# اثرات لجن فاضلاب بر زیست‌پالایی خاکهای آلوده به نفت خام

سارا شریفی حسینی[1] مصطفی چرم[2] حسین معتمدی[3] ایمان کامرانفر[4]

(دریافت ۸۷/۱۱/۸ پذیرش ۸۸/۱۰/۲۸)

## چکیده

در طول جنگ بیش از ٦ تا ۸ میلیون بشکه نفت خام در خلیج فارس ریخته شد و مقادیر عظیمی از این آلودگی‌ها به خاک خوزستان منتقل گردید. وجود این خاکهای آلوده یک خطر جدی برای محیط زیست به‌شمار رفته و اصلاح آنها امری ضروری است. برای دستیابی به این مهم روش زیست‌پالایی شامل کنترل، کاهش و حذف آلودگی از محیط زیست با استفاده از افزایش فعالیتهای بیولوژیکی محیط، مورد مطالعه قرار گرفت. در این بررسی نفت خام با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بر سطح خاک اسپری شد و سپس لجن فاضلاب به‌عنوان تیمار غذایی در ۳ سطح ۰، ۵۰ و ۱۰۰ تن در هکتار یا به‌ترتیب ۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ گرم در ۵ کیلوگرم خاک اضافه شد. نمونه‌برداری از ظروف پس از مدت زمان ۵ و ۱۰ هفته ماندگاری در شرایط رطوبتی و هوادهی مناسب انجام شد. شمارش باکتری‌های هتروتروفیک تجزیه کننده هیدروکربن با استفاده از روش MPN، درصد کاهش نفت از طریق استخراج به‌وسیله دستگاه سوکسیله و اندازه‌گیری به‌وسیله گروماتوگرافی گازی انجام شد. نتایج نشان داد که جمعیت باکتری‌های هتروترفیک تجزیه کننده در نمونه شاهد از مقدار $6\times10^{3}$ کلونی در واحد بر گرم خاک به حدود $2\times10^{10}$ رسید و نسبت C/N در خاک از ٦ به کمتر از ۳ کاهش یافت. تیمارهای اعمال شده منجر به تجزیه ٤٥ تا ٦٠ درصد آلودگی نفتی خاک شدند و نتایج کروماتوگرافی گازی نیز کاهش در کلیه مقادیر نرمال آلکان‌ها و ایزوپرنوئیدها مانند فیتان و پریستان را نشان داد. همچنین نتایج حاکی از آن بود که اعمال تیمار لجن فاضلاب با غلظت ۵۰ تن در هکتار (۱۰۰ گرم لجن فاضلاب در ۵ کیلوگرم خاک) به خاکهای آلوده به نفت به‌مدت زمان ۵ هفته، یک تیمار بهینه برای خاکهای آلوده به نفت منطقه محسوب می‌شود.

***واژه‌های کلیدی***: زیست پالایی، باکتری‌های هتروتروفیک، کروماتوگرافی گازی، نرمال آلکان‌ها

# Effect of Sewage-Sludge on Bioremediation of a Crude-Oil Polluted Soil

*Sara Sharifi Hosseini[1]* *Mostafa Chorom[2]* *Hossein Motamedi[3]* *Iman Kamranfar[4]*

*(Received Feb. 7, 2009 Accepted Jan. 18, 2010)*

## Abstract

Khuzestan Province accommodates the largest oil-fields with huge petroleum production in Iran. During the Persian Gulf war in 1991, more than 6-8 million gallons of oil was spilt in the Persian Gulf, the greatest amount of which was transported into Khuzestan soil. Thus, oil removal from contaminated soil by advanced technologies such as bioremediation seems to be of vital necessity. The aim of this study was to evaluate the effect of sewage-sludge application on bioremediation of oil-contaminated soil. Soil samples (5kg) were artificially contaminated with crude oil to a level of 1000 mg/kg. Sewage sludge treatments were applied at the 3 levels of 0, 100, and 200 gr/5kg soil in 3 replicates. The soils were kept in the normal moisture aerobic

۱- عضو هئیت علمی گروه پژوهشی حاصلخیزی خاک و توسعه پایدار جهاد دانشگاهی خوزستان (نویسنده مسئول) (۰٦٥٢) ٢٣٢٢٤١١٤ ssharifihoseini@yahoo.com
۲- استادیار گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز
۳- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز
۴- مربی گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز

1. Faculty Member of Soil Fertility and Sustainable Development Research Center, Khuzistan Jahad-e-Daneshgahi, (Corresponding Author) (+98 652) 2322414 ssharifihoseini@yahoo.com
2. Assist. Prof. of Soil Science, College of Agriculture, Chamran University, Ahvaz
3. Assist. Prof. of Microbiology, Faculty of Science, Chamran University., Ahvaz
4. Instructor of Agronomy and Plant Breeding, Dept. of Agriculture, Chamran University, Ahvaz

environment for 5 and 10 weeks. The soils were then analyzed for Hydrocarbon-degrading heterotrophic bacterial count. Oil extraction from the samples was accomplished using the oil Soxhlet extraction method and oil degradation was measured by GC chromatography. The results showed that the hydrocarbon-degrading and heterotrophic bacterial counts in all the treatments increased with time. Results indicate that heterotrophic bacterial population increased from $6\times10^{3}$ cfu/gr soil to $2\times10^{10}$ cfu/gr soil. Also, C/N ratio decreased from 6 to 3. GC results indicated that all normal Alkanes and Isopernoids, i.e. Phytane and Pristane, decreased by 50-90 percent in all the treatments. It was also found that the application of sewage sludge at 100 gr/5kg soil to oil-contaminated soil leads to greater rates of biodegradation after 5 weeks

***Keywords:*** Bioremediation, heterotrophic bacteria, Gas Chromatography, Normal Alkanes

## ۱- مقدمه

ایران یکی از بزرگ‌ترین تولید کننده‌های نفت در جهان است و حدود ۹ درصد از نفت جهان را در اختیار دارد. میزان تولید فعلی نفت ایران در حدود ۴ میلیون بشکه در روز است [۱]. رشد روز افزون فعالیتهای صنعتی از یک سو و عدم رعایت الزامات زیست‌محیطی از سوی دیگر سبب شده است تا در چند دهه اخیر مقادیر هنگفتی از آلاینده‌های هیدروکربنی به‌واسطه عواملی نظیر دفع و دورریز نامناسب فاضلابها و ضایعات مراکز صنعتی، پخش آلاینده‌ها توسط نیروگاهها، نشت آلاینده از مخازن نفتی زیرزمینی و ایستگاههای سوختگیری، تصادفات تانکرها و نفتکشها و غیره، وارد محیط زیست شوند [۲].

از طرف دیگر با توجه به محدود بودن منابع خاک و آب زیرزمینی، آلودگی خاک یکی از مهم‌ترین معضلات زیست‌محیطی کشور است. به این منظور شیوه‌هایی چون روشهای مستقیم مهندسی و یا پاکسازی طبیعی یعنی بدون دخالت انسان در اصلاح این عارضه بسیار مؤثر هستند. یکی از این روشها، زیست پالایی یعنی کنترل، کاهش یا حذف آلودگی از محیط زیست با استفاده از افزایش فعالیتهای بیولوژیکی محیط است. زیست پالایی یک روش مفید برای اصلاح خاکهای آلوده به نفت است. در این روش موجودات زنده ذره‌بینی از مواد هیدروکربنی به‌عنوان منبع غذا و انرژی استفاده کرده و آنها را به مواد ساده‌تر و غیرسمّی مانند آب و دی‌اکسیدکربن تبدیل می‌نمایند. حاصل این فرایند کاهش کل هیدروکربن‌های نفتی موجود در خاک است [۳]. در واقع زیست پالایی حد واسط بین روشهای مهندسی و روشهای طبیعی است و شامل دخالتهای انسانی از جمله تکنولوژی‌های کشاورزی مانند شخم زدن و کوددهی است که به منظور ارتقاء شرایط مناسب زیستی برای موجودات زنده ذره‌بینی خاک و در نتیجه افزایش تجزیه و کاهش آلودگی‌های خاک انجام می‌گیرد. علاوه بر این با استفاده از روشهای تسریع کننده تجزیه مواد آلاینده مثل کاربرد موادآلی نیتروژن‌دار و فسفردار و شخم‌زدن به‌منظور تهویه بهتر خاک، افزایش فعالیت میکربی تسریع می‌گردد. لازم به ذکر است که باکتری‌ها و قارچ‌ها تنها گونه‌های بیولوژیکی دارای توانایی متابولیکی برای استفاده از کربن نفت در سنتز سلولی خود هستند. نامکونگ و همکاران[1] در سال ۲۰۰۰ در زیست پالایی خاکهای آلوده به گازوئیل دریافتند که مخلوط کردن خاک آلوده با لجن فاضلاب به نسبت ۰/۵:۱ بیشترین تجزیه آلاینده را نشان می‌دهد[۴]. گوگی و همکاران[2] در سال ۲۰۰۳ در زیست پالایی خاکهای آلوده به نفت خام در محل ریزش نفت مشاهده کردند که هوادهی، کاربرد مواد آلی دارای نیتروژن و فسفر و تلقیح میکربی باعث تجزیه ۷۵ درصد از آلاینده‌ها شده است [۵].

هدف از اجرای این تحقیق ارزیابی اثرات افزایش لجن فاضلاب به‌عنوان کود آلی بر تحریک فرایندهای بیولوژیکی و میزان پالایش زیستی نفت خام در خاکهای آلوده به این ماده بود.

## ۲- مواد و روشها

### ۲-۱- آلوده کردن مصنوعی خاک

خاک اولیه از مزرعه دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران انتخاب شد که در طول سالیان طولانی بدون کشت بوده است. نتایج آنالیز شیمیایی، فیزیکی و میکروبیولوژی نشان داد که این خاک از نظر حاصلخیزی، خاک کاملاً فقیری است (جدول ۱). خاک اولیه پس از خشک شدن در هوا، از الک دو میلی‌متری عبور داده شد و سپس نفت خام چاه شماره ۶۹ میدان نفتی مارون که نفتی پارافینی است به مقدار ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی خاک اسپری گردید تا خاکها به‌طور کاملاً همگن و یکنواخت به نفت آلوده شوند.

پس از آلوده‌سازی، کل خاک روی هم انباشته شد و به‌منظور توزیع یکنواخت و جذب سطحی نفت روی ذرات خاک، به‌مدت دو هفته نگهداری شد. سپس خاکها به وزن‌های ۵ کیلوگرمی تقسیم و در ظروف مخصوص ریخته شد.

### ۲-۲- تیماردهی و برداشت نمونه‌ها

لجن فاضلاب شهری تصفیه شده از ایستگاه تصفیه فاضلاب غرب اهواز فراهم شد. سپس لجن کوبیده شد و از الک دو میلی‌متری عبور

[1] Namkoong et al.
[2] Gogoi et al.

**جدول ۱**- نتایج تجزیه شیمیایی، فیزیکی و میکروبیولوژی خاک اولیه

| | |
|---|---|
| هدایت الکتریکی در عصاره اشباع | ۵ دسی زیمنس بر متر |
| pH در گل اشباع | ۷/۵ |
| ماده آلی | ۰/۵۷ درصد |
| ازت | ۰/۰۲ درصد |
| فسفر قابل جذب | ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم |
| پتاسیم قابل جذب | ۶/۰۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم |
| سدیم محلول | ۴۶ میلی اکی والان در لیتر |
| کلسیم محلول | ۲۵ میلی اکی والان در لیتر |
| منیزیم محلول | ۱۰/۲ میلی اکی والان در لیتر |
| بی کربنات، سولفات، کلر محلول | ۲۵/۱،۴۵/۵ ، ۵۵ میلی‌اکی والان بر لیتر |
| ظرفیت تبادل کاتیونی | ۱۰/۴ سانتی مول بار مثبت بر کیلوگرم |
| بافت خاک | رس ماسه‌ای |
| تعداد باکتری‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن | $۶\times۱۰^{۳}$ سلول در واحد بر گرم خاک |

داده شد و در ۳ سطح تیماری ۰، ۵۰ و ۱۰۰ تن در هکتار (۰،۱۰۰،۲۰۰ گرم لجن فاضلاب در ۵ کیلوگرم خاک) با خاک درون ظروف مخلوط گردید و برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد [۶]. خاکهای تیمارشده در گلخانه تحت شرایط نور و دمای کنترل شده بین ۲۵ تا ۳۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند و در طول ۱۰ هفته فرایند زیست پالایی درجا بررسی شدند [۷]. در این مدت زمان به‌منظور ایجاد شرایط محیطی مناسب برای فعالیت میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده نفت‌خام، رطوبت نمونه‌های خاک درحد ۱۵ تا ۲۰ درصد رطوبت وزنی تنظیم شد. به منظور رفع کمبود اکسیژن و ایجاد شرایط هوازی، خاکها ۲ بار در هفته به‌هم زده شدند [۸ و ۹].

## ۳- آنالیز نمونه‌ها

### ۳-۱- آنالیزهای میکروبیولوژی

#### ۳-۱-۱- تهیه محیط کشت بوشنل هاس[1]

در ابتدا محیط کشت بوشنل هاس به‌ترتیب زیر و طبق روش ونوسا و ورن[2] در سال ۱۹۹۶ تهیه گردید [۸]:

۱- سولفات منیزیم ۰/۲ گرم در لیتر
۲- کلرید کلسیم ۰/۰۲ گرم در لیتر
۳- مونوفسفات پتاسیم ۱ گرم در لیتر
۴- فسفات آمونیوم دو عاملی ۱ گرم در لیتر
۵- نیترات پتاسیم ۱ گرم در لیتر
۶- کلرید فریک ۰/۰۵ گرم در لیتر

[1] Bushnell Hass Medium
[2] Venosa and Wrenn

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

#### ۳-۱-۲- شمارش باکتری‌های هتروترفیک تجزیه‌گر نفت

به‌منظور شمارش باکتری‌های هتروتروف تجزیه‌گر هیدروکربن از روش ۲MPN استفاده شد. در این روش ابتدا کلیه وسایل مورد استفاده استریل شد و پس از آماده‌سازی محیط کشت، از نمونه خاک مورد نظر که در زمان مناسب جمع‌آوری شده بود، ۳ گرم وزن شد و با ۱۰ میلی‌لیتر از محیط بوشنل هاس به‌خوبی مخلوط گردید تا به‌صورت دوغاب در آید. بعد از نیم ساعت، ۱میلی‌لیتر از دوغاب به ۹ میلی‌لیتر محیط کشت اضافه شد و به‌همین ترتیب غلظتهای $۱۰^{-۱}$ تا $۱۰^{-۱۲}$ تهیه شد. از هر غلظت ۳ تکرار تهیه شد به‌صورتی که برای هر نمونه خاک ۳۶ لوله آزمایش تهیه گردید. بعد از رقیق‌سازی، معرف ریسازورین به‌میزان ۹۰ میکرولیتر به لوله‌ها اضافه شد و سپس نفت خام استریل شده به مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر به هر لوله اضافه گردید و لوله‌های آماده شده به‌مدت ۲ هفته در انکوباتور نگهداری شد. لازم به‌ذکر است که هدف از استریل کردن نفت، حذف هرگونه فلور باکتریایی خارج از خاک و بررسی اثر لجن بر افزایش باکتری‌های تجزیه کننده نفت در خاک بود.

پس از دو هفته بررسی مرتب لوله‌ها، هنگامی که تغییر رنگ آبی به‌صورتی (نشان دهنده رشد باکتری هتروترفیک) مشاهده شد، لوله‌ها از انکوباتور خارج شده و باکتری‌ها براساس جدول MPN شمارش شدند [۸].

### ۳-۲- آنالیزهای تغییرات نفت

به‌منظور آنالیز تغییرات نفت، ابتدا نفت موجود در نمونه‌ها توسط دستگاه سوکسیله و با استفاده از حلال آلی کلروفرم از نمونه‌ها استخراج شد و پس از آسفالتن‌گیری در مقادیر میکرولیتری به دستگاه کروماتوگرافی گازی[3] تزریق گردید. دستگاه GC مورد استفاده در این تحقیق مدل ۲۰۱۰ ساخت شرکت وینکی[4] بود که در آن شناسایی پیک‌ها توسط آشکارگر FID انجام می‌شد. ستون موئینه به طول ۲۵ متر، دمای اولیه ۵۰ درجه سلسیوس و دمای نهایی ۳۲۰ درجه سلسیوس بود. افزایش دما در دستگاه به ازای هر دقیقه، ۵ درجه سلسیوس تنظیم شد. گاز حامل، هلیم بود و از هوای فشرده و گاز هیدروژن برای شعله آشکارگر FID استفاده گردید.

[3] Gas Chromatography (GC)
[4] Vinci Technologies

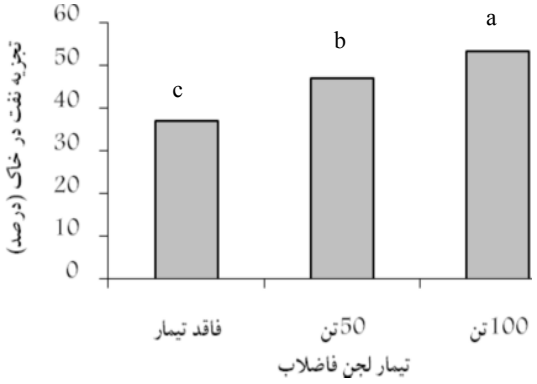
به‌منظور اندازه‌گیری کل کربن آلی و مقدار ازت کل به‌ترتیب از دستگاه راکی ایوال[1] ۶ و روش کجلدال[2] استفاده گردید [۱۰].

## ۴- تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های حاصل از تحقیق در قالب آزمایش اسپیلیت پلات[3] خرد شده در زمان در قالب طرح کاملا تصادفی و به‌کمک نرم افزار SAS تجزیه و تحلیل شدند.

## ۵- نتایج و بحث

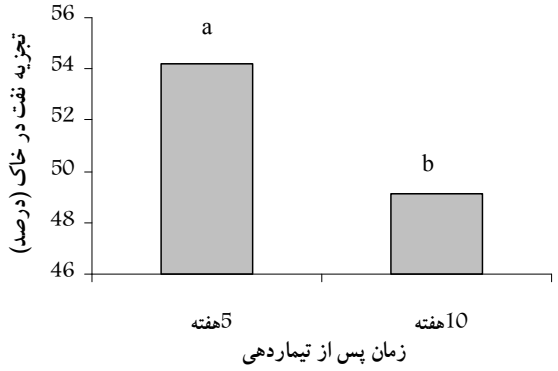
در تحقیق حاضر افزایش لجن فاضلاب به‌عنوان کود آلی و هوادهی خاک در طول زیست پالایی همزمان با افزایش رشد باکتری‌های هتروترف، اثر معنی‌داری بر تجزیه نفت داشت به‌طوری‌که آلودگی در خاک بین ۴۵ تا ۶۰ درصد کاهش یافت. در تیمار ۱۰۰ تن لجن فاضلاب در هکتار (۲۰۰ گرم لجن در ۵ کیلوگرم خاک) تجزیه نفت بیشتر از تیمار ۵۰ تن لجن فاضلاب در هکتار (۱۰۰ گرم لجن در ۵ کیلوگرم خاک) بود. نتایج مقایسه میانگین اثر تیمار لجن فاضلاب بر تجزیه نفت به‌روش دانکن[4] در سطح ۵ درصد حاکی از تفاوت معنی‌دار شاهد با نمونه‌های تیمار شده از لحاظ آماری بود (شکل ۱). لذا تجزیه نفت درنمونه‌های فاقد تیمار از نمونه‌های تیمار شده به‌شکل معنی‌داری کمتر بود. همچنین میزان تجزیه نفت در نمونه‌های تیمار شده با ۱۰۰ تن لجن فاضلاب به‌صورت معنی‌داری بیشتر از نمونه‌های تیمار شده با ۵۰ تن لجن فاضلاب بود. اسپینوزا[5] و دندوون[6] در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که افزایش مواد آلی مانند لجن فاضلاب به خاک آلوده به‌علت وارد کردن حجم




**شکل ۱**- مقایسه میانگین تأثیر تیمار لجن فاضلاب بر تجزیه نفت در خاک

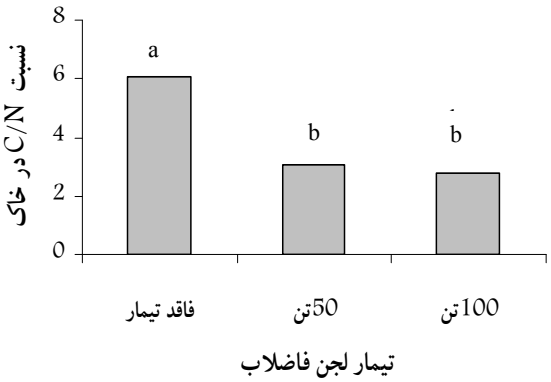
[1] Rocky Vial
[2] kedgeldal
[3] Split Plate
[4] Dunkan
[5] Espinoza
[6] Dendooven

زیادی از مواد غذایی باعث تسریع زیست‌پالایی گازوئیل و تجزیه TPH[7] می‌شود [۹]. اثر زمان نیز بر تجزیه نفت در سطح ۵ درصد معنی‌دار شد و با گذشت زمان از تیماردهی، میزان تجزیه نفت کاهش یافت (شکل ۲). این مشاهده کاملاً با نتایج رشد باکتری مطابقت دارد. بیشترین رشد باکتری در هفته پنجم بود که در این زمان به‌علت حضور نرمال آلکان‌های سریع تجزیه شونده و وفور مواد غذایی معدنی، فعالیت باکتری‌ها و در نتیجه تجزیه نفت حداکثر بود. با گذشت زمان، ترکیبات نفتی سخت تجزیه شونده، بلند زنجیره و دارای کمبود نیتروژن باقی ماند و رشد باکتری و تجزیه نفت کاهش یافت [۶].




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

نتایج تجزیه واریانس، تفاوت معنی‌دار بین اثر تیمارهای مختلف لجن فاضلاب بر نسبت C/N خاک را نشان داد. نتایج مقایسه میانگین به‌روش دانکن حاکی از بالاتر بودن معنی‌داری نسبت C/N در شاهد نسبت به نمونه‌های تیمار شده بود. حال آن که بین ۲ تیمار ۵۰ و ۱۰۰ تن از این لحاظ اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد مشاهده شد (شکل ۳). در نمونه شاهد، کمبود مواد

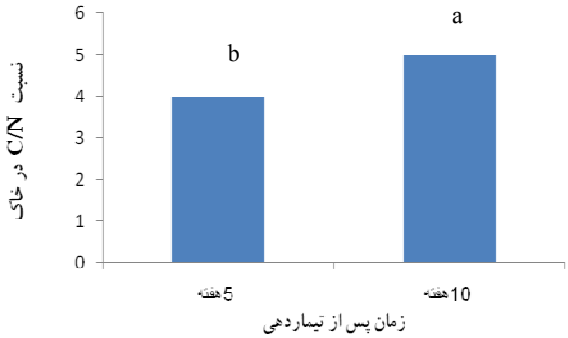



**شکل ۳**- مقایسه میانگین تأثیر تیمار لجن فاضلاب بر نسبت C/N در خاک

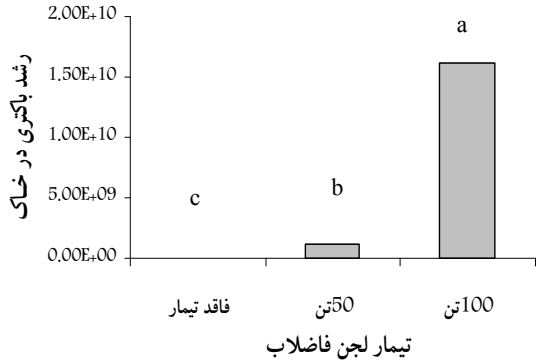
[7] Total Petroleum Hydrocarbon (TPH)

مغذی معدنی، رشد باکتری‌های تجزیه کننده هیدروکربن و در نتیجه تجزیه نفت را محدود می‌کند و نسبت C/N بالا می‌رود [۱۱]. در نتیجه نسبت C/N از ۶ درنمونه‌های شاهد به حدود ۳ در نمونه‌های تیمارشده رسید. با گذشت زمان از تیماردهی، نسبت C/N کاهش معنی‌داری یافت و در هفته پنجم این نسبت کمتر از هفته دهم بود (شکل ۴). در هفته پنجم مواد غذایی کافی در دسترس باکتری‌ها بود اما با گذشت زمان کمبود عناصر معدنی ظاهر شد و رشد باکتری و تجزیه نفت را محدود ساخت.

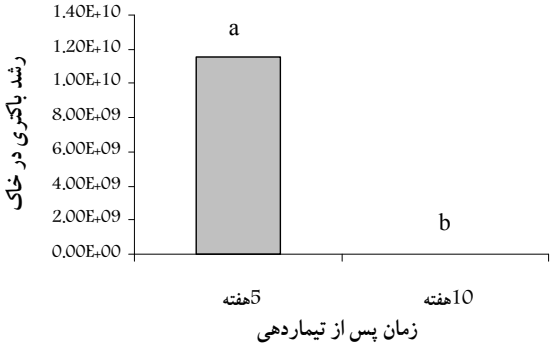
تجزیه واریانس نتایج به‌دست آمده از تیماردهی خاکهای آلوده به نفت خام با لجن فاضلاب نشان داد که کاربرد تیمار لجن فاضلاب اثر معنی‌داری در سطح پنج درصد بر رشد باکتری در خاک داشت و بین نمونه‌های تیماردهی شده با شاهد تفاوت معنی‌دار بود (شکل ۵). لجن فاضلاب در طی فرایند معدنی شدن، مواد غذایی را در محلول خاک آزاد می‌کند و با ایجاد شرایط تغذیه‌ای مناسب باعث افزایش رشد باکتری‌های هتروترف تجزیه کننده نفت، تجزیه نفت و کاهش نسبت C/N در خاک می‌شود.




**شکل ۴**- مقایسه میانگین اثر زمان بر نسبت C/N در خاک




**شکل ۵**- مقایسه میانگین تأثیر تیمار لجن فاضلاب بر رشد باکتری در خاک




**شکل ۶**- مقایسه میانگین اثر زمان بر رشد باکتری در خاک

رامسی و همکاران[1] در سال ۲۰۰۰ در مطالعه اثر زیست پالایی بر جمعیت میکربی در رسوبات نفتی مشاهده کردند که هوادهی مداوم و افزایش کود، باعث تحریک قابل ملاحظه رشد باکتری‌های تجزیه کننده هیدروکربن در خاک می‌شود [۸]. وانگستل و همکاران[2] در سال ۲۰۰۱ در زیست پالایی خاکهای آلوده به نفت، افزایش معنی‌داری را در جمعیت باکتری‌ها گزارش کردند [۱۲].

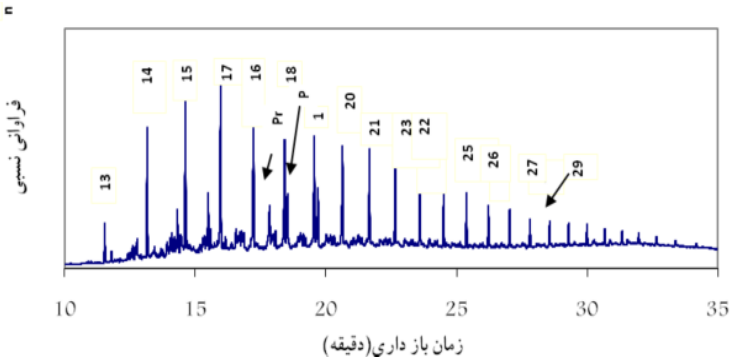
در تحقیق حاضر در زمان ۵ هفته به‌علت حضور نرمال آلکان‌ها و شرایط محیطی و غذایی مناسب، رشد باکتری و تجزیه نفت بالا بود اما با گذشت زمان در ۱۰ هفته ترکیبات آروماتیک و آسفالت‌ها باقی مانده و کمبود عناصر غذایی رخ داد که باعث کاهش فرایند زیست پالایی شد (شکل ۶) [۶].

کیم و همکاران[3] در سال ۲۰۰۷ نیز گزارش دادند که اثر کوددهی بر تحریک بیولوژی باکتری‌های بومی خاک، با گذشت زمان کاهش می‌یابد که در تطبیق با نتایج این تحقیق بود [۱۳].

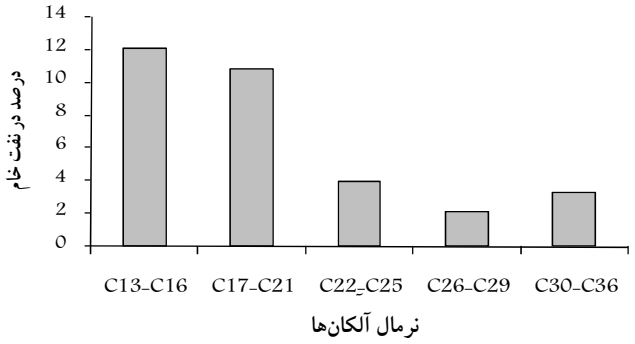
## ۶- اثر تیمار لجن فاضلاب بر تغییر غلظت نرمال آلکان‌ها در نفت خام

نفت خام چاه شماره ۶۹ میدان نفتی مارون ۳ که به‌عنوان آلاینده نفتی در این تحقیق به خاکها اسپری شد پس از استخراج از خاک با استفاده از دستگاه سوکسیله و آسفالتن‌گیری بیتومن باقیمانده، در مقادیر میکرولیتری به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق گردید. پس از ارائه پیک GC، سطوح زیر منحنی هر کدام از نرمال آلکان‌ها محاسبه شد (شکلهای ۷ و ۸). پریستان و فیتان به‌عنوان استانداردهای داخلی استفاده شدند زیرا این ترکیبات که معرف آلکان‌های شاخه‌ایی هستند به‌علت ساختمان مولکولی‌شان نسبت به

[1] Ramsay et al.
[2] Van Gestel et al.
[3] Kim et al




**شکل ۷**-کروماتوگرافی گازی نفت خام چاه شماره ۶۹ میدان نفتی مارون




**شکل۸**- درصد نرمال آلکان‌ها در نفت خام چاه شماره ۶۹

نرمال آلکان‌های مجاور یعنی C17 و C18 در برابر تجزیه زیستی بسیار مقاوم هستند [۱۴، ۱۵ و ۱۶].

نرمال آلکان‌ها، به‌منظور سهولت بررسی تغییرات براساس نزدیکی ترکیب شیمیایی در ۶ دسته به‌ترتیب زیر تقسیم‌بندی شدند [۱۴]:

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

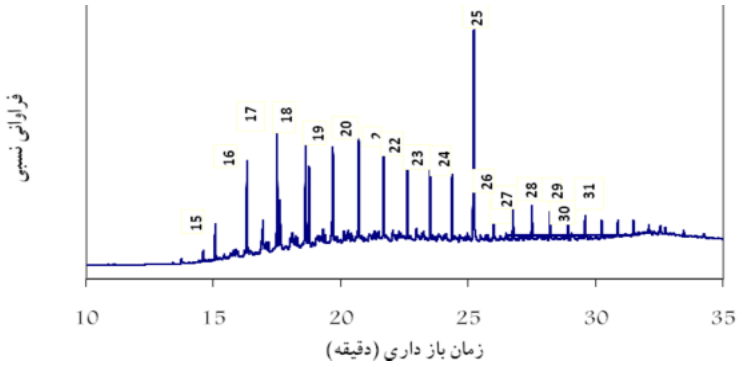
دسته اول که نرمال آلکان‌های کوچک‌تر از C13 را شامل می‌شود به‌علت فرّار بودن در هیچ یک از پیک‌های حاصل از تزریق نمونه‌ها به دستگاه GC مشاهده نشد به‌همین دلیل نیز در نمودارها بررسی نشده است.

شکل ۸ از محاسبه سطح زیر منحنی شکل ۷ به‌دست آمده است. دسته C13-C16 حدود ۱۲ درصد از کل نفت خام و بیشترین حجم نرمال آلکان‌ها را تشکیل داده در حالی که دسته C26-C29 کمترین حجم و تنها ۴ درصد کل نفت خام را تشکیل داده 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) است، در این نمونه، گازوئیل ۲۳ درصد و ایزوپرنوئیدهای غیرحلقوی پریستان و فیتان به‌ترتیب ۱/۳۴درصد و ۱/۵۵درصد از کل نفت را تشکیل می‌دهند.

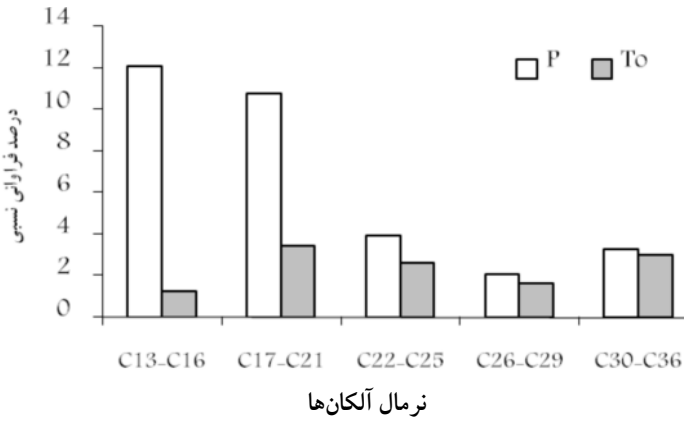
شکل ۹ در پی استخراج نفت از نمونه شاهد و تزریق آن به دستگاه GC به‌دست آمد. در مقایسه با نمونه نفت اولیه بلند بودن پیک مربوط به C25 قابل توجه بود که در سایر نمونه‌ها نیز مشاهده شد.

C25جزو نرمال آلکان‌های فرد است که اولین بار توسط چبنال[1] در سال ۱۹۳۴ مورد بررسی قرار گرفت. او گزارش داد که گیاهان در زنجیره خود بیشتر پارافین‌ها با اتم‌های فرد را دارند و در عین حال این پارافین‌ها از C25 تا C37 در گیاهان متغیرند. از سوی دیگر، باکتری‌ها نمی‌توانند نرمال آلکان‌های فرد با منشاء زمینی را به‌طور قابل توجه تجزیه کنند. کنوچ[2] و اریسون[3] در سال ۱۹۶۷ ثبات این نرمال آلکان‌ها در گیاهان در حال رشد دم اسبی را با گونه فسیل شده آن در دوره تریاسیک مقایسه کردند. در هر دو گونه گیاهی فسیل شده و تازه، هیدروکربن‌های غالب C23، C25، C27 و C29 بودند [۱۷]. به‌همین دلیل در این مطالعه با تزریق نفت به خاک برخلاف سایر نرمال آلکان‌ها، C25 کمتر دچار تغییر و تحول شد.

[1] Chibnall
[2] Kenooch
[3] Erison




**شکل ۹**-کروماتوگرافی گازی نمونه خاک شاهد




**شکل ۱۰**- مقایسه درصد نرمال آلکان‌ها در نمونه شاهد (T0) با نفت خام اولیه (P)

نمونه شاهد در طی ۱۰ هفته زیست پالایی، تیمار غذایی دریافت نکرد ولی تحت رطوبت و شرایط هوازی مناسب قرار گرفت. مقایسه درصد نرمال آلکان‌های نمونه شاهد با نفت خام اولیه نشان داد که دسته هیدروکربن‌های کوچک‌تر از C22 تغییرات شدیدی کردند به‌طوری‌که در دسته C13-C16 حجم نرمال آلکان‌ها از ۱۲درصد در نفت به حدود ۲ درصد در نمونه شاهد رسید (شکل ۱۰). دسته C17-21 در شاهد به نصف حجم اولیه در نفت خام رسید اما در ۳ دسته هیدروکربن‌های بزرگ‌تر از C22، تغییرات حجم بسیار اندک بود. نتایج حاکی از آن بود که مقدار قابل دسترس دسته پارافینی C13-C21 در خاک به‌علت کوتاه بودن طول زنجیره هیدروکربنی و جذب شدن بر سطح ذرات کلوئیدی پس از اسپری نفت به خاک، کاهش یافت، اما در سایر دسته‌ها با طویل شدن زنجیره‌شان میزان جذب سطحی به‌وسیله کلوئیدهای خاک، کاهش زیادی نشان داد. ایزوپرنوئیدهای غیرحلقوی پریستان و فیتان نیز در شاهد نسبت به نفت اولیه به‌ترتیب ۵۱ درصد و ۴۹درصد تغییر حجم یافتند که نشانگر تجزیه زیستی بالا در خاک است. این نتایج با تحقیقات گیلر و همکاران[1] در سال ۲۰۰۲ و داس[2] و ماکرج[3] در سال ۲۰۰۰ مطابقت دارد [۱۴ و ۱۸].

در اثر اعمال تیمار ۵۰ تن لجن فاضلاب در هکتار (۱۰۰ گرم لجن فاضلاب در ۵ کیلوگرم خاک) دسته‌های C26-C29،C17-C21 تغییرات مشخصی داشتند به‌طوری که تجزیه در این دسته‌ها از حدود ۲۵درصد در ۵ هفته به‌ترتیب به ۵۳ درصد و ۴۶ درصد در ۱۰ هفته رسید. بقیه دسته‌ها نسبت به هفته پنجم تغییرات واضح نداشتند اما دسته‌های C13-C16 C30-C36، C17-C21، C26-C29 C25–C22 نسبت به نمونه شاهد به‌ترتیب ۶۵، ۵۳، ۴۳، ۴۶ و ۵۷ درصد کاهش حجم را نشان دادند. آنچه در کلیه پیک‌ها حاصل گردید تجزیه بیولوژیکی کم دسته C25-C22 بود که نشان دهنده تمایل کمتر باکتری‌های هتروترف مورد بررسی به مصرف و تجزیه این دسته است. این امر مربوط به ساختمان زنجیره‌ای این دسته

[1] Geller et al.
[2] Das
[3] Murkherjee

می‌باشد. بیشترین تغییرات حجم در نرمال آلکان‌های C13-C16 دیده شد که ۶۱ درصد کاهش داشتند. در دسته‌های پارافینی متوسط، تغییرات کمتر بوده و بین ۲۵ تا ۳۷ درصد کاهش مشاهده شد اما در دسته نرمال آلکان‌های C30-C36، ۵۶ درصد کاهش وجود داشت که نسبت به زمان اولیه بسیار واضح و حاکی از تجزیه نرمال آلکان‌های بلند زنجیره در این مدت زمان بود (شکل ۱۱).

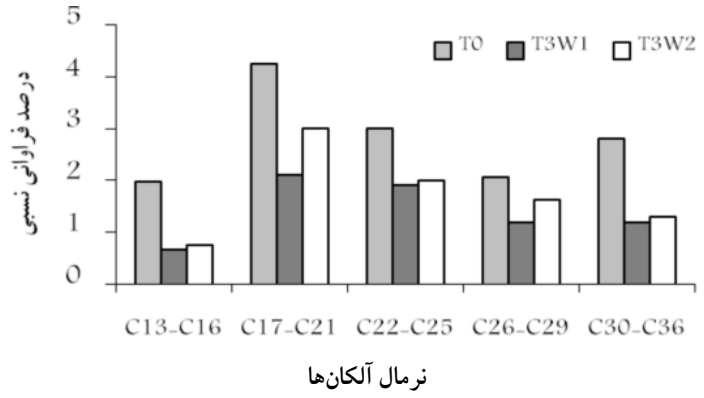
بر اثر کاربرد لجن فاضلاب به‌عنوان یک ماده مغذی برای میکروارگانیسم‌های خاک، تجزیه نفت افزایش واضحی داشت و دسته‌های نرمال آلکان C13-C16 ، C26-C29 و C30-C36 توسط باکتری‌های هتروتروف به‌خوبی مورد تجزیه قرار گرفتند و بیش از ۹۰ درصد تجزیه نسبت به شاهد مشاهده گردید. اما تغییرات در پارافین‌های متوسط زنجیره همانند نتایج تیمار ۵۰ تن لجن فاضلاب، حدود ۵۰ درصد کاهش نسبت به شاهد نشان داد. این امر گویای عدم تمایل باکتری‌های هتروترف تجزیه کننده هیدروکربن برای تجزیه نرمال آلکان‌های فرد در این پارافین‌ها بود که مربوط به منشاء اولیه آنهاست. با گذشت مدت زمان ۱۰ هفته از اعمال تیمار لجن فاضلاب به‌عنوان کود آلی، تجزیه میکربی دسته C30-C36 به‌گونه معنی‌داری از ۲ درصد به ۶۲ درصد افزایش یافت که نشان دهنده افزایش تمایل میکرب‌ها برای تجزیه نرمال آلکان‌های بلند زنجیره بود. تجزیه دسته C13-C16 حدود ۷۴ درصد بود. دسته‌های میانی C17-C21، C22-C25 و C26-C29 به‌ترتیب ۳۷، ۲۲ و ۶۹ درصد تجزیه شدند (شکل ۱۲).

## ۷- نتیجه‌گیری

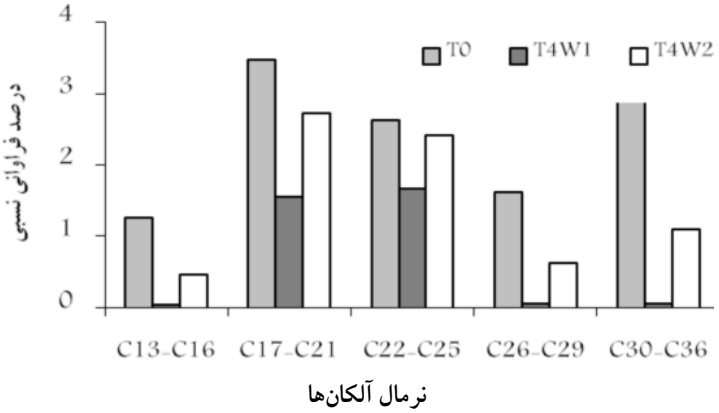
۱- نسبت C/N از حدود ۶ در نمونه شاهد به حدود ۳ در نمونه‌های دریافت کننده تیمار غذایی کاهش یافت که نشان دهنده تجزیه نفت در اثر این تیمارها و کاهش مقدار کربن آلی و نسبت C/N در این نمونه‌ها بود.

۲- تیمار اعمال شده باعث تجزیه ۴۵ تا ۶۰ درصد آلودگی نفتی در خاک شد.

۳- جمعیت باکتری‌های هتروترفیک تجزیه کننده هیدروکربن در پی تیمارهای غذایی به‌کار رفته در این تحقیق افزایش چشمگیری




**شکل ۱۱**- مقایسه درصد نرمال آلکان‌ها در نمونه‌های تیمار شده با ۵۰ تن لجن فاضلاب در هفته پنجم (T4 W1) و در هفته دهم (T4W2) با نمونه شاهد (T0)




**شکل ۱۲**- مقایسه درصد نرمال آلکان‌ها در نمونه‌های تیمار شده با ۱۰۰ تن لجن فاضلاب در هفته پنجم (T4W1) و در هفته دهم (T4W2) با نمونه شاهد (T0)

پیدا کرد و از مقدار $۶\times۱۰^{۳}$ کلونی در واحد بر گرم خاک در نمونه شاهد به $۲\times۱۰^{۱۰}$ در نمونه‌های تیمار شده با لجن فاضلاب رسید.

۴- تجزیه نفت و افزایش جمعیت میکربی در هر دو تیمار در هفته پنجم بیشتر از هفته دهم بود زیرا در پنج هفته اول تیماردهی به‌علت حضور نرمال آلکان‌های سریع تجزیه شونده و وفور مواد غذایی معدنی، فعالیت باکتری‌ها و کاهش نفت بیشتر بود اما با گذشت زمان، ترکیبات نفتی سخت تجزیه شونده، بلند زنجیره و دارای کمبود نیتروژن باقی مانده و رشد باکتری و در نتیجه تجزیه نفت کاهش یافت. بنابراین به‌طور کلی می‌توان این‌گونه بیان کرد که اعمال تیمار لجن فاضلاب به خاکهای آلوده به نفت به‌مدت زمانی پنج هفته یک تیمار بهینه است.

## ۸- مراجع


1- Rezaei, M. (2005). *Petroleum Geology*, 2nd Ed., Farhikhtegan Alavi Pub., Tehran (in Persian).

2. Moslemi, M. R., Vosoughi, M., Pak, A., and Jafarzadeh, M.T. (2005). "The effect of environmental factors on biological remediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil." *J. of Water and Wastewater*, 55, 15-23 (in Persian).

3- Espinoza, Y.R., and Dendooven, L. (2004). "Dynamics of carbon, nitrogen and hydrocarbons in diesel-contaminated soil amended with biosolids and maize." *J. Chemosphere*, 54, 379-386.

4- Namkoong, W., Hwang, E. Y., Park, J.S., and Choi, J. Y. (2002). "Bioremedation of diesel-contaminated soil with composting." *J. of Environmental Pollution*., 119, 23-31.

5- Gogoi, B.K., Dutta, N.N., and Krishnamohn, T.R. (2003). "A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site." *J. Advances in Environmental Research*., 7, 767-782.

6- Schaefer, M., and Juliane, F. (2007). "The influence of earthworms and organic additives on the biodegradation of oil contaminated soil." *J. Applied Soil Ecoogy*., 36, 53-62.

7- Kim, S.J., Choi, D.H., Sim, D.S., and Oh, Y.S. (2005). "Evaluation of bioremediation effetiveness on crude oil-contaminated sand." *J. Chemosphere*., 59, 845-852.

8- Ramsay, A. M., Swannell-Warren, P. T., Duke, A.Sh., and Hill, R. T. (2000). "Effect of bioremediation on the microbial community in oiled mangrove sediments." *J. Marine Pollution Bulletin*., 41 (7-12), 413-419.

9- Espinoza, Y.R., and Dendooven, L. (2003). "Dynamics of carbon, nitrogen and hydrocarbons in diesel-contaminated soil amended with biosolids and maze." *J. Chemosphere*., 54, 379- 386.

10- Ryan, J.R., Loehr, R.C., and Rucker, E. (1991). "Bioremediation of organic contaminated soils." *J. Hazard. Mater*., 28 (10), 159-169.

11- Odokuma, O., and Dickson, A. A. (2003). "Bioremediation of a crude oil polluted tropical rain forestL." *Global J. Environmental Sciences*., 2 (1), 29-40

12- Van Gestel, K., Mergaert, J., Swings, J., Coosemans, J., and Ryckebore, J. (2003). "Bioremediation of diesel oil-contaminated soil by composting with biowaste." *J. Environmental Pollution*, 125 (3), 361-368.

13- Kim, S.H., Lee, S., Kim, D.Y., and Kim, J.G. (2007). "Degradation characteristic of waste lubricants under different nutrient codition." *J. Hazardous Materials*, 143 (5),65-72.

14- Geller, A., Michels, J., Track, T., Gehrke, U., and Sell, D. (2002). "Grundlagen derbiologischen Bodensanierung". *Biologigische Verfahren Zar Bodensanierung*, UBA. Berlin.

15- De Jonge, H., Freijer, J.I., Verstraten, J.M., Westerveld, J., and Vander Wielen, F.W.M. (1997). "Retation between bioavailability and fuel oil hydrocarbon composition in contaminated soils." *J. Environ. Sci. Technol*., 31, 771-775.

16- Atlas, R.M., and Bartha, R. (1973). "Fate and effects of polluting petroleum in the marine environment". *Residue Rev*., 49 (2), 49-83.

17- Hunt, J. M. (1996). *Petroleum geochemistry and geology*, 2nd Ed., W.H. Freeman and Company, New York.

18- 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." *J. of Bioresource Technology*, 98 (10), 1339-1345.