دوازدهمین کنگره علوم خاک ایران
تبریز، 12 الی 14 شهریور 1390
(بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک)

زیست پالایی خاکهای آلوده به هیدروکربنهای نفتی بوسیله باکتریهای تجزیه‌گر نفتی و قارچ میکوریز

وحید سروی مغانلو[1]، دکتر مصطفی چرم[2]، دکتر حسین معتمدی[3]
[1]دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گروه خاکشناسی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز
[2] دانشیارگروه خاکشناسی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز
[3]استادیار گروه زیست‌شناسی(میکروبیولوژی) دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران
پست الکترونیکی مسئول مکاتبه کننده: vsarvi@gmail.com

چکیده

یکی از مهمترین راهکارهای حذف این آلاینده‌های نفتی از خاک استفاده از موجودات زندهٔ ذره‌بینی بومی همان منطقه می‌باشد. هدف از پژوهش، بررسی میزان تجزیه ترکیبات نفتی و عملکرد گیاه در طی فرآیند زیست بهسازی خاک‌های آلوده نفتی بود. برای این منظور دو خاک الوده با سطح آلودگی 1 و 2 درصد آماده گردید و چهار تیمار کشت گیاه شبدر(T1)،کشت گیاه شبدر همراه با مایه‌زنی قارچ میکوریز(T2) ،کشت گیاه شبدر همراه با مایه‌زنی باکتری‌های تجزیه‌گر(T3) ،کشت گیاه همراه با مایه‌زنی قارچ میکوریز و باکتری‌های تجزیه‌گر نفت(T4) بکار گرفته شد. عملکرد گیاه و میزان تجزیه ترکیبات نفتی در تیمارهایی با مایه زنی میکوریزا و باکتری‌های تجزیه-گر بیشترین میزان بود.

کلمات کلیدی: هیدرو کربن های نفتی، باکتری تجزیه‌گر، کیاه پالایی، میکوریز

مقدمه

وجود هیدروکربنهای نفتی در خاک می‌تواند سبب بروز سمیت برای انسان‌ها و سایر موجودات زنده شده و موجبات آلودگی منابع آب، ایجاد سمیت و بیماری برای انسان و سایر موجودات زنده را به دنبال دارد، باید به نحوی از محیط زیست حذف گردند(1). عامل کلیدی در زیست بهسازی موجودات زندهٔ ذره‌بینی و باکتری‌ها که قادر به رشد وحیات با حداقل شرایط می‌باشد، است. موجودات زندهٔ ذره‌بینی به عنوان ابزار مناسب برای تخریب آلاینده ها بوده، زیرا که آنها آنزیم‌هایی ترشح می‌کنند که به آنها اجازه می‌دهد که از آلاینده‌ها به عنوان منبع غذایی استفاده کنند از طرف دیگر نیز آنها بخاطر اندازه کوچک و سطح ویژه بالا براحتی با این آلاینده‌ها تماس پیدا می‌کنند، که در زیست بهسازی در جا می‌تواند به عنوان یک روش با کارایی بلند مدت مدنظر قرار گیرد (2). از طرف دیگر استفاده از میکروارگانیسم ها و گیاهان برای زیست‌پالایی آلاینده‌های نفتی از خاک تکنولوژی قابل دسترس برای حذف آلاینده‌ها بنظر می‌رسد. بسیاری از نژادهای باکتریهای جداسازی شده از خاکهای آلوده توانایی استفاده از پلی آروماتیکها به عنوان منبع کربن و انرژی را دارا می‌باشند. میکوریزا به عنوان قارچ همزیست گیاهان خانواده لگوم نقش مهمی را در جذب آب، فسفر و دیگر عناصر غذایی توسط گیاه ایفا می‌کند(1). تحقیقات اخیر نشان دهنده نقش میکوریزا در گیاه پالایی به واسطه بهبود و تسریع رشد گیاه در خاکهای آلوده و افزایش نسبت تجزیه آلاینده‌ها است. هدف از این پروژه بررسی نقش میکوریزا و باکتریهای تجزیه‌گر در افزایش گیاه پالایی آلاینده‌های نفتی در خاکهای آلوده به نفت اهواز می‌باشد.

مواد و روشها

جهت انجام این پژوهش خاک لازم از لایه رویین (0-30cm) خاک‌های کشاورزی غیر آلوده پیرامون چاه‌های نفت مارون اهواز جمع آوری شد. خاک با مقادیر 1و 2 درصد وزنی از نفت خام که از نزدیکترین چاه به منطقه نمونه برداری شده بود، بطور مصنوعی آلوده شد. برای این منظور نفت خام با نسبت 5:1 در کلروفرم حل گردید و بر روی خاک با رطوبت 10 درصد وزنی در روی ظروف شیشه‌ای مسطح اسپری گردید و برای توزیع یکنواخت و جذب سطحی آلاینده‌ها نمونه‌ها به مدت دو هفته در دمای آزمایشگاه نگهداری شدند و طی این مدت خاک‌ها در حد رطوبت ظرفیت زراعی آبیاری و کاملا زیرورو و مخلوط شدند. برای زیست بهسازی خاک‌های آلوده از چهار تیمار بهره‌گیری شد که شامل: 1-کشت گیاه شبدر(T1) 2-کشت گیاه شبدر همراه با مایه‌زنی قارچ میکوریز(T2)3 -کشت گیاه شبدر همراه با مایه‌زنی باکتری‌های تجزیه‌گر(T3) 4-کشت گیاه همراه با مایه‌زنی قارچ میکوریز و باکتری‌های تجزیه‌گر نفت(T4) بودند. در تیمارهای مایه‌زنی شده با باکتری‌های تجزیه‌گر نفت، باکتری‌های تجزیه‌گر دو هفته پیش از کاشت گیاه به نمونه خاک‌های آلوده افزوده شد. در این پروژه از باکتریهای تجزیه‌گر بومی *سودوموناس* و *مورکسلا* که از خاک‌های مناطق آلوده جداسازی شده بودند، بهره‌گیری گردید. بدین منظور ابتدا این باکتریها در محیط کشت مایع TSB به مدت یک هفته و دمای $25^{\circ C}$ تکثیر داده شدند. سپس 10 میلی‌لیتر از این محیط با OD= 0/5 (میزان نور عبوری اندازه‌گیری شده با اسپکتروفتومتر در طول موج 600 نانومتر) به ازای هرکیلوگرم خاک بر روی خاک آلوده اضافه گردید. و به همراه سایر نمونه خاکها در شرایط مشابه در گلخانه قرار داده شدند. پس از دو هفته در هر گلدان آزمایش که دارای 5 کیلوگرم خاک بود، 20 عدد بذر شبدر کاشته شد. در تیمارهای دارای قارچ میکوریزا (جنس ***Arbescolar-vezicolar*** گونه ***Glomus intraradices***) 20گرم ازمایه آن در عمق 3 سانتیمتری از سطح خاک به صورت یک لایه گذاشته شد. یک نمونه شاهد بدون هیچ تیمار با سطح آلودگی 1/5 درصد آماده شد ودر تمام مراحل آزمایش در شرایط مشابه با سایر نمونه‌ها نگهداری شد پس از پایان هشت هفته اندام‌های هوایی (ساقه و برگ) هر گلدان از قسمت طوقه جداشده و وزن تر آنها محاسبه گردید و برای جداسازی ریشه‌ها از خاک روش الک مرطوب استفاده شد. به منظور تعیین غلظت کل ترکیبات نفتی در خاک از روش عصاره‌گیری به روش سوکسیله با نسبت مساوی ان هگزان و دی کلرومتان (روش شماره 8100 سازمان حفاظت محیط زیست امریکا) استفاده شد(4). برای تجزیه آماری داده‌ها نیز از نرم‌افزار SPSS و آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه‌ای کاملا تصادفی و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن استفاده شد.

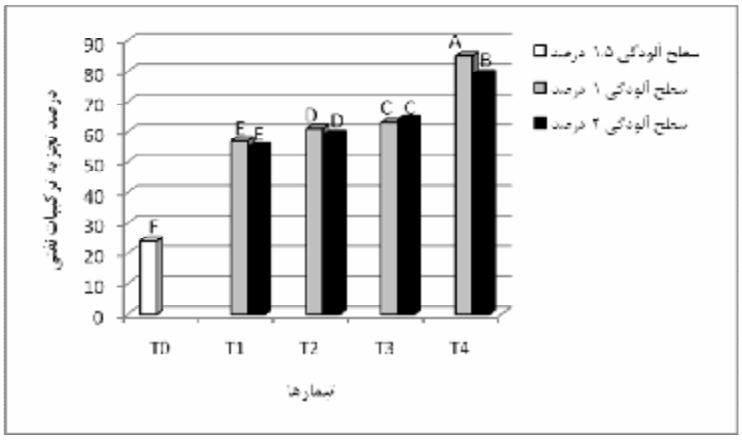
نتایج و بحث

بررسی نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد که که هر سه عامل سطح آلودگی، تلقیح میکوریزا و تلقیح باکتری‌های تجزیه‌گر بر تأثیر تیمارها در تجزیه ترکیبات نفتی در سطح 5 درصد دارای تأثیر معنی داری می‌باشند، در ضمن اثر متقابل سطح آلودگی با تلقیح میکوریز و سطح آلودگی با تلقیح باکتری‌های تجزیه‌گر در تجزیه ترکیبات نفتی در سطح 5 درصد معنی دار نمی‌باشد. این نکته نشان دهنده این می‌باشد، که میکوریزا و باکتری‌های تجزیه‌گر صرفنظر از میزان آلودگی نقش خود را در تجزیه ترکیبات نفتی ایفا می‌کنند، در حالیکه سایر اثرات متقابل در سطح 5 درصد دارای تاثیر معنی دار در تجزیه ترکیبات نفتی می‌باشند (جدول1). با بررسی نتایج بدست آمده از مقدار ترکیبات نفتی استخراج شده بوسیله سوکسیله چنین

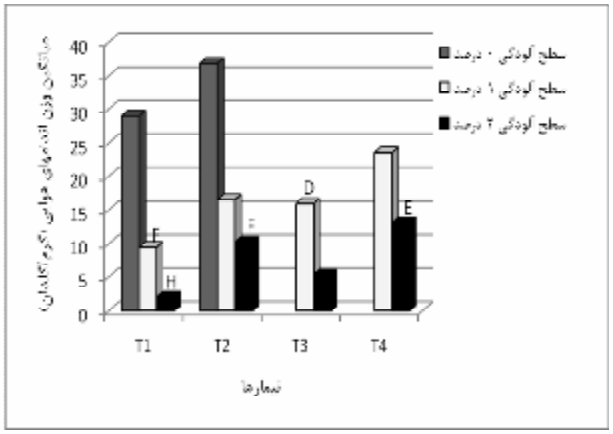
برداشت می‌شود که تیمار دریافت کننده مایه میکوریزا به همراه باکتری‌های تجزیه‌گر بیشترین بازدهی را در پالایش ترکیبات نفتی داشتند. به گونه‌ای که در سطح آلودگی 1 درصد توسط این تیمار 85 درصد تجزیه آلاینده‌های آلی دیده شد، در برابر آن در سطح آلودگی 2 درصد میزان تجزیه توسط این تیمار 79 درصد بود. میان تجزیه ترکیبات آلی در هر چهار تیمار در هردو سطح آلودگی نسبت به تیمارشاهد با میزان تجزیه 24 درصد تفاوت معنی‌داری درسطخ 5 درصد دیده شد. از سوی دیگر مقایسه نتایج بازدهی تیمارها بین دو سطح آلودگی 1 و 2 درصد بیانگر این است که فقط در تیمار 4 تفاوت معنی‌داری بین بازدهی تیمارها وجود دارد(شکل1). در واقع میکوریزا نقش خود را در افزایش تجزیه آلاینده‌های آلی از راه تغییر ساختار میکروبی ریزوسفر و میکوریزوسفر، ایجاد محیط مناسب برای فعالیت میکروارگانیسم‌ها بواسطه افزایش حجم ریشه و ریزوسفر و افزایش ترشحات ریشه اعمال می‌کند (1). در این صورت حضور همزمان میکوریز با باکتری‌های تجزیه کننده می‌تواند میزان تجزیه و تخریب را افزایش دهد. حضور میکوریزا می‌تواند به عنوان عامل برطرف کننده محدودیت مایه زنی میکروارگانیسم‌های تجزیه‌گر، که شامل محدودیت اکسیژن و عناصر غذایی می‌باشد، عمل کند(3). نتایج مطالعات آلرسون و همکاران نشان داد که در بین چهار تیمار بررسی شده مشابه با این پروژه تیمار دریافت کننده مایه باکتری و میکوریزا با 59 درصد تخریب آلاینده‌های هیدروکربنی بیشترین بازدهی را در بین تیمارها داشته و میان میزان تجزیه هر چهار تیمار نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری گزارش شد(2). بررسی وزن اندامهای هوایی نشان می‌دهد که با افزایش سطح آلودگی وزن اندامهای هوایی کاهش می‌یابد، و میان سطح آلودگی 1و2 درصد با تیمار شاهد تفاوت معنی داری در سطح 5 درصد دیده شد، همچنین میان عملکرد هر چهار تیمار در دوسطح آلودگی 1و 2 درصد نیز تفاوت معنی داری در سطح 5 درصد دیده شد(شکل2). در بین تیمارها نیز تیمار با مایه‌زنی میکوریزا و باکتری‌های تجزیه‌گر و تیمار با مایه زنی میکوریزا بیشترین عملکرد دیده شد، در واقع میکوریزا نقش خود را در افزایش عملکرد به واسطه افزایش جذب فسفر به دلیل توسعه ریشه و اثرات سینرژیسم بین باکتری‌های حل کننده فسفات با میکوریزا و افزایش تثبیت نیتروژن به دلیل اثر سینرژیسمی بین قارچ‌های میکوریزی VAM و باکتری‌های ریزوبیومی در تثبیت ازت و افزایش گرهکهای تثبیت کننده ازت ریشه‌ای دانست. باکتری‌های تجزیه‌گر نیز با تجزیه ترکیبات آلاینده از میزان سمیت آنها برای رشد و جوانه‌زنی گیاه را تقلیل می‌دهد. به گونه‌ای که در تیمارهایی که کاهش قابل ملاحظه آلاینده‌ها صورت گرفته، میزان رشد و عملکرد گیاه بالا می‌باشد. بررسی وزن ریشه گیاه نیز نشان داد که در تیمارهای دریافت کننده مایه زنی میکوریزا بیشترین راندمان را داشتند و با افزایش سطح آلودگی وزن ریشه کاهش می‌یابد، و بین عملکرد هر چهار تیمار در هر دو سطح آلودگی تفاوت معنی داری در سطح 5 درصد دیده شد(شکل3).

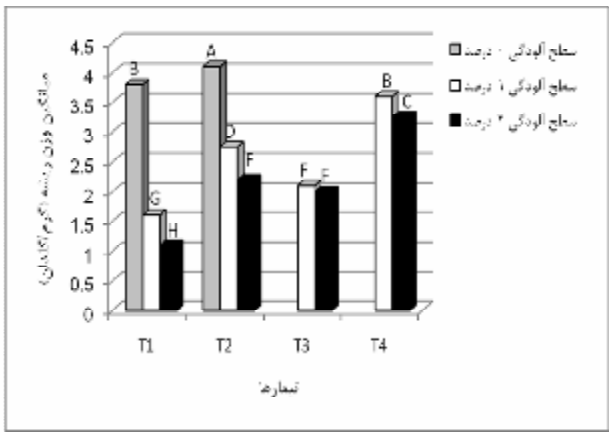
جدول1) تجزیه واریانس اثر تیمارها بر تجزیه ترکیبات نفتی

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	ارزش F
سطح آلودگی	1	45/37	45/37	45/37 *
تلقیح میکوریز	1	828/37	828/37	38/828*
تلقیح باکتری	1	1683/37	1683/37	1683/37 *
سطح‌آلودگی×تلقیح باکتری	3	3/37	0/79	3 /37 ns
سطح‌آلودگی×تلقیح میکوریز	3	1/125	0/375	0/375 ns
تلقیح باکتری ×میکوریز	3	198/37	66/123	198/37*
تلقیح باکتری×میکوریز×سطح آلودگی	7	45/37	15/12	45/37*
خطای آزمایشی	19	19	1	



شکل 1) راندمان تیمارهای T0: تیمار شاهد T1:تیمار کشت شبدر T2:کشت شبدر با مایه زنی میکوریزا T3:کشت شبدر با مایه زنی باکتری‌های تجزیه‌گر T4:کشت شبدر با مایه زنی میکوریزا و باکتری‌های تجزیه‌گر برای تجزیه هیدروکربن‌های نفتی





شکل 2) میانگین وزن اندامهای هوایی و ریشه در تیمارهای T0: تیمار شاهد T1:تیمار کشت شبدر T2:کشت شبدر با مایه زنی میکوریزا T3:کشت شبدر با مایه زنی باکتری‌های تجزیه‌گر T4:کشت شبدر با مایه زنی میکوریزا و باکتری‌های تجزیه‌گر

منابع

1) Alarcon, A., Davies, F.T., Autenneth, R.L. and Zuberer, D.A. 2008. Arbuscular Mycorrhiza and Petroleum-Degrading Microorganisms Enhance Phytoremediation of Petroleum-Contaminated Soil. International Journal of Phytoremediation. pp 10: 251-263.

2) Atlas , R.M. 1981. Microbial degredation of petrolium hydrocarbon an enviromental . Perspective Microbial. 45:180-209.

3) Azcon-aguiler, C. 1992. interaction between mycoohizal fungi and other rhizosphere microorganisms . in: Mycorrhizal unctioning, Allen Mf :163-198.

4) Christopher, S., P. Hein, J. Marsden and A.S. Shurleff. 1988. Evaluation of methods 3540 (soxhlet) and 3550(Sonication) for evaluation of appendix IX analyses from solid samples. S-CUBED, Report for EPA contract 68-03-33-75, work assignment No.03, Document No. SSS-R-88-9436.