

## مقایسه تاثیر مواد مغذی و شوری بر حذف فناترین از خاک آلوده

معصومه روانی پور<sup>۱</sup>، روشنگ رضایی کلانتری<sup>۲</sup>، مهدی فرزاد کیا<sup>۳</sup>، سمیره هاشمی نجف آبادی<sup>۴</sup>، علی اسرافیلی<sup>۵</sup>

نویسنده مسئول: تهران، میدان آرژانتین، خیابان الوند، دانشگاه علوم پزشکی تهران (پردیس الوند)، دانشکده بهداشت، گروه بهداشت محیط [r-rezaei@tums.ac.ir](mailto:r-rezaei@tums.ac.ir)

پذیرش: ۹۰/۰۴/۲۱

دریافت: ۹۰/۰۱/۲۴

### چکیده

**زمینه و هدف:** قابلیت دسترسی ضعیف میکروارگانیسم‌ها به PAH ها در خاک سرعت فرایند اصلاح زیستی را به عنوان یک روش موثر برای حذف آلودگی از خاک محدود می‌سازد. عوامل فیزیکیوشیمیایی متعددی بر این فرایند موثرند. در این مطالعه تاثیر مواد مغذی و شوری بر حذف فناترین از خاک آلوده بررسی شد.

**روش بررسی:** خاکی عاری از آلودگی‌های شیمیایی و میکروبی را به طور مصنوعی به فناترین آلوده نموده سپس محلول مواد مغذی و شوری در دو غلظت همراه با مخلوط میکروبی به آن اضافه شد تا نسبت ۱۰٪ وزنی حجمی حاصل گردد. نهایتاً غلظت فناترین باقی مانده در خاک پس از استخراج با اولتراسونیک توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی مورد سنجش قرار گرفت. جمعیت میکروبی نیز با روش MPN سنجش شدند. این مطالعه بر اساس طراحی آزمایش فاکتوریل کامل دو سطحی انجام شد.

**یافته‌ها:** نتایج آزمون MPN نشان داد که روند رشد میکروبی دارای تاخیر بوده است. طراحی آزمایش فاکتوریل کامل نشان داد مواد مغذی بیشترین تاثیر بر فرایند اصلاح داشته و راندمان حذف فناترین از خاک در محلول مواد مغذی حداکثر - شوری حداقل بیشترین مقدار و برابر ۷۵/۱۴٪ به دست آمد.

**نتیجه‌گیری:** این مطالعه نشان داد که با افزایش غلظت مواد مغذی میکروارگانیسم‌ها قادرند مقدار بیشتری از آلاینده نفتی فناترین را از خاک حذف نمایند، اما شوری در محدوده غلظت به کار رفته تنها موجب تاخیر در رشد میکروارگانیسم‌ها شده و اثر ممانعت‌کنندگی و یا پیشرفت بر حذف فناترین نداشته است.

**واژگان کلیدی:** هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای، طراحی آزمایش، اصلاح زیستی خاک، مواد مغذی، شوری

- ۱- کارشناس ارشد بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر
- ۲- دکترای عمران محیط زیست، دانشیار دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۳- دکترای بهداشت محیط، دانشیار دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۴- دکترای شیمی بیوتکنولوژی، استادیار دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس
- ۵- دکترای شیمی تجزیه، استادیار دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

## مقدمه

نفت خام، مایعی تصفیه نشده حاوی کربن و هیدروژن در اشکال آلکانها (هیدروکربنهای اشباع شده)، آلکنها و الکنها (هیدروکربنهای غیر اشباع شده) و هیدروکربنهای آروماتیک است. تخمین زده می شود سالانه بیش از ۱۰-۵ میلیون تن نفت به اقیانوسها وارد می شود (۱). هیدروکربنهای آروماتیک چند حلقه ای Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) از دو یا چند حلقه بنزنی تشکیل شده (۲ و ۳) و جزو آلاینده های گسترده زیست محیطی اند که به دنبال فرایند احتراق ناقص سوخت های فسیلی، دود سیگار، دود خروجی از آگزوز موتورهای دیزلی، آلودگی نفتی و فرایندهای صنعتی به وجود می آیند (۲-۶). حضور PAHs در منابع اصلی اکوسیستم شامل گیاهان، هوا، آب، غذا و خاک مکررا تایید شده است (۷) و انسان در معرض خطر این گونه خاک های آلوده از طریق تماس پوستی، هضم، تنفس گرد و غبار و بخارات ناشی از آنها و خوردن غذاها و سبزیجاتی است که در خاک این مناطق رشد یافته یا آلوده شده اند (۸). فنانترین یک ترکیب سه حلقه ای از دسته PAHs است (۹). مناطقی که اصولا با غلظت های بالایی از PAHs آلوده می شوند، مرتبط با فعالیت های صنعتی هستند (۲ و ۱۲-۱۰). افزایش در اندازه مولکولی PAHs، حلالیت و قابلیت دسترسی زیستی و نهایتا قابلیت تجزیه زیستی آنها را کاهش می دهد (۲، ۵، ۱۰، ۱۲ و ۱۳). ترکیبات PAH هم چنین تمایل به جذب شدن به ذرات خاک را دارند، بنابراین منجر به محدود شدن بیشتر دسترس پذیری زیستی شان در خاک می گردد (۲، ۴، ۱۴ و ۱۵). کاربرد روش های معمول حرارتی، شیمیایی - فیزیکی و ... جهت پاک سازی این نوع آلاینده ها خصوصا در خاک که یک محیط جامد معدنی متخلخل است، به دلایل گوناگون، نظیر پایین بودن حلالیت، غیر قطبی بودن و آبگریز بودن همواره با مشکلاتی مواجه بوده است (۱۶).

فرایند اصلاح زیستی (Bioremediation) گزینه ای است که امکان تخریب آلاینده های سمی را با استفاده از فعالیت بیولوژیکی بررسی می کند (۱۷). این فرایند سالم، موثر، دوست دار اکوسیستم و اقتصادی بوده و به منظور حذف آلاینده ها از خاک، از میکروارگانیسم های زنده برای کاهش آلاینده های

آلی و در نتیجه پاک سازی محیط استفاده می کند (۳، ۵، ۹، ۱۹-۱۶). برای کاهش محدودیت های موجود و افزایش سرعت فرایند اصلاح زیستی خاک های آلوده به PAHs و افزایش بازدهی حذف آلاینده ها استراتژی هایی به وجود آمده است که دست کاری نمودن محیط زیست با افزودن نوترینت ها، توسعه شرایط هوازی و آماده سازی میکروبها با مواد تلقیح شده و افزایش حلالیت PAHs نمونه هایی از آنست (۳ و ۹).

یکی از مهم ترین فاکتورهای موثر بر سرعت تجزیه بیولوژیکی، مواد مغذی اند (۱۸). افزایش مواد مغذی به عنوان روش قابل توجهی برای اصلاح زیستی و افزایش تجزیه هیدروکربن ها مورد توجه قرار دارد (۲۰). مواد مغذی مواد شیمیایی هستند که برای رشد میکروبی لازمند. مهم ترین مواد مغذی مورد نیاز نیتروژن (N) (به صورت آمونیاک) و فسفر (P) (به صورت ارتو فسفات) بوده که اغلب در محل های اصلاح زیستی کمبود آنها وجود دارد (۲۵-۲۱). مقادیر پیشنهادی مواد مغذی توسط Alvarez (۲۰۰۶) در نسبت C:N:P= 120:10:1 بوده است (۱۹). نیتروژن برای رشد سلولی (به صورت  $NH_4^+$  یا  $NO_3^-$ ) و به عنوان یک الکترون گیرنده (به صورت  $NO_3^-$ ) عمل می کند. فسفر نیز دومین ماده مغذی معمول مورد استفاده است و در رشد سلولی میکروارگانیسم شرکت دارد (۲۲ و ۲۶). هنگامی که خاکی به میزان قابل توجهی آلوده شود مقدار N و P طبیعی خاک نمی تواند به سرعت بیومس کافی برای تجزیه بیولوژیکی آلاینده ها را ایجاد کند و نیاز به مقادیر نسبتا زیادی مواد مغذی نیتروژنه دارد اما، حتی اصلاح مواد مغذی خاک نیز ممکن است به دلیل وجود برخی فاکتورهای محدود کننده بی تاثیر باشد (۱۳ و ۲۲). عامل دیگر تاثیرگذار بر کارایی اصلاح زیستی میزان شوری خاک به مقداری است که موثر بر رشد میکروارگانیسم های تجزیه کننده PAHs باشد. میکروارگانیسم های معمول تجزیه کننده هیدروکربن ها در محیط های شور شامل سودوموناس، آسیتو باکتر، نوکاردیا، ویبریو و آکروموباکتر هستند (۱). مطالعات بسیاری تاثیر شوری را به تنهایی یا در کنار سایر فاکتورهای موثر بر فرایند اصلاح زیستی در محیط زیست آبی دریاها، رسوبات سواحل اقیانوس ها و دریاها و ... مورد بررسی قرار داده اند (۶، ۲۹-۲۹).

در مرحله بعد مخلوط میکروبی شامل باکتری‌های باسیلوس لیچینی فرمیس، باسیلوس، SP، استافیلوکوکوس گزیلوس، اسپیتوباکتریومانی و کپنوسیتوفوگا اوکرا که توانایی تجزیه فنانتترین را داشته و در تحقیق جداگانه‌ای از بافت خاک آلوده به ترکیبات نفتی، از منطقه اطراف پالایشگاه تهران جداسازی شده بودند (۳۱) بر روی محیط کشت آگار تکثیر یافته و به عنوان تجزیه‌کننده آلاینده فنانتترین با دانسیته اپتیکی معادل یک (OD=1) در طول موج ۶۳۰ nm به هر یک از محلول‌های تهیه شده اضافه شد (۳۲). سپس هر محلول مطابق با جدول ۳ به خاک اضافه شدند. در این حالت فاز جامد خاک به فاز دوغابی تبدیل می‌گردد. برای خوانش دانسیته اپتیکی از دستگاه اسپکتروفتومتر CECIL UV/VIS مدل 7100 استفاده گردید. در این مطالعه دمای محیط آزمایشگاه که دامنه تغییرات آن محدود بوده است (۲۲±۳)، به عنوان دمای آزمایش برای خاک در نظر گرفته شد. همچنین کلیه راکتورها به منظور هوادهی بر روی دستگاه شیکر Heidolph مدل ProMAX 2020 با سرعت ۱۵۰ rpm در دمای محیط قرار گرفتند. آزمون میکروبی (MPN) (Most Probable Numer) (روش ۹ لوله‌ای) با فواصل زمانی تعریف شده برای کلیه نمونه‌ها انجام گردید؛ محیط کشت مورد استفاده نوترینت برات بوده و برای سنجش باکتریایی از غلظت‌های سریالی تا رقت  $10^{-10}$  استفاده گردید و بعد از ۴۸ h گرماگذاری نتایج بر اساس جدول استاتیکی تخمین زده شد (۳۳).

### طراحی آزمایش

برای تعیین کارایی اصلاح زیستی خاک آلوده شده به فنانتترین در راکتور زیستی از طریق فرایند هوازی، طرح آماری فاکتوریل دو سطحی با دو فاکتور مواد مغذی و شوری مورد استفاده قرار گرفت. یک آزمون فاکتوریل کامل شامل  $2^k$  آزمایش است که K برابر است با تعداد فاکتورها؛ در این تحقیق هر کدام از فاکتورها در دو سطح بودند. بر این اساس فاکتورها عبارتند از: الف) مواد مغذی: سطح حداقل (min) (۳۴) و سطح حداکثر (max) (۳۲) و ب) شوری: سطح حداقل آن برابر صفر و سطح حداکثر آن برابر ۲٪ وزنی به حجمی (۳۵). جهت اطمینان از روند رشد میکروبی در نمونه‌های اصلی، به ازای هر نمونه اصلی نمونه‌هایی به عنوان شاهد میکروبی

(۲۷). برای مثال در مطالعه Chen و همکاران (۲۰۰۸) پس از بررسی تاثیر ۵ فاکتور شوری، دما، نسبت C/N، میزان غلظت فنانتترین و میزان تلقیح میکروبی در ۴ سطح برای هر فاکتور، غلظت ۱/۵٪ شوری فاکتور مهمی محسوب شد (۳). شوری اثر ترکیبی خاصی بر حلالیت دارد. Chaudhry (۱۹۹۴) نشان داد با افزایش شوری حلالیت فنانتترین، آنتراسین، ۲ متیل آنتراسین و بنزوآپیرین کاهش یافت اما حلالیت بنزوآنتراسین افزایش نشان داد (۶). با توجه به اثرات متفاوتی که مواد مغذی و شوری می‌توانند بر فرایند اصلاح زیستی داشته باشند این مطالعه به بررسی تاثیر افزودن مواد مغذی و شوری بر حذف فنانتترین از خاک آلوده می‌پردازد.

### مواد و روش‌ها

#### مواد شیمیایی

فنانتترین با درجه خلوص بالا (۹۸٪)، استون HPLC grade از شرکت ROMIL، نوترینت برات و  $R_2A$  آگار از شرکت BIOMARK، نمک‌های محیط کشت معدنی و NaCl از شرکت Merck تهیه شدند.

#### آماده‌سازی خاک

خاک معمولی از ارتفاع ۲۰-۵ cm بالایی سطح زمین در تهران برداشته شد، سپس در معرض هوا خشک گردیده و از الک ۲ mm برای حذف سنگ‌ها عبور داده شد. به منظور عاری بودن از مواد آلی آن را با استون شسته و این عمل طی سه مرحله تکرار انجام گرفت. ۲ g از خاک آماده شده در شیشه‌هایی به رنگ تیره که به عنوان یک راکتور زیستی ناپیوسته آزمایش (Batch reactor) عمل می‌کند ریخته و در اتوکلاو (دمای  $121^{\circ}C$  در زمان ۱۵ min) استریل شد. سپس خاک درون راکتور به طور مصنوعی به فنانتترین آلوده شد به طوری که غلظت فنانتترین در خاک به ۵۰۰ mg/Kg خاک رسید (۳۰).

آماده‌سازی محلول مواد مغذی و تلقیح تجزیه‌کننده فنانتترین محلول‌ها در دو غلظت از دو متغیر مواد مغذی و شوری مطابق با جدول ۳-۱ تهیه شدند. pH محلول‌های تهیه شده، با استفاده از pH سنج مدل HACH 40d، pH در محدوده خنثی که مناسب رشد میکروب‌های هتروتروف است، تنظیم گردید.

جدول ۱: خصوصیات محلول مواد مغذی مصرفی بر اساس ماکرو و میکرو نوترینت و عناصر جزئی آن (۳۲)

محلول ماده مغذی	محلول ماده مغذی (max)	محلول ماده مغذی (min)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	۸۰۰	۰/۱۳۲
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	۲۰۰	۰/۱۰۳
KNO <sub>3</sub>	۱۰۰۰	۱/۷
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	۲۰۰	۲۰۰
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	۱۰۰	۱۰۰
NaCl	۱۰۰	۱۰۰
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	۱۰	۱۰
Trace elements	۱mL	۱mL

جدول ۲: خصوصیات عناصر جزئی محلول ماده مغذی مصرفی (۳۲)

Trace Elements	mg/L
EDTA-Sodium Salt	۵۰۰
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	۱۰
FeSO <sub>3</sub> .7H <sub>2</sub> O	۲۰۰
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	۳
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	۳۰
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	۲۰
CuSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	۱۰
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	۶
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	۳

و Excel برای طراحی و آنالیز نمونه‌ها استفاده شد و داده‌ها با استفاده از آزمون آماری آنالیز واریانس (ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

#### سنجش فنانتترین حذف شده

به منظور تعیین غلظت آلاینده باقی‌مانده در خاک با استفاده از حلال استون و به وسیله دستگاه اولتراسونیک مدل

که حاوی میکروپ و خاک بدون فنانتترین و مواد مغذی و شوری است و نیز نمونه‌هایی به عنوان شاهد شیمیایی که تنها حاوی خاک آغشته به فنانتترین و مواد مغذی و شوری بود، در نظر گرفته شدند (جدول ۳). کلیه نتایج آزمون از میانگین نتایج ۳ بار تکرار محاسبه گردید و اعداد با اطمینان ۹۵٪ ( $P < 0.05$ ) گزارش شدند. در این تحقیق از نرم‌افزار Design-Expert V.7

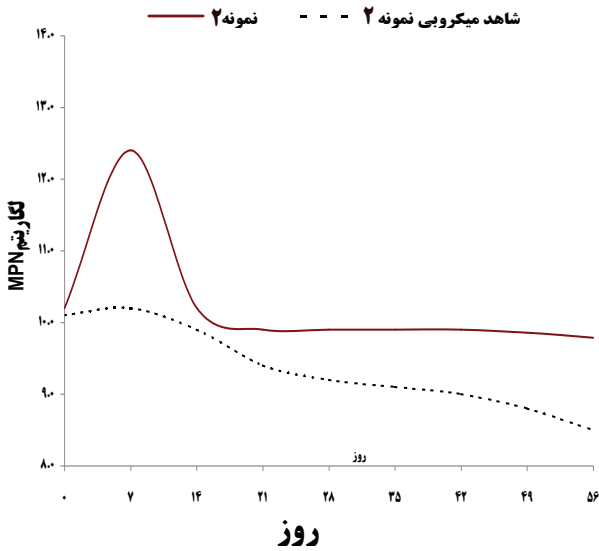
جدول ۳: وضعیت نمونه‌های اصلی و شاهد‌های میکروبی و شیمیایی آنها\*

آزمایش	مواد مغذی (Nu.)	شوری (Sal.)	مخلوط میکروبی	فنانتترین
نمونه ۱	+۱	+۱	+	+
نمونه ۲	+۱	-۱	+	+
نمونه ۳	-۱	+۱	+	+
نمونه ۴	-۱	-۱	+	+
شاهد شیمیایی نمونه ۱	+۱	+۱	-	+
شاهد شیمیایی نمونه ۲	+۱	-۱	-	+
شاهد شیمیایی نمونه ۳	-۱	+۱	-	+
شاهد شیمیایی نمونه ۴	-۱	-۱	-	+
شاهد میکروبی نمونه ۱	+۱	+۱	+	-
شاهد میکروبی نمونه ۲	+۱	-۱	+	-
شاهد میکروبی نمونه ۳	-۱	+۱	+	-
شاهد میکروبی نمونه ۴	-۱	-۱	+	-

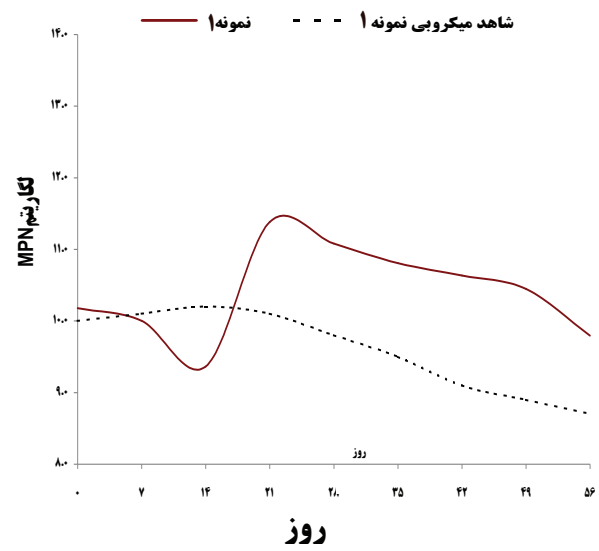
\* سطح حداکثر فاکتورها (+۱)، سطح حداقل فاکتورها (-۱)، حضور یک فاکتور (+) و عدم حضور آن (-) هستند.

برنامه دمایی GC به صورت: زمان اولیه ۱ min در ۱۰۰°C و سپس با افزایش دما و با سرعت ۱۰ °C /min تا دمای ۲۵۰ °C یعنی دمای نهایی ستون و دمای انژکتور ۲۵۰ °C و دمای دتکتور ۲۷۰ °C تنظیم گردید. کلیه مراحل آزمایش در آزمایشگاه پایلوت دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران صورت پذیرفته است.

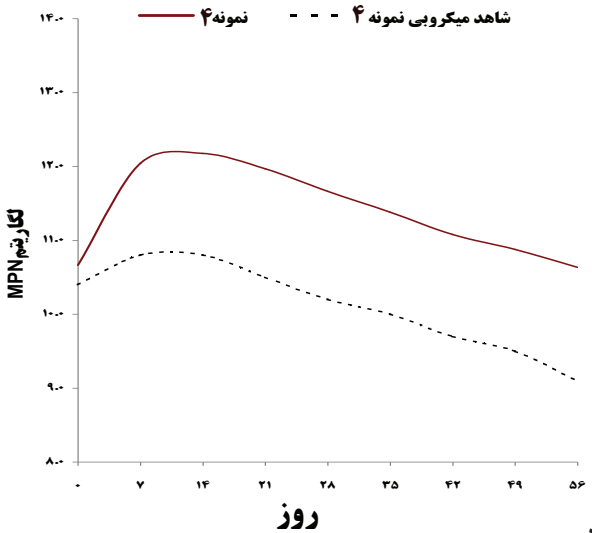
آژانس حفاظت محیط زیست (EPA) (۳۳) عمل استخراج صورت گرفت و محلول حاصل به دستگاه سانتریفوژ با مدل Hettich Universal منتقل و در سرعت ۶۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ min قرار گرفت. غلظت آلاینده باقی مانده با دستگاه GC مدل CHROMPACK CP9001 و ستون HP5 تعیین شد.



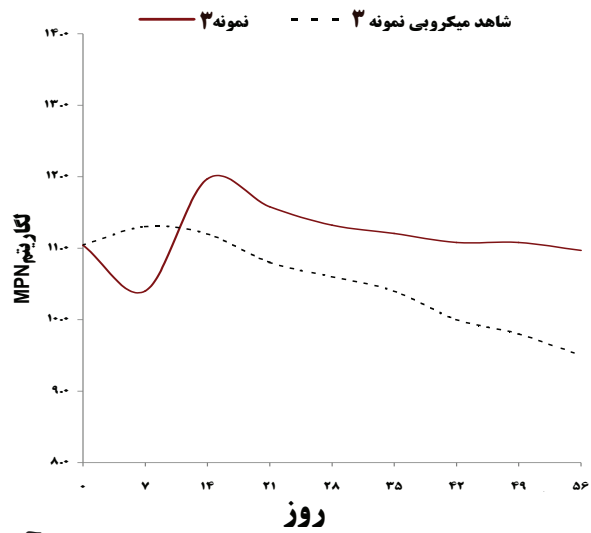
ب.



الف.



د.



ج.

شکل ۱: چگونگی رشد میکروبی در نمونه‌های اصلی ۱ و ۲ و ۳ و ۴ در طی دوره پنجاه و شش روز

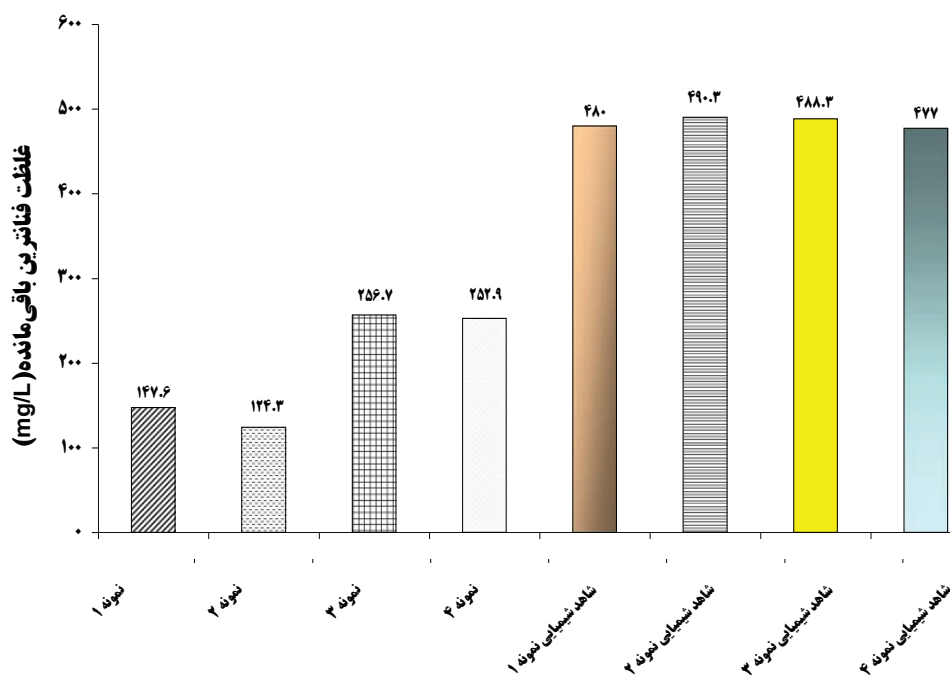
جدول ۴: جدول ANOVA برای مدل فاکتوریل کامل دو متغیر مواد مغذی و شوری و تداخل آنها

Source	Effects	Sum of Square	df	Mean Square	F-Value	P-Value Prob > F	
Model		43228/1	3	14409/4	8/464	0/0073	significant
A-Nu	118/87	42387/9	1	42387/9	24/900	0/0011	
B-Sal	-13/57	552/2	1	552/2	0/324	0/5846	
AB	-9/80	288/1	1	288/1	0/169	0/6916	
Pure Error		13618/8	8	1702/3			
Cor Total		56846/9	11				

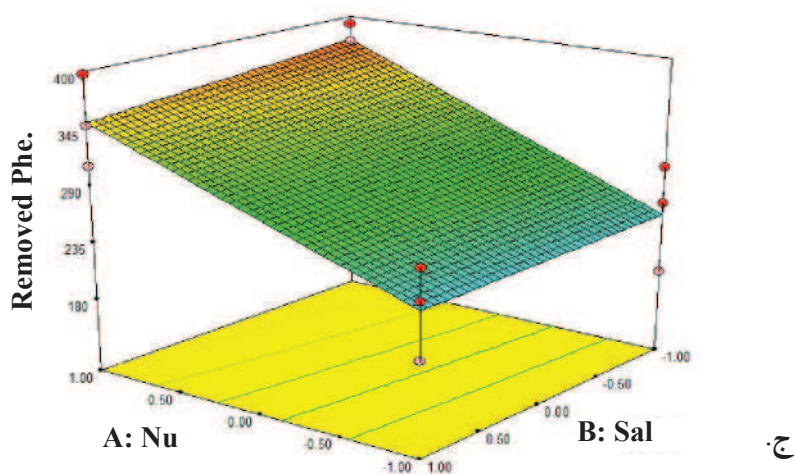
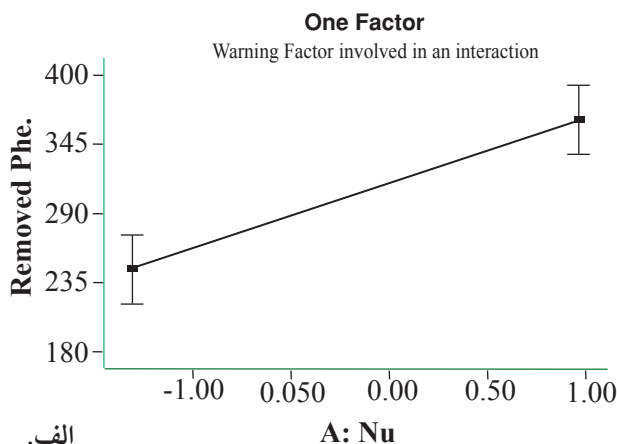
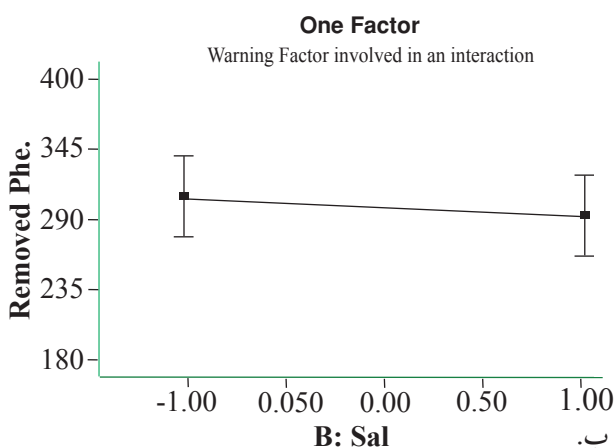
## یافته‌ها

در شاهد‌های هر چهار نمونه تقریباً مشابه است و بین روزهای هفتم تا چهاردهم دارای حداکثر رشد بوده‌اند. شکل ۲ مقدار فناترین باقی‌مانده‌ای که به روش گاز کروماتوگرافی با دکتور FID پس از پایان ۵۶d روز اصلاح زیستی پس از استخراج از نمونه‌های خاک را نشان می‌دهد. کمترین غلظت باقی‌مانده فناترین در نمونه ۲ سپس نمونه‌های ۱ و ۳ به ترتیب برابر با ۱۲۴/۳، ۱۴۷/۶، ۲۵۲/۹ و ۲۵۶/۷ mg/L به دست آمد. به این ترتیب میزان حذف در نمونه‌های ۱ و ۳ و ۴ به ترتیب ۷۰/۴۷٪، ۷۵/۱۴٪، ۴۸/۶۵٪ و ۴۹/۴۱٪ بود. شاهد‌های شیمیایی هر

مطابق با شکل ۱ چگونگی رشد میکروب مخلوط اضافه شده با خاک آلوده به فناترین به دست آمد. تقریباً در هر چهار شکل بیشترین رشد میکروبی در روزهای هفتم تا چهاردهم بوده و سپس جمعیت میکروبی روند نزولی داشته و شکل دارای شیب کاهشی ملایمی تا روز ۵۶ ام است. همان طور که ملاحظه می‌شود در شکل الف (نمونه ۱) و ج (نمونه ۳)، رشد میکروبی پس از یک افت اولیه، دارای تاخیر در روزهای هفتم تا چهاردهم است در حالی که در شکل ب (نمونه ۲) و د (نمونه ۴) این تاخیر مشاهده نمی‌گردد و روند رشد میکروبی



شکل ۲: مقایسه مقدار فناترین باقی‌مانده در خاک در نمونه‌های اصلی و شاهد‌های شیمیایی آن در پایان هفته هشتم



شکل ۳: اثرات متغیرها بر اساس آنالیز آماری فاکتوریل کامل. محور x غلظت متغیر (الف) مواد مغذی، (ب) شوری و محور y غلظت باقی مانده فنانترین حذف شده از خاک در نمونه‌ها در سطح حداقل و حداکثر در پایان روز ۵۶ ام، (ج) نمایش سه بعدی سطوح هر دو متغیر

### بحث

توانایی میکروب‌ها برای مصرف PAHs به عنوان منبع کربنی و یا انرژی اثبات شده است؛ اما کنترل شرایط محیطی و افزودن مواد مغذی یا عناصر کمیاب به خاک بسیار مهم است. نتایج این تحقیق نشان داد که روند رشد میکروبی در نمونه مواد مغذی حداکثر (نمونه ۱ و ۲) افزایش بیشتری نسبت به نمونه‌های با مواد مغذی حداقل داشته به طوری که میزان افزایش جمعیت باکتریایی نسبت به روز صفر در نمونه‌های ۱ و ۲ بیشتر از نمونه‌های ۳ و ۴ بوده است. اما با توجه به حضور شوری در نمونه ۱ و ۳ تاخیر در رشد باکتریایی در روزهای هفتم تا چهاردهم در نمودار رشد میکروبی آنها مشاهده می‌شود؛ با توجه به نظر Chaudhry (۲۰۰۸) مبنی بر کاهش حلالیت فنانترین به دنبال افزایش شوری احتمال

نمونه نیز با مقدار حذف بسیار اندک فنانترین در همین شکل ترسیم شده است. براساس نتایج حاصل از آزمون آماری آنالیز واریانس - ANOVA، مدل خطی (Linear) انتخابی برای این آزمایش با سه بار تکرار و  $P < 0.05$  قابل قبول (Significant) بوده بنابراین می‌توان به درستی بر یافته‌ها قضاوت نمود. نتایج این آزمون، فاکتور مواد مغذی را با  $F\text{-Value}$  ۲۴/۹ مهم‌ترین متغیر نشان داد. شکل ۳ اثرات متغیرهای شوری و مواد مغذی و تداخل آنها با یکدیگر را نشان می‌دهد. خطای حاصل از آزمایشات با تکرار آنها محاسبه گردید.



و ساخت بیومس دارد (۱۴). مطالعه‌ای که توسط Børresen و همکاران (۲۰۰۷) انجام شد نشان داد غلظت‌های بالای نمک - نوترینت ( $71 \text{ mmol Na}^+/\text{Kg soil}$  و  $200 \text{ NH}_4\text{-N}$ ) از طریق افزایش شوری خاک با افزودن  $\text{NH}_4^+$  و  $\text{Na}^+$  زمان سازگاری میکروارگانیسم‌ها را افزایش داده اما اثر ممانعت‌کنندگی روی معدنی‌شدن (تجزیه کامل تا رسیدن به  $\text{CO}_2$  و آب) کل هگزادکان در پایان آزمایش‌ها نداشته است (۳۹) که تاییدی بر نتیجه این مطالعه است.

مطالعات آزمایشگاهی و میدانی تجزیه بیولوژیکی نفت نشان داده‌اند که مواد مغذی اضافی موجب افزایش سرعت تجزیه بیولوژیکی نسبت به شرایط بدون کنترل مواد مغذی شده‌اند (۴۰). Lee و همکاران (۲۰۰۷) در تحقیقی که بر تاثیر تری اتیل فسفات (TEP) و نیترات بر افزایش الکتروکینتیکی تجزیه بیولوژیکی دیزل در خاک‌های با قابلیت نفوذ پذیری کم انجام دادند، فرایند اصلاح زیستی را در ۴ سطح انجام داده و یک گروه کنترل نیز بدون N و P در نظر گرفتند. نتایج نشان داد فسفر زمانی بهتر عمل می‌کند که در فرایند اصلاح زیستی، در حضور یک الکترون‌گیرنده مثل  $\text{NO}_3^-$  باشد (۴۱). در مطالعه‌ای که توسط Alvarez و Betancur (۲۰۰۶) انجام شد تاثیر تحریک میکروبی میکروارگانیسم‌های خاک آلوده به فنانتترین، آنتراسن و بنزوآپیرن توسط بارورکننده‌های biosoil و بارورکننده معدنی حاوی N به صورت  $\text{NO}_3^-$  و  $\text{NH}_4^+$  و P به صورت  $\text{PO}_4^{3-}$  به خاک اضافه شدند و در مدت ۱۱۲ d بررسی شد که نتایج آنان نشان داد کاربرد بارورکننده‌های معدنی و biosoil موجب افزایش تجزیه PAHs مورد مطالعه شده به طوری که غلظت فنانتترین حذف شده از خاک اصلاح شده با N و P به میزان ۱/۷ برابر افزایش داشته است (۳۸). این نسبت در افزایش تجزیه فنانتترین در مطالعه حاضر در محلول غنی از مواد مغذی (بارورکننده‌های معدنی) بیش از ۱/۵ برابر محلول فقیر از نظر مواد مغذی در مدت ۵۶ d (۱/۲ مدت زمان مطالعه Alvarez و Betancur (۲۰۰۶)) بود که نتیجه قابل قبولی است. در مطالعه‌ای که Kwok و Loh (۲۰۰۳) نیز برای بررسی تجزیه زیستی فنانتترین توسط سودوموناس پوتیدا بر روی ۶ نوع از خاک مناطق مختلف سنگاپور انجام دادند مشخص شد فسفر یک عامل محدودکننده در واکنش‌های زیستی است. در

دارد کاهش رشد میکروبی در این مطالعه نیز مرتبط با کاهش حلالیت فنانتترین باشد (۶). در همان حال نمودار شاهد کل نمونه‌ها نیز رشد کمتری نسبت به نمونه اصلی خود داشته است که دلیل آن عدم دسترسی میکروارگانیسم‌ها به غلظت مناسبی از کربن به جهت عدم حضور فنانتترین (به عنوان منبع غنی کربنه موجود در محلول) در نمونه شاهد در مقایسه با نمونه اصلی و در نتیجه کاهش رشد میکروبی به نظر می‌رسد (۳۶ و ۳۷). در ادامه، حذف فنانتترین متاثر از دو فاکتور مواد مغذی و شوری و تداخل آنها بحث و بررسی می‌گردد.

نتایج آنالیز واریانس با درصد اطمینان ۹۵٪ نشان می‌دهد از میان متغیرهای مستقل و تداخل آنها، فقط مواد مغذی دارای اثرات مهم ( $P < 0.05$ ) برابر  $0.0011$  بوده در حالی که شوری و تداخل هر دو فاکتور با یکدیگر دارای اثر مهمی نبودند ( $P > 0.05$ ). به این ترتیب فاکتور مواد مغذی اثر مثبت بر میزان حذف فنانتترین داشته اما فاکتور شوری اثر منفی دارد ولی این اثر در مقایسه با اثر نوترینت بسیار کوچک بوده و با توجه به شکل ۳ - ب اثر شوری (محور افقی) دارای شیب بسیار کم از سطح غلظتی حداقل به سمت سطح حداکثر بوده ولی این شیب در نمودار اثر مواد مغذی (۳- الف) دارای درجه بیشتری است. به این معنی که شوری کمتر و مواد مغذی با غلظت بالاتر تاثیر بیشتری بر راندمان حذف فنانتترین دارند. با توجه به نتایج حاصل از راندمان حذف و شکل ۳ - ج، بیشترین مقدار حذف فنانتترین در نقطه نوترینت حداکثر و شوری حداقل است. هم‌چنین مقایسه نمونه‌های با غلظت‌های مشابه مواد مغذی در سطح حداکثر (نمونه ۱ با ۲) و نمونه‌های با غلظت‌های مشابه مواد مغذی در سطح حداقل (نمونه ۳ با ۴) نشان می‌دهد که درصد حذف بین دو نمونه مشابه از نظر مواد مغذی تفاوت چندانی نداشته و شوری در غلظت ۲٪ تنها موجب تاخیر در رشد میکروبی گردیده و تاثیری در میزان معدنی شدن و تجزیه هیدروکربن فنانتترین نداشته است. Betancur-Galvis (۲۰۰۶) در مقاله خود اعلام کردند که در تحقیق میل و همکاران (۲۰۰۶) نیز اثر ممانعت‌کنندگی شوری را در غلظت (W/V) ۲/۴٪ از NaCl بیان می‌کند (۳۸). هم‌چنین شوری بیش از حد بهینه موجب افزایش فاز تاخیری (Lag phase) در فرایند رشد میکروبی شده و میکروارگانیسم تمایل به کاهش میزان رشد



### نتیجه گیری

بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان گفت مواد مغذی بیشتر، تجزیه بیشتر آلاینده نفتی فنانترین را موجب می‌گردد؛ همچنین مواد مغذی و شوری در غلظت‌های به کاررفته تداخل مهمی با یکدیگر نداشته و غلظت شوری به کار رفته (۲٪)، بیشتر از حد بهینه رشد مخلوط باکتریایی تلقیح شده به خاک بوده و بهتر است در غلظتی پایین‌تر از مقدار حداکثر آن انتخاب گردد. به این ترتیب می‌توان در صورت برقراری شرایط بهینه درصد حذف بیشتری از فنانترین را از خاک انتظار داشت.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل از پایان‌نامه با کد ۶۴۹ پ و عنوان "بررسی تاثیر سورفکتانت، مواد مغذی، اسید هیومیک و شوری بر افزایش کارایی فرایند اصلاح زیستی خاک‌های آلوده به فنانترین" مقطع کارشناسی ارشد مهندسی بهداشت محیط در دانشگاه علوم پزشکی تهران (ایران سابق) است.

بدینوسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از حمایت‌های مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران و مسئولین محترم آزمایشگاه‌های گروه مهندسی بهداشت محیط دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران که ما را در اجرای این تحقیق صمیمانه یاری نموده‌اند، اعلام می‌نمایم.

این تحقیق از نیترات آمونیوم به عنوان نوترینت نیتروژن و از  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  و PP (نمک فسفات سدیم فنیل) به عنوان نوترینت فسفر استفاده شد. افزایش در غلظت  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  موجب افزایش در تجزیه زیستی فنانترین در کل نمونه‌ها شد و فسفر آلی PP توانایی جذب بالاتری از فسفر معدنی  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  نشان داد (۲۲). مطالعه دیگری توسط Olivera و Franca (۲۰۰۵) به منظور تخمین اثرات سه متغیر pH اولیه خاک، افزودن مواد مغذی و تلقیح میکروبی مخلوط باکتریایی بر روی تجزیه زیستی نفت خام از طریق اصلاح زیستی خاک به روش آماری فاکتوریل کامل (۲) مورد غربال‌گری و سپس بهینه‌سازی قرار گرفت. در مرحله غربال‌گری متغیر مواد مغذی دارای اهمیت بوده و با تغییر نسبت‌های مختلف C:N آزمایشات در مرحله دوم برای رسیدن به شرایط بهینه ادامه یافت. نتایج نشان از افزایش تجزیه زیستی بخش سنگین نفت از ۲۴٪ تا ۶۵٪، مصرف کل n-پارافین‌ها، حاصل گردید و کاهش قابل قبولی در غلظت کل هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای در خاک ایجاد شد (۴۲). Silva و همکاران (۲۰۰۹) نیز نشان دادند که استفاده از N و P به میزان برابر (۲۵:۲۵ از نسبت N:P) همراه با بیوسورفکتانت‌ها در طی زمان ۳۰ d در بهینه‌سازی فرایند اصلاح زیستی خاک ساحلی ماسه‌ای آلوده شده با نفت خام به میزان ۱۴ g/Kg از طریق biostimulation و بر اساس فرایند طراحی آزمایش، حدود ۳۰٪ منجر به تجزیه بیولوژیکی بخش سنگین نفت شد (۴۳).

تحقیق حاضر در غلظت مواد مغذی حداکثر N:P = 140:180 دارای درصد حذف بیشتر آلاینده بوده است. نتایج حاصل از محاسبه نسبت‌ها در دو غلظت حداکثر و حداقل مواد مغذی در دو نمونه‌ای که غلظت شوری آنها صفر است (نمونه‌های ۲ و ۴) و احتساب مقدار کربن ثابت (برابر ۵۰۰ mg/Kg soil) در هر دو محلول، نشان داد در محلول مواد مغذی حداکثر، غلظت نیتروژن و فسفر به ترتیب حدود ۵۶۰ و ۳۸۰۰ برابر بیشتر از محلول مواد مغذی حداقل بوده است. به این ترتیب تاثیر حضور بیشتر نیتروژن و فسفر در محلول غنی از مواد مغذی تایید شده، طوری که راندمان بیشتر حاصل از شکست آلاینده سه حلقه‌ای فنانترین در خاک آلوده نیز موید آنست (۲۲)، ۳۸ و ۴۱).

## منابع

1. Doble M, Kumar A. Biotreatment of Industrial Effluents. Burlington: Elsevier Butterworth-Heinemann Publication; 2005.
2. Piskonen R, Itaevaara M. Evaluation of chemical pretreatment of contaminated soil for improved PAH bioremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004;65(5):627-34.
3. Chen J, Wong MH, Wong YS, Tam NFY. Multi-factors on biodegradation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Sphingomonas* sp. a bacterial strain isolated from mangrove sediment. *Marine Pollution Bulletin*. 2008;57(6-12):695-702.
4. Samanta SK, Singh OV, Jain RK. Polycyclic aromatic hydrocarbons: Environmental pollution and bioremediation. *Trends in Biotechnology*. 2002;20(6):243-8.
5. Kolomytseva MP, Randazzo D, Baskunov BP, Scozzafava A, Briganti F, Golovleva LA. Role of surfactants in optimizing fluorene assimilation and intermediate formation by *Rhodococcus rhodochrous* VKM B-2469. *Bioresource Technology*. 2009;100(2):839-44.
6. Pothuluri JV, Cerniglia CE. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Chaudhry GR, editors. *Biological Degradation and Bioremediation of Toxic Chemicals*. Portland: Dioscorides Press; 1995.
7. Srogi K. Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: A review. *Environmental Chemistry Letters*. 2007;5(4):169-95.
8. Scullion J. Remediating polluted soils. *Naturwissenschaften*. 2006;93(2):51-65.
9. Keane A, Lau PC, Ghoshal S. Use of a whole-cell biosensor to assess the bioavailability enhancement of aromatic hydrocarbon compounds by nonionic surfactants. *Biotechnology and Bioengineering*. 2008;99(1):86-98.
10. Powell SN, Singleton DR, Aitken MD. Effects of enrichment with salicylate on bacterial selection and PAH mineralization in a microbial community from a bioreactor treating contaminated soil. *Environmental Science and Technology*. 2008;42(11):4099-105.
11. Avramova T, Sotirova A, Galabova D, Karpenko E. Effect of Triton X-100 and rhamnolipid PS-17 on the mineralization of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. cells. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2008;62(4):415-20.
12. Ahn CK, Woo SH, Park JM. Enhanced sorption of phenanthrene on activated carbon in surfactant solution. *Carbon*. 2008;46(11):1401-10.
13. Liang Y, Sorensen DL, McLean JE, Sims RC. Pyrene fate affected by humic acid amendment in soil slurry systems. *Journal of Biological Engineering*. 2008;2(1):1-7.
14. Haderlein A, Legros R, Ramsay B. Enhancing pyrene mineralization in contaminated soil by the addition of humic acids or composted contaminated soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2001;56(3-4):555-9.
15. Mohan SV, Kisa T, Ohkuma T, Kanaly RA, Shimizu Y. Bioremediation technologies for treatment of PAH-contaminated soil and strategies to enhance process efficiency. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 2006;5(4):347-74.
16. Yaghmaei S. Bioremediation of polluted soils with Phenanthrene and Anthracene. *Proceedings of the 6th National Congress on Chemistry Engineering*; 2001; Tehran, Iran (in Persian).
17. Robles-González IV, Fava F, Poggi-Varaldo HM. A review on slurry bioreactors for bioremediation of soils and sediments. *Microbial Cell Factories*. 2008;7(1):5.
18. Niqui-Arroyo JL, Bueno-Montes M, Posada-Baquero R, Ortega-Calvo JJ. Electrokinetic enhancement of phenanthrene biodegradation in creosote-polluted clay soil. *Environmental Pollution*. 2006;142(2):326-32.
19. Alvarez PJ, Illman WA. *Bioremediation and Natural Attenuation: Process Fundamentals and Mathematical Models*. Hoboken: John Wiley & Sons; 2006.
20. Shin WS, Pardue JH, Jackson WA, Choi SJ. Nutrient enhanced biodegradation of crude oil in tropical salt marshes. *Water, Air, and Soil Pollution*. 2001;131(1-4):135-52.
21. King RB, Sheldon JK, Long GM. *Practical Environmental Bioremediation: The Field Guide*. 2nd ed. The Boca Raton: CRC Press LLC; 1997.
22. Kwok CK, Loh KC. Effects of Singapore soil type on bioavailability of nutrients in soil bioremediation. *Advances in Environmental Research*. 2003;7(4):889-900.

23. Eweis JB. *Bioremediation Principles*. Boston : WCB McGraw-Hill; 1998.
24. Chauhan A, Fazlurrahman, Oakeshott JG, Jain RK. Bacterial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: strategies for bioremediation. *Indian Journal of Microbiology*. 2008;48(1):95-113.
25. Andreoni V, Gianfreda L. Bioremediation and monitoring of aromatic-polluted habitats. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007;76(2):287-308.
26. Liebeg EW, Cutright TJ. The investigation of enhanced bioremediation through the addition of macro and micro nutrients in a PAH contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 1999;44(1):55-64.
27. Shi GT, Chen ZL, Xu S-Y, Yao C-X, Bi C-J, Wang L. Salinity and persistent toxic substances in soils from Shanghai, China. *Pedosphere*. 2009;19(6):779-89.
28. Mukherji S, Jagadevan S, Mohapatra G, Vijay A. Biodegradation of diesel oil by an Arabian Sea sediment culture isolated from the vicinity of an oil field. *Bioresource Technology*. 2004;95(3):281-6.
29. Chandrasekar S, Sorial GA, Weaver JW. Dispersant effectiveness on oil spills - impact of salinity. *ICES Journal of Marine Science*. 2006;63(8):1418-30.
30. Carlstrom CJ, Tuovinen OH. Mineralization of phenanthrene and fluoranthene in yardwaste compost. *Environmental Pollution*. 2003;124(1):81-91.
31. Rashid Ashmagh F, Rezaei Kalantary R, Farzadkia M, Joneidi Jafari A, Nabizadeh R. Survey of phenanthrene biodegradation's model in contaminated soils by *Acinetobacter* SP. *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering*. 2009;3(2):196-203.
32. Ressler BP, Kneifel H, Winter J. Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons and formation of humic acid-like residues during bacterial PAH degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1999;53(1):85-91.
33. Nasseri S, Rezaei Kalantary R, Nourieh N, Naddafi K, Mahvi AH, Baradaran N. Influence of bioaugmentation in biodegradation of PAHs contaminated soil in bio-slurry phase reactor. *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering*. 2010;7(3):191-200.
34. Maier RM, Pepper IL, P. Gerba PC. *Environmental Microbiology*. 2nd ed. Salt Lake City: Academic Press; 2009.
35. Minai-Tehrani D, Minoui S, Herfatmanesh A. Effect of salinity on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) of heavy crude oil in soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2009;82(2):179-84.
36. Ruberto L, Vazquez SC, Mac Cormack WP. Effectiveness of the natural bacterial flora, biostimulation and bioaugmentation on the bioremediation of a hydrocarbon contaminated Antarctic soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2003;52(2):115-25.
37. Gao Y, Yu XZ, Wu SC, Cheung KC, Tam NF, Qian PY, et al. Interactions of rice (*Oryza sativa* L.) and PAH-degrading bacteria (*Acinetobacter* Sp.) on enhanced dissipation of spiked phenanthrene and pyrene in waterlogged soil. *Science of the Total Environment*. 2006;372(1):1-11.
38. Betancur-Galvis LA, Alvarez-Bernal D, Ramos-Valdivia AC, Dendooven L. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated saline-alkaline soils of the former Lake Texcoco. *Chemosphere*. 2006;62(11):1749-60.
39. Børresen MH, Rike AG. Effects of nutrient content, moisture content and salinity on mineralization of hexadecane in an Arctic soil. *Cold Regions Science and Technology*. 2007;48(2):129-38.
40. Hughes JB, Beckles DM, Chandra SD, Ward CH. Utilization of bioremediation processes for the treatment of PAH-contaminated sediments. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 1997;18(2-3):152-60.
41. Lee GT, Ro HM, Lee SM. Effects of triethyl phosphate and nitrate on electrokinetically enhanced biodegradation of diesel in low permeability soils. *Environmental Technology*. 2007;28(8):853-60.
42. Olivera FJS, De Franca FP. Increase in removal of polycyclic aromatic hydrocarbons during bioremediation of crude oil-contaminated sandy soil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2005;121-124:593-603.
43. De Silva AC, de Oliveira FJ, Bernardes DS, de França FP. Bioremediation of marine sediments impacted by petroleum. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2009;153(1-3):58-66.

## **Comparison of Nutrients and Salinity on Phenanthrene Removal from Polluted Soil**

**Maasoumeh Ravanipour<sup>1</sup>, \*Roshanak Rezaei Kalantary<sup>2</sup>, Mahdi Farzadkia<sup>2</sup>, Samireh Hashemi-Najafabadi<sup>3</sup>, Ali Esrafil<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Department of Environmental Health Engineering, Faculty of Health, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

<sup>2</sup>Department of Environmental Health Engineering, Faculty of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>3</sup>Department of Biotechnology, Faculty of Chemical Engineering, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Received; 13 April 2011 Accepted; 12 July 2011

### **ABSTRACT**

**Background and Objectives:** The poor accessibility of microorganisms to PAHs in soil has limited success in the process of bioremediation as an effective method for removing pollutants from soils. Different physicochemical factors are effective on the rate of biodegradation. The main objective of this study is to assess effects of nutrient and salinity on phenanthrene removal from polluted soils.

**Materials and Methods:** The soil having no organic and microbial pollution was first artificially polluted with phenanthrene then nutrients and salinity solution in two concentrations were added to it in order to have the proportion of 10% w:v (soil: water). After that a microbial mixture enable to degrade phenanthrene was added to the slurry and was aerated. Finally, the residual concentration of Phenanthrene in the soil was extracted by ultrasonic and was analyzed using GC. We measured the microbial population using MPN test. This study was conducted based on the two level full factorial design of experiment.

**Results:** MPN test showed that the trend of microbial growth has experienced a lag growth. The full factorial design indicated that nutrient had the maximum effect on bioremediation; the rate of phenanthrene removal in the maximum nutrients – minimum salinity solution was 75.14%.

**Conclusion:** This study revealed that the more nutrient concentration increases, the more degradation will be happened by microorganisms in the soils. However, salinity in the concentration used had no effect on inhabitation or promoting on the Phenanthrene removal.

**Keywords:** PAHs, Experimental Design, Soil Bioremediation, Nutrient, Salinity

---

\*Corresponding Author: [r-rezaei@tums.ac.ir](mailto:r-rezaei@tums.ac.ir)

Tel: +98 21 88779118 Fax: +98 21 88779487