نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۳، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۸، ص. ۱۵۵-۱۴۵

Journal of Water and Soil
Vol. 23, No. 3, Fall 2009, p. 145-155

پالایش زیستی خاک‌های آلوده به نفت خام با کودهای شیمیایی

سارا شریفی حسینی*[۱] - علی شهبازی[۲] - عبدالرحمن یزدی‌پور[۳] - ایمان کامرانفر[۴]

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۲/۱۹
تاریخ پذیرش: ۸۸/۴/۱۴

چکیده

حفاری چاه‌های نفت و گاز، استخراج پی‌درپی نفت در استان خوزستان، پمپاژ آن به پالایشگاه‌ها و انتقال فرآورده‌های نفتی به مکان‌های مصرف سبب آلودگی اکوسیستم‌ها بویژه خاکها شده است. این آلودگی‌ها خطر زیست محیطی جدی بشمار می‌آیند و لازم است سریعاً اصلاح گردند. زیست‌پالایی (کنترل، کاهش و حذف آلودگی از محیط زیست) با استفاده از افزایش فعالیت‌های بیولوژیکی محیط روش مفید و اقتصادی برای پالایش این آلودگی‌هاست. در این تحقیق نفت خام چاه شماره ۶۹ میدان نفتی مارون، با غلظت ۱٪ وزنی بر سطح خاک اسپری و سپس کود شیمیایی NPK با غلظت ۰ ،۱ و ۲ تن در هکتار با ۳ تکرار به عنوان تیمار به خاک اعمال گردید. پس از مدت زمان ۵ و ۱۰ هفته ماندگاری تحت شرایط رطوبتی۲۰٪ وزنی و هوادهی مناسب از ظروف نمونه‌برداری به عمل آمد. رشد باکتری‌های هتروتروفیک تجزیه‌کننده هیدروکربن، تغییرات نسبت C/N و تجزیه مواد نفتی در طی پروسه زیست پالایی در خاک اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که جمعیت باکتری‌های هتروترفیک تجزیه کننده از مقدار ۶×۱۰^{۳} کلونی در واحد بر گرم خاک در نمونه شاهد به حدود $۱/۴\times۱۰^{۸}$ در نمونه‌های تیمار شده با ۲ تن در هکتار کود شیمیایی در زمان ۵ هفته رسید و نسبت C/N در خاک از ۶ به کمتر از ۳ کاهش یافت. تیمارهای اعمال شده باعث تجزیه ۶۰-۴۵٪ آلودگی نفتی در خاک شدند و نتایج کروماتوگرافی گازی نیز کاهش در کلیه مقادیر نرمال آلکان‌ها و ایزوپرنوئیدها مانند فیتان و پریستان را نشان داد. بنابراین اعمال تیمار کود شیمیایی با غلظت ۲ تن در هکتار به خاک‌های آلوده به نفت به مدت زمان ۵ هفته یک تیمار بهینه برای خاک‌های آلوده به نفت منطقه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: زیست پالایی، باکتری‌های هتروترفیک، گاز کروماتوگرافی، نرمال آلکانها

مقدمه

استان خوزستان با ذخایر عظیم نفت و گاز از مهمترین مراکز نفتی ایران به شمار می‌آید. در جنگ خلیج فارس در سال ۱۹۹۱ شش تاهشت میلیون بشکه نفت در خلیج فارس ریخته شد (۲۲) و به سبب نزدیکی و هم‌مرزی خوزستان با این خلیج مقادیر عظیمی از این آلودگی‌ها به این استان منتقل گردید. صرف نظر از این آلودگی‌ها مقادیر زیاد رسوبات نفتی تولید شده در سیستم جداسازی نفت از آب و حمل و نقل ضایعات نفتی در تانکرهای ذخیره نفت یک عامل آلاینده دیگر محسوب می‌شود (۵). در حال حاضر نیاز مبرمی به جلوگیری از گسترش این آلودگی‌ها و اصلاح خاک‌های آلوده به مواد نفتی احساس می‌شود. وجود این خاک‌های آلوده یک خطر جدی برای محیط زیست بشمار رفته و اصلاح آنها امری اجتناب ناپذیر است. زیست پالایی (کنترل، کاهش یا حذف آلودگی از محیط زیست با استفاده از افزایش فعالیت‌های بیولوژیکی محیط)، روشی مفید و مؤثر در اصلاح این عارضه است. در این روش ریز جانداران از مواد هیدروکربنی به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده کرده و آنها را به آب و دی‌اکسیدکربن تبدیل می‌نماید، حاصل این فرایند کاهش کل هیدروکربن‌های نفتی موجود در خاک می‌باشد (۶). ریزش نفت در خاک به علت وارد کردن مقادیر عظیم کربن آلی به خاک باعث بالا رفتن نسبت C/N می‌شود که برای رشد و فعالت میکروارگانیسم‌های خاک نامناسب می‌باشد. با تأمین موادغذایی معدنی از طریق کوددهی می‌توان این نسبت را تعدیل کرد (۱۴، ۱۵ و ۲۱) و هوادهی فعال و افزایش مواد مغذی ازت و فسفر در قالب یک پروسه زیست‌پالایی اثر معنی‌داری بر تحرک و تنوع باکتری‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن در خاک‌های آلوده به نفت ایجاد می‌کند. در واقع زیست‌پالایی براساس هوادهی و افزایش مواد-مغذی یک استراتژی مفید برای تسریع تجزیه آلودگی‌های نفتی در محیط است (۲ و ۶). والورث و همکاران به این نتیجه رسیدند که تجزیه هیدروکربن‌های خاک را می‌توان به وسیله کاربرد موادغذایی ضروری مانند نیتروژن و به مقدار کمتر فسفر افزایش داد (۲۳).

۱،۲،۳- به ترتیب مربیان پژوهشی، گروه حاصلخیزی خاک و توسعه پایدار جهاد دانشگاهی خوزستان
(* - نویسنده مسئول: Email : ssharifihoseini@yahoo.com)
۴- مربی گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز

فاسندو و همکارانش (۷) در مطالعه‌ای دریافتند که ۱۳ روز پس از تلقیح باکتری و کاربرد کود نیترات آمونیوم آلودگی خاک به گازوئیل به میزان ۹۰ درصد کاهش یافت. این نتیجه به وسیله مقایسه سطح زیر منحنی پیک‌های گاز کروماتوگرافی (GC) به دست آمد که نشان دهنده مصرف گازوئیل به وسیله جمعیت باکتری و افزایش فعالیت میکروبی در خاک آلوده در اثر تلقیح خاک به باکتری و کاربرد کود بود. آیوتامون و همکاران (۳) در مطالعه اثرات زیست-پالایی خاک زراعی آلوده به نفت‌خام در نیجریه به این نتیجه دست یافتند که اعمال تیمارکود شیمیایی، تجزیه بیولوژیکی را در خاک‌های آلوده به نفت افزایش داده و ۹۵-۵۰ درصد کاهش در هیدروکربن‌های آلاینده حاصل می‌شود. در این تحقیق اثر اعمال کود شیمیایی بر تحریک فرایندهای بیولوژیکی و افزایش پالایش زیستی در خاک‌های آلوده به نفت خام مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

ابتدا خاک مزرعه پس از هوا خشک کردن، از الک ۲ میلیمتر عبور داده شده و سپس نفت‌خام چاه شماره ۶۹ میدان نفتی مارون که نفتی پارافینی است به نسبت ۱٪ وزنی روی خاک اسپری گردید به گونه‌ای که خاک‌ها به طور کاملاً همگن و یکنواخت به نفت آلوده شدند.

پس از آلوده‌سازی، کل خاک روی هم انباشته شد و جهت توزیع یکنواخت و جذب سطحی نفت روی ذرات خاک، به مدت ۲ هفته نگهداری شد. خاک حاصله به وزن ۵ کیلوگرم تقسیم و در ظروف مخصوص ریخته شد.

در مرحله بعدی خاک‌های آلوده تیماردهی شدند، بدین منظور برای اعمال تیمار کود شیمیایی از ۳ کود اوره با ۴۶٪ ازت، دی‌فسفات آمونیوم با ۲۱٪ ازت و ۴۶٪ فسفر، سولفات پتاسیم با ۴۰٪ پتاسیم استفاده شد. کودهای شیمیایی NPK با توجه به ۳ سطح تیمار کودی (۱،۰و۲ تن در هکتار) به نسبت۲۰:۱۰:۱۰ برای N:P: K با مخلوط گردید. در کل در این تحقیق ۹ ظرف حاوی خاک آلوده به نفت وجود داشت که ۳ ظرف بدون تیمار کودی و به عنوان شاهد آزمایش، ۳ ظرف با تیمار ۴ گرم کود NPK در ۵ کیلوگرم خاک (معادل ۱ تن در هکتار) و ۳ ظرف با تیمار ۸ گرم کود NPK در ۵ کیلوگرم خاک (معادل ۲ تن در هکتار) در نظر گرفته شد.کود ازته به صورت تقسیط در۲ مرحله و پتاس و فسفر به صورت یکباره در ابتدای آزمایش داده شدند.

خاک‌های تیمارشده در گلخانه تحت شرایط نور و دمای کنترل شده قرار داده شد، و در طول ۱۰ هفته فرایند زیست‌پالایی درجا مورد بررسی قرار گرفت (۲۰). دراین مدت به منظور ایجاد شرایط محیطی مناسب برای فعالیت ریزجانداران تجزیه‌کننده نفت‌خام رطوبت نمونه‌های خاک درحد ظرفیت مزرعه[1] (F.C) نگه‌داری شد و همچنین به منظور رفع کمبود اکسیژن و ایجاد شرایط هوازی خاک‌ها ۲ بار در هفته به‌هم زده شدند (۹ و ۶).

به منظور استریل کردن نفت‌خام از فیلترهای سرسرنگی ۰/۴۵ میکرون CHROMAFIL CA/S استفاده شد، بدین صورت که ابتدا نفت را بوسیله سرنگ کشیده و سپس فیلتر مورد نظر را به سرسرنگ وصل کرده و به آرامی با یک فشار کنترل شده پیستون سرنگ را به پائین فشار داده تا نفت از فیلتر رد شده و به آرامی وارد لوله آزمایش شود.

محیط کشت بوشنل هاس به ترتیب زیر و طبق روش ونوسا و ورن تهیه گردید (۹):

- سولفات منیزیم ۰/۲ گرم در لیتر
- کلرید کلسیم ۰/۰۲ گرم در لیتر
- منوپتاسیم فسفات ۱ گرم در لیتر
- فسفات آمونیوم دو عاملی ۱ گرم در لیتر
- نیترات پتاسیم ۱ گرم در لیتر
- کلرید فریک ۰/۰۵ گرم در لیتر

که با ۲٪ وزنی کلرید سدیم تکمیل شد. سپس با استفاده از اتوکلاو در درجه حرارت ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه استریل گردید.

در مرحله بعد به منظور شمارش باکتری‌های هتروتروف تجزیه کننده هیدروکربن از روش MPN[2] استفاده شد. در این روش پس از آماده‌سازی محیط کشت، از نمونه خاک موردنظر که در زمان مناسب جمع‌آوری شده ۳ گرم خاک را با ۱۰ میلی‌لیتر از محیط بوشنل‌هاس به خوبی به‌هم زده تا به صورت سوسپانسیون درآید و بعد از نیم‌ساعت، ۱میلی‌لیتر از سوسپانسیون را به ۹ میلی‌لیتر محیط کشت اضافه کرده و به همین ترتیب یک‌سری محلول رقیق شده از 10^{-1} تا 10^{-12} تهیه می‌گردد. برای هر محلول رقیق شده ۳ تکرار در نظر گرفته می‌شود، به طوری که برای هر نمونه خاک ۳۶ لوله آزمایش تهیه شد. بعد از رقیق‌سازی معرف ریسازورین به میزان ۹۰ میکرولیتر و سپس نفت‌خام استریل شده را به مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر به هر لوله اضافه می‌گردد و لوله‌های آماده شده به مدت ۲ هفته در انکوباتور نگهداری می‌شود.

پس از دو هفته بررسی مرتب لوله‌ها، هنگامی که تغییر رنگ آبی به صورتی مشاهده شد (نشان‌دهنده رشد باکتری هتروترفیک است)، لوله‌ها را از انکوباتور خارج کرده و براساس جدول MPN باکتری‌ها شمارش می‌گردد (کلیه وسایل مورد استفاده استریل شد) (۹).

به منظور بررسی تغییرات نفت، ابتدا نفت موجود در نمونه‌ها توسط

1 - Field Capacity

2 - Most-Protable Number

دستگاه سوکسیله و حلال آلی کلروفرم از نمونه‌ها استخراج شد و پس از آسفالتن گیری در مقادیر میکرولیتری به دستگاه گاز کروماتوگرافی تزریق شد. دستگاه گاز کروماتوگرافی مورد استفاده در این تحقیق ساخت شرکت Vinci TEChnologies مدل۲۰۱۰ بوده که شناسایی پیکها توسط آشکارگر FID انجام گرفته است. در این دستگاه ستون موئینه‌ای به طول ۲۵ متر تعبیه شده است. دمای اولیه ۵۰ درجه سانتی گراد و دمای نهایی آن ۳۲۰ درجه سانتی گراد بوده که با افزایش دما در آن به ازای هر دقیقه، ۵ درجه سانتی گراد تنظیم شده است. گاز حامل هلیوم بوده و از هوای فشرده و گاز هیدروژن جهت شعله آشکارگر(FID) استفاده شده است (۱).

– به منظور اندازه گیری کربن آلی کل و مقدار ازت کل به ترتیب از دستگاه راکی ایوال ۶ و روش کجلدال استفاده گردید (۱۷).

تجزیه و تحلیل آماری

این آزمایش به صورت طرح آماری کرت‌های خرد شده در زمان در قالب کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام گرفت. فاکتور اصلی تیمار کوددهی با ۳ سطح ۰، ۱ و ۲ تن درهکتار بود و عامل زمان به عنوان فاکتور فرعی شامل ۲ سطح ۵ و ۱۰ هفته بود. برای تجزیه داده‌ها از نرم افزار SAS استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها برای فاکتورهای معنی‌دار شده با استفاده از روش دانکن انجام شد (۹).

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که کاربرد کودهای شیمیایی حاوی NPK و هوادهی منظم در طول فرایند اصلاح مقارن با افزایش رشد باکتری‌های هتروترف تجزیه کننده نفت، اثر معنی‌داری در سطح پنج درصد بر تجزیه نفت داشت. در خاک شاهد نیز ۳۷ درصد تجزیه نفت مشاهده شد که به علت هوادهی مرتب خاک و ایجاد شرایط دمایی (۲۵–۳۰ درجه سانتی‌گراد) و رطوبتی مناسب فعالیت باکتری‌ها بوده است (شکل ۱). گوگی و همکاران (۹) در مطالعه زیست‌پالایی خاک‌های آلوده به نفت‌خام در محل ریزش نفت مشاهده کردند که هوادهی، کاربرد کودهای دارای نیتروژن و فسفر و تلقیح میکروبی باعث تجزیه ۷۵ درصد از نفت‌خام می‌شود. مارگزین مشاهده کرد که تحریک بیولوژیکی خاک‌های آلوده به نفت، با مواد غذایی معدنی مانند کود شیمیایی حاوی NPK باعث افزایش تجزیه زیستی و تجزیه هیدروکربن‌ها به میزان ۲۷–۵۳ درصد می‌شود (۱۶).

اثر عامل زمان بر تجزیه نفت نیز در سطح ۱درصد احتمال معنی‌دار شده است. در شکل۲ مشاهده می‌شود با گذشت زمان روند تجزیه نفت کند شد و تجزیه نفت در هفته پنجم بیشتر از هفته دهم است، این مشاهده کاملاً با رشد باکتری‌های هتروترف مطابقت دارد و بیشترین رشد باکتری نیز در هفته پنجم رخ داده است. احتمالاً در ۵ هفته اول تیماردهی به علت حضور نرمال آلکان‌های سریع قابل تجزیه و وفور مواد غذایی معدنی فعالیت باکتری‌ها و تجزیه نفت بیشتر بوده اما با گذشت زمان ترکیبات نفتی سخت قابل تجزیه، بلند زنجیره و دارای کمبود نیتروژن باقی مانده و رشد باکتری و در نتیجه تجزیه نفت کاهش می‌یابد (۲۱).

ایانگ و همکاران (۱۸) مشاهده کردند مقارن با افزایش جمعیت میکروبی در خاک تجزیه نفت نیز بیشتر شده است و این افزایش در طول ماه اول تیماردهی سریعتر بوده و با گذشت زمان این فرایند کاهش می‌یابد (۱۹) این مشاهده با نتایج حاصل از این تحقیق همخوانی دارد.

تجزیه نفت درنمونه‌های فاقد تیمار با نمونه‌های تیمار شده تفاوت معنی‌داری در سطح ۱ درصد از لحاظ آماری داشت، همچنین بین میانگین تجزیه نفت در خاک در هر دو زمان استخراج نفت از خاک (۵ و ۱۰ هفته) تفاوت معنی‌دار وجود دارد و میانگین تجزیه نفت در خاک در پنج هفته بیشتر از ده هفته است (شکل ۲). نتایج کاتسیولا و همکاران در مطالعه زیست‌پالایی درجای خاک‌های کشاورزی آلوده به روغن موتور نشان داد که تجزیه نرمال آلکان‌ها در طول ۴ ماه اول تیماردهی به علت موجودیت و حیات جمعیت باکتری‌های فعال، سریعتر رخ می‌دهد (۱۲).

تجزیه واریانس نتایج تفاوت معنی‌داری بین اثر تیمارهای مختلف کود شیمیایی NPK بر نسبت C/N خاک را نشان می‌دهد. نسبت C/N در نمونه فاقد تیمار بیشتر از نمونه‌های تیمار شده است (شکل ۳) زیرا در نمونه شاهد کمبود مواد مغذی معدنی، رشد باکتری‌های تجزیه کننده هیدروکربن و در نتیجه تجزیه نفت را محدود می‌کند و نسبت C/N بالا می‌رود. نسبت C/N از ۶ درنمونه‌های شاهد به حدود ۳ در نمونه‌های تیمارشده می‌رسد (شکل ۳).

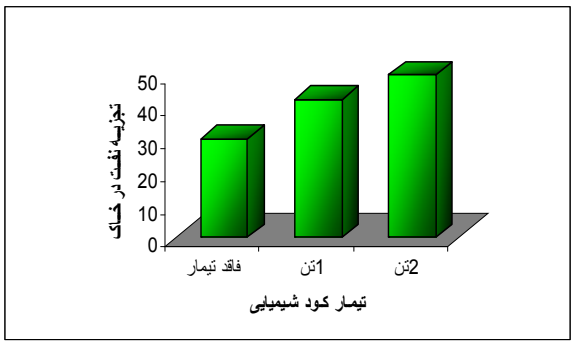
با گذشت زمان از تیماردهی نسبت C/N کاهش یافت ولی در هفته پنجم این نسبت کمتر از هفته دهم می‌باشد (شکل ۴)، زیرا در هفته پنجم مواد غذایی کافی در دسترس باکتری‌ها می باشد اما با گذشت زمان کم‌کم کمبود عناصر معدنی ظاهر شده و رشد باکتری و تجزیه نفت را محدود می‌کند.

میانگین نسبت C/N خاک در نمونه‌های تیمار شده با شاهد تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری دارد. این نسبت C/N در نمونه‌های شاهد از نمونه‌های تیمار شده بیشتر است.

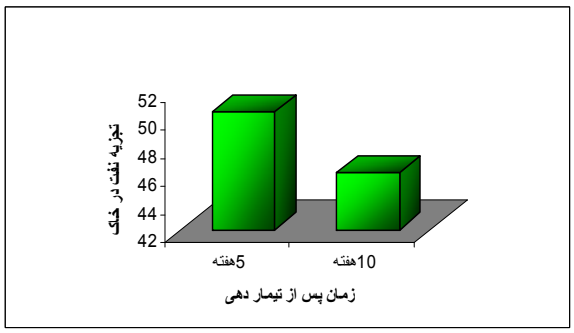
در بررسی مقایسه میانگین اثر زمان بر نسبت C/N در خاک مشاهده شد که بین میانگین نسبت C/N در خاک در هر دو زمان تجزیه تفاوت معنی‌داری در سطح ۱ درصد احتمال وجود دارد و مقدار نسبت C/N در خاک در ۱۰ هفته بیشتر از ۵ هفته می‌باشد (شکل ۴).

نتایج تجزیه واریانس حاکی از معنی‌داری اثر تیمار کود شیمیایی بر رشد باکتری‌های هتروترف تجزیه کننده نفت در خاکهای آلوده به

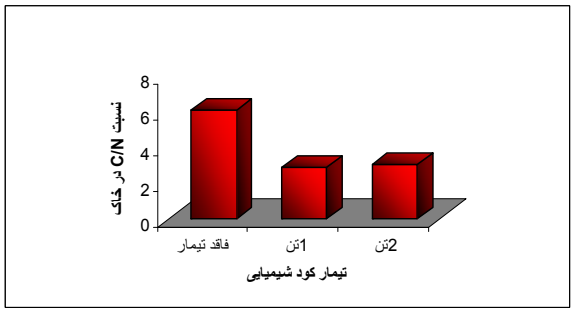
هیدروکربن در سطح پنج درصد احتمال بود. بین نمونه‌های تیمار شده با شاهد تفاوت معنی‌دار از لحاظ رشد باکتری وجود دارد (شکل ۵). رشد باکتری‌های هتروترف تجزیه کننده نفت در اثر تیمار مواد غذایی معدنی حاوی نیتروژن، فسفر و پتاسیم؛ افزایش چشمگیری کرده و مقارن با این افزایش تجزیه نفت خاک افزایش و نسبت C/N کاهش یافت. در واقع یک جنبه عظیم از عملیات زیست‌پالایی درجا شامل کاربرد مواد غذایی مانند کودهای شیمیایی حاوی نیتروژن و فسفر، هوادهی و کاربرد میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده هیدروکربن در مناطق آلوده می‌باشد (۸).



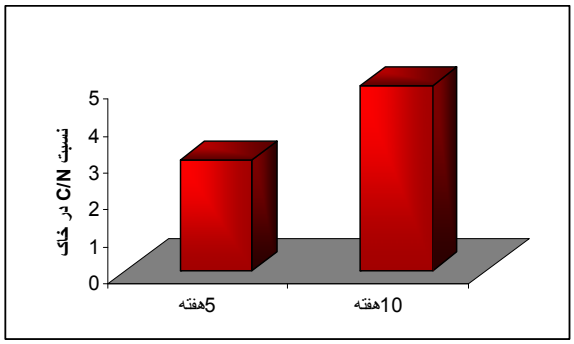
(شکل ۱) - مقایسه میانگین تأثیر تیمار کود شیمیایی بر تجزیه نفت در خاک



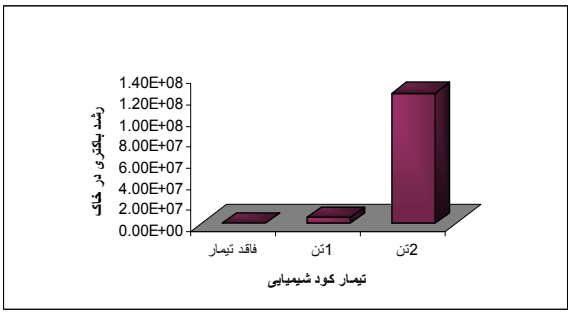
(شکل ۲)- مقایسه میانگین اثر زمان بر تجزیه نفت در خاک



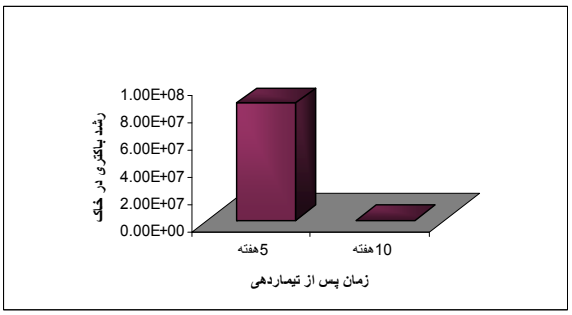
(شکل ۳)- مقایسه میانگین تأثیر تیمار کود شیمیایی بر نسبت C/N در خاک



(شکل ٤)- مقایسه میانگین اثر زمان بر نسبت C/N در خاک



(شکل ٥)- مقایسه میانگین تأثیر تیمارکود شیمیایی بر رشد باکتری در خاک



(شکل ٦)- مقایسه میانگین اثر زمان بر رشد باکتری در خاک

رامسی و همکاران (۲) در مطالعه اثر زیست‌پالایی بر جمعیت میکروبی در رسوبات نفتی مشاهده کردند که هوادهی مداوم و افزایش کود باعث تحریک قابل ملاحظه رشد باکتری‌های تجزیه کننده هیدروکربن در خاک می‌شود.

در تحقیق حاضر در زمان ۵ هفته به علت حضور نرمال آلکان‌ها و شرایط محیطی و غذایی مناسب، رشد باکتری و تجزیه نفت بالاست اما با گذشت زمان و در ۱۰ هفته ترکیبات آروماتیک و آسفالت‌ها باقی مانده و کمبود عناصر غذایی رخ می‌دهد که باعث کاهش فرایند زیست‌پالایی می‌شود.

در مطالعه لی و همکاران (۱۶) همانند این تحقیق اثر کوددهی بر تحریک بیولوژی باکتری‌های بومی خاک، با زمان کاهش می‌یابد.

میانگین رشد باکتری در نمونه‌های تیمار شده با شاهد تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری دارد و رشد باکتری در نمونه‌های فاقد تیمار از نمونه‌های تیمار شده کمتر است (شکل ۵). در نمونه‌های تیمار شده، ۲ تن کود شیمیایی باعث رشد باکتری بیشتر نسبت به تیمار ۱ تن شده است.

بررسی مقایسه میانگین اثر زمان بر رشد باکتری در خاک مؤید این مطلب است که روند رشد باکتری‌ها با زمان کاهش می‌یابد (شکل۶).

اثر تیمار کود شیمیایی بر تغییر غلظت نرمال آلکان‌ها در نفت خام

نفت خام چاه شماره ۶۹ میدان نفتی مارون ۳ که به عنوان آلاینده

نفتی در این تحقیق به خاک‌ها اسپری شده بود پس از استخراج از خاک با دستگاه سوکسیله و آسفالتن‌گیری بیتومن باقی مانده در مقادیر میکرولیتری به دستگاه گاز کروماتوگرافی تزریق گردید. پس از ارائه پیک GC (شکل ۷) سطوح زیر منحنی هر کدام از نرمال آلکان‌ها محاسبه شد (شکل ۸).

پریستان و فیتان به عنوان استانداردهای داخلی استفاده شدند (۱۰) چون این ترکیبات که معرف آلکان‌های شاخه‌ای هستند نسبت به نرمال آلکان‌های مجاورشان (C17 و C18) به علت ساختمان مولکولی، بسیار مقاوم در برابر تجزیه زیستی می‌باشند (۲۱) .

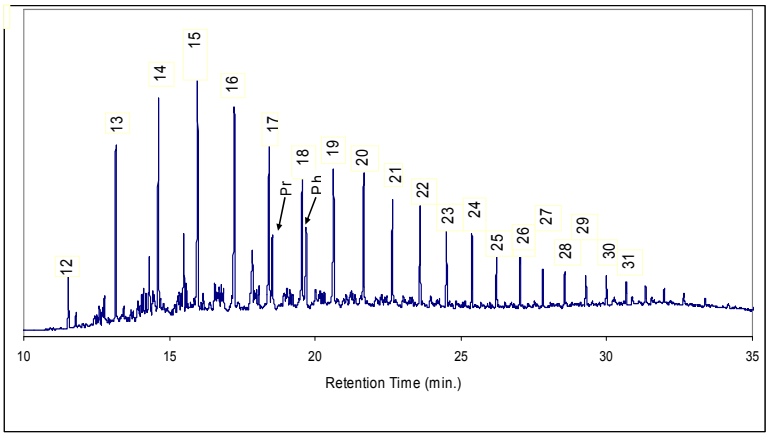
به منظور سهولت بررسی تغییرات نرمال آلکان‌ها، براساس نزدیکی ترکیب شیمیایی آنها، در ۶ دسته به ترتیب زیر تقسیم‌بندی شدند (۱۰):

<C13, C13-C16, C17-C21, C22-C25,
C26-C29, C29–C36

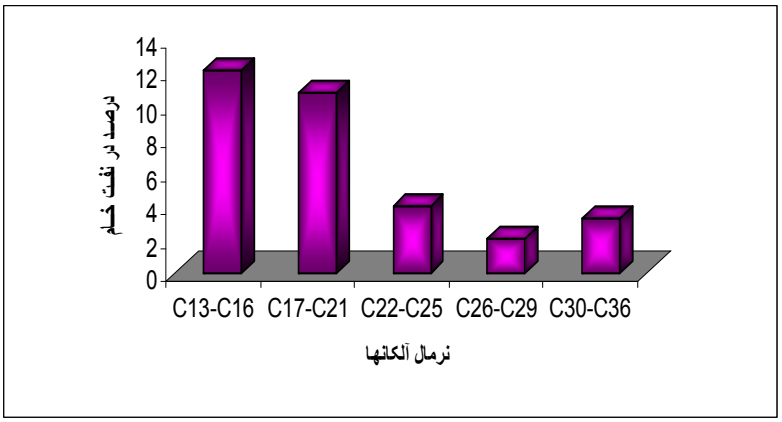
دسته اول که نرمال آلکان‌های کوچکتر از C13 را شامل می‌شود به علت فرار بودن در هیچ یک از پیک‌های حاصله از تزریق نمونه‌ها به دستگاه گاز کروماتوگرافی مشاهده نشد، به همین دلیل نیز در شکلها بررسی نشده است.

شکل ۸ از محاسبه سطح زیر منحنی شکل ۷ بدست آمده است، همانگونه که مشاهده می‌شود دسته C13-C16 حدود ۱۲٪ از کل نفت خام و بیشترین حجم نرمال آلکان‌ها را تشکیل داده است و دسته C26-C29 کمترین حجم و تنها ۴٪ کل نفت خام را شامل شده است. طبق ترکیب نفت خام که شامل بنزین (C4-C10) نفت سفید (C11-C12) گازوئیل(C13-C20) روغن موتور (C21-C40) و پس مانده C40>، در این نمونه نفت خام گازوئیل ۲۳٪ و ایزوپرنوئیدهای غیرحلقوی پریستان و فیتان به ترتیب ۱/۳۴٪ و ۱/۵۵٪ ازکل نفت را تشکیل می‌دهند.

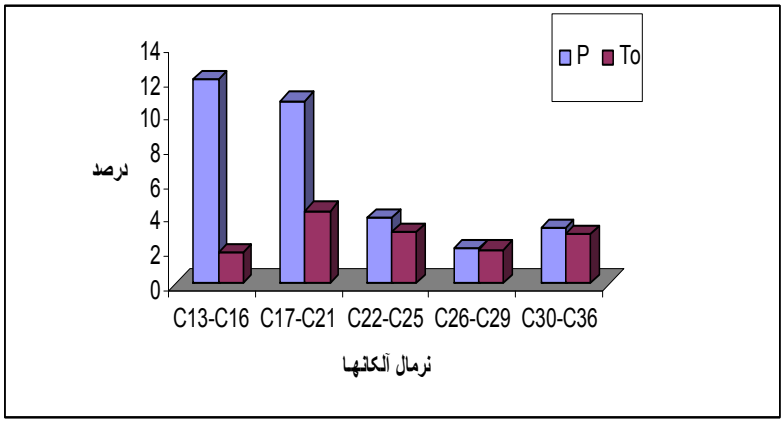
شکل ۱۰ در پی استخراج نفت از نمونه شاهد و تزریق آن به دستگاه GC بدست آمد، در مقایسه با نمونه نفت اولیه بلند بودن پیک مربوط به C25 قابل توجه است که در سایر نمونه‌ها نیز مشاهده می‌شود. C25 جزء نرمال آلکان‌های فرد می‌باشدکه اولین بار توسط Chibnall در سال ۱۹۳۴ مورد بررسی قرار گرفت. او پی برد که گیاهان بیشتر پارافین‌ها با اتم‌های فرد را در زنجیره خود دارند. او به این نکته پی برد که این پارافین‌ها از C_{25} تا C_{37} در گیاهان متغیرند، از سوی دیگر باکتری‌ها نمی‌توانند نرمال آلکان‌های فرد با منشاء زمینی را به طور قابل توجه تجزیه نمایند. ثبات این نرمال آلکان‌ها در گیاهان در حال رشد دم اسبی را با گونه فسیل شده آن در دوره تریاسیک مقایسه شده است در هر دو گونه گیاهی فسیل شده و تازه هیدروکربن‌های غالب C23، C25 ،C27 وC29، بودند (۱۱) بر این اساس در این مطالعه C25 با تزریق نفت به خاک برخلاف سایر نرمال آلکان‌ها کمتر دچار تغییر و تحول شده است.



(شکل ۷)- کروماتوگرافی گازی نفت خام چاه شماره ٦٩ میدان نفتی مارون



(شکل ۸)– درصد نرمال آلکان‌ها در نفت خام چاه شماره ۶۹



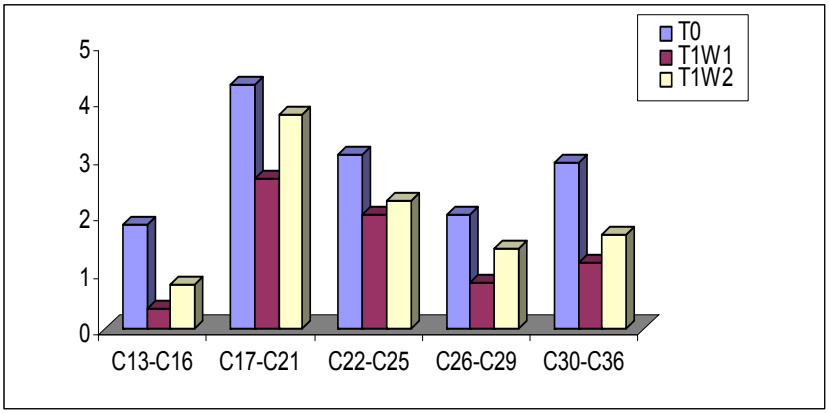
(شکل ۹)– مقایسه درصد نرمال آلکان‌ها در نمونه شاهد(T0) با نفت خام اولیه(P)

نمونه شاهد که در طی ۱۰ هفته زیست پالایی، تیمار غذایی دریافت نکرده ولی تحت رطوبت و شرایط هوازی مناسب قرار گرفته در شکل ۹ با T0 نشان داده شده است. در این شکل درصد نرمال آلکان‌های نمونه شاهد که با نفت خام اولیه (علامت اختصاری P) مورد مقایسه قرار گرفته است، نشان داده می‌شود. دسته هیدروکربن‌های کوچکتر از C22 تغییرات شدیدی کرده‌اند به طوری‌که در دسته C13-C16 حجم نرمال آلکان‌ها از ۱۲٪ در نفت به حدود ۲٪ در شاهد رسیده است. دسته C17-C21 در شاهد به نصف حجم اولیه در نفت خام رسیده، اما در ۳ دسته هیدروکربن‌های بزرگتر از C22 تغییرات حجم بسیار اندک است.

از نتایج این گونه برمی‌آید که بخش پارافینی C13-C21 به علت کوتاه بودن طول زنجیره شان و جذب سطحی شدن کلوئیدهای خاک، پس از اسپری نفت بر خاک کاهش زیادی را نشان می‌دهد. اما در سایر نیزدسته‌ها با طویل شدن زنجیره هیدروکربنی میزان جذب سطحی بر ذرات کلوئیدی نیز کاهش یافته است. ایزوپرنوئیدهای غیرحلقوی (پریستان و فیتان) نیز در شاهد نسبت به نفت اولیه به ترتیب ۵۱٪ و ۴۹٪ تغییر حجم یافته اند که نشانگر تجزیه زیستی بالا در خاک است.

این نتایج بدست آمده با تحقیقات گیلر و همکاران و داس و ماکرج مطابقت دارد (۸ و ۴).

شکل ۱۰ اثر تیمار کود شیمیایی در دو زمان ۵ و ۱۰ هفته را بر تغییرات نرمال آلکان‌های نفت با نمونه شاهد مقایسه می‌کند. این شکل نشان می‌دهد در زمان ۵ هفته تقریباً ۸۰ درصد از نرمال آلکان‌های دسته C13-C16 تجزیه شده‌اند که وسعت مصرف این دسته از هیدروکربن‌ها را بوسیله باکتری‌ها نشان می‌دهد. مصرف وسیع این دسته به علت زنجیره کربنی کوتاه و وفور مواد غذایی معدنی و شرایط محیطی مناسب در این مرحله است اما دسته‌های C17-C21 و C22-C25 فقط بین ۳۵–۳۸ درصد تجزیه شده‌اند که نشانگر مصرف کم پارافین های متوسط زنجیره بوسیله باکتری‌های مورد مطالعه به سبب تجزیه کم نرمال آلکان‌های فرد در این دو دسته است این نرمال آلکان‌ها با منشاء زمینی (گیاهان دم اسبی) به مقدار کمی توسط باکتری‌های تجزیه کننده نفت مورد تجزیه قرار می‌گیرند (۱۱). دسته چهارم C26-C29 و پنجم C30-C36 ۶۰ درصد نسبت به نمونه شاهد مورد تجزیه واقع شده‌اند.



(شکل ۱۰)- مقایسه درصد نرمال آلکان‌ها در نمونه‌های تیمار شده با ۱ تن کود شیمیایی در هفته ۵ (T1W1) و در هفته ۱۰ (T1W2) با نمونه شاهد (T0)

با گذشت مدت زمان ۱۰ هفته از اعمال تیمار کود شیمیایی تجزیه دسته C30-C36 به ۴ برابر نسبت به ۲ هفته رسید که تغییر بسیار واضحی است دسته C13-C16 با ۵۷٪ تجزیه همچنان تجزیه بالایی دارد و دسته‌های C17-C21، C22-C25 و C26-C29 به ترتیب ۱۲، ۲۶ و۳۰ درصد نسبت به شاهد تجزیه شده‌اند. نتایج نشان‌دهنده کاهش تجزیه کلیه دسته‌های نرمال آلکان‌ها در زمان ۱۰ هفته نسبت به زمان ۵ هفته است. دلیل این کاهش را می‌توان اینگونه بیان نمود که با گذشت زمان در اثر تصاعد گاز NH_3 از خاک، تثبیت پتاسیم به وسیله رس‌ها و غیرمتحرک شدن فسفر بوسیله کلسیم بالای خاک به شکل فسفات کلیسم؛ مواد غذایی مورد نیاز رشد باکتری در خاک کمتر شده و منتج به کاهش رشد باکتری و تجزیه نفت در زمان ۱۰ هفته می‌شود.

در اکثر نمونه‌ها نرمال آلکان‌های دکان تا هگزادکان خیلی سریعتر از نمونه‌های پارافینی (C17–C24) تجزیه شده‌اند، که با مطالعات سچفر و جولیان (۲۱) همخوانی دارد.

شکل ۱۱ نشان می‌دهد که در اثر اعمال تیمار ۲ تن کود شیمیایی بعد از گذشت مدت زمان ۵ هفته میزان تجزیه دسته C13-C16 و C30-C36 به نزدیک ۹۰ درصد رسید که مقدار قابل توجهی می‌باشد و نشان از افزایش رشد باکتری‌ها به علت مصرف مواد غذایی قابل دسترس در این زمان و تجزیه این دسته‌ها از نرمال آلکانها دارد. باکتری‌های هتروترف که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفته‌اند تمایل زیادی برای تجزیه نرمال آلکان‌های کوتاه و بلند زنجیره داشته‌اند با این تفاوت که از ابتدای اعمال تیمار دسته C13-C16 تجزیه بالایی داشته‌اند اما دسته C30-C36 در ابتدای تیماردهی تجزیه کم داشته است و با گذشت زمان از اعمال تیمار در هفته پنجم ۴ برابر و درهفته دهم تقریباً ۲ برابر نسبت به هفته دوم تجزیه داشته است.

با گذشت مدت زمان ۱۰ هفته‌ای از اعمال تیمار کودی مقدار تجزیه دسته C13-C16 نسبت به شاهد همچنان بالا اما نسبت به هفته دوم تغییرات کمی داشته است اما تجزیه دسته C30-C36 به ۲ برابر رسیده است. دسته‌های C17-C21، C22-C25 و C26-C29 تقریباً ۱/۵ برابر افزایش تجزیه (به ترتیب ۴۷، ۳۳ و ۴۱ درصد) نسبت به هفته دوم داشته‌اند.

سچفر و جولیان (۲۱) در مطالعه اثرات کرم خاکی و افزایش موادآلی در زیست پالایی خاک آلوده به نفت مشاهده کردند که غلظت ایزوپرنوئیدهای فیتان و پریستان کاهش زیادی داشته و نرمال آلکان‌های دسته C10-C19، به شدت تغییر کرده‌اند و با گذشت زمان کاهش در دسته C29-C36 به همراه افزایش در غلظت پارافین‌های متوسط زنجیره‌ی C19-C29 دیده شده است.

نتیجه گیری

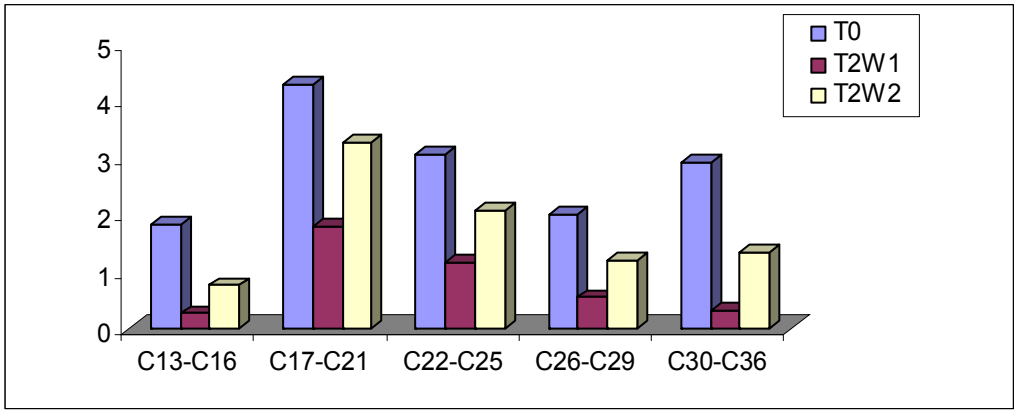
۱- نسبت C/N از حدود ۶ در نمونه شاهد به حدود ۳ در نمونه‌های دریافت کننده تیمار غذایی کاهش یافت که نشان دهنده تجزیه نفت در اثر این تیمارها و کاهش مقدار کربن آلی و نسبت C/N در این نمونه‌هاست.

۲- تیمارهای اعمال شده باعث تجزیه ۶۰-۴۵٪ آلودگی نفتی در خاک شدند.

۳- جمعیت باکتری‌های هتروترفیک تجزیه کننده هیدروکربن در پی تیمارهای غذایی به کار رفته در این تحقیق افزایش چشمگیری پیدا کرده و از مقدار ۶×۱۰^{۳} کلونی در واحد بر گرم خاک در نمونه شاهد به $۱/۴\times۱۰^{۸}$در نمونه‌های تیمار شده با کود شیمیایی افزایش پیدا کرد.

۴- تجزیه نفت و افزایش جمعیت میکروبی در هر دو تیمار در

هفته ۵ بیشتر از هفته ۱۰ بوده بنابراین به طور کلی میتوان اینگونه بیان کرد که اعمال تیمار کود شیمیایی به خاک‌های آلوده به نفت به مدت زمانی ۵ هفته یک تیمار بهینه می‌باشد.



(شکل ۱۱)- مقایسه درصد نرمال آلکان‌ها در نمونه‌های تیمار شده با ۲ تن کود شیمیایی در هفته ۵(T2W1) و در هفته ۱۰ (T2W2) با نمونه شاهد (T0)

منابع

۱- حسینی ح. ۱۳۸۵. بررسی پتانسیل هیدروکربوری سازند سر گلو در فروافتادگی دزفول. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه شهید چمران اهواز. ص ۱-۱۰۰.

2- ARamsay M., Swannell P.J., Duke W., A.Sh., and Hill T., R. 2000. Effect of bioremediation on the microbial community in oiled mangrove sediments. Marine Pollution Bulletin vol.41, Nos 7-12pp:413-419.

3- Ayotamuno M., J., Kogbara R.B., Ogaji S.O.T., and Probert S.D. 2006. Bioremediation of a Crude – Oil Polluted Agricultural – Soil at Port Harcort, Nigeria. Applied Energy, 85:1249-1257.

4- Das K., and Murkherjee A.K. 2007. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of Bacillus subtilis and Pseudomonas aeruginosa isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. Bioresource Technology, 98:1339-1345.

5- Degonge H., Freijer J.L., Verstraten J.M., Westerveld J., and Vander Wielen F.W.M. 1997. Relation between bioavailability and fuel oil hydrocarbon composition in contaminated soil. Environ. Sci. Technol, 31:771-775.

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- Facundo J., Marquez R., Hernandez V., and Teresa Lamela M.A. 2000. Biodegraradation of diesel oil in soil by a microbial consortium, 313-320.

8- Geller A., Michels J., Track T., Gehrke U., and Sell D. 2002. Grundlagen derbiologischen Bodensanierung. Biologigische Verfahren Zar Bodensanierung. UBA. Berlin.

9- Gogoi B.K., Dutta N.N., Goswami P., and Krishna Mohan T.R. 2003. A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site. Advances in Environmental Research, 7: 767-782.

10- Ho Y., Jackson M., Yang Y., Mueller J.G., and Pritchard P.H. 2000. Ization of uoranthene and pyrene-degrading bacteria isolated. PAH- contaminated soil and sediments and comparison of several sph- ingomona ssp, J. Ind. Microbial, 2:100-112.

11- Hunt J. M. 1996. Petroleum Geochemistry and Geology. 2nd Edition. W.H. Freeman and Company, New York. 743p.

12- Katsivela E., Moore E.R.B., Maroukli D., Strompl C., Pieper D., and Kalogerakis N. 2005. Bacterial community dynamics during in-situ bioremediation of petroleum waste sludge in landfarming sites. Biodegradation, 16: 169-180.

13- Kim, S.H., Lee, S., Kim, D.Y., and Kim J.G. 2007. Degradation characteristic of waste lubricants under different nutrient codition. Jaurnal of Hazardous Materials, 143:65-72.

14- Kim S.J., Choi D.H., Sim D.S., and Oh Y.S. 2005. Evaluation of bioremediation effetiveness on crude oil-contaminated sand. Chemosphere, 59:845-852.

15- Lee M.D., and Ward C.H. 1985. Environmental and biological methods for the restoration of contaminated aquifers. Environ. Toxicol. Chem, 4:743-750.

16- Margesin R. 2000. Potentiol of cold-adapted microorganisms for bioremediation of oil-polluted Alpine soils. International Biodeterioration & Biodegradation, 46:3-10.
17- Odokuma O., and Dickson A.A. 2003. Bioremediation of a crude oil polluted tropical rain forestL. Global Journal of Environmental Sciences, Vol.2 No.1:29-40.
18- Ouyang W., Liu H., Murygina V., Yongyong Y., Xiu Z., and Kalyuzhnyi S. 2005. Comparison of bio-augmentation and composting for remediation of oily sludge : A field-scale study in China. Process Biochemistry, 40:3763-3768.
19- Ryan J.R., Loehr R.C., and Rucker, E. 1991. Bioremediation of organic contaminated soils. Journal Hazard. Mater, 28:159-169.
20- Schaefer M., and Juliane F. 2007. The influence of earthworms and organic additives on the biodegradation of oil contaminated soil. Applied Soil Ecoogy, 36: 53-62.
21- Tajik M. 2004. Assessment of geoenvironmental effect of petroleum pollution on coastal sediments of Bushehr province. Iran.M.Sc. Thesis, tarbiat modares university, Tehran-Iran(in Persian) 97p.
22- Walworth J.L., and Reynolds C.M. 1995. Bioremediation of a petroleum-contaminated cryic soil: effects of phosphorous, nitrogen, and temperature. Journal of Soil Contam, 4:299-310.

Journal of Water and Soil
Vol. 23, No. 3, Fall 2009, p. 145-155

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۳، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۸، ص. ۱۵۵-۱۴۵

The effect of Agricultural Fertilizers on Bioremediation of a Crude-Oil Polluted Soil

S. Sharifi Hosseini[1*] - A. Shahbazi [2] – A. Yazdipoor [3]- I. Kamranfar[4]

Abstract

Khuzestan province accommodates the largest oil-fields with huge petroleum production in Iran. Oil spills through transportations, oil pumping station and storage tanks are the cause of frequent contamination in land areas, including crop fields, imposing great damages to soil ecology. Thus, oil removal from contaminated soil by advance technologies such as bioremediation seems to be of vital necessity. The aim of this work was to study the effect of agricultural fertilizers and sewage-sludge application on bioremediation of oil-contaminated soil. Soil samples (5kg) were artificially contaminated with crude oil to a level of 1%. Fertilizers treatments were applied in 3 levels of 0, 1 and 2 ton/ha in 3 replicates. The soils were kept in normal moisture aerobic environment for 5 and 10 weeks. The soils were then analyzed for hydrocarbon-degrading heterotrophic bacteria count. Oil degradation was measured by oil Soxhlet extraction method. The results showed that the hydrocarbon-degrading and heterotrophic bacteria count in all the treatment increased with time. The result showed that hetrotrophic bacteria population increased from 6×10^3 cfu/gr soil to 1.4×10^8 cfu/gr soil Also, C/N Ratio decreased from 6 to 3. GC results indicated that all normal paraffin and isopernoids i.e. Phytane and Pristane decreased from 50 to 90 percent in all treatments moreover, the result indicated that application of fertilizers in 2 ton/ha rate in oil-contaminated soil lead to greater rates of biodegradation after 5 weeks, and could be introduced as the best suggested condition. Rates of biodegradation after 5 weeks.

Key words: Bioremediation, hetrotrophic bacteria, Gas Chromatography, Normal paraffin

1, 2, 3 – Research educators of soil fertility and Sustaineable development research, Department of A.C.E.C.R. Branch : Khouzestan
(*- Corresponding author Email: ssharifihoseini@yahoo.com)
4- Instructor of Agronomy and Plant Breeding Department, Agriculture Faculty, Shahid Chamran University of Ahwaz