فصلنامه علوم محیطی،دوره هفدهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۸

۵۷-۶۸

بررسی کارایی فرمولاسیون پودری یک کنسرسیوم باکتریایی تجزیه‌کننده آلاینده‌های هیدروکربنی در مقیاس پایلوت میدانی

علی ابوالحسنی سورکی[۱]*، مهناز مظاهری اسدی[۱]و سید امید رعنایی سیادت[۲]

[۱]پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران
[۲] مرکز تحقیقات پروتئین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۶/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۷/۰۸

ابوالحسنی سورکی، ع.، م. مظاهری اسدی و س.ا. رعنایی سیادت. ۱۳۹۸. بررسی کارایی فرمولاسیون پودری یک کنسرسیوم باکتریایی تجزیه‌کننده آلاینده‌های هیدروکربنی در مقیاس پایلوت میدانی. فصلنامه علوم محیطی.۱۷(۲): ۶۸-۵۷.

سابقه و هدف: آلودگی‌های نفتی می‌توانند سبب آسیب‌های جدی و بلندمدت بر محیط‌زیست و سلامت جامعه‌های انسانی شوند. ترکیب‌های هیدروکربنی می‌توانند در طبیعت به‌مدت طولانی باقی مانده و تبدیل به آلاینده‌های محیط زیستی شوند. پاک‌سازی آلودگی‌های هیدروکربنی همچنان موضوعی چالشی برای پژوهشگران رشته‌های مختلف می‌باشد. زیست‌پالایی، نوعی بیوتکنولوژی است که می‌تواند برای رفع این آلودگی‌ها مورد استفاده قرار گیرد. با این وجود بیشتر یافته‌های موجود در مورد ارزیابی عامل‌های مؤثر بر زیست‌پالایی[۱] هیدروکربن‌های نفتی از مطالعات آزمایشگاهی به‌دست آمده است و پژوهش‌ها در این زمینه در مقیاس پایلوت یا مطالعات میدانی بسیار محدود است. مطالعات نشان می‌دهد که عامل‌های اصلاح بیولوژیکی که در شرایط آزمایشگاهی مؤثرند ممکن است بطورقابل‌ملاحظه‌ای در مقیاس وسیع دارای اثربخشی کمتری باشند بنابراین پژوهش‌ها و کاربردهای میدانی، آزمون‌های قانع‌کننده نهایی برای میزان کارآیی این محصول‌ها می‌باشند. هدف از انجام این پژوهش ارزیابی عملکرد یک کنسرسیوم باکتریایی تجزیه‌کننده آلاینده‌های هیدروکربنی در شرایط طبیعی و در مقیاس پایلوت میدانی بود.

مواد و روش‌ها: برای اجرای این پژوهش،کنسرسیوم باکتریایی تجزیه‌کننده آلودگی نفتی شامل ۵ سویه باکتری *Alcanivorax dieselolei*, *Thalassospira xianheensis*, *Rhodococcus ruber*, *Gracilibacillus dipsosauri* و *Microbacterium* sp. در فرمانتور نیمه صنعتی در حجم ۵۰۰ لیتر تکثیر گردید. سپس سلول‌های میکروبی بعد از ته نشینی در فرمانتور به روش spray-drying خشک و با نشاندن بر روی پودر دیاتومه بعنوان بستر تثبیت، تبدیل به پودر شدند. با مخلوط سازی پودر خالص میکروبی با افزایه‌های مغذی مناسب، فرمولاسیون نهایی پودر میکروبی تجزیه‌کننده آلودگی نفتی تولید شد. آزمون میدانی ارزیابی عملکرد این پودر میکروبی بر روی خاک‌های آلوده به نفت خام در جزیره خارک صورت گرفت. برای این منظور خاک‌های آلوده به نفت سنگین در دو بلوک مجزا شامل یک بلوک شاهد و یک بلوک تیمار به روش زیست‌افزایی[۲] مورد آزمون تجزیه زیستی مواد نفتی قرار گرفت و غلظت هیدروکربن‌های نفتی کل و تغییرات دمای خاک در دوره آزمون سنجش شد.

نتایج و بحث: میانگین میزان TPH[۳] در روز اول در نمونه‌های شاهد و مورد آزمایش ۳۴۱ میلی‌گرم در هر گرم خاک بود. در نمونه شاهد کاهش

* CorrespondingAuthor: *Email Address*.a_abolhasani@sbu.ac.ir

هیدروکربن‌های نفتی بعد از دوره ۱۴ روزه آزمایش به میزان ۱۴/۲٪ بود که می‌تواند بدلیل فعالیت جمعیت باکتری‌های بومی خاک و یا به سبب فرآیندهای فیزیک و شیمیایی مانند تبخیر و فتواکسیداسیون باشد. در مقابل در خاک تیمار شده با فرمولاسیون پودری کنسرسیوم میکروبی تجزیه‌کننده آلودگی نفتی غلظت هیدروکربن‌های نفتی در پایان دوره آزمون با ۶/۷۰٪ کاهش به ۹۹ (mg/g) رسید. این نتایج نشان‌دهنده عملکرد بسیار سریع این کنسرسیوم میکروبی در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی می‌باشد. همچنین بدلیل افزایش فعالیت باکتری‌ها و تجزیه هیدروکربن‌های نفتی دمای خاک در بلوک تیمار شده با پودر میکروبی با افزایشی معادل ۱۱ درجه سانتی‌گراد همراه شد. افزایش دمای خاک بویژه در منطقه‌های سردسیر یا در فصل‌های سرد سال در نتیجه فعالیت باکتری‌ها خود می‌تواند سبب بالا رفتن متابولیسم جمعیت‌های میکروبی خاک و افزایش راندمان زیست پالایی شود. این موضوع بویژه در مورد آلودگی‌های نفتی در منطقه‌های قطبی اهمیت دوچندانی دارد.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از کنسرسیوم میکروبی برای زیست پالایی خاک‌های آلوده به غلظت‌های بسیار زیاد هیدروکربن‌های نفتی مانند آنچه در زمان نشت نفت خام از خطوط انتقال نفت ایجاد می‌شود، می‌تواند نتیجه بخش باشد. همچنین کاربرد محصول‌های پودری بدلیل سهولت انجام عملیات و عدم نیاز به تجهیزهای پیچیده و گران قیمت یک راهکار مؤثر بحساب می‌آید. افزون بر این افزودن کنسرسیوم میکروبی بدلیل جمعیت اولیه مناسب باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت می‌تواند سبب افزایش دمای خاک شده و فعالیت جمعیت‌های بومی خاک را نیز افزایش دهد.

واژه‌های کلیدی: زیست پالایی، آزمون پایلوت میدانی، کنسرسیوم میکروبی، فرمولاسیون پودری.

مقدمه

آلودگی‌های نفتی می‌توانند سبب آسیب‌های جدی و بلندمدت بر محیط‌زیست و سلامت جامعه‌های انسانی شوند (Winkler and Agapova, 2010). هیدروکربن‌ها که ساختار اصلی تشکیل‌دهنده نفت خام هستند، غالباً فاقد گروه‌های عاملی روی مولکول‌های خود بوده و حلالیت بسیار پایینی در آب دارند. بیشتر این ترکیب‌ها در طبیعت به‌مدت طولانی باقی مانده و بعنوان آلاینده‌های محیط زیستی بحساب می‌آیند (Labinger and Bercaw, 2002). پاک‌سازی آلودگی‌های هیدروکربنی همچنان موضوعی چالشی برای پژوهشگران رشته‌های مختلف می‌باشد.

زیست‌پالایی نوعی بیوتکنولوژی است که می‌تواند برای رفع این آلودگی‌ها مورد استفاده قرار گیرد. در این تکنیک، از باکتری‌های نفت‌خوار و دیگر میکروارگانیسم‌ها بمنظور تجزیه مواد آلاینده نفتی به ترکیب‌های بی‌خطر، بهره برده می‌شود (Adams *et al*., 2015). فناوری تصفیه بیولوژیکی، برتری‌های بسیاری ازجمله سازگاری کامل با محیط‌زیست، ارزان بودن و امکان کاربرد درجا [۴]، نسبت به دیگر روش‌های رفع آلودگی‌های نفتی دارا می‌باشد. در فرآیند تجزیه بیولوژیکی، باکتری‌های نفت‌خوار، ترکیب‌های نفتی را هضم نموده و برای کسب انرژی موردنیاز خود، آن‌ها را به CO_2 و H_2O تبدیل می‌کند. استفاده از میکروارگانیسم‌ها برای سم‌زدایی یا حذف آلاینده‌ها، بخاطر قابلیت‌ها و تنوع در سوخت‌وساز میکروارگانیسم‌ها یک روش در حال تحول و توسعه است که می‌تواند برای حذف و تجزیه بسیاری از آلاینده‌های محیط زیستی ازجمله محصول‌های نفتی بکار برود. افزون بر این در این روش سعی بر این است که فن‌آوری کم‌هزینه باشد. تجزیه بیولوژیکی توسط جمعیت‌های مختلف میکروارگانیسم‌ها یک مکانیسم پایه است که از این طریق نفت و هیدروکربن‌های آلاینده دیگر می‌توانند از محیط حذف شوند.

محیط‌های کشت میکروبیولوژیکی، آنزیم‌ها و مواد مغذی افزودنی که ضمن افزایش قابل‌توجه تجزیه بیولوژیکی، هزینه‌های تحمیلی را کاهش می‌دهند بعنوان عامل‌های اصلاح بیولوژیکی از سوی U.S.EPA در نظر گرفته می‌شوند (Nichols, 2001). سازمان حفاظت محیط‌زیست آمریکا با یک لیست از ۱۵ عامل اصلاح بیولوژیکی که توسط قانون آب پاک، قانون آلودگی نفتی و NCP مورد نیاز در نظر گرفته شده است، تأیید کرد (U.S.EPA, 2010).

با این وجود بیشتر یافته‌های موجود در مورد ارزیابی عامل‌های مؤثر بر زیست‌پالایی نفت از مطالعات آزمایشگاهی به‌دست آمده است و یافته‌های متقاعدکننده از این تکنولوژی در مقیاس پایلوت یا مطالعات میدانی فقط توسط تعداد محدودی

از مطالعات فراهم شده است (Swannell *et al*., 1996). مطالعات نشان می‌دهد که عامل‌های اصلاح بیولوژیکی که در شرایط آزمایشگاهی مؤثرند ممکن است بطور قابل ملاحظه‌ای در مقیاس وسیع دارای اثربخشی کمتری باشند. این موضوع به خاطر این است که مطالعات آزمایشگاهی همیشه نمی‌تواند شرایط پیچیده جهان واقعی را مانند ناهمگونی فضایی، فعل و انفعالات بیولوژیکی، اثرهای آب و هوایی، و محدودیت‌های دسترسی به مواد مغذی معدنی را شبیه‌سازی نماید، بنابراین مطالعات و کاربردهای میدانی، آزمون‌های قانع‌کننده نهایی برای ارزیابی میزان کارآیی این محصول‌ها می‌باشند.

در این پژوهش عملکرد یک کنسرسیوم باکتریایی تجزیه‌کننده آلاینده‌های هیدروکربنی در شرایط طبیعی و در مقیاس پایلوت میدانی مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور ابتدا سویه‌های میکروبی در فرمانتور نیمه صنعتی تکثیر شدند. سپس با خشک کردن و مخلوط سازی با افزایه‌های مورد نیاز باکتری‌ها، فرمولاسیون پودری از محصول ایجاد شد. در پایان با انجام آزمون پایلوت میدانی زیست‌پالایی پسماندهای آلوده به نفت خام در جزیره خارک، میزان کارآیی محصول در شرایط واقعی و طبیعی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد و محیط‌های کشت

کلیه مواد آزمایشگاهی مورد استفاده در این پروژه از درجه خلوص آنالیتیکی برخوردار بودند. کلیه محیط‌های کشت آزمایشگاهی از شرکت مرک (آلمان) خریداری شد.

کنسرسیوم میکروبی تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های نفتی

کنسرسیوم باکتریایی تجزیه‌کننده آلودگی نفتی مورد استفاده شامل ۵ سویه باکتری بود که از خاک‌های آلوده به مواد نفتی در جزیره خارک و منطقه نفت خیز مارون خوزستان جداسازی و به روش تاگوچی بهینه سازی شده بود (در حال انتشار مقاله). این کنسرسیوم میکروبی شامل سویه‌های منتخب باکتری تجزیه‌کننده نفت در این کنسرسیوم میکروبی متعلق به جنس و گونه‌های *Alcanivorax dieselolei*, *Thalassospira xianheensis*, *Rhodococcus ruber* ,*Gracilibacillus dipsosauri* و *Microbacterium* sp. بودند. این کنسرسیوم میکروبی قابلیت فعالیت در دامنه دمایی ۱۰ تا ۵۵ درجه سانتی‌گراد، شوری (ppt) ۰ تا ۱۲۰ و pH ۶ تا ۹ را دارا بود.

تولید فرمولاسیون پودری کنسرسیوم میکروبی تجزیه‌کننده آلودگی نفتی

فرآیند تولید پودر میکروبی تجزیه‌کننده آلودگی نفتی در این مطالعه با استفاده از پایلوت فرمانتور پژوهشکده زیست‌فناوری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران انجام شد. تکثیر باکتری‌ها بصورت کشت غیرمداوم در فرمانتور ۷۵۰ لیتری با حجم عملیاتی ۵۰۰ لیتر صورت گرفت. بمنظورتهیه کشت استارتر برای فرمانتور دو مرحله کشت مقدماتی شامل کشت آزمایشگاهی در حجم ۰/۵ لیتر در ارلن و بر روی شیکر، و کشت در حجم ۵ لیتر در فرمانتور ۷/۵ لیتری صورت گرفت. محیط کشت مورد استفاده در تهیه کشت استارتر و همچنین در فرمانتورها شامل ملاس چغندرقند (شرکت قند هگمتانه) با غلظت ۴ ٪ و مایع آب استیپ ذرت (شرکت گلوکوزان) با غلظت ۵ ٪ بود. روغن مایع خوراکی بعنوان عامل ضدکف در فرمانتور استفاده شد. pH اولیه محیط کشت صنعتی روی ۷/۵ تنظیم شد. دمای محیط کشت و هوادهی در طول دوره تکثیر باکتری‌ها در فرمانتورهای صنعتی بر اساس نتایج حاصل از بهینه‌سازی رشد و تکثیر باکتری‌ها در فرمانتور آزمایشگاهی، بترتیب روی ۳۵ درجه سانتی‌گراد و ۱ vvm تنظیم شد. از محیط کشت در طول دوره کشت نمونه‌برداری صورت گرفت و کدورت سلولی بوسیله اسپکتروفتومتر با سنجش جذب در ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

فرآیند خشک کردن کشت تکثیر یافته باکتری‌ها و تبدیل به پودر با استفاده از دستگاه spray-drier صورت گرفت. محصول فرمانتور بعد از رسیدن به فاز سکون رشد، از طریق شیلنگ مخصوص به پمپ دور متغیر اسپری - درایر انتقال داده شد. این پمپ سوسپانسیون باکتریایی را از طریق یک نازل به‌صورت پاششی به درون محفظه خشک‌کن اسپری نمود. قطره‌های میکروسکوپی در این محفظه در دمای ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد در کسری از ثانیه خشک شدند. دمای

نهفته[5] تبخیر آب سبب جلوگیری از آسیب به سلول‌های باکتریایی در مرکز قطره‌های میکروسکوپی شده و باکتری‌ها بصورت زنده خشک شدند. سپس پودر خالص باکتریایی از طریق یک سیکلون به یک مخزن استیل منتقل شد. دمای پودر باکتریایی در این مخزن $^{\circ}$c ۸۰-۷۵ حدود بود که به سرعت به دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد رسانده شد. در پایان پودر تولیدشده مورد شمارش سلول‌های زنده قرار گرفت. در آخرین مرحله از فرآیند تولید پودر میکروبی تجزیه‌کننده آلودگی نفتی، پودر خالص باکتری‌ها روی بستر پودر دیاتومه تثبیت و با نوترینت‌های ازته و فسفاته مناسب مخلوط شد.

آزمون پایلوت میدانی زیست‌پالایی خاک آلوده به نفت خام در شرایط طبیعی

برای بررسی کارآیی زیست‌پالایی آلودگی نفتی خاک با استفاده از پودر میکروبی تجزیه‌کننده آلودگی نفتی، آزمون پایلوت میدانی زیست‌پالایی خاک آلوده به نفت خام در شرایط طبیعی در جزیره خارک انجام شد. برای انتخاب محل اجرای آزمون پایلوت، پارامترهایی شامل امکان دسترسی به محل، دسترسی به آب صنعتی و نوع و میزان آلودگی نفتی محل معیار انتخاب بود. بر این اساس در زمان گفتگوهای صورت گرفته با مسئولین اداره عملیات صادرات شرکت پایانه‌های نفتی ایران، آلودگی نفتی ناشی از نشت خط لوله انتقال نفت در مجاورت تأسیسات میترینگ آذرپاد آن شرکت برای اجرای آزمون پایلوت پاک‌سازی خاک آلوده به نفت خام انتخاب گردید. با نمونه‌برداری از خاک آلوده در محل موردنظر میزان و نوع آلودگی‌های نفتی در نمونه خاک به روش گراویمتری تعیین گردید. پس از انتخاب محل، حجمی معادل حدود ۵/۲ مترمکعب از ماسه‌های ساحلی آلوده به نفت جمع‌آوری و مخلوط گردید و در دو قطعه با ابعاد ۲×۳×۰/۲ متر توزیع گردید که یکی برای انجام آزمون نمونه پودری و دیگری بعنوان شاهد در نظر گرفته شد. سپس یک کیلوگرم نمونه پودری روی خاک آلوده در قطعه آزمون پخش شد. شکل۱ عکس مرحله‌های اجرایی را نشان می‌دهد. رطوبت خاک به‌مدت ۱۴ روز با آب‌پاشی روزانه روی بلوک زیست‌پالایی و کنترل روی حدود ٪۵۰ اشباع نگهداری شد. روزانه به‌صورت تصادفی از سه عمق مختلف سطحی، ۱۰ سانتی‌متر و ۲۰ سانتی‌متر از خاک مورد آزمایش در دو بلوک مجزا نمونه‌برداری شد. نمونه‌های مربوط به هر بلوک سپس با هم مخلوط و الک شد و سه نمونه در حدود ۱۰۰ گرمی از هرکدام برای اندازه‌گیری هیدروکربن‌های نفتی داخل ظرف‌های شیشه‌ای استریل به آزمایشگاه منتقل شد. همچنین روزانه تغییرات دمایی خاک مورد زیست‌پالایی و شاهد ثبت شد.

سنجش هیدروکربن‌های نفتی با استفاده از GC-MS

برای اندازه‌گیری هیدروکربن‌های نفتی کلز روش کروماتوگرافی گازی استفاده شد. برای استخراج مواد نفتی از نمونه‌های خاک برای تزریق به دستگاه GC، ابتدا نمونه خاک در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک شب خشک شد تا رطوبت خاک خارج شود. سپس به ۱ گرم خاک خشک شده داخل میکروویال ۱ میلی‌لیتر حلال n-هگزان اضافه و پس از ورتکس کردن، در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۲/۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی شامل مواد هیدروکربنی به یک لوله آزمایش منتقل شد. این عمل ۳ بار تکرار شد تا هیدروکربن‌های موجود در خاک بطور کامل استخراج گردد. سپس به عصاره حاصل ۰/۱ گرم سولفات سدیم بدون آب اضافه شد تا رطوبت آن بطور کامل جذب شود و دوباره در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۲/۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. عصاره حاصل سپس به ویال دیگر منتقل شد و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا حلال موجود در آن تبخیر گردد. قبل از تزریق به دستگاه GC به هر ویال ۱ میلی‌لیتر n - هگزان اضافه شد.

دستگاه گازکروماتوگراف مورد استفاده مدل Shimadzu (GC-15A) و با دتکتور FID بود. ستون مورد استفاده برای اندازه‌گیری هیدروکربن‌های نفتی از نوع RTX-5MS 30 m بود. دمای Injector و Detector بر روی ۳۲۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد و میزان تزریق ۱ میکرولیتر بود. برنامه زمانی دستگاه گازکروماتوگراف برای آنالیز هیدروکربن‌های نفتی شامل ۱ دقیقه در ۲۰ درجه سانتی‌گراد، به دنبال آن افزایش دما تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد با نرخ ۲ درجه در دقیقه و نگهداری در دمای ۵۰ درجه به‌مدت ۳ دقیقه، سپس افزایش دما تا ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد با نرخ ۵ درجه در دقیقه و نگهداری در دمای ۱۲۰ درجه به‌مدت ۱ دقیقه و درنهایت افزایش دما تا ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد با نرخ ۳ درجه در دقیقه و نگهداری در دمای ۲۹۰ درجه به‌مدت ۲۰ دقیقه بود.

شکل۱- اجرای عملیات آزمون پایلوت میدانی زیست‌پالایی خاک‌های آلوده به نفت خام با استفاده از نمونه پودری کنسرسیوم میکروبی تجزیه‌کننده آلاینده‌های هیدروکربنی

Fig. 1- Field test operation conducted to evaluate the performance of petroleum-degrading microbial powder on crude oil contaminated soils

جدول۱- ویژگی‌های نفت خام منشأ آلودگی نفتی خاک مورد آزمایش

Table 1. Characteristics of the crude oil which was the source of contamination of the tested soil

Iranian heavy crude oil	
0.8814	Specific gravity (kg/l)
29.0	API gravity (degrees)
1.96	Sulfur (wt%)
0.21	Nitrogen (wt%)
88.0	Vanadium (ppm)
24.0	Nickel (ppm)
-14	Pour point (°C)
	Viscosity (cSt)
21.52	At 20 °C
10.43	At 40 °C

جدول۲- ویژگی‌های خاک آلوده به نفت خام در محل موردنظربرای انجام آزمون پایلوت زیست پالایی

Table 2. Specifications of the soil contaminated with crude oil at the site of a bioremediation pilot test

غلظت هیدروکربن‌های نفتی کل Total petroleum hydrocarbons (ppm)	دمای خاک Soil temperature (° C)	pH	شوری خاک Salinity (ppt)	محل نمونه‌برداری Sampling location
341.000	19	7.35	59	آلودگی نفتی مجاور تأسیسات میترینگ آذرپاد در جزیره خارک Oil pollution near Azarpad Metering Facilities

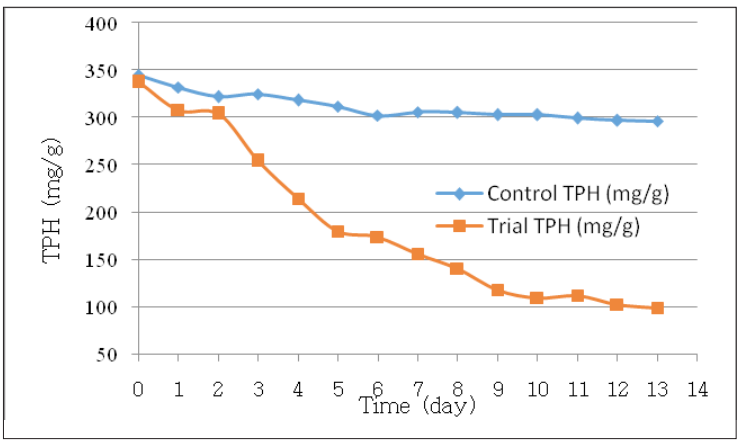
نتایج و بحث

ویژگی‌های خاک آلوده

خاک آلوده به نفت که از نوع رسوب‌های ساحلی بود که بدلیل نشت نفت از یک خط لوله کمابیش بطور کامل اشباع از نفت بود بطوری که در هنگام جابجایی خاک نفت خام از خاک تراوش می‌نمود. نوع نفت خام منشأ آلودگی از نوع نفت سنگین ایران بود که ویژگی‌های آن در جدول نشان داده شده است: زمان نمونه برداری که از خاک آلوده به نفت قبل از اجرای آزمون پایلوت زیست پالایی صورت گرفت ویژگی‌های خاک آلوده از لحاظ دما، pH، شوری و غلظت هیدروکربن‌های نفتی در نمونه خاک اندازه گیری گردید که نتایج آن در جدول زیر نشان داده شده است.

نتایج آزمون پایلوت زیست پالایی

روند در کاهش میزان هیدروکربن‌های نفتی در خاک تیمار شده با فرمولاسیون پودری کنسرسیوم میکروبی تجزیه‌کننده آلودگی نفتی به روشنی قابل مشاهده بود (شکل۲). غلظت هیدروکربن‌ها در نمونه کنترل نیز کاهش یافت، هرچند این کاهش نسبت به نمونه تیمار شده بسیار کمتر بود. همان‌گونه که مشاهده می‌شود میانگین مقدار TPH در روز اول در نمونه‌های شاهد و مورد آزمایش ۳۴۱ میلی‌گرم در هر گرم خاک بود. در نمونه شاهد کاهش هیدروکربن‌های نفتی بعد از دوره ۱۴ روزه آزمایش تنها ۱۴/۲ ٪ بود. این کاهش می‌تواند بدلیل فعالیت جمعیت باکتری‌های بومی خاک و یا به سبب فرآیندهای فیزیک وشیمیایی مانند تبخیر و فتواکسیداسیون باشد. در مقابل در خاک تیمار شده با فرمولاسیون پودریکنسرسیوم میکروبی تجزیه‌کننده آلودگی نفتی غلظت هیدروکربن‌های نفتی در پایان دوره ۱۴ روزه آزمون با ۷۰/۶ ٪ کاهش به ۹۹ (mg/g) رسید. این نتایج نشان‌دهنده عملکرد بسیار سریع این کنسرسیوم میکروبی در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی می‌باشد. Sanushi *et al.* (2016) با استفاده از تکنیک بهینه سازی فرآیند



شکل۲- نمودار تغییرات هیدروکربن‌های نفتی خاک در خاک مورد زیست‌پالایی به‌وسیله پودر میکروبی تجزیه‌کننده آلودگی نفتی و خاک شاهد

Fig. 2- Chart of oil hydrocarbon changes in the soil bioremediated by microbial powder and in the control soil

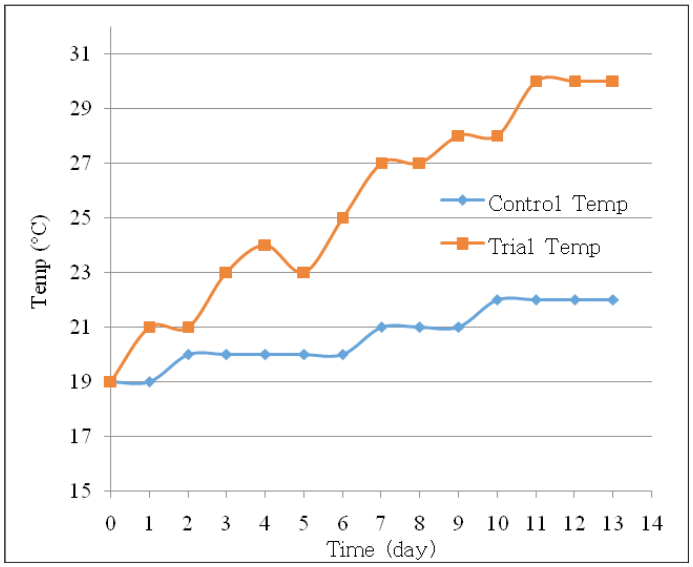
شکل۳- عکس از نمونه شاهد (چپ) و نمونه مورد آزمایش (راست) در روز اول (بالا) و روز چهاردهم (پایین.) تغییر رنگ خاک آلوده در نمونه مورد آزمایش نشان از تجزیه هیدروکربن‌های نفتی موجود در آن می‌باشد

Fig. 3- Photos of the control block (left) and the bioremediatied block (right) on the first day (on the top) and on the fourteenth day (bottom). The change in the color of the contaminated soil in the test sample shows the degradation of the petroleum hydrocarbons

تجزیه هیدروکربن‌های نفتی موفق شدند خاک آلوده به ۳ ٪ دیزل را در یک دوره زمانی ۷۲ روزه به میزان ۸۵/۵ ٪ در یک آزمون پایلوت مورد تجزیه زیستی قرار دهند (Sanusi *et al*., 2016). همچنین در آزمون پایلوت دیگری که توسط Murygina *et al*. (2016) انجام شد میزان کاهش TPH در لایه سطحی (۰ تا ۱۰ سانتی متر) ۲۳ ٪ و در لایه غیراشباع زیرسطحی (۱۰ تا ۲۵ سانتی متر) ۷۲/۶ ٪ مشاهده شد.

شکل۳ تغییر رنگ خاک آلوده را قبل و بعد از روز چهاردهم نشان‌شد میزان کاهش TPH در لایه سطحی (۰ تا ۱۰ سانتی متر) ۲۳ ٪ و در لایه غیراشباع زیرسطحی (۱۰ تا ۲۵ سانتی متر) ۷۲/۶ ٪ مشاهده شد (Murygina *et al*., 2016).

شکل۳ تغییر رنگ خاک آلوده را قبل و بعد از روز چهاردهم نشان می‌دهد. همان‌گونه که مشاهده می‌شود کاهش غلظت هیدروکربن‌های نفتی در خاک آلوده سبب روشن شدن رنگ



شکل۴- نمودار تغییرات دمای خاک در بلوک زیست‌پالایی به‌وسیله پودر میکروبی تجزیه‌کننده آلودگی نفتی و بلوک شاهد

Fig. 4- Chart of soil temperature changes in soil bioremediation by petroleum-degrading microbial powder and in control block soil

خاک نسبت به نمونه کنترل شده است. شکل۴ نمودار تغییرات دمای خاک را در دوره ۱۴ روزه آزمون پودر میکروبی نشان می‌دهد. همان‌گونه که ملاحظه می‌شود در شروع آزمایش دمای خاک در بلوک‌های شاهد و مورد آزمایش برابر و ۱۹ درجه سانتی‌گراد بود. با ادامه فرآیند دمای شاهد بطور اندکی افزایش یافت که تابعی از دمای هوا می‌باشد. ولی در نمونه مورد آزمایش همان‌گونه که پیشتر بیان شد بدلیل افزایش فعالیت باکتری‌ها و تجزیه هیدروکربن‌های نفتی دمای خاک با افزایشی معادل ۱۱ درجه سانتی‌گراد رسید.

افزایش دمای خاک بویژه در منطقه‌های سردسیر یا در فصل‌های سرد سال در نتیجه فعالیت باکتری‌ها خود می‌تواند موجب بالا رفتن متابولیسم جمعیت‌های میکروبی خاک و افزایش راندمان زیست پالایی شود. این موضوع بویژه در مورد آلودگی‌های نفتی در منطقه‌های قطبی اهمیت دوچندانی دارد (Mohn *et al.*, 2001).

نتیجه‌گیری

در این پژوهش فرمولاسیون پودری یک کنسرسیوم میکروبی از باکتری‌های طبیعی تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های نفتی جداشده از پسماندهای آلوده به مواد نفتی منطقه‌های نفت‌خیز ایران تولید شد. میزان کارآیی این پودر میکروبی با انجام یک آزمون پایلوت میدانی در جزیره خارک مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از کنسرسیوم میکروبی برای زیست پالایی خاک‌های آلوده به غلظت‌های بسیار زیاد هیدروکربن‌های نفتی مانند آنچه در زمان نشت نفت خام از لوله‌های انتقال نفت ایجاد می‌شود، می‌تواند نتیجه بخش باشد. همچنین کاربرد محصول‌های پودری بدلیل سهولت انجام عملیات و عدم نیاز به تجهیزات پیچیده و گران قیمت یک راهکار مؤثر بحساب می‌آید. افزون بر این افزودن کنسرسیوم میکروبی بدلیل جمعیت اولیه مناسب باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت می‌تواند موجب افزایش دمای خاک شده و فعالیت جمعیت‌های بومی خاک را نیز افزایش دهد.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی و عملیاتی شرکت پایانه‌های نفتی ایران و پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی صورت گرفته است.

پی نوشت‌ها

[1] Bioremediation
[2] Bioaugmentation
[3] Total Petroleum Hydrocarbons (TPH)
[4] in situ
[5] Latent heat

منابع

Adams, G.O., Fufeyin, P.T., Okoro, S.E. and Ehinomen, I., 2015. Bioremediation, biostimulation and bioaugmention: A review. International Journal of Environmental Bioremediation and Biodegradation. 3, 28-39.

Labinger, J.A. and Bercaw, J.E., 2002. Understanding and exploiting C–H bond activation. Nature. 417, 507.

Mohn, W., Radziminski, C., Fortin, M.C. and Reimer, K., 2001. On site bioremediation of hydrocarbon-contaminated Arctic tundra soils in inoculated biopiles. Applied Microbiology and Biotechnology. 57, 242-247.

Murygina, V., Gaydamaka, S., Gladchenko, M. and Zubaydullin, A., 2016. Method of aerobic-anaerobic bioremediation of a raised bog in Western Siberia affected by old oil pollution. A pilot test. International Biodeterioration and Biodegradation. 114, 150-156.

Nichols, W.J., 2001. The U.S. Environmental Protect Agency: National Oil and Hazardous Substances Pollution Contingency Plan, Subpart J Product Schedule (40 CFR 300.900), American Petroleum Institute, Washington, DC, USA .

Sanusi, S.N.A., Halmi, M.I.E., Abdullah, S.R.S., Hassan, H.A., Hamzah, F.M. and Idris, M., 2016. Comparative process optimization of pilot-scale total petroleum hydrocarbon (TPH) degradation by Paspalum scrobiculatum L. Hack using response surface methodology (RSM) and artificial neural networks (ANNs). Ecological Engineering. 97, 524-534.

Swannell, R.P.J., Lee, K. and Mcdonagh, M., 1996. Field evaluations of marine oil spill bioremediation. Microbiological Reviews. 60, 342–365.

U.S.EPA, 2010. Guide To Using The Ncp Product Schedule Notebook. ((OEM) O.o.E.M., ed.). U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA.

Winkler, I. and Agapova, N., 2010. Determination of water pollution by the oil products through UV photometry. Environmental Monitoring and Assessment. 168, 115-119.

Environmental Sciences Vol.17/ No.2 / Summer 2019

57-68

Pilot-scale evaluation of bioremediation efficiency by powder formulation of a consortium of hydrocarbon-degrading bacteria

Ali Abolhasani Soorki,[1] Mahnaz Mazaheri Assadi[1*] and Seyed Omid Ranaei Siadat[2]

[1]Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran

[2] Protein Research Center, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Received: 2018.09.03 Accepted: 2019.09.30

Abolhasani Soorki, A., Mazaheri Assadi, M. and Ranaei Siadat, S.O., 2019. Pilot-scale evaluation of bioremediation efficiency by powder formulation of a consortium of hydrocarbon-degrading bacteria. Environmental Sciences. 17(2): 57-68.

Introduction: Oil pollution can cause serious and long-term damage to the environment and the health of human communities. Hydrocarbon compounds can remain in nature for a long period and become environmental pollutants. The elimination of hydrocarbon contamination is still a challenge for researchers of different disciplines. Bioremediation is a branch of biotechnology that can be used to eliminate these contaminants. However, most findings on the evaluation of factors affecting oil bioremediation are obtained from laboratory studies, and research in this area is very limited in pilot or field scale studies. Studies show that bioremediation agents that are effective in vitro may be significantly less effective on a large scale because laboratory studies cannot always simulate the real world's conditions due to spatial heterogeneity, biological interactions, weather effects, and restrictions on access to mineral nutrients. In this study, the performance and effectiveness of a consortium of hydrocarbon-degrading bacteria were evaluated under natural conditions in a pilot scale.

Material and methods: To conduct this research, a bacterial consortium of five strains of bacteria including *Alcanivorax dieselolei*, *Thalassospira xianheensis*, *Rhodococcus ruber*, *Gracilibacillus dipsosauri and Microbacterium* sp. were proliferated in a 500-liters semi-industrial fermenter. Then, the microbial cells were dried by the spray-drying method after sedimentation in the fermenter and formulated on the diatomaceous powder as a stabilizing bed. By blending this microbial powder with appropriate nutrient supplements, the final formulation of the oil-degrading microbial powder was produced. A field test was conducted to evaluate the performance of this microbial powder on crude oil contaminated soils in Kharg Island. For this purpose, soils contaminated by heavy crude oil resulting from oil pipeline leakage were examined for 14 days in two separate blocks, including a control block and a bioaugmentation block treated by the petroleum-degrading microbial powder. Reduction of total petroleum hydrocarbons concentration and soil temperature changes were measured during the test period.
Results and discussion: The mean of TPH in the first day was 341 mg per gram soil. In the control block, the reduction of

*CorrespondingAuthor: *Email Address.*a_abolhasani@sbu.ac.ir

petroleum hydrocarbons after 14 days of the experiment was 14.2%, which could be due to the activity of the population of native soil bacteria or due to physico-chemical processes such as evaporation and photo-oxidation. In contrast, in the soil treated with the petroleum-degrading microbial powder, the concentration of hydrocarbons at the end of the test period was reduced by 70.6% to 99 mg per gram soil. These results indicate the very rapid performance of this microbial consortium in the decomposition of hydrocarbons. Also, due to the increased activity of bacteria and degradation of hydrocarbons, soil temperature was increased about 11 degrees Celsius in the block treated with microbial powder. Increasing the temperature of the soil as a result of the activity of bacteria, especially in cold regions or in the cold seasons, can lead to the further increase of soil microbial population's metabolism and increase the biodegradation efficiency. This is especially important in the case of oil pollution in Polarregions.

Conclusion: The results of this study showed that the use of a microbial consortium for the biological treatment of contaminated soils with very high concentrations of petroleum hydrocarbons, such as crude oil spill from oil pipelines, could be beneficial. Also, the use of powdered products is an effective solution due to the ease of operation and independency from complex and expensive equipment. In addition, due to the high level of early population of bacteria that can degrade the oil, the addition of a microbial consortium can increase the temperature of the soil and increase the activity of native soil populations.

Keywords: Bioremediation, Pilot test, Microbial consortium, Powder formulation.