



دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گیلان

نشریه پژوهش‌های حفاظت آب و خاک

جلد بیستم، شماره چهارم، ۱۳۹۲

<http://jwsc.gau.ac.ir>

پاک‌سازی خاک آلوده به نفت کوره به وسیله یونجه

و چمن به همراه باکتری سودوموناس پوتیدا

*مریم خسروی‌نوده^۱، علی عباسپور^۲، سیده‌سهیلا ابراهیمی^۳ و حمیدرضا اصغری^۴

^۱دانشجوی کارشناسی ارشد گروه آب و خاک، دانشگاه صنعتی شاهرود، ایران، ^۲استادیار گروه آب و خاک، دانشگاه

صنعتی شاهرود، ایران، ^۳استادیار گروه خاکشناسی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران،

^۴استادیار گروه زراعت، دانشگاه صنعتی شاهرود، ایران

تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۷؛ تاریخ پذیرش: ۹۱/۹/۲۰

چکیده

آلودگی منابع آبی و خاک توسط نفت خام و مشتقات آن در هنگام استخراج نفت خام، ترابری، پالایش و سوختن آن مشکلی پیچیده و رایج در سراسر دنیا به‌شمار می‌آید. این نوع آلودگی اثرات منفی و زیان‌آوری بر سلامت انسان و سایر موجودات دارد و تهدیدی جدی برای محیط زیست به‌شمار می‌رود. از این‌رو، پاک‌سازی زیستی آلودگی نفتی در صورت امکان‌سنجی کاربرد، جایگزینی مناسب و کاربردی برای روش‌های فیزیکی و شیمیایی است. در این راستا، هدف از انجام این پژوهش، بررسی نرخ کاهش آلودگی هیدروکربنی خاک‌های آلوده به مواد هیدروکربنی (نفت کوره) توسط کشت دو گیاه یونجه و چمن با و بدون همراهی باکتری سودوموناس پوتیدا به روش گیاه‌پالایی بود. به این منظور بذور دو گیاه یونجه و چمن در دو سطح تراکم و به همراه دو تیمار با و بدون باکتری سودوموناس پوتیدا در تعدادی گلدان شامل خاک آلوده به نفت کوره با درصد آلودگی مشخص، کشت و در شرایط گل‌خانه‌ای نگهداری شدند. نمونه‌برداری خاک در مراحل جوانه‌زنی، رویشی و زایشی گیاهان انجام شد. سپس نمونه‌های خاک به آزمایشگاه منتقل و آزمایش‌های لازم بر روی نمونه‌های خاک موردنظر انجام شد. بررسی نتایج به‌دست آمده از این پژوهش نشان داد که هر دو گیاه یونجه و

*مسئول مکاتبه: m.khosravinodeh@gmail.com

چمن میزان آلودگی خاک به نفت کوره را کاهش دادند. همچنین افزایش تراکم کشت و اعمال تیمار باکتری نیز در کاهش میزان آلودگی هیدروکربنی خاک اثر مثبتی داشته اما این کاهش نسبت به تیمار بدون باکتری و تراکم کم‌تر گیاه معنی‌دار نبود.

واژه‌های کلیدی: آلودگی خاک، سودوموناس پوتیدا، گیاه‌پالایی، نفت کوره

مقدمه

جامعه مدرن امروز همچنان در درجه اول به استفاده از هیدروکربن‌های نفت خام برای تولید انرژی مورد نیاز تکیه دارد. با وجود پیشرفت‌های اخیر فن‌آوری، آلودگی خاک در اثر نشت تصادفی نفت خام و محصولات تصفیه شده آن به‌طور مکرر در طی عملیات معمول استخراج، حمل و نقل، ذخیره‌سازی، پالایش و توزیع رخ می‌دهد (ژو و همکاران، ۲۰۰۱). بنابراین آلودگی محیط زیست توسط نفت خام و مشتقات آن یک مشکل جدی در سراسر جهان است. به‌طور کلی تجمع آلاینده‌ها در خاک می‌تواند اثرات مخربی بر محیط زیست و سلامت انسان داشته باشد. آلاینده‌های موجود در خاک می‌توانند وارد زنجیره غذایی شده و سلامت حیوان و انسان را با خطر جدی مواجه سازد (مرکل و همکاران، ۲۰۰۴). نفت خام یک ترکیب پیچیده و مخلوطی از ترکیبات آلی است که به آن‌ها هیدروکربن گفته می‌شود. این ترکیبات می‌توانند شکل‌های مختلف داشته باشند؛ گاز طبیعی، نفت خام مایع، آسفالت جامد یا نیمه‌جامد یا قیر (ژیونگ و همکاران، ۱۹۹۷). نفت خام و محصولات آن شامل انواع زیادی از ترکیبات آلی دربرگیرنده هیدروکربن‌های آروماتیک و آلیفاتیک هستند (فوکویی و همکاران، ۱۹۹۹). این هیدروکربن‌ها در ۳ گروه پارافینی (آلکان‌ها)، نفتنی (سیکلوآلکان‌ها) و آروماتیک قرار می‌گیرند. ترکیبات آروماتیک شامل بنزن، تولوئن، اتیل بنزن و زایلن (بی تی ای ایکس) هستند. علاوه بر این هیدروکربن‌های نفت دارای مقدار کمی ترکیبات آلی گوگردار، نیتروژن‌دار و اکسیژن‌دار و مقدار بسیار جزئی ترکیبات آلی-فلزی با پایه نیکل، وانادیم و آهن می‌باشد. از نظر تجزیه‌پذیری نفت را می‌توان به ۴ جزء هیدروکربن‌های اشباع، هیدروکربن‌های آروماتیک، مواد قطبی غیرهیدروکربنی مثل رزین و در نهایت آسفالتن تقسیم کرد. نفت سبک بیش‌تر از هیدروکربن‌های اشباع و آروماتیک تشکیل شده که دارای درصد کمی از رزین و آسفالتن می‌باشد اما نفت سنگین که ناشی از تجزیه نفت خام در شرایط بدون اکسیژن در مخازن طبیعی است هیدروکربن‌های اشباع و آروماتیک کم‌تری دارد و بیش‌تر از

ترکیبات قطبی، رزین و آسفالتن تشکیل شده است. هنگام تجزیه زیستی نفت خام در محیط طبیعی، مواد مشابه‌ای با تجزیه نفت سنگین به دست می‌آید. به دلیل این‌که بیش‌ترین قسمت نفت را هیدروکربن‌ها تشکیل می‌دهند، تجزیه آن‌ها از نظر کمی مهم‌ترین فرآیند حذف نفت از محیط است. آلودگی‌های نفتی به ۳ روش فیزیکی، شیمیایی و زیستی پاک‌سازی می‌شوند. در روش فیزیکی در مورد آلودگی آب‌ها ممکن است از ابزارهای جمع‌کننده و در مورد خاک‌ها از روش دفن بهداشتی مواد آلوده استفاده شود و یا سوزاندن به کار گرفته می‌شود. روش‌های شیمیایی شامل تزریق مستقیم اکسیدکننده‌های شیمیایی به محیط است که منجر به تغییر ماهیت طبیعی محیط می‌شود. روش‌های فیزیکی و شیمیایی بسیار گران هستند و بیش‌تر در پاک‌سازی آلودگی‌های با شدت زیاد مورد استفاده قرار می‌گیرند. متأسفانه هزینه‌های بالای حذف آلاینده‌ها از خاک به وسیله روش‌های فیزیکی و شیمیایی متداول سبب شده است بسیاری از کشورها، به‌ویژه کشورهای در حال توسعه که از قدرت فنی و اقتصادی کم‌تری نسبت به کشورهای پیشرفته برخوردارند، از این مشکل به‌طورکلی صرف‌نظر کنند. در عین حال کشورهای صنعتی برای دستیابی به فن‌آوری‌های پالایش ارزان و کارآمد، پیش‌گام و پیش‌تاز هستند که این نشانی از درک صحیح از اهمیت مسایل زیست‌محیطی و تلاش آگاهانه در برخورد با معضلات زیست‌محیطی می‌باشد. اما روش‌های زیستی ارزان‌تر، مؤثرتر و بی‌ضررتر به نظر می‌رسند. زیست‌پالایی یک فن‌آوری حذف آلودگی است که در آن سیستم زیستی برای تخریب یا تغییر شکل مواد شیمیایی زیان‌بار استفاده می‌شود. عموماً احیاء زیستی به دو روش در محل^۱ و خارج از محل^۲ انجام می‌شود. هدف زیست‌پالایی نفت، تجزیه کامل هیدروکربن‌ها به آب و دی‌اکسیدکربن توسط میکروارگانیسم است. این تکنیک نسبت به سایر روش‌های حذف آلودگی نفتی چندین برتری دارد، که از جمله می‌توان به این موارد اشاره نمود: تبدیل مواد سمی به محصولات نهایی و بی‌خطر، هزینه پایین، کاهش اثرات جانبی روی سلامت انسان و محیط زیست، تأثیر طولانی‌مدت همراه با روش‌های غیرمخرب و بالاخره توانایی حذف آلودگی به‌صورت درجا و بدون این‌که لازم باشد اختلالی در اکوسیستم ایجاد شود (راه‌پیما سروستانی، ۲۰۱۰). در میان روش‌های زیستی، استفاده از باکتری‌ها در حذف آلودگی بازدهی بسیار خوبی دارد و مورد مطالعه فراوان قرار گرفته است (اطلس، ۱۹۸۱؛ براگ و همکاران، ۱۹۹۴) روش دیگر گیاه‌پالایی است که شامل استفاده از گیاهان برای

1- In Situ

2- Ex Situ

پاک‌سازی آلاینده‌های خاک است. در گیاه‌پالایی، گیاهان معمولاً آلاینده‌ها را جذب، اندوخته و یا متصاعد می‌کنند. در حقیقت گیاه‌پالایی خاک‌های نفتی را برای استفاده میکروفلور ریزوسفر نسبت به خود گیاه سریع‌تر آماده می‌سازد (رادوان، ۲۰۰۸). هم‌چنین موفقیت گیاه‌پالایی تا حد زیادی به سن و گونه گیاهی، قابلیت دسترسی مواد غذایی و آلاینده‌ها بستگی دارد (لیسته و فلجنتریا، ۲۰۰۶). در دهه اخیر مطالعات زیادی در خصوص استفاده از انواع روش‌های مختلف تصفیه خاک‌های آلوده به مواد نفتی انجام شده است. در این راستا، هدف از انجام این پژوهش، بررسی اثر منفرد و تلفیقی چندین سیستم زیستی پاک‌سازی آلودگی هیدروکربوری خاک‌های آلوده، یافتن گیاهان اصلاح‌کننده بومی منطقه با خاصیت زیست‌پالایی و انتخاب نوع مناسب آن با توجه به زیست‌بوم، به‌عنوان راهی عملی و پایدار برای استفاده در خاک‌های آلوده در حذف و پالایش هیدروکربورهای نفتی از خاک می‌باشد. علاوه بر آن بررسی خواهد شد که اثر باکتری‌های نفت‌خوار در پالایش منطقه به چه صورت است. افزون بر آن، سعی می‌شود اثر مشترک هر دو سیستم پاک‌سازی مورد ارزیابی قرار گیرد و حذف یا کاهش آلودگی خاک‌های منطقه مورد مطالعه از آلاینده‌های نفتی با استفاده از گیاه و ارزیابی مقدار و چگونگی امکان پالایش خاک‌های آلوده به آلاینده‌های نفتی اطراف پالایشگاه‌ها با استفاده از روش‌های زیستی و دستیابی به دانش فنی پالایش این خاک‌ها مورد نظر قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

خصوصیات خاک: در این پژوهش، خاک مورد مطالعه از شرکت ملی پخش و پالایش فرآورده‌های نفتی واقع در شرق شاهرود تهیه شد. آلاینده هیدروکربنی خاک موردنظر، از نوع نفت کوره بود. نفت کوره برشی از نفت خام تقطیر شده است و به‌طور عمده به مایعی گفته می‌شود که برای سوختن در کوره و بویلر و موتورهای تولید قدرت مصرف می‌شود. نفت کوره متشکل از سنگین‌ترین بخش‌های نفت خام و معمولاً فرآورده پایین ستون تقطیر در حلال است و چون سیاه‌رنگ است به نفت سیاه نیز موسوم است. مطالعات خاک‌شناسی نمونه‌های خاک شامل هیدروکربن‌های نفتی (نفت کوره) شامل pH عصاره اشباع خاک (توماس، ۱۹۹۶)، قابلیت هدایت الکتریکی خاک با دستگاه هدایت‌سنج (EC) (رودس، ۱۹۹۶)، مقدار آهک (بوویوکاس، ۱۹۶۲)، نیتروژن کل خاک به روش کجلدال (برمر، ۱۹۹۶)، کربن آلی به روش والکی بلک (نلسون و سامر، ۱۹۸۲)، فسفر خاک به روش اولسن (کائو، ۱۹۹۶) در آزمایشگاه انجام شد (جدول ۱). غلظت کل هیدروکربن‌های نفتی خاک در ابتدای آزمایش و براساس

دستورالعمل EPA (آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا، ۲۰۰۱) به صورت انتقال آلودگی از ماتریکس خاک به سیال حلال به نام دی کلرومتان، تبخیر حلال و سنجش آلاینده هیدروکربنی بود. به این صورت آلودگی اولیه خاک حدود ۱۶/۵ درصد برآورد شد، که این مقدار آلودگی برای گیاه بسیار بالاتر از ماکزیمم بازدهی گیاه پالایی بود (شهریاری و همکاران، ۲۰۰۶) که حداکثر معادل ۱۰ درصد برآورد شده است، بنابراین خاک آلوده براساس آلودگی اولیه با مقداری خاک رسی مخلوط گردید تا مقدار آلودگی آن به ۶/۵ درصد رسید و برای کاشت گیاهان آماده شد.

جدول ۱- برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در گیاه پالایی.

پارامتر	رس (درصد)	سیلت (درصد)	شن (درصد)	بافت	pH	EC (دسی زیمنس بر متر)	نیتروژن کل (درصد)	کربن آلی (درصد)	فسفر قابل دسترس (درصد)
مقدار	۳/۹	۱۷/۶	۷۸/۵	شنی لوم	۷/۹۹	۱/۳۴	۰/۱۰۴	۳/۸	۲۹

انتخاب گیاهان برای انجام گیاه پالایی: برای شناسایی و انتخاب گونه‌های گیاهی مقاوم و مستعد در حذف آلودگی هیدروکربن‌های نفتی، مطالعات لازم انجام شد و در نهایت ۲ گیاه یونجه یک‌ساله (*Medicago scutellata*) از خانواده لگوم‌ها و چمن پوآ (*Poa bulbosa*) از خانواده گراس‌ها انتخاب شد (مرکل و همکاران، ۲۰۰۴).

یونجه گیاهی یک یا چندساله از خانواده لگوم‌ها است که ریشه‌ای راست و مستقیم دارد. برخوردار بودن این گیاه از یک سیستم ریشه‌ای قوی، عامل موفقیت آن در مقاومت به همه عوامل نامساعد به‌شمار می‌آید. هم‌چنین لگوم‌ها به دلیل تثبیت نیتروژن توسط ریشه‌های گره‌ای خود بازسازی خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی را تسهیل می‌کنند (مرکل و همکاران، ۲۰۰۴).

چمن جزو تیره گندمیان^۱ محسوب شده و به‌عنوان گیاه مؤثر در گیاه پالایی خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی پیشنهاد شده است. چمن گیاه علفی بوده و دارای سیستم ریشه‌ای فیبری است و به تعامل جامعه میکروبی و آلاینده کمک می‌کند (وایت و همکاران، ۲۰۰۵).

1- (Graminae) Poaceae

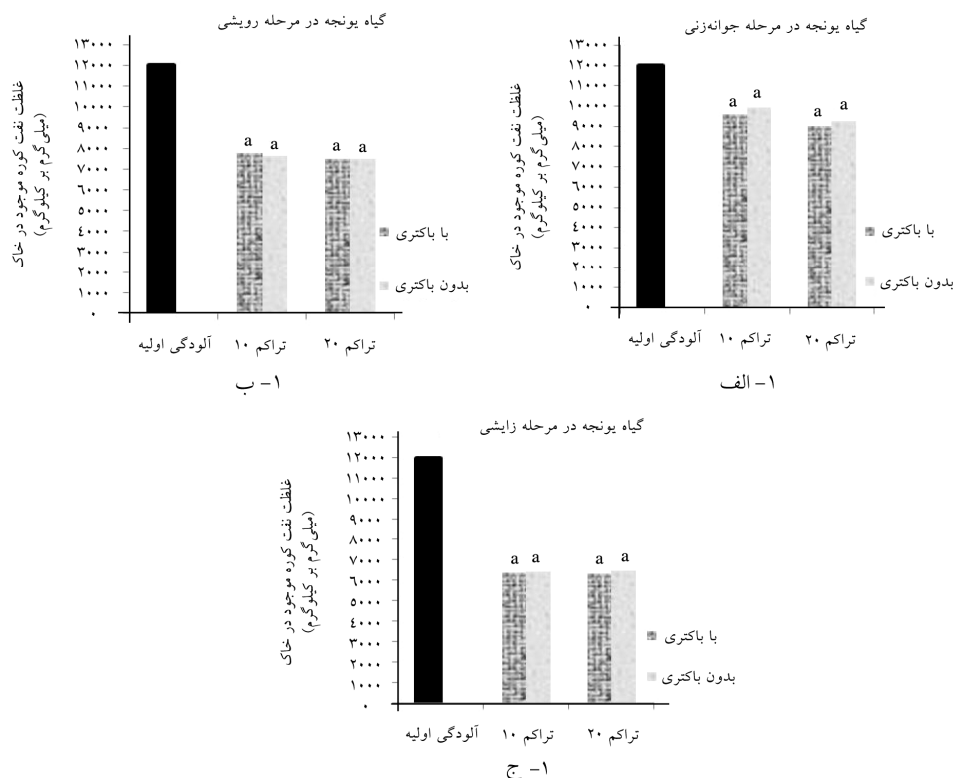
انتخاب باکتری: مطالعات لازم بر روی گونه‌های مختلف باکتریایی انجام گرفت (رادوان، ۲۰۰۹). گونه‌های باکتریایی که بیش‌تر به‌عنوان تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های نفتی عمل می‌کنند، به‌طور عموم شامل *Bucillus*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas* و *Acinetobacter* هستند. در این پژوهش باکتری سودوموناس پوتیدا (*Pseudomonasputida*) (محرک رشد گیاه PGPR) انتخاب شد. از دلایل اصلی انتخاب این باکتری ریزوسفری (تثبیت‌کننده نیتروژن) توانایی آن در افزایش آزاد کردن ترکیبات آلی ساده توسط ریشه‌های گیاهی و پتانسیل مصرف هیدروکربن‌های نفتی در میان این گونه است (کورن و همکاران، ۲۰۰۳؛ رابسون و همکاران، ۲۰۰۴؛ رادوان، ۲۰۰۹).

آزمایش گل‌خانه‌ای: برای آماده‌سازی خاک، نمونه‌های خاک از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شد، سپس با نسبت معینی از خاک رسی مخلوط شد و به‌میزان آلودگی مشخص اولیه رسید و پس از زمان تعادلی مقدار آلودگی کل هیدروکربنی آن معادل ۶/۵ درصد اندازه‌گیری شد. سپس مقدار ۳ کیلوگرم از خاک آلوده موردنظر (با آلودگی ۶/۵ درصد) به هر گلدان منتقل شد و بذور ۲ گیاه یونجه (یک‌ساله) و چمن (پوآ) در ۲ سطح تراکم (تراکم ۱۰ و ۲۰ برای گیاه یونجه و تراکم ۵ و ۱۰ برای گیاه چمن براساس میزان حداقل و حداکثر کاشت در هکتار (خطی و همکاران، ۲۰۰۹)) و با ۲ تیمار با و بدون باکتری (سودوموناس پوتیدا) به‌کار رفت. به‌دلیل این‌که قوه نامیه بذور یونجه بسیار پایین بود قبل از کشت، ابتدا آن‌ها را به‌مدت ۵ و ۱۰ دقیقه در اسید سولفوریک ۹۸ درصد خوابانده که در مدت زمان ۱۰ دقیقه بالاترین درصد جوانه‌زنی (۹۰ درصد) مشاهده شد. بعد از آن بذور یونجه در گلدان‌ها قرار داده شد و سپس گلدان‌ها در گلخانه و شرایط کنترل شده نگهداری شدند. گلدان‌ها هر ۲ روز یک‌بار آبیاری شدند. بعد از گذشت ۱۱ روز بذور هر دو گیاه یونجه و چمن در خاک آلوده جوانه زدند که در مقایسه با شاهد تاخیری در جوانه‌زنی آن‌ها مشاهده نشد. پس از گذشت حدود ۱ ماه از کشت، نمونه‌برداری خاک به‌صورت حفر دستی در مرحله پس از جوانه‌زنی در ناحیه ریشه گیاهان انجام شد. این نمونه‌برداری هم‌چنین در مرحله پس از رشد رویشی و مرحله زایشی گیاهان موردنظر نیز انجام شد. سپس نمونه‌های خاک به آزمایشگاه منتقل و در دمای اتاق خشک و برای آنالیز آماده شد. این مطالعه به‌صورت طرح کاملاً تصادفی در قالب آزمایش فاکتوریل در ۲ سطح تراکم، ۲ تیمار با و بدون باکتری، ۳ مرحله رویشی و ۳ تکرار انجام شد. تیمار شاهد شامل خاک غیرآلوده و هر دو گیاه در ۲ سطح تراکم، ۲ تیمار با و بدون باکتری، ۳ مرحله رویشی و ۳ تکرار بود. تجزیه آماری داده‌ها نیز با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد.

استخراج نفت از خاک: استخراج نفت از خاک طبق روش اصلاح شده Marquez-Rocha (مارکوئز روکا و همکاران، ۲۰۰۰) انجام شد. مقدار ۲ گرم خاک آلوده وزن شد و به آن حدود ۱۰ میلی لیتر حلال دی کلرومتان اضافه شد. مخلوط به شدت و به مدت ۱۰ دقیقه تکان داده شد. سپس مخلوط در دور ۳۰۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد تا خاک آن رسوب نماید. محلول روایی از خاک جدا شد و در ظرف شیشه‌ای که از قبل وزن شده بود ریخته شد. مرحله بالا دوباره تکرار شد. سپس اجازه داده شد که حلال دی کلرومتان برای مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه تبخیر شده و باقی مانده دوباره وزن شد. این وزن مقدار نفت موجود در خاک را مشخص می کند.

نتایج و بحث

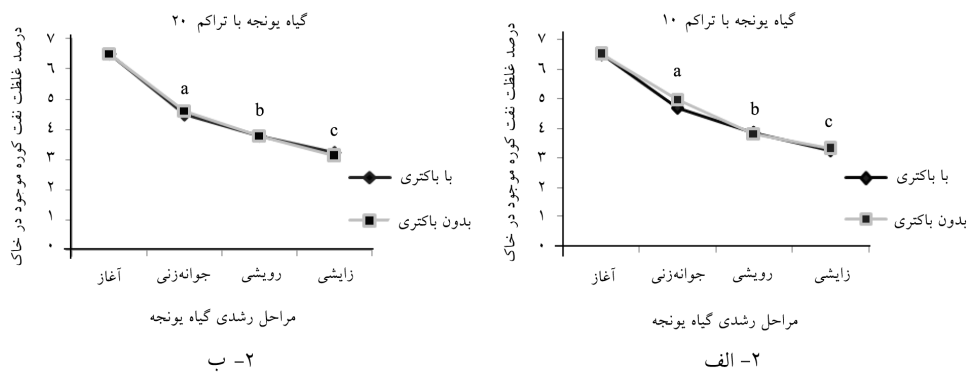
نتایج به دست آمده در این پژوهش نشان داد، گیاه یونجه کشت شده در خاک آلوده به نفت کوره به آلودگی موجود در خاک مقاوم بوده و در آن جوانه زده و رشد کرد و مقدار آلودگی نفتی (نفت کوره) کل خاک را در هر مرحله از رشد کاهش داد. در مرحله جوانه زنی گیاه یونجه، مقدار کاهش بیش تر آلودگی نفتی خاک مربوط به تیمار با باکتری و در تراکم ۲۰ (تراکم بیش تر) بود (اثر تراکم و باکتری در کاهش میزان آلودگی نفتی خاک معنی دار نبود) که مقدار این کاهش برابر با ۳۰/۸ درصد بود (شکل ۱- الف). در مرحله رویشی گیاه یونجه، تراکم ۲۰ نسبت به تراکم ۱۰ اندکی بیش تر در میزان آلودگی نفتی خاک کاهش نشان داد (اثر تراکم در کاهش میزان آلودگی نفتی خاک معنی دار نبود) همچنین اعمال تیمار باکتری تأثیری بر میزان کاهش آلودگی نفتی خاک نداشت (اثر باکتری در کاهش میزان آلودگی نفتی خاک معنی دار نبود) و مقدار کاهش آلودگی نفتی در خاک، در تیمار بدون باکتری با تیمار با باکتری برابر بود که مقدار آن ۴۱/۵ درصد بود (شکل ۱- ب). در مرحله زایشی گیاه یونجه نیز تیمار با باکتری نسبت به تیمار بدون باکتری در هر دو سطح تراکم گیاه یونجه تأثیر کمی در کاهش میزان آلودگی نفتی خاک داشت و مقدار کاهش آلودگی نفتی خاک در تراکم ۲۰ و تیمار با باکتری نسبت به تراکم ۱۰ و تیمار با باکتری اندکی کاهش بیش تری نشان داد (اثر تراکم و باکتری در کاهش میزان آلودگی نفتی خاک معنی دار نبود) که مقدار آن معادل ۵۰ درصد نسبت به آلودگی نفتی اولیه موجود در خاک بود (شکل ۱- ج).



شکل ۱- تغییرات غلظت نفت کوره موجود در خاک پس از کاشت گیاه یونجه در ۳ مرحله رشد در ۲ سطح تراکم و تیمار با و بدون باکتری. (الف) مرحله جوانه‌زنی، (ب) مرحله رویشی و (ج) مرحله زایشی (حروف مشابه نشان‌دهنده این است که اثر تیمار سطح تراکم گیاه و تیمار باکتری در میزان کاهش غلظت آلودگی نفتی (نفت کوره) موجود در خاک معنی‌دار نبوده است).

با توجه به نتایج مشاهده‌ها در گیاه یونجه، اعمال تیمار باکتری و سطح تراکم میزان آلودگی موجود در خاک را کاهش داد ولی میزان این کاهش معنی‌دار نبود به این معنی که افزایش تراکم گیاه یونجه و افزودن باکتری به گیاه اثر مثبتی در کاهش آلودگی نفتی (نفت کوره) خاک نداشت، اما تأثیر مراحل مختلف رشدی گیاه یونجه در کاهش آلودگی نفتی (نفت کوره) معنی‌دار بوده به این معنی که در هر مرحله از رشد گیاه، ما شاهد کاهش معنی‌دار میزان آلودگی نفتی (نفت کوره) در خاک بودیم. بنابراین بیش‌ترین میزان کاهش آلودگی نفتی (نفت کوره) موجود در خاک در هر ۳ مرحله رشد مربوط به مرحله زایشی در گیاه یونجه در هر دو سطح تراکم گیاه و تیمارهای با و بدون باکتری بود (اثر مرحله رشد در

کاهش میزان آلودگی نفتی خاک معنی دار بود) که میزان آلودگی نفتی موجود در خاک را به نصف کاهش داد (شکل ۲- الف و ب) (جدول ۲) و با پژوهش‌های وایلتس و همکاران (۱۹۹۸) در مورد اثر مثبت گونه‌های گیاه یونجه بر کاهش غلظت آلاینده‌های ناشی از نفت خام در خاک هم‌خوانی داشت.



شکل ۲- بررسی روند تغییرات درصد آلودگی نفتی خاک (نفت کوره) در طول دوره رشدی گیاه یونجه در ۲ سطح تراکم و با ۲ تیمار با و بدون باکتری. الف) گیاه یونجه با تراکم ۱۰. ب) گیاه یونجه با تراکم ۲۰ (حروف غیرمشابه نشان‌دهنده معنی دار بودن تیمار مرحله رشد در کاهش غلظت آلودگی نفتی (نفت کوره) در خاک است).

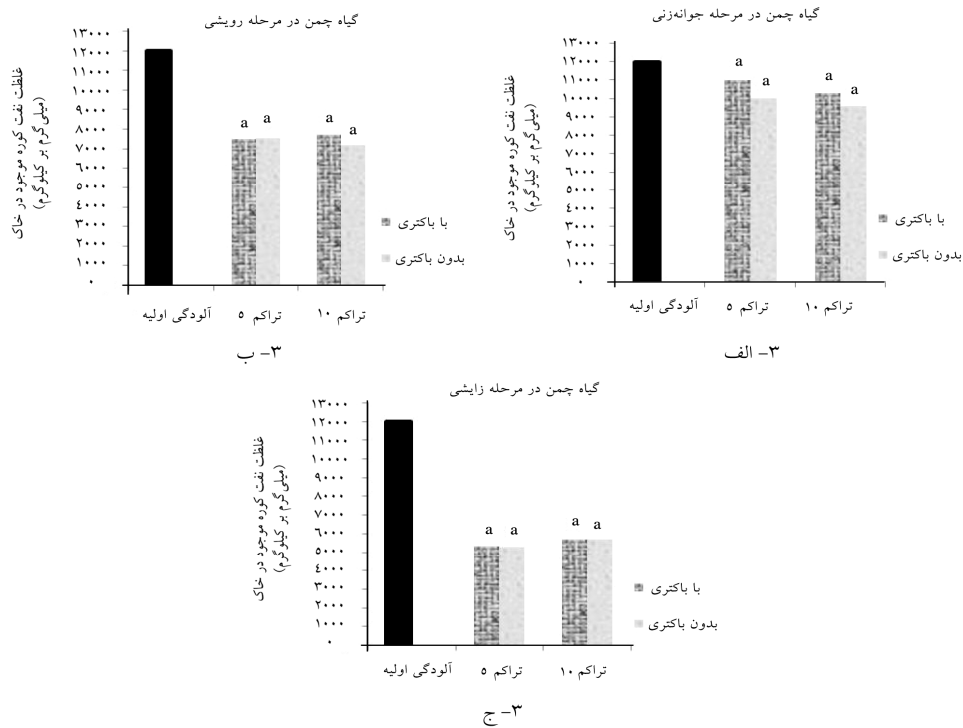
جدول ۲- تجزیه واریانس اثر مراحل رویشی، تراکم گیاه و باکتری بر میزان گیاه‌بالایی یونجه.

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد نفت
تکرار	۲	۰/۰۹۸ ^{ns}
مرحله رشد	۱	۶/۵۲ ^{**}
تراکم	۱	۰/۱۷۳ ^{ns}
باکتری	۱	۰/۰۲۳ ^{ns}
مرحله رشد × تراکم	۲	۰/۰۴۷ ^{ns}
مرحله رشد × باکتری	۲	۰/۰۵۳ ^{ns}
تراکم × باکتری	۱	۰/۰۲۴ ^{ns}
رشد × تراکم × باکتری	۲	۰/۰۰۹ ^{ns}
خطا	۲۲	۰/۱۷۷۸
ضریب تغییرات (درصد)	-	۱۰/۷۶

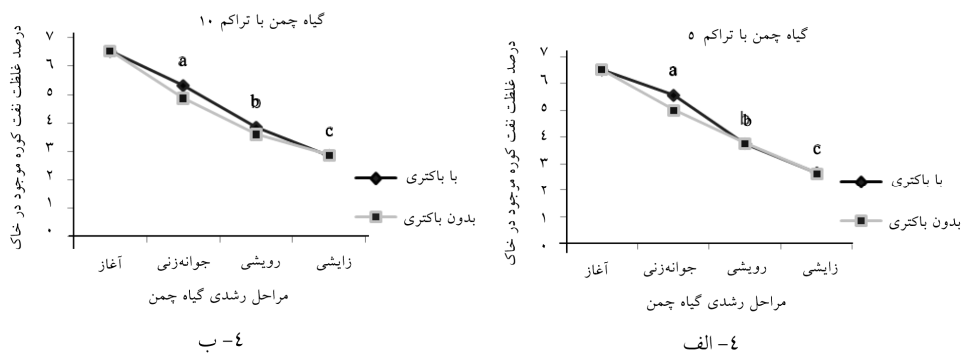
** معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد و ^{ns} غیرمعنی دار.

نتایج به‌دست آمده در مورد گیاه چمن، نشان داد که گیاه چمن کشت شده در خاک آلوده به نفت کوره نیز به آلودگی نفتی موجود در خاک مقاوم بوده و در آن جوانه زده و رشد کرده و مقدار آلودگی نفتی (نفت کوره) موجود در خاک را در هر مرحله از رشد گیاه چمن کاهش داد. در مرحله جوانه‌زنی گیاه چمن میزان کاهش آلودگی نفتی خاک در تراکم ۱۰ (تراکم بیش‌تر) و در تیمار بدون باکتری بیش‌تر بود که مقدار آن برابر با ۲۵/۲ درصد بود (اثر تراکم و باکتری در کاهش میزان آلودگی نفتی خاک معنی‌دار نبود) (شکل ۳- الف). در مرحله رویشی گیاه چمن میزان کاهش آلودگی نفتی موجود در خاک در تراکم ۱۰ گیاه چمن و تیمار بدون باکتری نسبت به سایر تیمارها به میزان کمی بیش‌تر بود (اثر تراکم و باکتری در کاهش میزان آلودگی نفتی خاک معنی‌دار نبود) که مقدار آن برابر با ۴۰ درصد بود (شکل ۳- ب). اما در مرحله زایشی گیاه چمن میزان کاهش آلودگی نفتی (نفت کوره) موجود در خاک در تراکم ۵ گیاه چمن (تراکم کم) و در تیمار بدون باکتری نسبت به سایر تیمارها اندکی بیش‌تر بود (اثر تراکم و باکتری در کاهش میزان آلودگی نفتی خاک معنی‌دار نبود) که مقدار آن برابر با ۵۹/۲ درصد بود (شکل ۳- ج).

با توجه به نتایج مشاهده‌ها در گیاه چمن، اعمال تیمار باکتری و سطح تراکم میزان آلودگی موجود در خاک را کاهش داد ولی میزان این کاهش معنی‌دار نبود به این معنی که افزایش تراکم گیاه و افزودن باکتری به گیاه اثر مثبتی در کاهش آلودگی نفتی (نفت کوره) خاک نداشت، اما تأثیر مراحل مختلف رشدی گیاه در کاهش آلودگی نفتی (نفت کوره) معنی‌دار بوده به این معنی که در هر مرحله از رشد گیاه ما شاهد کاهش معنی‌دار میزان آلودگی نفتی (نفت کوره) خاک بودیم و بیش‌ترین میزان کاهش آلودگی نفتی خاک در هر ۳ مرحله رشد مربوط به مرحله زایشی در گیاه چمن در هر ۲ سطح تراکم گیاه و تیمارهای با و بدون باکتری بود (اثر مرحله رشد در کاهش میزان آلودگی نفتی خاک معنی‌دار بود) (جدول ۳) که میزان آلودگی نفتی (نفت کوره) موجود در خاک را به بیش‌تر از نصف کاهش داد (شکل ۴- الف و ب) و با پژوهش‌های دینگ و همکاران (۲۰۰۴) در مورد اثر مثبت گیاه ری‌گرس بر کاهش غلظت آلاینده‌های هیدروکربنی در خاک هم‌خوانی داشت. همچنین کایمی و همکاران (۲۰۰۶) ری‌گرس را گیاهی مقاوم به نفت گزارش کردند که در خاک‌های شور و قلیایی به‌خوبی رشد می‌کنند. ریشه‌های ری‌گرس در افزایش تجزیه زیستی خاک آلوده به نفت دیزل مؤثر نشان داده شده است. ژيو و همکاران (۲۰۰۶) نیز به نقش مؤثرتر کشت هم‌زمان ذرت- ری‌گراس بر کاهش غلظت ترکیبات نفتی در خاک اشاره کردند.



شکل ۳- تغییرات غلظت نفت کوره موجود در خاک پس از کاشت گیاه چمن در ۳ مرحله رشد در ۲ سطح تراکم و تیمار با و بدون باکتری. الف) مرحله جوانه زنی. ب) مرحله رویشی. ج) مرحله زایشی (حروف مشابه نشان دهنده این است که اثر تیمار سطح تراکم گیاه و تیمار باکتری در میزان کاهش غلظت آلودگی نفتی (نفت کوره) موجود در خاک معنی دار نبوده است).



شکل ۴- بررسی روند تغییرات درصد آلودگی نفتی خاک (نفت کوره) در طول دوره رشدی گیاه چمن در ۲ سطح تراکم و با ۲ تیمار با و بدون باکتری. الف) گیاه چمن با تراکم ۵. ب) گیاه چمن با تراکم ۱۰ (حروف غیرمشابه نشان دهنده معنی دار بودن تیمار مرحله رشد در کاهش غلظت آلودگی نفتی (نفت کوره) در خاک است).

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر مراحل رویشی، تراکم گیاه و باکتری بر میزان گیاه‌پالایی چمن.

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد نفت
تکرار	۲	۰/۰۲۹ ^{NS}
مرحله رشد	۱	۱۷/۶۷ ^{**}
تراکم	۱	۰/۰۰۰۱ ^{NS}
باکتری	۱	۰/۳۶۶ ^{NS}
مرحله رشد × تراکم	۲	۰/۱۲۷ ^{NS}
مرحله رشد × باکتری	۲	۰/۱۹۸ ^{NS}
تراکم × باکتری	۱	۰/۰۰۳ ^{NS}
رشد × تراکم × باکتری	۲	۰/۰۲۹ ^{NS}
خطا	۲۲	۰/۱۷۷۲
ضریب تغییرات (درصد)	-	۱۰/۸۰

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد و ^{NS} غیرمعنی‌دار.

به‌طورکلی نتایج به‌دست آمده در این پژوهش نشان داد که دو گیاه یونجه و چمن کشت شده در خاک آلوده به هیدروکربن‌های نفتی (نفت کوره)، به آلودگی نفتی موجود در خاک مقاوم بوده و در آن جوانه زده و رشد کردند (تاخیری در زمان جوانه‌زنی گیاه نسبت به شاهد مشاهده نشد) و مقدار آلودگی نفتی (نفت کوره) موجود در خاک را در هر مرحله از رشد (هر دو گیاه یونجه و چمن) کاهش دادند، البته به‌نظر می‌رسد عملکرد گیاه چمن در کاهش آلودگی نفتی (نفت کوره) خاک بهتر بوده است. اعمال تیمار باکتری سودوموناس پوتیدا نیز اثر معنی‌داری بر روی میزان کاهش آلودگی نفتی موجود در خاک نسبت به تیمار بدون باکتری نداشته است، همچنین تراکم بیش‌تر گیاه نسبت به تراکم کم‌تر اثر معنی‌داری بر روی میزان کاهش آلودگی نفتی موجود در خاک نداشت. بنابراین گیاه یونجه (از خانواده لگومینه) برای کشت در خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی به‌دلیل مقاومت به آلودگی هیدروکربنی و گیاه چمن به‌دلیل رشد مناسب در خاک آلوده به هیدروکربن‌های نفتی و ایجاد سیستم ریشه‌ای فیبری مناسب برای استفاده در پاک‌سازی خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی به روش گیاه‌پالایی پیشنهاد می‌شود.

منابع

1. Atlas, R.M. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol. Rev.* 45: 180-209.
2. Bouyoucos, C.J. 1962. Hydrometer method improved for making particle size analysis of soil. *Agron. J.* 54: 464-465.
3. Bragg, J.R., Prince, R.C., Harner, E.J., and Atlas, R.M. 1994. Effectiveness of Bioremediation of Exxon Valdez oil spill. *Nature*, 368: 413-418.
4. Bremner, J.M. 1996. Nitrogen-total. P 1085-1122, In: Sparks, D.L., Page, A.L., Helmke, P.A. and Loeppert, R.H. *Method of soil analysis published by: Soil Science Society of America, Inc. American Society of agronomy. Inc: Madison, Washington, USA.*
5. Cerniglia, C.E., Gibson, D.T., and Van Baalen, C. 1980a. Oxidation of naphthalene by the cyanobacteria and microalgae. *J. Gen. Microbiol.* 116: 495-500.
6. Curl, E.A., and Truelove, B. 1986. *The rhizosphere.* Springer, Berlin.
7. Ding, K.Q., Luo, Y.M., Liu, S.L., Wu, L.H., Xin, W.Q., Li, Z.G., and Tao, S. 2004. Dynamics in benzo[a]pyrene concentrations in soil as influenced by ryegrass plants. *Act. Pedo. Logi. Sin.* 41: 348-353.
8. Fukui, M., Harms, G., Rabus, R., Schramm, A., Widdel, F., Zengler, K., Boreham, C., and Wilkers, H. 1999. Anaerobic degradation of oil hydrocarbons by sulfate-reducing and nitrate-reducing bacteria. P 359-367, In: Bell, C.R., Brylinski, M., Johnson-Green, P. (Eds.), *Microbial biosystems: New Frontiers. Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology.* Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax Canada.
9. Kaimi, E., Mukaidani, T., Miyoshia, S., and Tamaki, M. 2006. Ryegrass enhancement of biodegradation in diesel-contaminated soil. *Environ. Exp. Bot.* 55: 110-119.
10. Kao, S. 1996. Phosphorus. P 869-920, In: Sparks, Sparks, D.L., Page, A.L., Helmke, P.A. and Loeppert, R.H. *Method of soil analysis published by: Soil Science Society of America, Inc. American Society of agronomy. Inc: Madison, Washington, USA.*
11. Khatibi, Sh., Mir Seyyed Hosseini, H., Nezami, M.T., and Ebrahimi, S. 2009. Change the oil pollutants in soil by alfalfa, grass and white clover around Tehran Oil Refinery. 11th Congress of Soil Science, Gorgan.
12. Koren, O., Knezevic, V., Ron, E.Z., and Rosenberg, E. 2003. Petroleum pollution bioremediation using water-insoluble uric acid as the nitrogen source. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6337-6339.
13. Liste, H.H., and Felgentrea, D. 2006. Crop growth, culturable bacteria, and degradation of petrol hydrocarbons (PHCs) in a long-term contamination field soil. *App. Soil. Ecology*, 31: 41-52.
14. Marquez-Rocha, F.J., Hernandez-Rodriguez, V.Z. and Teresa Lamela, M.A. 2000. Biodegradation of diesel oil in soil by microbial consortium. *Water. Air. Soil. Pollut.* 128: 313-320.

15. Merkl, N., Schultz-Kraft, R., and Infante, C. 2004. Phytoremediation in the tropics-the effect of crude oil on the growth on tropical plants. *Bioremed. J.* 8: 177-184.
16. Nelson, D.W., and Sommers, L.E. 1982. Total carbon, organic carbon and organic matter. P 539-580, In: A.L. Page (ed). *Methods of soil analysis part 2.* 2nd ed. Chemical and microbiology properties. Agronomy monograph no. 9. SSSA and ASA, Madison, WI.
17. Radwan, S.S. 2008. Microbiology of oil-contaminated desert soils and coastal in the Arabian Gulf region. P 275-298, In: Dion P. Chandra, S.N. (Eds.), *Microbiology of extreme soils.* Soil biology Series 13. Springer, Berlin.
18. Radwan, S.S. 2009. Phytoremediation for oily desert soils. *App. Bioremed. Soil. Biology.* 10: 107-978.
19. Rahpeyma Sarvestani, N. 2010. Bioremediation technology for the removal of oil contaminated in soil and water Utilization of 3-fold. *J. Naftepar.* 82: 5-8. <http://www.Niazemarkazi.com/Article/pdf/10000210.html>.
20. Rhoades, J. 1996. Electrical conductivity and total dissolved solids. P 417-436, In: Sparks, D.L., Page, A.L., Helmke, P.A. and Loeppert, R.H. *Method of soil analysis published by: Soil Science Society of America, Inc. American Society of agronomy. Inc: Madison, Washington, USA.*
21. Robson, D.B., Knight, J.D., Farrell, R.E., and Germida, J.J. 2004. Natural revegetation of hydrocarbon-contaminated soil in semi-arid grassland. *Can. J. Bot.* 82: 22-30.
22. Shahriari, M.H., Savaghebi Firoozabadi, G.R., Minaei Tehrani, D., and Padidarani, M. 2006. The effect of alfalfa and fescuemixes in phytoremediation of soil contaminated with crude oil. *J. Environ. Sci.* 13: 40-33.
23. Thomas, G.W. 1996. Soil pH and soil acidity. P 475-490, In: Sparks, D.L., Page, A.L., Helmke, P.A. and Loeppert, R.H. *Method of soil analysis published by: Soil Science Society of America, Inc. American Society of agronomy. Inc: Madison, Washington, USA.*
24. USEPA. 2001. Treatment technologies for site cleanup. Annual Status Report, Office of Solid Waste and Emergency Response (5102G), 10th ed. United State Environmental Protection Agency.
25. White, P.M., Wolf, D.C., Thoma, G.J., and Reynolds, C.M. 2006. Phytoremediation of alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons in a crude oil-contaminated soil. *Water. Air. Soil. Pollut. J.* 169: 207-220.
26. Wilts, C.C., Rooney, W.L., Chen, Z., Schawb, A.P., and Banks, M.K. 1998. Greenhouse evaluation of agronomic and crude oil-phytoremediation potential among alfalfa genotypes. *J. Environ. Qual.* 27: 169-173.
27. Xiong, Z.T., Hu, H.X., Wang, Y.X., Fu, G.H., Tan, Z.Q., and Yan, G.A. 1997. Comparative Analyses of soil Contaminant Levels and Plant Species Diversity at Developing and Disused Oil Well Sites in Qianjiang Oilfield, China, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58: 667-672.

28. Xu, S.Y., Chen, Y.X., Wu, W.X., Wang, K.X., Lin, Q., and Liang, X.Q. 2006. Enhanced dissipation of phenanthrene and pyrene in spiked soils by combined plants cultivation. *Sci. Environ.* 363: 206-215.
29. Zhu, X., Venosa, A.D., Suidan, M.T., and Lee, K. 2001. *Guidelines for the Bioremediation of Marine Shorelines and Freshwater Wetlands*. US Environmental Protection Agency.



Gorgan University of Agricultural
Sciences and Natural Resources

J. of Water and Soil Conservation, Vol. 20(4), 2013
<http://jwsc.gau.ac.ir>

Phytoremediation of a fuel oil-contaminated soil using alfalfa and grass with *Pseudomonas putida* bacterium

***M. Khosravinodeh¹, A. Abbaspour², S.S. Ebrahimi³ and H.R. Asghari⁴**

¹M.Sc. Student, Dept. of Water and Soil, University of Technology, Shahrood, Iran,

²Assistant Prof., Dept. of Water and Soil, University of Technology, Shahrood, Iran,

³Assistant Prof., Dept. of Soil Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, ⁴Assistant Prof., Dept. of Agronomy, University of

Technology, Shahrood, Iran

Received: 05/27/2012; Accepted: 12/10/2012

Abstract

Pollution caused by crude oil and its derivatives is the most prevalent problem throughout the world, during its crude oil extraction, transport, refining and burning. Oil spills can have serious effects on human and other creatures. Therefore cleaning up environmental oil pollution is an alternative technique for physicochemical methods. The purpose of this study was to evaluate the biodegradation rate of fuel-oil contaminated soil by alfalfa (*Medicago sativa*) and grass (*Poa bulbosa*) along with *Pseudomonas putida* bacterium. Thus, alfalfa and grass seeds were planted in two density levels with and without *Pseudomonas putida* in pots containing fuel oil-contaminated soil under greenhouse condition. Soil samplings were done in germination, vegetative and reproductive stages of plant growth. Results obtained in this study showed that both alfalfa and grass plants decreased fuel oil in the contaminated soil. The treatment of bacteria and the plants with high density had a positive effect in reducing the amount of soil hydrocarbon contamination. However, this reduction was not significant compared to treatments without bacteria and plants with less density.

Keywords: Soil pollution, *Pseudomonas putida* bacteria, Phytoremediation, Fuel oil

* Corresponding Author; Email: m.khosravinodeh@gmail.com