دانشگاه گنبد کاووس
نشریه "حفاظت زیست بوم گیاهان"
دوره پنجم، شماره یازدهم، پاییز و زمستان ۹۶
http://pec.gonbad.ac.ir

بررسی نقش باکتری‌های باسیلوس مگاتریوم و باسیلوس سابتیلیس در افزایش گیاه پالایی گونه‌های *Agropyron cristatum* و *Achillea millefolium* در خاک‌های آلوده به مواد نفتی (مطالعه موردی: خاک‌های اطراف پالایشگاه تهران)

رضا کاوندی حبیب*[۱]، غلامعلی حشمتی[۲]، سیده سهیلا ابراهیمی[۳]

۱ دانشجوی دکتری گروه مرتعداری، دانشکده مرتع و آبخیزداری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان
۲ استاد گروه علوم مرتعداری، دانشکده مرتع و آبخیزداری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان
۳ استادیار گروه مهندسی علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۳/۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۶/۱۲

چکیده

در این مطالعه، اثر همزمان گونه‌های گیاهی و باکتری‌های تجزیه‌گر بر میزان حذف هیدروکربن‌های نفتی کل از خاک در طی فرایند گیاه پالایی در شرایط گلخانه مورد بررسی قرار گرفته است. به این منظور دو گیاه مرتعی *Agropyron cristatum* و *Achillea millefolium* به همراه تیمارهای بدون و با تلقیح باکتری‌های تجزیه‌گر *B. Megaterium* و *B. subtilis*، همراه با دو سطح آلودگی نفتی ۳/۵ و ۷ درصد وزنی، بکار برده شدند. در نهایت پایش تغییرات هیدروکربن‌های نفتی کل (TPHs) با و بدون تلقیح باکتری‌های تجزیه‌گر برای گونه‌های مرتعی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بهترین راندمان حذف TPHs برای گونه *Agropyron cristatum* در حضور تیمارهای باکتری باسیلوس مگاتریوم و باسیلوس سابتیلیس در سطح آلودگی ۳/۵ درصد به ترتیب ۷۲/۱۸ و ۶۴/۰۸ درصد مشاهده شد و در گونه *Achillea millefolium* به ترتیب ۶۰/۵۹ و ۵۸/۱۲ درصد بود. هم‌چنین درصد کاهش هدایت الکتریکی برای گونه *Agropyron cristatum* در پایان دوره رشد گیاهی در حضور تیمارهای باکتری باسیلوس سابتیلیس و باسیلوس مگاتریوم در غلظت ۳/۵ درصد آلودگی نفتی به ترتیب ۴۲/۳۷ و ۳۹/۲۷ درصد و در گونه *Achillea millefolium* به ترتیب ۳۳/۴۱ و ۳۱/۴۸ درصد مشاهده شد. بیشترین تغییرات pH در غلظت ۳/۵ درصد وزنی آلودگی نفتی و در حضور تیمار باکتری باسیلوس سابتیلیس برای گونه *Agropyron cristatum* به میزان۷/۲۵ درصد مشاهده شد. با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش می‌توان گفت دوگیاه *Agropyron cristatum* *Achillea millefolium* کشت شده در خاکهای آلوده هیدروکربنی، به آلودگی نفتی موجود در خاک مقاوم بوده و مقدار آلودگی نفتی موجود در خاک را کاهش دادند، البته عملکرد گیاه *Agropyron cristatum* در کاهش آلودگی نفتی خاک بهتر بوده است.

واژه‌های کلیدی: **گیاه پالایی، هیدروکربن نفتی کل (TPHs)، باسیلوس مگاتریوم، باسیلوس سابتیلیس، Agropyron cristatum، Achillea millefolium**

*نویسنده مسئول: r.kavandi65@gmail.com

مقدمه

آلودگی خاک و منابع آب زیرزمینی توسط آلاینـده‌هـای مختلـف از جملـه هیـدروکربورهـا و حلالهـای شیمیایی، اثرات منفی زیست محیطی متنـوعی بـه دنبـال دارد (ابراهیمـی و همکـاران، ۱۳۸۸). هـر سـاله عرصه‌های وسیعی در اطراف مراکز صنعتی از جمله مراکز پالایشگاهی در اثر گازهای تولیدی، نشت و پساب این مجموعه‌ها به انـواع آلاینـده‌هـایی آلـی آلـوده مـی‌شـوند. اگـر راهـی بـرای حـذف ایـن آلاینـده‌هـا از اکوسیستم‌های طبیعی پیدا نشود، در دراز مدت سلامت بشر به مخاطره خواهد افتـاد (Arjmandi et al., 2010). امروزه رشد روز افزون صنعت نفت و صنایع جانبی در ایـران هیـدروکربن‌هـای نفتـی را در ردیـف مهمترین آلاینده‌های محیطی قرار داده است. با شدت یافتن آلـودگی‌هـای زیسـت محیطـی طـی دو دهـه گذشته، کنترل، حذف یا کاهش این آلودگی‌ها با کمک فناوری‌های متنـوع در مرکـز توجـه محققـین قـرار گرفته است (Chaillan et al., 2004). امروزه از روش‌های متعددی جهت حـذف آلاینـده‌هـای حاصـل از نفت استفاده می‌شود. در این بین تجزیه زیستی توسط میکروارگانیسم‌ها، نقش اساسی در حذف مواد نفتـی از محیط زیست ایفا می‌کند (Diaz, 2008). تاکنون شمار متعددی از باکتری‌های تجزیه کننده مواد نفتـی جداسازی شده‌اند، ولی با این وجود تعداد کمی از آنها به نظر می‌رسد که در تجزیه زیستی نفت در محـیط-های طبیعی حائز اهمیت باشند. از مهم ترین باکتری‌های تجزیه کننده این مواد مـی‌تـوان بـه جـنس‌هـای سـودوموناس، اسـینتوباکتر، باسـیلوس، ویبریـو و مارینوبـاکتر اشـاره نمـود (Jain et al., 2010). در واقـع میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده ترکیبات نفتی ابتدا با تولید و ترشح بیوسورفاکتانت نفت خام را امولسیونه می‌نمایند که با این عمل نسبت سطح به حجم قطرات نفت بسیار افزایش می‌یابد و از این طریق دسترسـی سلول‌های باکتری را به ترکیبات نفت بیشتر کرده و کارایی آنها را در مصرف نفت بسـیار افـزایش مـی‌یابـد (Vyas and Dave, 2011). بنابراین باکتری‌هایی که قابلیـت معـدنی کـردن بـالا دارنـد عمـدتا ترکیبـات امولسیونه کننده قوی تولید کرده و توان بالایی در حذف ترکیبات هیدروکربنی نفت دارند (Ferhat et al., 2011). مطالعات نشان داده است که میکروارگانیسم‌های جداشده از محیط‌های طبیعی بیشترین سـازگاری را با محیط پیدا کرده‌اند. لذا بهترین گزینه استفاده از میکروارگانیسم‌های بومی به منظور استفاده در فرایند حذف زیستی لکه‌های نفتی در محیط‌های آلوده می‌باشد (Milić et al., 2009).

زیست پالایی شامل روش‌های بیولوژیکی و استفاده از میکروارگانیسم‌ها بـه ویـژه بـاکتری‌هـا در جهـت کاهش یا رفع آلودگی از محیط زیست می‌باشد و در میان سایر روش‌های اصـلاح خـاک بـازده خـوبی دارد (Alexander, 2000). میکروارگانیسم‌ها نیاز به شرایط مناسبی برای رشد و زنده ماندن خود دارند که ایـن فاکتورها شامل pH مناسب، دما، اکسیژن، شوری و عناصـر غـذایی مـی‌باشـد (پـاریش، ۲۰۰۵؛ اسـپارکس، ۲۰۰۳). علاوه بر این گیاه پالایی یا فن استفاده از گیاهان مقاوم برای پالایش و پاکسازی خاک‌های آلوده به ترکیبات مختلف آلاینده می‌باشد نیز در کنار تجزیه میکروبی توجه خاصی را به خود معطوف داشـته اسـت (Fiorenza et al., 2000).

یکی از اساسی‌ترین نقش گیاه در فرایند گیاه پالایی پدیده ریزوسفر می‌باشد، چرا که کیفیت خـاک نـه

تنها به خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن وابسته است، بلکه ارتباط نزدیکی با خصوصیات زیستی آن نیز دارد (Ebhin Masto et al., 2006). از اینرو، این منطقه مکانی است که اثرات متقابل بین خاک، گیاهان و ریزجانداران به وقوع می‌پیوندد و جوامع میکروبی آن از نظر کمی و کیفی با جوامع میکروبی خاک غیر ریزوسفری تفاوت بسیار زیادی دارد (Smits, 2005).

تا کنون مطالعات اندکی برای بررسی و درک کاربرد بالقوه گیاه پالایی گیاهان مرتعی و استفاده از باکتری‌های تجزیه‌گر در پاک‌سازی آلاینده‌هایی ارگانیک و غیر ارگانیک صورت پذیرفته است. بانشی و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه‌ای، پتانسیل گیاه پالایی فناترن و پیرن[۱] را توسط گیاهان مرتعی سورگوم و اسپرس (*Onobrychis sativa*) بررسی کرده و دریافتند که اسپرس و سورگوم هر دو در پالایش و پاک سازی پیرن و فناترن از خاک‌هایی آلوده به ترتیب تا ۲۲ و ۱۶ درصد نقش مهمی ایفا می‌کنند. لو و همکاران در سال۲۰۰۹، نیز اثر کشت نوعی گراس را در زیست پالایی خاک آلوده به نفت بررسی و گزارش دادند بعد از ۵ ماه غلظت آلاینده تا ۴۷ درصد در خاک حاوی گیاه و تا ۱۱ درصد در خاک فاقد گیاه کاهش نشان داد و جمعیت باکتری‌ها در ریزوسفر ۷۲ برابر بیشتر از خاک فاقد گیاه بود. رجایی و همکاران در سال ۱۳۹۱، زیست پالایی خاک آلوده به نفت خام با استفاده از روش‌های بیولوژیک و گیاه پالایی را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد بدون حضور گیاه تنها ۲/۴ درصد TPHs خاک تجزیه شده بود در حالی که در حضور گیاه این مقدار به ۳۴ درصد رسید. دوستکی و همکاران (۱۳۹۲) در مطالعه‌ای بر روی تأثیر میکروارگانیسم‌های بومی و غیر بومی بر تجزیه هیدروکربن‌های نفتی نتیجه گرفتند که باکتری‌ها به میزان ۳۵ درصد میزان آلاینده‌های نفتی را کاهش داده‌اند. لین و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند ترکیب PCP و مس، اثر آنتاگونیستی سمی بر رشد *Raphanus sativus* (تربچه) و *Lolium perenne* (چچم) دارد.

تاکنون مطالعه‌ای جامع بررسی همزمان اثر ترکیبی باکتری‌ها و گیاهان بومی مرتعی بخصوص در ایران، صورت نگرفته است. لازم به ذکر است یکی از مهمترین نقش‌های گیاهان مرتعی که کمتر مورد توجه قرار گرفته است، قابلیت پالایندگی آنها در محیط‌های آلوده است. این گیاهان به دلیل سیستم ریشه‌ای تکامل یافته، سازگاری با محیط و نوسانات بارندگی، زیتوده بالا و جوامع همزیست موجود در ریشه‌های آنها موفق‌تر از گیاهان وارداتی و زراعی عمل می‌کنند (Devinny et al., 2005). بدین منظور در این پژوهش، حذف هیدروکربن‌های نفتی کل و همچنین برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک آلوده به مواد نفتی، با گونه‌های مرتعی *Agropyron cristatum* و *Achillea millefolium* و تلفیق دو باکتری *B. megaterium* و *B.subtilis* در پایان دوره رشد رویشی گیاهی در شرایط پایلوت مورد بررسی قرار گرفت.

[۱] Phenatren and Piren

مواد و روش‌ها

نمونه برداری خاک

در این پژوهش، خاک آلوده به هیدروکربن‌های نفتی از محل رها سازی پس ماندها و ضایعات پالایشگاه تهران و خاک غیر آلوده از زمین‌های اطراف پالایشگاه برداشت شد. این خاک به گلخانه موسسه تحقیقات کشاورزی فنی و مهندسی کرج منتقل شد. بعد از خشک شدن خاک، از سرند ۱۰ میلی‌متری عبور داده شد تا بقایای ریشه‌های گیاهان و سنگ و سنگریزه از خاک تفکیک شود. سپس خاک کاملا آلوده و غیر آلوده به نسبت ۱ به ۱ (خاک کاملا آلوده: خاک غیر آلوده، تیمار خاک با آلودگی متوسط) و به نسبت ۱ به ۳ (خاک کاملا آلوده: خاک غیر آلوده، تیمار خاک با آلودگی کم) مخلوط شدند.

برای تهیه مایه تلقیح از جدایه باکتری Bacilus با قابلیت تجزیه کنندگی نفت خام استفاده گردید. باکتری‌های موثر مذکور از کلکسیون بخش گیاه‌پزشکی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان تهران تهیه گردید. طبق تحقیقات انجام شده، برای اینکه باکتری‌های تجزیه کننده بتوانند هیدروکربن‌های نفتی را تجزیه کنند باید حداقل تعداد آنها ۲×۱۰^{۸} در هر کیلوگرم خاک باشد. این مقدار برای شرایط اپتیمم تجزیه مواد نفتی است که در این حالت میزان آلودگی ۵ تا۱۰ درصد وزن خشک خاک می‌باشد (Thapa et al., 2012). از آن‌جایی که خاک مورد مطالعه در این تحقیق دردو سطح آلودگی حدود ۳/۵ و ۷ درصد وزنی مورد بررسی قرار گرفته است، مقدار باکتری مورد استفاده در هر دو سطح آلودگی همان مقدار اپتیمم (۲×۱۰^{۸}) در نظر گرفته شده است. سپس باکتری‌های مورد نظر در مخلوط با پرلیت به خاک افزوده شد. لازم به ذکر است باکتری‌های تجزیه‌گر دو هفته پیش از کشت گیاه به نمونه خاک‌های آلوده افزوده گردیدند.

عملیات گلخانه‌ای

بذر گونه‌های گیاهی مورد استفاده از موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور تهیه شد. کشت گلدانی گونه‌های مورد نظر در گلخانه موسسه تحقیقات کشاورزی فنی و مهندسی کرج انجام گرفت. گلخانه دارای شرایط استاندارد بوده و دمای محیط آن در روز **C**° ۵ ± ۲۵ و در شب **C**° ۵ ± ۱۷ بوده. سپس خاک تیمار شده با باکتری‌های مورد نظر به گلدان‌های آماده شده، اضافه شد. در ادامه بذرهای گونه‌های مورد نظر با توجه به ابعاد بذر در عمق مناسب در گلدان‌های با عمق ۲۰ سانتی متر و عمق ۱۸ سانتی متر کشت شد. آبیاری به طور منظم و در فواصل ۴ روز یک بار انجام گرفت. رطوبت در حد FC [۲] یا رطوبت مزرعه نگهداری شده است. در نهایت در پایان دوره رویش ازخاک هرگلدان یک نمونه جهت اندازه‌گیری خصوصیات فیزیکی و شیمایی خاک و آلاینده‌های آلی (هیدروکربن‌های نفتی) برداشت شد.

[۲] Filed Capacity

اندازه‌گیری‌های مربوط به خاک در آزمایشگاه

نمونه‌های خاک به آزمایشگاه خاکشناسی دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران منتقل و پس از هوا خشک شدن و عبور از الک ۲ میلیمتری، به طور یکنواخت مخلوط و برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک شامل قابلیت هدایت الکتریکی، pH، درصد ماده آلی (روش والکلی و بلک) و میزان TPHs (روش استاندارد EPA) اندازه‌گیری شدند.

pH: برای سنجش اسیدیته خاک، مقدار ۱ گرم از نمونه خاک برداشته و به آن ۵ میلی‌لیتر آب‌مقطر افزوده می شود، مخلوط به خوبی تکان داده و سپس برای مدتی بی‌حرکت گذاشته شد تا خاک آن رسوب کند، سپس محلول رویی برای تعیین مقدار pH درنظر گرفته شد (Holoshak, 2006).

هدایت الکتریکی: هدف از اندازه‌گیری هدایت‌الکتریکی عصاره اشباع، اندازه‌گیری املاح محلول در آن می‌باشد. مقدار عبور جریان الکتریکی نسبت مستقیم با مقدار یون‌های موجود در محیط دارد. بنابراین با عبور جریان الکتریکی از یک الکترولیت یا عصاره می‌توان به میزان املاح محلول در آن پی برد. بدین منظور ۲۰۰ یا ۳۰۰ گرم خاک کوبیده از نمونه با آب اشباع و پس از ۲۴ ساعت، عصاره توسط پمپ خلاء استخراج گردید. سپس هدایت الکتریکی عصاره اشباع توسط دستگاه هدایت سنج تعیین شد (Holoshak, 2006).

کربن آلی: برای اندازه گیری کربن آلی خاک از روش والکی بلاک (والکی و بلاک، ۱۹۳۴) استفاده شد.

اندازه‌گیری هیدروکربن‌های کل نفتی (TPH)

تعیین مقدار هیدروکربن‌های نفتی با روش استاندارد آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا (EPA) صورت پذیرفت. بدین صورت که ابتدا خاک را درون هاون کوبیده، یک گرم خاک خشک را وزن نموده، درون لوله‌های دربدار سانتریفیوژ ریخته، ۱۰ میلی لیتر محلول دی کلرومتان + استون اضافه نموده و لوله‌ها را به مدت ۴ دقیقه تکان داده و سپس آنها را به مدت ۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ نموده تا رسوبات ته نشین گردند. پس از سانتریفیوژ کردن یک میلی‌لیتر از مایع رویی برداشت گردید و به ویال منتقل گشت و به مدت ۴۸ ساعت رها شد. پس از ۴۸ ساعت وزن آنچه در ویال باقی مانده بود به عنوان TPH بر حسب میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک برآورد گردید (مینایی تهرانی و همکاران، ۲۰۰۶؛ هاتچینسون و همکاران، ۲۰۰۱؛ علیخانی و همکاران، ۱۳۹۰؛ ابراهیمی و همکاران، ۲۰۱۰). لازم به ذکر است برای افزایش دقت اندازه‌گیری TPH (از هر تیمار یک نمونه پس از استخراج محلول)، از دستگاه کروماتوگرافی گازی از نوع یونیزاسیون شعله ای مدل Agilent 7890A استفاده شد. شرایط GC به صورت زیر بود: دمای انژکتور: ۳۰۰ درجه سانتی گراد، دمای آغازین آون ۴۰ درجه به مدت دو دقیقه بود و سپس تا ۳۰۰ درجه به صورت ۱۰ درجه بر دقیقه افزایش یافت. دمای شناساگر ۳۰۰ درجه بود. هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت ۱ میلی لیتر بر دقیقه استفاده شد.

جهت بررسی و تجزیه و تحلیل آماری اطلاعات اندازه‌گیری شده از آزمون مقایسه میانگین چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد ($P<0.05$) در محیط نرم‌افزارهای SPSS و جهت رسم نمودارها

از نرم افزار Excel استفاده شد.

نتایج

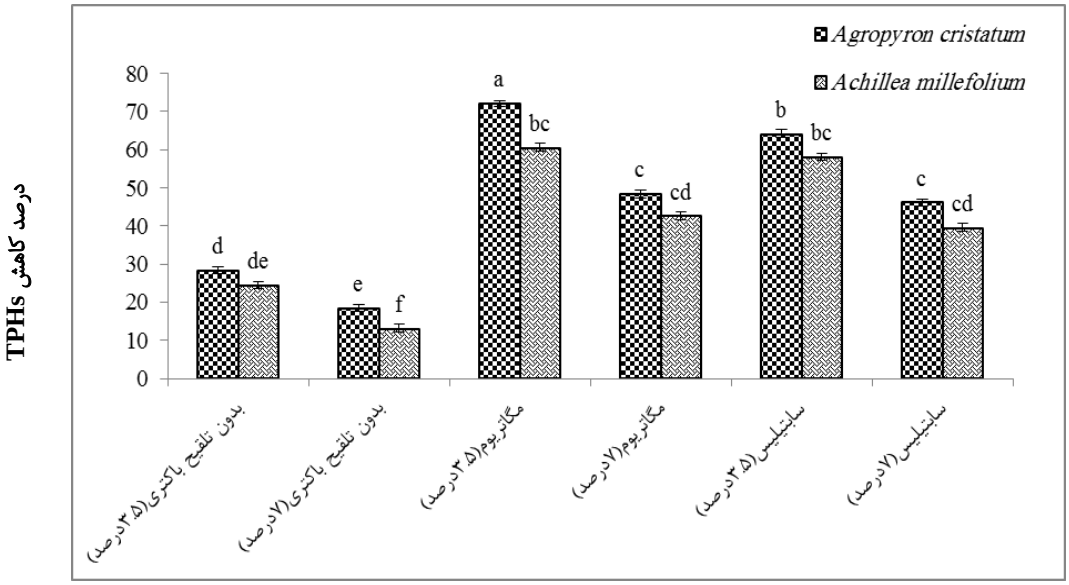
تغییرات TPHs طی فرایند گیاه پالایی

در این تحقیق میزان تغییرات حذفTPHs در تیمارهای باکتری تجزیه‌گر در دو غلظت آلودگی نفتی (۳/۵ و ۷ درصد وزنی) برای دوگونه مرتعی *Agropyron cristatum* و *Achillea millefolium* در پایان دوره رشد گیاهی بررسی شد. با توجه به جدول ۱، بهترین راندمان حذف TPHs برای هر دوگونه مورد مطالعه در پایان دوره رشد رویشی گیاهان، در تیمار باکتری باسیلوس مگاتریوم در غلظت ۳/۵ درصد آلودگی نفتی و کمترین راندمان حذفTPHs در تیمار بدون تلقیح باکتری در غلظت ۷ درصد آلودگی نفتی مشاهده شد. همچنین همانطور که ملاحظه می‌شود با افزایش سطح آلودگی از ۳/۵ به ۷ درصد وزنی، راندمان حذفTPHs در هر دو گونه مورد مطالعه کاهش یافت.

جدول۱- میزان تغییرات TPHs در تیمارهای باکتری تجزیه‌گردر حضور دو گونه *Agropyron cristatum* و *Achillea millefolium* در دو غلظت ۳/۵ و ۷ درصد وزنی آلودگی نفتی بر حسب mg/kg

گیاه	*Agropyron cristatum*		*Achillea millefolium*	
درصد آلودگی	۳/۵ درصد	۷ درصد	۳/۵ درصد	۷ درصد
TPH اولیه	۳۶۳۴۰	۷۱۱۵۲	۳۶۳۴۰	۷۱۱۵۲
بدون تلقیح باکتری	۲۶۰۱۳	۵۸۰۱۴	۲۷۴۳۱	۶۱۸۶۲
باکتری باسیلوس مگاتریوم	۱۰۱۰۷	۳۶۶۷۹	۱۴۳۲۱	۴۰۸۰۵
باکتری باسیلوس سابتیلیس	۱۳۰۵۱	۳۸۲۱۸	۱۵۲۱۷	۴۲۹۷۰

مقایسه میانگین‌های درصد کاهش TPHs برای گونه‌های مورد مطالعه نشان داد، بیشترین درصد کاهش آلودگی خاک در تیمار *گونه Agropyron cristatum* همراه با باکتری تجزیه‌گر *B. megaterium* در سطح آلودگی ۳/۵ درصد وزنی به میزان ۷۲/۱۸ درصد و کمترین درصد کاهش هیدروکربن‌های کل نفتی خاک در گونه *Achillea millefolium* و تیمار بدون تلقیح باکتری در سطح آلودگی۷ درصد وزنی به میزان ۱۳/۰۵ درصد مشاهده گردید (شکل۱). نتایج تحقیق حاضر حاکی از تاثیر بهتر *گونه Agropyron cristatum* در کاهش هیدروکربن‌های کل نفتی خاک نسبت به گونه *Achillea millefolium* در کلیه تیمارهای مورد بررسی بود.



شکل ۱- مقایسه میانگین درصد کاهش TPHs در تیمارهای باکتری تجزیه‌گردر سطح آلودگی ۳/۵ و ۷ درصد وزنی برای دو گونه مورد مطالعه، هر عددمیانگین ۴ تکرار می‌باشد و خطوط روی ستون‌ها خطای استاندارد (± SE) می‌باشد. تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند، در آزمون دانکن ($p\leq0.05$) دارای اختلاف معنی‌دار با یکدیگر هستند.

تغییرات pH طی فرایند گیاه پالایی

تغییرات pH خاک در طی فرایند گیاه پالایی در پایان دوره رشد گیاهان در غلظت ۳/۵ و ۷ درصد وزنی آلودگی نفتی مورد سنجش قرار گرفت. با توجه به جدول ۲ می‌توان مشاهده کرد که میزان pH در طی فرایند گیاه پالایی در تیمار بدون تلقیح باکتری افزایش داشته و در تیمارهای باکتری تجزیه‌گر کاهش یافته است. بیشترین تغییرات pH در حضور تیمارهای باکتری تجزیه‌گر بوده و بیشترین تغییرات در غلظت ۳/۵ درصد وزنی آلودگی نفتی و در تیمار باکتری باسیلوس سابتیلیس برای گونه *Agropyron cristatum* به میزان۷/۲۵ درصد بوده است.

جدول۲- میزان تغییرات pH در تیمارهای باکتری تجزیه‌گردر حضور دو گونه*Agropyron cristatum* و *Achillea millefolium* در دو غلظت ۳/۵ و ۷ درصد وزنی آلودگی نفتی

گیاه	*Agropyron cristatum*		*Achillea millefolium*	
درصد آلودگی	۳/۵ درصد	۷ درصد	۳/۵ درصد	۷ درصد
pH اولیه	۷/۵۸	۷/۰۶	۷/۵۸	۷/۰۶
بدون تلقیح باکتری	۷/۶۹	۷/۱۷	۷/۷۲	۷/۲۱
باکتری باسیلوس مگاتریوم	۷/۱۴	۶/۷۲	۷/۲۸	۶/۸۳
باکتری باسیلوس سابتیلیس	۷/۰۳	۶/۶۹	۷/۲۴	۶/۸۸

تغییرات شوری طی فرایند گیاه پالایی

میزان تغییرات شوری در پایان دوره رشد گیاهان مورد سنجش قرار گرفت. در طی فرایند گیاه پالایی میزان شوری کاهش داشته و این کاهش در تیمارهای تلقیح باکتری‌های تجزیه‌گر بیش‌تر از تیمار بدن تلقیح باکتری بوده است. با توجه به جدول ۳ می‌توان مشاهده نمود که بیشترین تغییرات شوری در حضور تیمارهای باکتری تجزیه‌گر و درغلظت ۳/۵ درصد برای هر دو گونه مورد مطالعه مشاهد شده است. همچنین در تیمار گیاه *Agropyron cristatum* همراه با باکتری تجزیه‌گر باسیلوس سابتیلیس بیشترین کاهش شوری خاک به میزان ۴۲/۳۷ درصد مشاهده گردید. لازم به ذکر است میزان کاهش شوری در غلظت ۳/۵ درصد آلودگی نفتی بیشتر از غلظت ۷ درصد آلودگی نفتی در کلیه تیمارها بوده است.

جدول۳- میزان تغییرات EC در تیمارهای باکتری تجزیه‌گردر حضور دو گونه *Agropyron cristatum* و *Achillea millefolium* در دو غلظت ۳/۵ و ۷ درصد وزنی آلودگی نفتی بر حسب دسی‌زیمنس بر متر

گیاه	*Agropyron cristatum*		*Achillea millefolium*	
درصد آلودگی	۳/۵ درصد	۷ درصد	۳/۵ درصد	۷ درصد
EC اولیه	۴/۱۳	۵/۱	۴/۱۳	۵/۱
بدون تلقیح باکتری	۳/۱۸	۴/۱۱	۳/۳۱	۴/۲۵
باکتری باسیلوس مگاتریوم	۲/۵۱	۳/۵۲	۲/۸۳	۳/۶۸
باکتری باسیلوس سابتیلیس	۲/۳۸	۳/۴۱	۲/۷۵	۳/۵۹

تغییرات درصد کربن آلی طی فرایند گیاه پالایی

در این تحقیق تغییرات درصد کربن آلی خاک در پایان دوره رشد گیاهان در غلظت ۳/۵ و ۷ درصد وزنی آلودگی نفتی مورد سنجش قرار گرفت. در طی فرایند گیاه پالایی میزان کربن آلی کاهش داشته و این کاهش در تیمارهای تلقیح باکتری‌های تجزیه‌گر بیش‌تر از تیمار بدون تلقیح باکتری بوده است. بنابراین تیمارهای باکتری تجزیه‌گر باعث کاهش کربن آلی خاک شده‌اند. با توجه به جدول ۴ می‌توان مشاهده نمود که بیشترین تغییرات کربن آلی خاک در تیمارهای باکتری تجزیه گر و درغلظت ۳/۵ در هر دو گونه مورد مطالعه مشاهد شده است.

جدول۴- میزان تغییرات درصد کربن آلی در تیمارهای باکتری تجزیه‌گردر حضور دو گونه *Agropyron cristatum* و *Achillea millefolium* در دو غلظت ۳/۵ و ۷ درصد وزنی آلودگی نفتی

گیاه	*Agropyron cristatum*		*Achillea millefolium*	
درصد آلودگی	۳/۵ درصد	۷ درصد	۳/۵ درصد	۷ درصد
درصد کربن آلی اولیه	۲/۲۱	۳/۴۴	۲/۲۱	۳/۴۴
بدون تلقیح باکتری	۱/۸۹	۳/۰۵	۲/۰۱	۳/۱۷
باکتری باسیلوس مگاتریوم	۱/۶۹	۲/۷۸	۱/۷۹	۲/۹۱
باکتری باسیلوس سابتیلس	۱/۷۳	۲/۸۴	۱/۸۲	۲/۹۶

بحث و نتیجه‌گیری

در این تحقیق توانایی دو گونه گیاهی*Agropyron cristatum* و *Achillea millefolium* به همراه دو باکتری تجزیه‌گر *B. megaterium* و *B. subtilis* در حذف آلودگی‌های نفتی و تغییرات ویژگی‌های فیزیکی و شیمایی خاک در دو غلظت ۳/۵ و ۷ درصد وزنی آلودگی نفتی مورد بررسی قرار گرفت. کارایی فرایند گیاه پالایی مانند اکثر فرایندهای بیولوژیکی به عوامل محیطی متعددی بستگی دارد که از مهمترین این عوامل می‌توان به مواد آلی، رطوبت، دما، ظرفیت تبادلی، نوع بافت خاک و pH اشاره کرد که بر کارایی گیاه پالایی تاثیر گذار هستند (Basumatary et al., ۲۰۱۲). در این مطالعه سعی شد حتی الامکان شرایط محیطی مانند نور، دما و رطوبت برای همه تیمارها یکسان حفظ شود.

نتایج نشان داد در حضور تیمارهای باکتری‌های تجزیه‌گر باسیلوس مگاتریوم و باسیلوس سابتیلیس، غلظت هیدروکربن‌های نفتی خاک نسبت به تیمار بدون تلقیح باکتری به‌طور معنی‌داری کمتر بود. از دلایل حذف بیشتر هیدروکربن نفتی کل در حضور تیمارهای باکتری تجزیه‌گر می‌توان گفت، اضافه شدن باکتری‌های تجزیه‌گر باعث افزایش حلالیت بخش غیر قابل دسترس آلاینده‌ها به واسطه ترشح بیوسورفکتانت‌ها و بالطبع آن باعث افزایش تجزیه هیدروکربن نفتی کل می‌شود.

در همین راستا داس و همکاران (۲۰۰۶)، بروجمانس و همکاران (۲۰۰۹)، تاهان و همکاران (۲۰۱۱)، چیکر و همکاران (۲۰۱۲) و اسدی‌راد و همکاران (۱۳۹۵) نیز اثر سویه‌های باسیلوس سابتیلیس[۳] ، باسیلوس مگاتریوم[۴] و سودموناس آئروژینوزا[۵] را در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی خاک مورد بررسی قرار دادند. نتایج این محققین با نتایج این تحقیق مبنی بر افزایش قابل توجه تجزیه هیدروکربن‌های نفتی خاک، در حضور باکتری‌های تجزیه‌گر همخوانی دارد.

نتایج نشان داد کاربرد تیمارهای باکتری‌های تجزیه‌گر باعث کاهش میزانpH خاک محیط کشت گونه-های گیاهی نسبت به تیمار بدون تلقیح باکتری شده است. میزانpH خاک بطور مستقیم یا غیرمستقیم

۳ *Bacilus subtilis*

۴ *Bacilus megaterium*

۵ *Pseudomonas aeroginosa*

رشد گیاه را تحت تاثیر قرار می‌دهد.مهم‌ترین نقشpH خاک کنترل حلالیت عناصر غذایی در خاکمی‌باشد. به عبارت دیگر قابلیت جذب عناصر غذایی وابستگی زیادی بهpH خاک دارد. عناصر غذایی در pH های مختلف، حلالیت‌های متفاوتی دارند. معمولاً با افزایشpH حلالیت عناصر غذایی به جز مولیبدن کاهش پیدا می‌کند. در این تحقیق باکتری‌های باسیلوس از طریق کاهش pH خاک توانسته به افزایش قابلیت جذب فسفر و عناصر کم مصرف کمک نماید و منجر به افزایش عملکرد رشد گیاهان شوند. همچنین از آنجا که فاکتور pH بر رشد و تجزیه زیستی نفت خام توسط باکتری‌ها مهم می‌باشد و رشد باکتری و تولید بیوسورفاکتانت[۶] منجر به اسیدی شدن محیط کشت می‌گردد، از این لحاظ بررسی و کنترل pH محیط کشت حائز اهمیت بسیار می‌باشد. نتایج این تحقیق با نتایج اله‌دادی وهمکاران (۱۳۹۰) مبنی بر کاهش میزانEC وpH خاک در پایان دوره رشد گیاهی همخوانی دارد.

نتایج تحقیق نشان داد طی فرایند گیاه پالایی میزان هدایت الکتریکی کاهش داشته و این کاهش در تیمارهای تلقیح باکتری‌های تجزیه‌گر بیش‌تر از تیمار بدون تلقیح باکتری بوده است. بنابراین می‌توان گفت جدایه‌های باکتری باسیلوس باعث کاهش EC خاک شده‌اند. باسیلوس سابتیلیس توسط بسیاری از محققان به عنوان باکتری مقاوم به شوری یاد شده است؛ سرچشمه پور و همکاران (۱۳۸۸) جدایه‌هایی از این گونه را جداسازی کردند که تا حد بالایی از شوری (۶۴ دسی‌زیمنس بر متر) توانایی رشد داشتند. این باکتری همچنین توسط بسیاری از محققان از جمله رای (۲۰۰۶) و تیلاک و همکاران (۲۰۰۵) به عنوان باکتری ریزوسفری محرک رشد گیاه به خصوص از نظر انحلال فسفات‌های نامحلول و نیز تولید سیدروفور شناخته شده است. وویتک و همکاران (۲۰۰۴) نیز از باسیلوی سابتیلس به عنوان باکتری مقاوم به شوری در خاک شور استفاده و مشاهد نمودند که در تیماری که دارای این باکتری بود رشد گیاه بیشتر شد.همچنین همانطور که در نتایج مشاهده می‌شود میزان کاهش EC در غلظت ۳/۵ درصد آلودگی نفتی بیشتر از غلظت ۷ درصد آلودگی نفتی در کلیه تیمارها بوده است. واردو براک (۱۹۷۸)، نیز طی تحقیقی تجزیه هیدروکربن‌ها را در شرایط شور مشاهده نموده و دریافتند که مینرالیزه شدن هیدروکربن‌ها با اضافه شدن نمک کاهش می‌یابد که این کاهش مربوط به کاهش سطح اکسیژن یا قابلیت دسترسی عناصر غذای توسط میکروارگانیسم‌های موجود بود که قادر بودند از نفت به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده کنند اما در پی شوری‌های خیلی زیاد تجزیه زیستی به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت و دریافتند که سرعت متابولیسم هیدروکربن‌ها با افزایش سطوح شوری کاهش می‌یابد. شیاریز (۱۹۸۹)، نیز در مطالعه اثر شوری روی تجزیه هیدروکربن‌ها نشان داد که بین شوری و سرعت معدنی شدن فنانترن و نفتالین رابطه مثبتی وجود دارد. در شوری‌های پایین مینرالیزه شدن این دو ترکیب افزایش می‌یابد. چندین مطالعه نیز روی اثر شوری بر تجزیه هیدروکربن‌ها نشان داده که در مقادیر شور پایین سرعت متالیزه شدن نفت افزایش می‌یابد، به طور معمول غلظت‌های بالای نمک از رشد باکتری‌ها و تجزیه هیدروکربن‌های نفتی جلوگیری می‌کند زیرا منجر به حذف آب از سلولهای باکتری می‌گردد و به این ترتیب مرگ سلول باکتری را منجر می‌شود (لهی و

[۶] Biosurfactant

کولول، ۱۹۹۰). نتایج نشان داد در طی فرایند گیاه پالایی میزان کربن آلی کاهش داشته و این کاهش در تیمارهای تلقیح باکتری‌های تجزیه‌گر بیش‌تر از تیمار بدن تلقیح باکتری بوده است. زیاد بودن مقدار کربن آلی در خاک به دلیل وجود هیدروکربن های نفتی در خاک است. با مقایسه داده های مربوط به کربن آلی با داده‌های مربوط به کل هیدروکربن‌های نفتی (TPHs)، این موضوع تایید می‌شود که بین مقدار کربن آلی و غلظت هیدروکربن‌های نفتی (که منبع قابل توجهی از کربن را شامل می شوند) رابطه مستقیم وجود دارد.

نتایج تحقیق حاضر حاکی از تاثیر بهتر گونه*Agropyron cristatum* در کاهش هیدروکربن‌های کل نفتی خاک نسبت به گونه*Achillea millefolium* دارد. در همین راستا موراتووا و همکاران (۲۰۱۲) طی پژوهشی نشان دادند، تعدادی از گرامینه‌های وحشی شامل لولیوم[۷] (۴۶ درصد)، آگروپیرون کریستاتوم (۴۵ درصد) و آگروپیروم تنروم[۸] (۴۴ درصد) به خوبی باعث پالایش و حذف آلاینده‌ها شدند، که با نتایج این تحقیق مبنی بر توانایی بالای گونه آگروپیرون کریستاتوم[۹] در کاهش هیدروکربن‌های نفتی خاک همخوانی دارد.به دلیل بیشتر بودن مقدار ریشه تولید شده نسبت به اندام هوایی و تولید سیستم ریشه فیبری وگسترده توسط گیاه آگروپایرون کریستاتوم، توانایی این گیاه در کاهش هیدروکربن‌های کل نفتی خاک بیشتر است.

به طور کلی نتایج به دست آمده در این پژوهش نشان داد که دوگیاه *Agropyron cristatum* و*Achillea millefolium* کشت شده در خاکهای آلوده به هیدروکربن‌های نفتی، به آلودگی نفتی موجود در خاک مقاوم بوده و مقدار آلودگی نفتی موجود در خاک را کاهش دادند، البته عملکرد گیاه *Agropyron cristatum* در کاهش آلودگی نفتی خاک بهتر بوده است. بنابراین نتایج حاصل از این مطالعه تایید کننده اثر مثبت گیاه در حذف هیدروکربن‌های نفتی است. همچنین در حضور تیمارهای باکتری تجزیه‌گر باسیلوس غلظت هیدروکربن‌های نفتی خاک نسبت به تیمار بدن تلقیح باکتری به‌طور معنی‌داری کمتر بود. بنظر می‌رسد دو باکتری غیربومی با در نظر گرفتن شرایط محیطی و امکان سنجی دقیق، بتواند برای زیست افزایی و پاکسازی محیط‌های آلوده به ویژه خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی استفاده شوند. همچنین توصیه می‌گردد استفاده از این گیاهان بیش اندوز مرتعی همراه با باکتری‌های غیر بومی موثر پرکاربرد، در جهت پاکسازی آلودگی‌های نفتی مورد پایش و بررسی دقیق قرار گرفته و کاربرد آنها مورد توجه قرار گیرد.

منابع

احمدی، س.، گیتی پور، س.، صدیقیان، س. ۱۳۹۱. آلودگی خاک محوطه پالایشگاه تهران به فلزات سنگین کروم و کادمیوم و بررسی روش‌های پاک سازی این فلزات از خاک محوطه پالایشگاه تهران. تهران، مجموعه مقالات

۷ *Lolium*
۸ *Agropyron tenerum*
۹ *Agropyron cristatum*

دومین کنفرانس برنامه ریزی و مدیریت محیط زیست، ۱-۱۴.

اسدی‌راد، م.، مظاهری، م.، راشدی، ح.، نژادستاری، ط. ۱۳۹۵. جداسازی و شناسایی فیلوژنتیکی باکتری های بومی نفت خوار از خاک منطقه کارون اهواز. مجله دنیای میکروب ها، ۳(۲۸): ۲۴۶-۲۳۴.

پارسادوست، ف.، بحرینی نژاد، ب.، صفری سنجانی، ع.، کابلی، م.ه. ۱۳۸۶.گیاه پالایی عنصر سرب توسط گیاهان مرتعی و بومی در خاک‌هایی آلوده منطقه ایران کوه (اصفهان)، مجله پژوهش و سازندگی در منابع طبیعی، ۷۵(۲): ۵۴-۶۳.

دوستکی، م.، ابراهیمی، س.، موحدی نائینی، س.ع.، علمائی، م. ۱۳۹۲. بهینه سازی شرایط تجزیه زیستی هیدروکربنهای نفتی به وسیله میکرواورگانیسمهای بومی و غیربومی. نشریه پژوهشهای حفاظت آب و خاک جلد بیستم، شماره چهارم، ۴ (۲۰): ۱۶۵ – ۱۸۲.

رجایی، س.، رئیسی، ف.، سیدی، س.م. ۱۳۹۱. زیست پالایی خاک آلوده به نفت خام مسن به روش‌های افزایش بیولوژیک و گیاه پالایی. نشریه آب وخاک، ۴ (۲۶): ۹۰۸ -۹۲۱.

عسگری، م.، نوری، م.، بیگی، ف.، امینی، ف. ۱۳۹۰. ارزیابی گیاه پالایی اقاقیا در خاک‌هایی آلوده به نفت خام با تاکید بر برخی فلزات سنگین، مجله سلول و بافت، ۲ (۴): ۴۳۵-۴۴۲.

Alexander, M. 2000. Aging bioavailability and overestimation of risk from environmental pollutants. Appl. Environ. Microbial. 34: 4259-4265.

Arjmandi, R., Nouri, J., Khezri, S., Mohammadi, M. 2010. Managment of environmental treatment of acid Sludge of second refinement of waste used lubrication oil (case study: Bouin zahra–fath abad dictrict). Master thesis. Environment and Energy, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, 44(2): 22-31.

Baneshi, M., Kalantari, R., Jafari, A., Nasseri, S., Esrafili, A. 2014. Effect of bioaugmentation to enhance phytoremediation for removal of phenanthrene and pyrene from soil with *Sorgum* and *Onobrychis sativa*, Baneshiet al. Journal of Environmental Health Sciences & Engineering, 12:24-30.

Basumatary, B., saikia, R., Bordoloi, S., Prasad, H., Sarma, H. 2012. Assessment of potential plant species for phytoremediation of hydrocarbon-contaminated areas of upper Assam, India. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 87(9): 1329-1334.

Brooijmans, R.W., Pastink, M.I., Siezen, R.J. 2009. Hydrocarbon-degrading bacteria: the oil-spill clean-up crew. Micro Biotech, 2(6):587–594.

Chaillan, F., Fleche, A.L., Bury, E., Phantavong, Y., Grimont, P., Saliot, A., Oudot, J. 2004. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms, Research in Microbiology, 155:121-124.

Chikere, C.B., Okpokwasili, G.C. 2012. Bioreactor-based bioremediation of hydrocarbon-polluted Niger Delta marine sediment, Nigeria. Biotech, 2:53–66.

Das, K., Mukherjee, A.K. 2007. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of Bacillus subtilis and Pseudomonas aeruginosa strains isolated from apetroleum-oil contaminated soil from north-east India Bioresource Technology. 98(7): 1339-45.

Devinny, J., Longcore, T., Bina, A., Kitts, Ch., Osborne, K. 2005. Phytoremediation

with Native Plants. The Zumberge Fund for Innovation. P. 415-459.

Diaz, E. 2008. Microbial Biodegradation: Genomics and Molecular Biology. 1st Ed. Uk: Casier academic, pp: 402.

Ebhin Masto, R., Chhonkar, P.K., Singh, D., Patra, A.K. 2006. Changes in soil biological and biochemical characteristics in a long-term field trial on a sub-tropical inceptisoil. Soil Biology and Biochemistry 38:1577-1582.

Ebrahimi, S. 2009. Spatial-temporal variability of hydrocarbon pollutants and chemical solvents behavior in soil porous media. Ph.D. Thesis. Tarbiat Modares University, 150p.

Ebrahimi, S., Shayegan, J., Malakouti, M.J., Akbari, A. 2011. Environmental evaluation and assessment of some important factors of oil contamination in soil around sarkhoun gas refinery of Bandar Abbas. J. Environ. Stud. 57: 9-18.

Ebrahimi, S., Shayegan, J., Malakouti, M.J., Akbari, A., Atashjameh, A. 2010. Hydrocarbon pollution emission in soil around sarkoun refinery. J. Water Soil Cons. 4: 101-124.

Ferhat, S., Mnif, S., Badis, A., Eddouaouda, K., Alouaoui, R., Boucherit, A., Mhiri, N., Moulai-Mostefa, N. 2011. Sayadi, Screening and preliminary characterization of biosurfactants produced by Ochrobactrum sp. 1C and Brevibacterium sp. 7G isolated from hydrocarbon-contaminated soils. Int. Biodet. Biodeg, 65(8): 1182-1188.

Fiorenza, S., Oubre, C., Ward, C.H. 2000. Phytoremediation of Hydrocarbon-Contaminated Soil. Boca Raton, Lewis Publishers.

Jain, P.K., Gupta, V.K., Gaur, R.K., Lowry, M., Jaroli, D.P., Chauhan, U.K. 2011. Bioremediation of petroleum oil contaminated soil and water. Res. J. Environ. Toxicol, 5(6): 1-26.

Kambhampati, M., Vu, V. 2013. EDTA enhanced phytoremediation of Cu contaminated soils using chickpea (Cicer aeritinum L.). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 91: 310-313.

Lin, Q., Wang, Z., Ma, S., Chen, Y. 2006. Evaluation of dissipation mechanisms by Lolium perenne L, and Raphanus sativus for pentachlorophenol (PCP) in copper co-contaminated soil. Science of the Total environment, 368: 814-822.

Lu, M., Zhang, Z., Sun, S., Wei, X., Wang, Q., Su, Y. 2009. The use of goosegrass (Eleusine indica) to remediate soil contaminated with petroleum. Water, Air and Soil Pollution, 209:181-189.

Milić, J.S., Beškoski, V.P., Ilić, M., Gojgićcvijović, G.D., Vrvić, M. 2009. Bioremediation of soil heavily contaminated with crude oil and its products: composition of the microbial consortium. J. Serb. Chem. Soc, 74 (4):455–460.

Muratova, A.Y., Golubev, S.N., Dubrovskaya, E.V., Pozdnyakova, N.N., Panchenko, L.V., Pleshakova, E.V., Turkovskaya, V. 2012. Remediating abilities of different plant species grown in diesel-fuel-contaminated leached chernozem. Applied Soil Ecology, 56, 51-57.

Parrish, Z.D., Banks, M.K., Schwab, A.P. 2005. Assessment of andaminantl ability during Phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon impacted soil, J. Environ. Poll. 137: 187-197.

Smits, P.E. 2005. Phytoremediation. Annual Reviews, Plant Biology, 56:15–39.

Sparks, D.L. 2003. Environmental Soil Chemistry. 2ed Academic Press. California. USA, 352p.

Susarla, S., Medina, V.F., McCutchon, S.C. 2002. Phytoremediation: an ecological solution to organic chemical contamination, Ecological engineering 18: 647–658.

Tahhan,R.A., Ammari, T.G., Goussous, S.J., Shdaifat, H.I. 2011. Enhancing the biodegradation of total petroleum hydrocarbons in oily sludge by a modified bioaugmentation strategy. International Biodeterioration and Biodegradation, 65(1):130-34.

Thapa, B., Kumar, A., Ghimire, A. 2012. A review on biormediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil. J. Nepjol. 8: 164-170.

Vyas, T.K., Dave, B.P. 2011. Production of biosurfactant by Nocardia otitidiscaviarum and its role in biodegradation of crude oil. Int. J. Environ. Sci. Tech, 8(2): 425-432.