مطالعه اثر آلودگی نفت سفید بر روی خاک مزرعه

زهرا زید آبادی نژاد [۱]، مهدی حسن شاهیان [۲]
۱-گروه میکروبیولوژی واحد علوم تحقیقات سیرجان دانشگاه آزاد اسلامی سیرجان ایران، ۲- دانشگاه شهید باهنر کرمان دانشکده علوم گروه زیست شناسی

چکیده
نفت سفید یا کروزان یکی از منابع عمده آلودگی خاک می باشد. هدف این تحقیق ارزیابی پاسخ خاک مزرعه به آلودگی نفت سفید است. جهت درک اثر نفت سفید بر روی جمعیت میکروبی خاک مزرعه سه میکروکازم شامل بدون آلودگی، آلوده به نفت سفید و آلوده به نفت سفید همراه با مواد غذایی نیتروژن و فسفر طراحی شد. شاخص هایی همچون جمعیت باکتری های هتروتروف، جمعیت باکتری های تجزیه کننده، سنجش گردید. نتایج نشان داد که تعداد باکتری های هتروتروف در زمان ۱۲۰ روز افزایش قابل ملاحظه ای تنها در خاک همراه با ماده غذایی داشت. تعداد باکتری های تجزیه کننده نفت سفید الگوی افزایش تدریجی را در خاک مزرعه نشان داد. بالاترین کمیت باکتری ها در خاک مزرعه که همراه با افزودن مواد معدنی نیتروژن و فسفر بود مشاهده گردید. این نتیجه نشان دهنده این واقعیت است که مواد غذایی می تواند استرس ناشی از نفت سفید را به حداقل برساند.
کلمات کلیدی: آلودگی، تجزیه زیستی، خاک مزرعه، میکروکازم، نفت سفید

مقدمه
خاک های مزارع از لحاظ ماده آلی کربنی عمدتا در سطح مطلوبی قرار دارند (Wang et al., ۲۰۱۱). منظور از خاک مزرعه در این تحقیق زمین هایی است که گیاهان علفی یکساله و دوساله از قبیل گندم، جو، نخود و .. در آنها کشت می شود. با توجه به وجود پوشش گیاهی در آنها منبع کربن آلی از منشا گیاهی هر سال وارد این خاک ها می شود (Wang et al., ۲۰۱۱). اهمیت درک اثرات آلودگی های هیدروکربنی نفتی بر روی خاک مزارع از این جهت است که مشتقات نفتی متعددی می توانند بتدریج خاک های مزارع حاصلخیز را به خاک های غیر قابل کشت تبدیل کنند این امر بخصوص در مناطق زراعی که نزدیک به تاسیسات نفتی هستند و یا در مسیر لوله های انتقال نفت می باشند حایز اهمیت است (Ruberto et al., ۲۰۰۳). بنابراین با درک بهتر اثر الودگی مشتقات نفتی می توان تدابیر بهتری برای حذف و استفاده از پتانسیل درونی خاک جهت احیای آنها بهره برد. بیشتر تحقیقاتی که در زمینه خاک اثر الودگی نفتی بر روی خاک مزرعه انجام شده است با هدف اثر گذاری این الوگی بر روی بازدهی محصولات کشت شده در این خاکها بوده است.

مواد و روش ها
نمونه برداری
نمونه برداری تحت شرایط استریل انجام شد. ابتدا ۱۰ سانتی متر از سطح خاک برداشته شد و حدود ۳ کیلو گرم از خاک داخل ظروف استریل ریخته شد. نمونه های خاک تا انتقال به آزمایشگاه روی یخ نگهداری شدند و سپس در دمای ۴ C تا انجام آزمایشات بعدی قرار داده شدند (Alef and Nanniper ۱۹۹۵).

طراحی میکروکازم ها
میکروکازم به محیط کوچک آزمایشگاهی گفته می شود که شرایط مورد آزمایش در آن طراحی می شود. سه میکروکازم برای هر نوع خاک در ظروف شیشه ای با مشخصات ۵۰ cm طول، ۱۰ cm عمق و ۲۵ cm عرض جهت مطالعه تغییرات در جوامع میکروبی طراحی گردید. هر میکروکازم حاوی ۵۰۰ گرم خاک بود. میکروکازم ها درسه حالت میکروکازم خاک غیر آلوده [۱۷۹](با نام اختصاری N)، میکروکازم خاک آلوده به نفت سفید [۱۸۰] (با نام اختصاری P) و میکروکازم خاک آلوده به نفت سفید همراه با افزودن مواد غذایی [۱۸۱] (با نام اختصاری NP) در جدول ۳-۲ میکروکازم های طراحی شده آمده است. میکروکازم ها در تاریکی و دمای ۲۵ C به مدت ۱۲۰ روز انکوبه شدند. در فواصل زمانی هر دو روز یکبار خاک در میکروکازم ها با دست به هم خوردند تا شرایط بی هوازی ایجاد نگردد. در زمان های صفر، ۳۰ روز، ۶۰ روز، ۹۰ روز و ۱۲۰ روز نمونه گیری از میکروکازم ها انجام شد (Ives et al., ۱۹۹۶).

شمارش تعداد کل هتروتروف ها و تجزیه کننده ها در خاک با روش سریال رقت (CFU[۱۸۲])
ابتدا ۱۰ گرم از خاک های هر میکروکازم در ۱۰۰ میلی لیتر از بافر فسفات نمکی (PBS[۱۸۳]) حل شد. سپس درون لوله های آزمایش میزان ۹ میلی لیتر بافر PBSریخته شد. برای شمارش هتروتروف ها رقت 10^{-5} و 10^{-6} در لوله های آزمایش تهیه گردید و ۱۰۰ میکرولیتر از این رقت در پلیت های نوترینت آگار کشت سفره ای داده شد. برای شمارش تجزیه کننده ها رقت 10^{-3} و 10^{-2}

---
[۱۷۹] - Non pollutant
[۱۸۰] - Polluted soil
[۱۸۱] - Nutrient polluted soil
[۱۸۲] - Clony forming unit
[۱۸۳] - Phosphate Buffer Saline

۱۰تهیه شد و ۱۰۰ میکرولیتر از این رقت در پلیت های بوشنل هاس آگار حاوی ۱٪ نفت سفید به عنوان تنها منبع کربن کشت سفره ای داده شد. پس از انکوباسیون در دمای ۳۰ C، شمارش کلنی ها انجام شد و طبق فرمول زیر تعداد کلنی در هر گرم خاک محاسبه شد: (Okerentugba et al., ۲۰۰۳)

Cfu/gram= × عکس رقت × میانگین تعداد کلنی های شمارش شده ۱۰۰

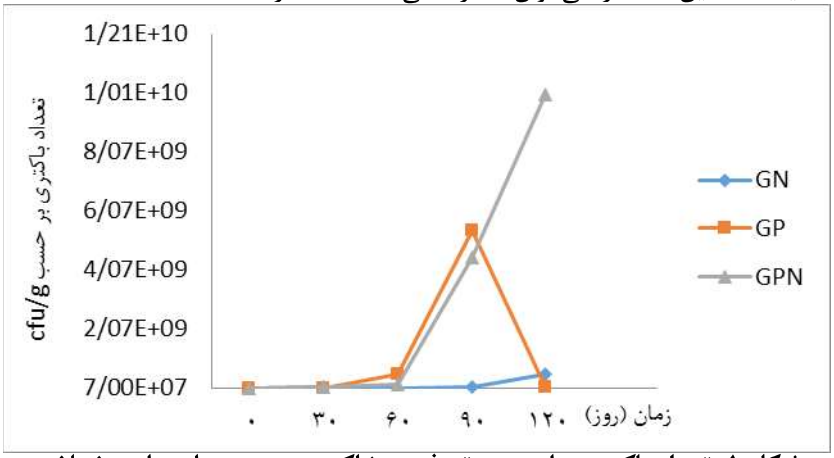
شمارش تعداد کل هتروتروف ها و تجزیه کننده ها در خاک با روش MPN[۱۸۴]

ابتدا ۱۰ گرم از خاک های آلوده در ۱۰۰ میلی لیتر از بافر فسفات نمکی(PBS) حل شد. سپس درون لوله های آزمایش میزان ۹ میلی لیتر بافر PBS ریخته شد. برای شمارش هتروتروف ها رقت های 10^{-1} تا 10^{-5} در لوله های آزمایش تهیه گردید و در میکروپلیت های ۲۴ خانه میزان ۱۵۰۰ میکرولیتر محیط نوترینت براث تحت شرایط استریل ریخته شد. از رقت های 10^{-3} تا 10^{-5} تهیه شده، میزان ۱۰۰ میکرولیتر درون محیط کشت تلقیح گردید. برای شمارش تجزیه کننده ها رقت های 10^{-1} تا 10^{-3} در در لوله های آزمایش تهیه گردید و در میکروپلیت های ۲۴ خانه میزان ۱۵۰۰ میکرولیتر محیط بوشنل هاس براث حاوی ۱٪ نفت سفید به عنوان تنها منبع کربن، تحت شرایط استریل ریخته شد. از رقت های تهیه شده ، میزان ۱۰۰ میکرولیتر درون محیط کشت تلقیح گردید. هر رقت دارای ۳ تکرار بود و MPN به صورت ۳ تایی انجام شد. میکروپلیت های جهت شمارش هتروتروف ها به مدت ۷ روز و میکروپلیت های جهت شمارش تجزیه کننده ها به مدت ۲۱ روز در دمای ۳۰ C انکوبه شدند و پس از گذشت دوره انکوباسیون، ایجاد کدورت در مقایسه با شاهد به عنوان شاخص مثبت آزمایش MPN به حساب آمد و با استفاده از نرم افزار MPN calculator version ۲۳ تعداد باکتری ها در هر گرم خاک محاسبه گردید .(Wrenn and Venosa, ۱۹۹۶)

نتایج و بحث

کمیت باکتری های هتروتروف به روش سریال رقت در خاکهای مورد مطالعه

خاک های مورد تیمار از لحاظ تغییر در جمعیت باکتری های هتروتروف با روش سریال رقت مورد بررسی قرار گرفتند با گذشت زمان تیمار از زمان صفر تا زمان ۱۲۰ روز سیر افزایشی در باکتری های هتروتروف مشاهده می شود. بالاترین تعداد باکتری های هتروتروف خاک مزرعه در روز ۱۲۰ با ارزش 10^{8} × ۱ می باشد (شکل ۱). اما یک کاهش قابل ملاحظه در جمعیت هتروتروف های خاک الوده در روز ۱۲۰ دیده شد. این نتیجه را می توان به اثر سمی نفت سفید ارتباط داد.

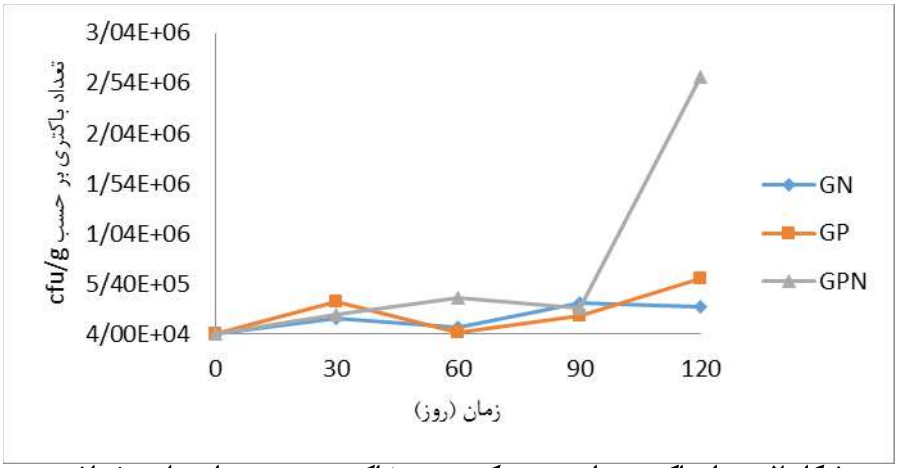


شکل ۱: تعداد باکتری های هتروتروف در خاک مزرعه در زمان های مختلف

کمیت باکتری های تجزیه کننده به روش سریال رقت در خاکهای مورد مطالعه

باکتری های تجزیه کننده نفت سفید در تیمارهای میکروکازم حاوی خاک مزرعه با روش کشت در محیط اختصاصی حاوی نفت سفید بعنوان تنها منبع کربن و انرژی تعین کمیت شدند. تعداد باکتری های تجزیه کننده در کلیه حالات سیر یکسان افزایشی تا روز ۱۲۰ تیمار دارد. اما یک افزایش قابل ملاحظه در خاک همراه با ماده غذایی در روز ۱۲۰ در شکل ۲ دیده می شود. این افزایش قابل توجه را می توان به اثر کمکی و تقویتی مواد غذایی نسبت داد، زیرا یکی از مهمترین اتفاقاتی که در خاک پس از الودگی نفتی ایجاد می شود فقر نیتروژن و فسفر است که با تامین این مواد اثر استرس نفتی در خاک کاهش می یابد (شکل ۲).

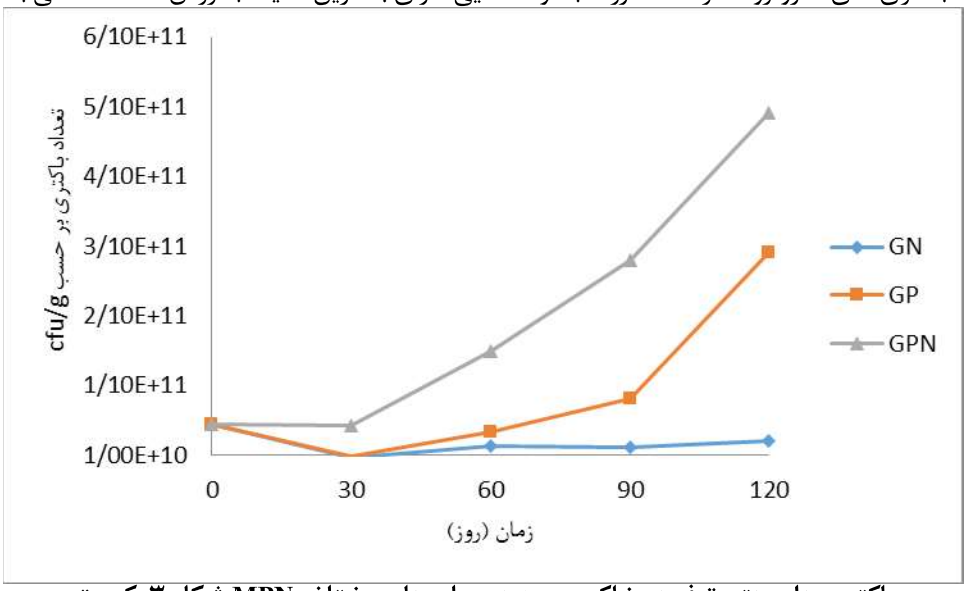
[۱۸۴] - Most Probable Number



شکل ۲: تعداد باکتری های تجزیه کننده در خاک مزرعه در زمان های مختلف

کمیت حداکثر احتمالی (MPN) باکتری های هتروتروف در میکروکازم های مورد مطالعه

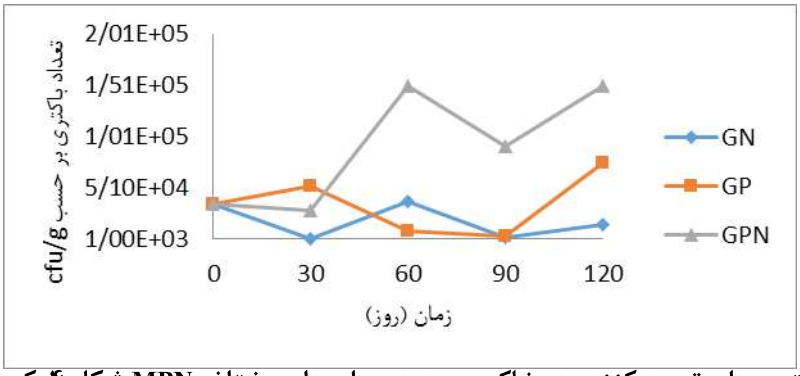
نتایج حاصل از از تعیین کمیت حداکثر احتمالی باکتری های هتروتروف خاک مزرعه در شکل (۳) آمده است. . از این نمودار اینطور می توان نتیجه گرفت که در کلیه میکروکازم ها سیر افزایشی در تعداد باکتری های هتروتروف تا انتهای آزمایش دیده می شود. اما کمیت باکتری های هتروتروف در خاک مزرعه با مواد غذایی دارای بالاترین کمیت با ارزش ۶×۱۰^{۱۱} می باشد.



باکتری های هتروترف در خاک مزرعه در زمان های مختلف MPN شکل ۳: کمیت

کمیت حداکثر احتمالی (MPN) باکتری های تجزیه کننده در میکروکازم های مورد مطالعه

با استفاده از نفت سفید بعنوان منبع کربن و کدورت بعنوان شاخص مثبت کمیت باکتری های تجزیه کننده نفت سفید شامل باکتری های قابل کشت و غیر قابل کشت در میکروکازم های مورد بررسی معین گردید. همانطور که در شکل (۴) دیده می شود، هر کدام از حالات خاک مزرعه الگوی متفاوتی را نشان می دهند. بطوریکه در خاک الوده سیر ابتدا افزایشی است اما در روز ۶۰ تعداد باکتری ها کاهش یافته و دوباره افزایش صورت گرفته است. این الگو را می توان به اثر سمی نفت سفید و تطابق باکتری ها پس از گذشت زمان نسبت داد. نکته قابل توجه دیگری که از شکل (۴) بدست می آید بالا بودن تعداد باکتری های تجزیه کننده نفت سفید در میکروکازم حالت آلوده و همراه با مواد غذایی نسبت به سایر میکروکازم ها می باشد. این امر امکانپذیر است زیرا حضور مواد غذایی استرس نفت سفیدی و فقر غذایی را بر روی جامعه میکروبی کاهش داده و کمیت باکتری های تجزیه کننده دچار تغییر نمی شود.



باکتری های تجزیه کننده در خاک مزرعه در زمان های مختلف MPN شکل ۴: کمیت

منابع

Alef K. and Nanniper P. ۱۹۹۵. Methods in applied soil microbiology and biochemistry. Academic Press, New York, ۲۲۸.

Ives A. R., Foufopoulos J., Klopfer E. D., Klug J. L. and Palmer T. M. ۱۹۹۶. Bottle or big-scale studies: how do we do ecology. Ecol, ۷۷: ۶۸۱-۶۸۵.

Ruberto L. R., Dias A., Balbo S. C., Vazquez E. A. and Mac W. ۲۰۰۹. Influence of nutrients addition and bioaugmentation on the hydrocarbon biodegradation of a chronically contaminated Antarctic soil. J. Appl. Microbiol. ۱۰۶: ۱۱۰۱-۱۱۱۰.

Okerentugba P.O. and Ezeronye O.U. ۲۰۰۳. Petroleum degrading potentioals of single and mixed microbial cultures isolatedfrom rivers and refinery effluents in Nigeria. Afr J Biotechnol. ۲(۹): ۲۸۸-۲۹۲.

Wrenn B. A. and Venosa, A. D. ۱۹۹۶. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most probable number procedure. Canad J Microbiol, ۴۲: ۲۵۲-۲۵۸.

Wang B., Guo Bin L., Xue S. ۲۰۱۱. Changes in soil physico-chemical and microbiological properties during natural succession on abandoned farmland in the Loess Plateau. Environ Earth Scien, ۶۲: ۹۱۵-۹۲۵.

Abstract

Kerosene pollution has some ecological effect on soil that disturbed composition and diversity of microbial community. Also this pollution has some effects on microbial activity and enzymes of soil. The aim of this research understands the effect of Kerosene pollution on farm soil ecosystem. In this research for understanding the effect of crude oil on microbial community farm soil three microcosms such as: unpolluted microcosm polluted microcosm and polluted microcosm with nutrient (Nitrogen and Phosphor). Some factors were assayed in each microcosm during ۱۲۰ day of experiment. The results of this study show that The quantities of degradative bacteria significantly were lower than heterotrophic bacteria in all soil microcosms. The quantity of degradative bacteria have decrement pattern until ۶۰th day of experiment but after this day these bacteria have increment pattern and deydrogenase activity between different microcosms related to pollute microcosm with nutrient. lowest degradation take place on farm soil.