در حدود ۴۲/۳٪ از آلاینده را (نفت خام) تجزیه و حذف نمایند.

با توجه به نتایج این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که تغییر در برخی فاکتورهای محیطی، مثل؛ دما و رطوبت، کارآیی تجزیه زیستی نفت خام توسط باکتری‌های *سودوموناس پوتیدا* محدوده را تحت تأثیر قرار می‌دهد. این باکتری‌ها در شرایط محیطی مختلف مورد آزمایش در این تحقیق، محدوده‌های مختلفی از پالایش زیستی نفت خام را در محدوده ۴۲/۳ تا ۹۲/۸ درصد را از خود نشان داده‌اند. در واقع حفظ شرایط محیط عملیات زیست پالایی در حد مطلوب، سبب شده است تا کارآیی پالایش حدود ۵۰/۵٪ افزایش یابد. نتایج این تحقیق مؤید نقش مؤثر فاکتورهای محیطی در کاهش یا افزایش میزان تجزیه زیستی باکتری‌هاست. به عبارت دیگر می‌توان اظهار داشت که برای حصول نتایج رضایت‌بخش در طرح‌های زیست پالایی مناطق آلوده به نفت خام باید فاکتورهای محیطی مؤثر، بهینه‌سازی شده و در طی انجام عملیات این فاکتورها در حد بهینه حفظ گردند. شایان ذکر است که بین حالت بهینه و سایر شرایط محیطی در این تحقیق تفاوت اساسی از لحاظ کارآیی حذف آلاینده وجود دارد که این تفاوت در هزینه‌های عملیات زیست پالایی و کاهش زمان پالایش نیز مشهود خواهد بود. لذا با توجه به اهمیت اقتصادی این موضوع و کاهش زمان فرایند زیست پالایی، لزوم توجه به شرایط محیطی و بهینه‌سازی آن‌ها امری ضروری خواهد بود.

منابع

1. Guarino, C., Spada, V., and Sciarrillo, R., 2017. Assessment of three approaches of bioremediation (Natural Attenuation, Landfarming and Bioagumentation – Assistited Landfarming) for a petroleum hydrocarbons contaminated soil. Chemosphere 170:10-16.
2. Mirsal Ibrahim, A., 2008. Soil pollution: origin, monitoring and remediation, 1st Ed., Springer, Germany. 312 p.
3. Sajna, K.V., Sukumaran, R.K., Gottumukkala, L.D., and Pandey, A., 2015. Crude oil biodegradation aided by biosurfactants from Pseudozyma sp. NII 08165 or its culture broth. Bioresource Technology 191:133-139.
4. Zhu, XAD., Venosa, MT., and Suidan, M., 2004. Literature review on the use of commercial bioremediation agents

for cleanup of oil-contaminated estuarine environments. EPA/600/R-04/075.

5. Yang, S Z., Jin, HJ., Wei, Z., He, RX., Ji, YJ., Li, XM., and Yu, SP., 2009. Bioremediation of oil spills in cold environments: A review. Pedosphere. 19(3): 371–381.
6. 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.
7. Tekorienė, R., 2008. Distribution of the genus *Pseudomonas* bacteria in oil-polluted soil, water, polymeric materials, plant remnants and food products. Ekol. 54(3):143–148.
8. Taoufik, J., Zeroual, Y., Moutaouakkil, A., Moussaid, S., Dzairi, FZ., Talbi, M., Hammoumi, A., Belghmi, K., Lee, K., Loutfi, M., and Blaghen, M., 2004. Aromatic hydrocarbons removal by immobilized bacteria (*Pseudomonas sp*., *Staphylococcus sp*.) in fluidized bed bioreactor. Annals of Microbiology, 54:189-200.
9. Guieysse, B., Viklund, G., Toes, AC., and Mattiasson, B., 2004. Combined UV-biological degradation of PAHs. Chemosphere, 55(11):1493-1499.
10. Nnamchi, CI., Obeta, JAN., and Ezeogu, LI., 2006. Isolation and characterization of some poly aromatic hydrocarbon degrading bacteria from Nsukka soils in Nigeria. Int. J. Environ. Sci. Tech. 3(2): 181-190.
11. Bayat, Z., Hassanshahian, M., Hesni, M.A., 2015. Enrichment and isolation of crude oil degrading bacteria from some mussels collected from the Persian Gulf. Marine Pollution Bulletin 101, 85-91.
12. Di Martino, C., López, N.I., and Raiger Iustman, L.J., 2012. Isolation and characterization of benzene, toluene and xylene degrading Pseudomonas sp. selected as candidates for bioremediation. International Biodeterioration & Biodegradation 67:15-20.
13. Ma, K.-Y., Sun, M.-Y., Dong, W., He, C.-Q., Chen, F.-L., and Ma, Y.-L., 2016. Effects of nutrition optimization strategy on rhamnolipid production in a Pseudomonas aeruginosa strain DN1 for bioremediation of crude oil. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 6:144-151.
14. Shim, H., Hwang, B., Lee, SS., and Kong, SH., 2005. Kinetics of BTEX biodegradation by a coculture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* under hypoxic conditions. Biodegradation, 16: 319–327.
15. Walkey, A., and Black, IA., 1934. An Examination of the Degtjareff Method for Determining Soil Organic Matter and a Proposed Modification of the Chromic Acid Titration Method. Soil Science, 37: 29-38.
16. Olsen, SR., and Sommers, LE., 1982. Phosphorus. *In*: Page AL. (ed), Methods of Soil Analysis, Agron. No. 9, Part 2: Chemical and microbiological properties, 2nd ed., Am. Soc. Agron., Madison, pp: 403-430.
17. Page, AL., Miller, RH., and Keeney, DR., 1982. Method of soil analysis (part 2: chemical & microbiological

properties). American society of Agronomy, Madison, 1121 p.

18. Atagana, HI., Haynes, RJ., and Wallis, FM., 2003. Optimization of soil physical and chemical conditions for the bioremediation of creosote-contaminated soil. Biodegradation, 14(4): 297-307.
19. USEPA. 2001. Guideline for the bioremediation of marine shorelines and fresh water wetland. Office of research and development, US Environmental Protection Agency.
20. Eaton, AD., and Franson, MAH., 2005. Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater: American Public Health Association. Washington DC. 1020 p.
21. Asrari, E., Tavallali, H., and Hagshenas, M., 2010. Removal of Zn (II) and Pb(II) ions Using Rice Husk in Food Industrial Wastewater, Journal of Applied Sciences and Environmental Management, 14(4): 159–162.
22. Safahie, A., Mojudi, F., and Zolgharnain, H., 2011. Evaluation and Comparision of the Ability of Pseudomonas strain indigenous to Khormousa in removal of Aromatic Cmpounds. Journal of Environmental Studies, 58:149-158. (In Persian).
23. Naji Rad, S., Alikhani, HA., Savaghebi, GR., Saleh-Rastin, N., and Farahani, M., 2006. Bioremediaton of Soil Contaminated to Petroleum Hydrocarbons. Master of Science Thesis, University of Tehran. (In Persian)
24. Das, k., and Mukherjee, K., 2007. Crude petroleum-oil biodegradation eyciency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. Bioresource Technology 98: 1339-1345.
25. Kucerova, R., 2006. Application of pseudomonas putida and rhodococcus sp. By biodegradation of PAH(s), PCB(s) and nel soil samples from the hazardous waste dump in pozďátky (czech republic). Rud. Geol. Naft. 18:97-101.
26. Liu, B., Ju, M., Liu, J., Wu, W., Li, X., 2016. Isolation, identification, and crude oil degradation characteristics of a high-temperature, hydrocarbon-degrading strain. Marine Pollution Bulletin 106:301-307.
27. Bushnaf, K.M., Puricelli, S., Saponaro, S., Werner, D., 2011. Effect of biochar on the fate of volatile petroleum hydrocarbons in an aerobic sandy soil. Journal of Contaminant Hydrology 126:208-215.
28. Varjani, S.J., 2017. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. Bioresource Technology 223:277-286.
29. Yuan, SY., Wei, SH., and Chang, BV., 2000. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a mixed culture. Chemosphere 41:1463–1468.
30. Nwinyi, O.C., Ajayi, O.O., Amund, O.O., 2016. Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by two strains of Pseudomonas. Brazilian Journal of Microbiology 47:551-562.
31. Alexander, M., 1999. Biodegradation and bioremediation. Gulf Professional Publishing, San Diego. 453 p.