تاثیر افزودن منبع نیتروژن و فسفر بر تغییرات جمعیت میکروبی خاک آلوده به لجن نفتی

الهام حسن زاده[۱] ، امیرحسن زاده[۲]، قاسمعلی محبعلی[۳]
۱. کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشکده علوم پایه دانشگاه شاهد تهران، ۲. دانشجوی ارشد دانشکده منابع طبیعی و کشاورزی دانشگاه یزد و ۳. عضو هیئت علمی پژوهشگاه صنعت نفت تهران

چکیده

طی پاکسازی مخازن نفتی که جهت ذخیره سازی نفت‌خام و مشتقات آن استفاده می‌شوند، حجم وسیعی از لجن نفتی به محیط تخلیه می‌شود که در صورت عدم رسیدگی صحیح، آلودگی‌های زیست محیطی به ویژه آلودگی خاک را به دنبال خواهد داشت. به منظور بررسی کارایی افزودن مخلوط کودهای نیتروژن و فسفر در زیست‌سالم سازی خاک آلوده به لجن نفتی کف مخازن نفت خام، ۲ راکتور آزمایشگاهی طراحی شد. خاک آلوده به لجن نفتی در یک بیوراکتور تحت تیمار کود قرار گرفت و موازی با این بیوراکتور، یک بیوراکتور حاوی خاک غیرآلوده (بیوراکتور شاهد) راه‌اندازی و راهبری شد. این بیوراکتورها تحت شرایط عملکردی تعریف‌شده به مدت ۵ ماه هوادهی شد. طی شش مرحله نمونه‌گیری از هر بیوراکتور تغییرات جمعیت باکتری‌های قابل‌کشت در خاک مورد آنالیز قرار گرفت. تغییرات جمعیت میکروبی در راکتور حاوی کود فسفر و نیتروژن مشاهده شد. در مراحل پایانی نمونه‌برداری، علیرغم کاهش جمعیت میکروبی کل، در راکتور افزایش تنوع میکروبی مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: پاکسازی زیستی، بیوراکتور، آلودگی، لجن نفتی، جمعیت میکروبی

مقدمه

زیست سالم سازی فرایندی است که طی آن از میکروارگانیسم های طبیعی موجود در محیط مثل مخمر، قارچ و باکتری ها برای شکستن و تجزیه ترکیبات خطرناک و سمی به ترکیباتی با سمیت کمتر و یا غیرسمی استفاده می‌کنند. میکروارگانیسم ها ترکیبات آلی را برای تامین ماده غذایی و انرژی مصرف و هضم می کنند. (EPA, 1996) هدف از زیست سالم سازی، تجزیه‌ی آلاینده های آلی به میزانی است که غیر قابل شناسایی باشند و چنانچه قابل ردیابی باشند غلظتشان پایین تر از حد تعیین شده باشند (EPA, 1996) روش های زیست سالم سازی را می توان به دو دسته مسیر های پاکسازی درجا و دگرجا تقسیم نمود. تکنیک های دگرجا بر خاک یا آب آلوده که از محل اصلی خود با خاک برداری یا پمپ کردن برداشته شدند در محلی غیر از محل اصلی خود اعمال می شوند. در حالی که تکنیک درجا در همان محل آلوده انجام می گیرد.(Vidali, 2001) پاکسازی درجا نسبت به تیمار های دگرجا قابل قبول تر می باشند که این بر می گردد به هزینه های کمتر انتقال و یا حفاری. از روش هایی که می توان نام برد تهویه زیستی[۱]، تحریک زیستی[۲] و افزودن جمعیت میکروبی[۳] می باشد.(Vidali, 2001) تکثیر میکروارگانیسم های خارجی که به خاک آلوده وارد شده اند تحت تاثیر فاکتور های زیستی و غیر زیستی قرار می گیرند. نشان داده شد که فاکتور های غیر زیستی در خاک مانند مواد معدنی خاک، کشش سطحی آب، کربن آلی، مواد غذایی معدنی، pH، دما و مواد شیمیایی بر بقا و فعالیت تجزیه‌ای میکروب های وارد شده به خاک اثر می گذارند(Hosokawa etal, 2009.) در دسترس بودن مواد غذایی نقش مهمی را در رشد و سازش میکروب ها به هیدروکربن ها ایفا می کنند. دو عنصر غذایی اصلی، نیتروژن و فسفر، به عنوان مهمترین ها شناخته شده‌اند.

[1] Bioventing
[2] Biostimulation
[3] Bioaugmentation

نیتروژن و فسفر معمولا فاکتور های محدود کننده‌ای در تجزیه‌ی هیدروکربن ها می باشند و همچنین نسبت بالای کربن / نیتروژن و یا کربن / فسفر برای رشد میکروبی می توانند نامطلوب باشند.(Kuhad&Gupta,2009)

مواد و روش‌ها

بیوراکتور به شکل استوانه هایی به ارتفاع ۴۰ سانتیمتر و قطر ۲۰ سانتی متر می باشد. هر راکتور حجمی حدود ۱۰ لیتر دارد. این مجموعه از ۴ استوانه تشکیل شده است زیرا در ادامه آزمایش چهار تیمار متفاوت اعمال می شود. خاکی که در این تحقیق استفاده شد دارای سابقه تماس با آلاینده نمی باشد. خاک از یک منطقه کشاورزی در منطقه جعفر آباد تهران از عمق تقریبی ۱۵ سانتیمتری از سطح خاک به مقدار ۵۰ کیلوگرم جمع آوری شد. خاک به آزمایشگاه دانشگاه شاهد منتقل و تا زمان ریختن در راکتور در داخل سردخانه و در دمای چهار درجه سانتیگراد نگهداری شد بعد از جمع آوری خاک، مقداری از خاک به منظور آنالیز فیزیکی و شیمیایی به آزمایشگاه خاکشناسی استان اردبیل منتقل شد.(جدول۱) آنالیز میکروبی نیز که شامل شمارش میکروبی خاک می باشد در زمان صفر انجام شد. لجن نفتی از مناطق نفت خیز جنوب، اهواز تهیه و به تهران و آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه شاهد منتقل شد. یک راکتور از چهار راکتور باید با نسبت مناسب که در ادامه خواهد آمد با کود اوره (منبع نیتروژن) و کود تریپل فسفات (منبع فسفر) مخلوط می‌شد. و بر اساس آنالیز خاک میدانیم که مقدار نیتروژن در خاک ۰/۱۳۳ درصد و مقدار فسفر ۷/ ۶۰ درصد به صورت میلی گرم در کیلوگرم می باشد. بر این اساس در ۷ کیلوگرم خاک به ترتیب ۳۱/ ۹ گرم و ۴۲/ ۰ گرم نیتروژن و فسفر موجود می بود و بر اساس اینکه نسبت C:N:P بهینه در اکثر مقالات نسبت۱ : ۱۰ : ۱۰۰ می باشد . این نسبت در نظر گرفته شد. میزان کربن موجود در خاک آلوده با استخراج توسط حلال نرمال هگزان برابر با ۵۰۰ گرم در هفت کیلوگرم خاک می باشد و بر این اساس میزان نیتروژن ۵۰ گرم و میزان فسفر ۵ گرم در نظر گرفته شد بنابراین میزان نیتروژن و فسفری که باید به خاک افزوده شود محاسبه شد بعد از محاسبه مقدار کود مورد نیاز عدد را گرد کرده و ۲۰۰ گرم اوره تجاری و ۴۰ گرم فسفات تجاری برای هفت کیلوگرم خاک در نظر گرفته شد. به منظور ممانعت از اعمال شوک کودها بر جامعه میکروبی این مقادیر به سه بخش تقسیم شده و در سه مرحله با فاصله یک ماه به خاک اضافه شدند.

خاک با نسبت ۱۰٪ با لجن مخلوط شد. این خاک کنترل می باشد و فاقد هرگونه تیمار زیست سالم سازی می باشد و راکتور شماره ۱ حاوی این خاک می‌باشد. راکتور شماره ۲ حاوی خاک آلوده مخلوط با مواد غذایی نیتروژن و فسفر می باشد که می‌توان آن را مسیر تحریک زیستی به حساب آورد. با نمونه‌گیری از راکتور ها تغییرات نفتی و میکروبی آنها بررسی شد. به این ترتیب شش بار و هرکدام با فاصله‌ی حدود ۳۰-۲۵ روز از راکتور ها نمونه گیری صورت گرفت. در هر بار نمونه‌گیری سعی شد از هر راکتور در سه عمق متفاوت نمونه گیری شود و سپس با هم مخلوط شود تا میانگینی از پراکندگی میکروبی به دست بیاید. نمونه های گرفته شده در ظرف هایی تاریخ نمونه گیری برروی آن نوشته شده بود در یخچال نگهداری می شد. بلافاصله بعد از نمونه گیری آنالیز میکروبی صورت گرفت. برای تعیین تعداد باکتری های کل از روش pour plate استفاده شد .در این روش ۱گرم خاک در یک لوله آزمایش حاوی ۹ میلی لیتر آب مقطر استریل ریخته شد و سپس توسط دستگاه ورتکس به شدت تکان داده شد. به مدت ده دقیقه اجازه داده شد تا خاک رسوب کند. سپس شش لوله آزمایش حاوی ۹ میلی لیتر آب مقطر استریل را آماده کرده و از لوله اول ۱ میلی لیتر به لوله دوم منتقل شد. و این کار با همین ترتیب ادامه پیدا کرد تا در نهایت ۱ میلی لیتر به لوله چهارم منتقل شد. و سپس در گام بعدی از لوله های آماده شده با رقت های 10^{1} تا 10^{4}، ۱۰۰ ماکرولیتر در هر پلیت با سه بار تکرار ریخته شده و بر روی آن نوترینت آگاری که دمای آن مناسب است ریخته شد. با حرکت دادن پلیت مخلوط یکنواخت شد. پلیت ها بعد از سرد شدن در انکوباتور و در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت گرماگذاری شد. در مرحله بعد کلنی های ایجاد شده شمارش شدند.(مینایی تهرانی و همکاران، ۱۳۹۱)

جدول۱: نتایج آنالیز خاک

ردیف	پارامتر	علامت	A	واحد	روش اندازه گیری
۱	شوری	ECe	۲/۲	دسی زیمنس بر متر	روش عصاره اشباع
۲	pH	pH	۷/۶		روش گل اشباع
۳	کربن آلی	OC	۰/۱۴	درصد	روش فروآمونیوم سولفات
۴	ازت کل	Total N	۰/۱۳۳	درصد	روش کجلدال و دیازو
۵	ازت آمونیاکی	NH_4-N	۰/۱۰۹	درصد	روش کجلدال
۶	ازت نیتراتی	NO_3-N	۵۲	میلی گرم بر کیلوگرم	روش دیازو
۷	ازت نیتریتی	NO_2-N	۱۵	میلی گرم بر کیلوگرم	روش دیازو
۸	فسفر قابل جذب	P ava	۶۰/۸	میلی گرم بر کیلوگرم	روش اولسن
۹	پتاسیم قابل جذب	K ava	۹۷۵	میلی گرم بر کیلوگرم	روش استات آمونیوم
۱۰	درصد اشباع	SP	۴۱	درصد	اندازه گیری رطوبت گل اشباع
۱۱	جرم ویژه ظاهری	BD	۱ /۶۰	گرم بر سانتیمترمکعب	روش کلوخ و پارافین
۱۲	رس	Clay	۲۴	درصد	روش هیدرومتری
۱۳	سیلت	Silt	۵۴	درصد	روش هیدرومتری
۱۴	شن	Sand	۲۲	درصد	روش هیدرومتری
۱۵	بافت خاک	Texture	Silt loam		روش هیدرومتری
۱۶	ظرفیت نگهداری آب در خاک	Water Holding capacity	۵۶/۷	درصد	روش گلدانی

آنالیز میکروبی نیز در زمان صفر صورت گرفت که تعداد کلی باکتری ها به این صورت می باشد:۲/۰۱ ×۱۰^{۵} در یک گرم خاک

نتایج و بحث:

تعداد کل باکتری ها در هر راکتور بر روی محیط نوترینت آگار به دست آمد:

راکتور شماره یک به عنوان کنترل در این آزمایش می باشد که حاوی خاک آلوده به لجن بدون هیچگونه تیماری بود. با گذشت زمان و با هر بار نمونه گیری تعداد باکتری ها افزایش پیدا کرد اما کاهش تعداد باکتری ها در نمونه گیری ششم مشاهده شد. افزایش تعداد باکتری ها در راکتور کنترل به علت فراهم نمودن شرایط مناسب رشد مناسب مانند هوادهی و رطوبت بود و این افزایش تا زمانی که مواد غذایی در دسترس در اختیار میکروارگانیسم های بومی وجود داشته باشد ادامه دارد. (جدول۲)

راکتور شماره دو حاوی خاک آلوده به لجن نفتی بود که به آن کود نیتروژن و فسفر به عنوان منابع نیتروژن و فسفر اضافه شد. جمعیت میکروبی سیر افزایشی داشت اما در نمونه گیری پنجم و ششم افت وکاهش رشد باکتری ها مشاهده شد. به صورت تدریجی ودر سه مرحله کود به خاک اضافه شد و در این راکتور کاهش رشد حتی نسبت به کنترل و سایر راکتور ها

دیده شد که این می تواند به علت وارد شدن شوک نیتروژن و فسفر به میکروارگانیسم های موجود در خاک و ممانعت از تکثیر آنها باشد (جدول۲)

جدول ۲: تعداد باکتری های شمارش شده در محیط نوترینت آگار در هر راکتور

شماره راکتور	تعداد باکتری در هر میلی لیتر از نمونه (مرحله صفر)	تعداد باکتری در هر میلی لیتر از نمونه (مرحله ۱)	تعداد باکتری در هر میلی لیتر از نمونه (مرحله ۲)	تعداد باکتری در هر میلی لیتر از نمونه (مرحله۳)	تعداد باکتری در هر میلی لیتر از نمونه (مرحله۴)	تعداد باکتری در هر میلی لیتر از نمونه (مرحله ۵)
۱	$۱۰^{۵}$ × ۲/۰۱	$۱۰^{۵}$ × ۳ /۲۵	$۱۰^{۵}$ × ۳/۹	$۱۰^{۶}$×۳/ ۱۲	$۱۰^{۶}$×۳ /۲	$۱۰^{۵}$× ۱/۷۶
۲	$۱۰^{۵}$ × ۲/۰۱	$۱۰^{۵}$ × ۴ /۷۶	$۱۰^{۵}$ × ۴ /۹	$۱۰^{۶}$×۱ /۹۶	$۱۰^{۵}$ × ۲/۴	$۱۰^{۵}$× ۱/۵۹

منابع :

۱. مینایی تهرانی داریوش، حرفت‌منش علی، آذری‌دهکردی فرود. مطالعه تجزیه زیستی نفت‌خام سنگین در خاک با مقیاس پایلوت. علوم محیطی, ۱۰: ۷۱-۸۲.

EPA, A. Citizen Guide to Bioremediation. 1996. EPA 542-F-96-007

Hosokawa, R., Nagai, M., Morikawa, M., & Okuyama, H. 2009. Autochthonous bioaugmentation and its possible application to oil spills. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(9): 1519-1528.

Kuhad, R. C. & Gupta, R. 2009. Biological Remediation of Petroleum Contaminants. *Advances in Applied Bioremediation*, 173-187.

Okoh, A. I. & Trejo-Hernandez, M. R. 2010. Remediation of petroleum hydrocarbon polluted systems: Exploiting the bioremediation strategies. *African Journal of Biotechnology*, 5(25).

Vidali, M. 2001. Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry*, 73(7): 1163-1172

The effects of adding a source of nitrogen and phosphorus on soil microbial population change contaminated with oily sludge

Abstract

During the cleaning of oil tanks that are used to store crude oil and its derivatives, Size range of oily sludge is discharged to the environment. That without proper care, environmental pollution, especially pollution of soil will follow. To evaluate the effectiveness of adding a mixture of nitrogen and phosphorus in bioredemation of soil contaminated with oily sludge Crude oil tank floor, 2 reactor was designed Soil contaminated with oily sludge in a bioreactor treated with fertilizers And parallel bioreactor, a bioreactor containing uncontaminated soil (bioreactor control) was set up and operation. It was aerated bioreactors under operating conditions defined for 5 months. During the six sampling from the bioreactor changes in bacterial population in the soil were analyzed. Changes in microbial population was observed in the reactor containing phosphorus and nitrogen fertilizers. In the final stages of sampling, in spite of the reduction of the total microbial population, microbial diversity was observed in the reactor increases.

Keywords: Biological cleaning, Bioreactors, pollution, oily sludge, microbial population