

## بررسی تغییرات جمعیت میکروبی خاک در فرایند گیاه پالایی خاک آلوده به نفت خام

نادعلی علوی<sup>۱</sup>، مهدی احمدی<sup>۲</sup>، نعمت‌اله جعفرزاده<sup>۳</sup>، خبیر فلاحی‌نژاد<sup>۴</sup>، مجید هاشمی<sup>۵</sup>، مریم علمداری<sup>۶</sup>، ایمان پارسه<sup>۷</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** گیاه پالایی روش ارزان و مؤثری جهت تصفیه خاک آلوده به نفت خام می‌باشد. به منظور اجرای هرچه بهتر این فرایند، آگاهی از روند تغییرات جمعیت میکروبی ضروری است. هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی تغییرات جمعیت میکروبی در خاک ریزوسفری و شاهد بود.

**روش‌ها:** خاک مورد مطالعه به پنج قسمت تقسیم و با غلظت‌های ۰/۴۳، ۰/۸۶، ۱/۹، ۴/۱۳ و ۸/۲۷ درصد وزنی-وزنی نفت خام، آلوده گردید. سپس تیمارهایی از آن تهیه شد و تغییرات جمعیت میکروبی خاک به مدت شش ماه مورد بررسی قرار گرفت. جمعیت میکروبی و غلظت اولیه نفت خام به ترتیب به روش شمارش بشقاب‌های هتروتروفیک (Heterotrophic plate count یا HPC) و به وسیله دستگاه کروماتوگرافی گازی (Gas Chromatography یا GC) سنجش شد.

**یافته‌ها:** میانگین جمعیت میکروبی در تیمارهای کشت شده با گیاه  $7/55 \log_{10}$  واحد تشکیل کلونی (CFU یا Colony-forming unit) بر گرم) و تیمارهای حاوی مواد مغذی  $7/79 \log_{10}$  واحد تشکیل کلونی بر گرم) به طور معنی‌داری بیشتر از تیمارهای بدون گیاه  $6/29 \log_{10}$  واحد تشکیل کلونی بر گرم) و بدون مواد مغذی  $6/97 \log_{10}$  واحد تشکیل کلونی بر گرم) بود ( $P < 0/05$ ). حداکثر جمعیت میکروبی نیز در تیمارهای آلوده به غلظت  $0/86 \log_{10}$  واحد تشکیل کلونی بر گرم) به دست آمد.

**نتیجه‌گیری:** بر اساس نتایج حاصل شده، وجود گیاه و مواد مغذی به دلیل فراهم نمودن ریزمغذی برای باکتری‌ها، می‌تواند جمعیت میکروبی خاک و در نتیجه، کارایی گیاه پالایی را افزایش دهد.

**واژه‌های کلیدی:** تجزیه زیستی، آلودگی محیط، نفت خام، میکروبیولوژی خاک

**ارجاع:** علوی نادعلی، احمدی مهدی، جعفرزاده نعمت‌اله، فلاحی‌نژاد خبیر، هاشمی مجید، علمداری مریم، پارسه ایمان. **بررسی تغییرات جمعیت میکروبی خاک در فرایند گیاه پالایی خاک آلوده به نفت خام.** مجله تحقیقات نظام سلامت ۱۳۹۶؛ ۱۳ (۳): ۲۹۱-۲۸۵

پدیرش مقاله: ۱۳۹۶/۴/۲۱

دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۷/۶

### مقدمه

از جمله قوانین سختگیرانه موجود، هزینه، نوع آلودگی، غلظت آلودگی و... بستگی دارد. گیاه پالایی شامل به کارگیری گیاه جهت حذف، تثبیت، یا تجزیه آلاینده است که نسبت به سایر روش‌های پاکسازی خاک، ارزان‌تر می‌باشد (۵، ۴). می‌توان از فعالیت‌های هم‌زیستی میکروب-گیاه به عنوان یک بیوتکنولوژی ارزان در سیستم‌های کشاورزی (به جای استفاده از کودهای شیمیایی)، اکوسیستم‌های طبیعی و پاکسازی خاک‌های آلوده استفاده نمود (۶). ترشحات ریشه و مواد گیاهی تجزیه‌پذیر، منابع ترکیبات آلی را برای میکروب‌های هتروتروفیک خاک ناحیه ریشه گیاهان فراهم می‌سازد. فعالیت میکروبی در ناحیه ریزوسفری با تغییر در الگوی ریشه و فراهم‌سازی مواد مغذی برای گیاه، کیفیت و کمیت ترشحات ریشه را تعدیل می‌کند (۷). عامل تغییرات و تنوع زیاد جمعیت میکروبی خاک ریزوسفری در مقایسه با خاک بدون ریشه گیاه را می‌توان به تنوع مشخصات فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی در خاک ریزوسفری نسبت داد (۸).

افزایش فعالیت‌های صنعتی مربوط با استخراج نفت در سال‌های اخیر، منجر به آلودگی‌های زیست محیطی زیادی شده است (۱). ترکیبات نفتی کل (Total petroleum hydrocarbons یا TPH) شامل ترکیبات متنوع هیدروکربنی است که دامنه وسیعی از ترکیبات از جمله بنزین، گازوئیل و روغن‌های گرمایشی، روغن‌های سوختی تا روغن‌های روان کننده را شامل می‌شود. این ترکیبات به دلیل اثرات سوئی که بر روی سلامت انسان، محصولات کشاورزی، کیفیت خاک اراضی، آب‌های سطحی و زیرزمینی می‌گذارند، مستلزم انتخاب روش مناسبی جهت تصفیه هستند (۲). روش‌های متنوعی جهت پاکسازی ترکیبات نفتی از خاک وجود دارد که از آن جمله می‌توان به شستشوی خاک، واجذب حرارتی، شکافتن خاک، تثبیت و جامدسازی، گیاه پالایی و... اشاره کرد (۳). انتخاب یک روش به عوامل متعددی

۱- دانشجوی ارشد، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۲- دانشجوی ارشد، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اهواز، اهواز، ایران

۳- استاد، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اهواز، اهواز، ایران

۴- کارشناس ارشد، گروه مدیریت محیط زیست، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اهواز، اهواز، ایران

۵- دانشجوی دکتری، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

۶- دانشجوی کارشناسی، گروه علوم تربیتی، دانشکده علوم تربیتی، دانشگاه فرهنگیان، پردیس کوثر یاسوج، یاسوج، ایران

۷- دانشجوی دکتری، کمیته تحقیقات دانشجویی و گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: iparseh97@gmail.com

نویسنده مسؤول: ایمان پارسه

Sorghum halepense و خاک شاهد، با اعمال متغیرهایی مانند «افزودن مواد مغذی» و «درصد مختلف نفت خام» بود.

### روش‌ها

خاک مورد بررسی از اطراف واحد نمک‌زدایی اهواز ۲ و مکانی غیر آلوده و از عمق مؤثر گیاه پالایی (۳۰ سانتی‌متر) تهیه و جمع‌آوری گردید و برخی مشخصات مهم آن طبق دستورالعمل‌های معتبر (۱۳)، مورد سنجش قرار گرفت (جدول ۱). سپس در هوای آزاد به صورت لایه‌های نازکی درآمد و به خوبی کوبیده شد؛ به طوری که قطر ذرات تا حدود ۳ میلی‌متر کاهش یافت. سپس این لایه‌ها با غلظت‌های ۰/۴۳، ۰/۸۶، ۱/۹، ۴/۱۳ و ۸/۲۷ درصد وزنی - وزنی نفت خام آلوده گردید. نفت خام مورد استفاده در مطالعه، شامل نفت مخازن آسماری با دانسیته ۸۶۰ و نفت مخازن بنگستان با دانسیته ۹۰۰ گرم بر لیتر حاصل شده از میدان نفتی اهواز بود. لایه‌های آلوده شده به مدت یک ماه در دمای اتاق نگهداری شدند تا ضمن تبخیر استون، آلودگی اجزای خاک یکنواخت گردد.

در مرحله بعد، با تهیه گلدان‌هایی به قطر و ارتفاع ۲۰ سانتی‌متر، تیمارهای مختلف از نظر درصد آلودگی، مواد مغذی و شاهد یا بدون گیاه آماده شد. در هر گلدان، ۳ کیلوگرم خاک و برای هر تیمار ۳ تکرار و در مجموع، ۴۵ تیمار آماده گردید و گلدان‌ها هر ۳ روز به طور تصادفی جابه‌جا شد. ۲۰ بذر از گیاه Sorghum در گلدان‌ها (به غیر از تیمارهای شاهد) اضافه گردید که بعد از ۱۵ روز، به ۱۰ جوانه در هر گلدان کاهش داده شد. منبع نور برای گیاهان، نور طبیعی خورشید بود. دما و رطوبت نیز با تهیه سه دستگاه کولر گازی و یک دستگاه کولر آبی به ترتیب در  $5 \pm 25$  درجه سانتی‌گراد و  $10 \pm 55$  درصد کنترل گردید. کود معدنی تجاری شامل اوره (۴۶ درصد نیتروژن)، سولفات پتاسیم (۶۰ درصد پتاس) و دی‌سولفات آمونیم (۴۶ درصد فسفر و ۱۸ درصد نیتروژن)، پس از حل کردن در آب و با توجه به نیاز زراعی گیاه، به تیمارهای دریافت کننده مواد مغذی اضافه شد. مقدار اضافه شده در جدول ۲ ارائه شده است.

ریزوسفر گیاهان مختلف، توان متفاوتی در تحریک جمعیت میکروبی مسؤوّل تجزیه آلاینده دارند. نتیجه بررسی‌های انجام شده در دنیا نشان می‌دهد که گونه‌های چمنی و لگومی به دلیل سیستم ریشه‌ای - افشان، برای انجام عمل گیاه پالایی خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی مناسب هستند (۹، ۱۰). مطالعات زیادی در زمینه بررسی تغییرات جمعیت میکروبی صورت گرفته است. Lee و همکاران پژوهشی را به مدت ۸۰ روز بر روی میزان گیاه پالایی دو گونه لگومی (*Astragalus membranaceus* و *Aeschynomene indica*) و دو گونه چمنی (ارزن یا *Panicum bisulcatus* و سورف یا *Echinochloa crus-galli*) انجام دادند. طبق آنالیز میکروبی به روش شمارش بشقابی هتروتروفیک (Heterotrophic plate count یا HPC) در روزهای ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ دریافتند که تغییرات جمعیت میکروبی در خاک تیمارهای کشت شده با گیاه و خاک شاهد روند ثابتی ندارد؛ به طوری که بیشترین جمعیت میکروبی مربوط به گیاه *Echinochloa crus-galli* در روز بیستم بود (۱۱). Wang و همکاران نیز در مطالعه خود، تغییرات جمعیت میکروبی خاک تیمارهای کشت شده با سه گونه چمنی *Tall fescue*، *Panicum, eleusine indica* (L.) و *Gearth* خاک تیمار شاهد را طی فرایند گیاه پالایی به مدت ۱۵۰ روز مورد بررسی قرار دادند. آنالیز میکروبی به روش HPC در شروع کار، روز ۹۰ام و روز ۱۵۰ام صورت گرفت و نتایج نشان داد که جمعیت میکروبی در خاک تیمار شاهد کمتر از خاک تیمارهای کشت شده با گیاه می‌باشد (۱۲).

از آنجایی که یکی از مکانیسم‌های مهم کاهش ترکیبات نفتی در فرایند گیاه پالایی، تجزیه ریزوسفری با استفاده از میکروارگانیسم‌های اطراف ریشه می‌باشد؛ آگاهی از تغییرات جمعیت میکروبی در خاک اطراف ریشه گیاه، گامی اساسی در اجرای موفقیت‌آمیز فرایند گیاه پالایی در مقیاس میدانی به شمار می‌رود تا از این طریق بتوان شرایط وجود جمعیت میکروبی حداکثر را مشخص نمود و با کاربرد چنین شرایطی در مقیاس میدانی، حذف ترکیبات نفتی در خاک‌های آلوده را به طور مؤثری افزایش داد. هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی تغییرات جمعیت میکروبی در خاک کشت شده با گیاه چمنی

جدول ۱. مشخصات فیزیکی - شیمیایی خاک مورد مطالعه

شاخص	روش اندازه‌گیری	میزان اندازه‌گیری شده
pH	دوغاب خاک با استفاده از دستگاه pH متر دیجیتال	۷/۵۱
EC (دسی‌زیمنس بر متر)	با استفاده از دستگاه EC متر (از عصاره اشباع)	۱۴/۵۰
رطوبت اشباع (درصد)	کاهش وزن در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد	۴۳/۱۳
پتاسیم (میلی‌گرم بر لیتر)	دستگاه فلیم فتومتر	۱۲/۱۰
نیتروژن (درصد)	کجدال	۰/۰۵
فسفر (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	روش بی‌کربنات سدیم، اولسن	۵/۶۱
رس (درصد)	هیدرومتری	۳۵/۰۰
لای (درصد)	هیدرومتری	۴۷/۰۰
شن (درصد)	هیدرومتری	۱۸/۰۰
آهک (درصد)	هیدرومتری	۴۱/۰۰

EC: Electrical conductivity

جدول ۲. میزان مواد مغذی مورد استفاده

گیاه	پتاسیم (کیلوگرم بر هکتار)	فسفر (کیلوگرم بر هکتار)	نیتروژن (کیلوگرم بر هکتار)
Sorghum halepense	۱۰۰ (هنگام کشت)	۱۰۰ (هنگام کشت)	۱۰۰ (هنگام کشت)
			۵۰ (بعد از هشت برگ)
			۵۰ (بعد از گل‌دهی)

نفت خام (۴۳ درصد) و کمترین آن ( $\log_{10}$  ۳/۲ واحد تشکیل کلونی بر گرم) به تیمارهای شاهد با آلودگی ۸/۲۷ درصد وزنی- وزنی نفت خام (۸/۲۷ درصد) اختصاص یافت (شکل ۱). بر اساس نتایج آزمون‌های ANOVA و Tukey، میانگین جمعیت میکروبی در کل تیمارهای کشت شده با گیاه Sorghum ( $\log_{10}$  ۴/۸۲ واحد تشکیل کلونی بر گرم) به طور معنی‌داری بیشتر از میانگین میکروبی در تیمارهای شاهد ( $\log_{10}$  ۳/۸۵ واحد تشکیل کلونی بر گرم) بود ( $P < 0.05$ ). همچنین، میانگین جمعیت میکروبی در پایان ماه در تیمارهای دریافت کننده مواد مغذی و تیمارهای بدون دریافت مواد مغذی به ترتیب ۵/۱۲ و ۴/۱۹ واحد تشکیل کلونی بر گرم به دست آمد که اختلاف معنی‌داری را با هم نشان داد ( $P < 0.05$ ).

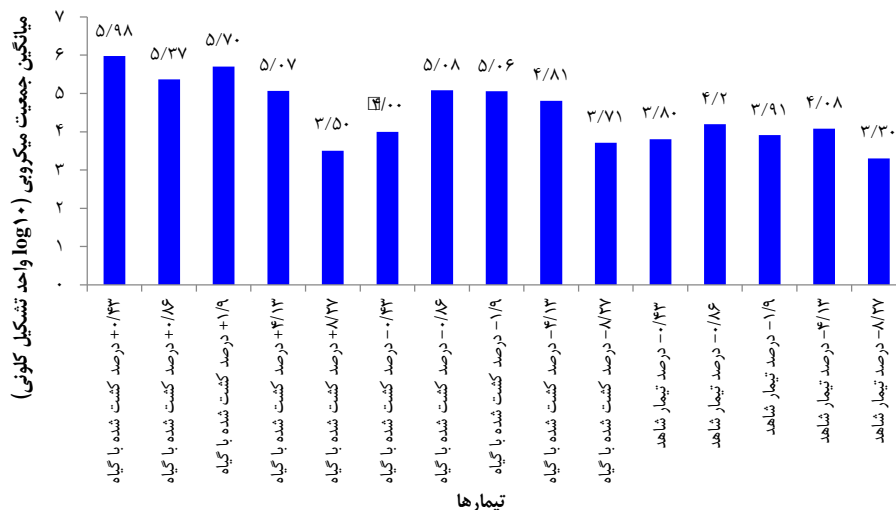
حداقل جمعیت میکروبی در پایان ماه سوم مربوط به تیمارهای کشت شده با Sorghum و دریافت کننده مواد مغذی و آلوده به غلظت ۸/۲۷ درصد وزنی- وزنی نفت خام با میانگین جمعیت میکروبی  $\log_{10}$  ۵/۹۷ واحد تشکیل کلونی بر گرم بود (شکل ۲). حداکثر جمعیت میکروبی در پایان این ماه به تیمارهای کشت شده با Sorghum و دریافت کننده مواد مغذی و آلوده به غلظت ۰/۸۶ درصد وزنی- وزنی نفت خام اختصاص داشت که میانگین جمعیت میکروبی آن  $\log_{10}$  ۷/۲۳۷ واحد تشکیل کلونی بر گرم به دست آمد. در این ماه، میانگین جمعیت میکروبی در تیمارهای دریافت کننده مواد مغذی ( $\log_{10}$  ۷/۱۵ واحد تشکیل کلونی بر گرم) به طور معنی‌داری بیشتر از تیمارهای بدون مواد مغذی ( $\log_{10}$  ۷/۴۷ واحد تشکیل کلونی بر گرم) بود ( $P < 0.05$ ).

TPH خاک مطابق روش 8015B USEPA (۱۴) و با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC یا Gas Chromatography) (شرکت Agilent، آمریکا) که مجهز به آشکارساز Flame ionization detector (FID) بود، تعیین گردید. جمعیت باکتری‌های هتروترئوفیک خاک تیمارهای مختلف نیز طبق روش استاندارد (۱۵) و با استفاده از تکنیک HPC مورد سنجش قرار گرفت. بدین منظور، از نمونه سوسپانسیون خاک (که از حل کردن ۱ گرم خاک در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر تهیه شده بود)، یک‌سری رقت ( $10^{-2}$  تا  $10^{-7}$ ) تهیه و از هر رقت، ۱ میلی‌لیتر نمونه درون پتری دیش استریل ریخته شد و سپس محیط کشت آماده شده Reasoner's 2A agar (R2A) به آن اضافه گردید. ظروف به مدت ۲ تا ۳ روز در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوباته گردید.

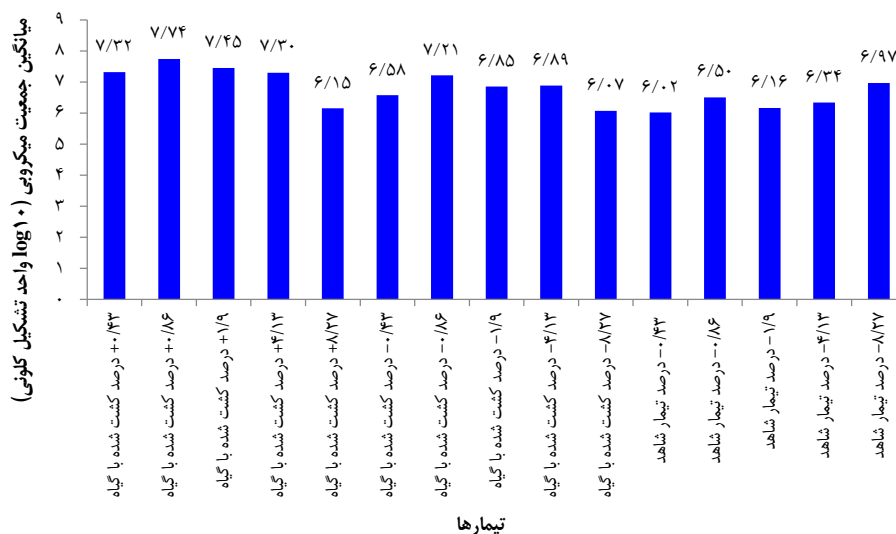
داده‌ها با استفاده از آزمون‌های ANOVA و Independent t نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۷ (SPSS Inc., Chicago, IL) و Excel نسخه ۲۰۱۰ (جهت رسم نمودار) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.  $P < 0.05$  به عنوان سطح معنی‌داری داده‌ها در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

در پایان ماه اول، بیشترین میانگین جمعیت میکروبی [ $\log_{10}$  ۵/۹۸ واحد تشکیل کلونی (Colony-forming unit یا CFU) بر گرم] به تیمارهای کشت شده با Sorghum و دریافت کننده مواد مغذی و آلوده به غلظت ۰/۴۳ وزنی- وزنی



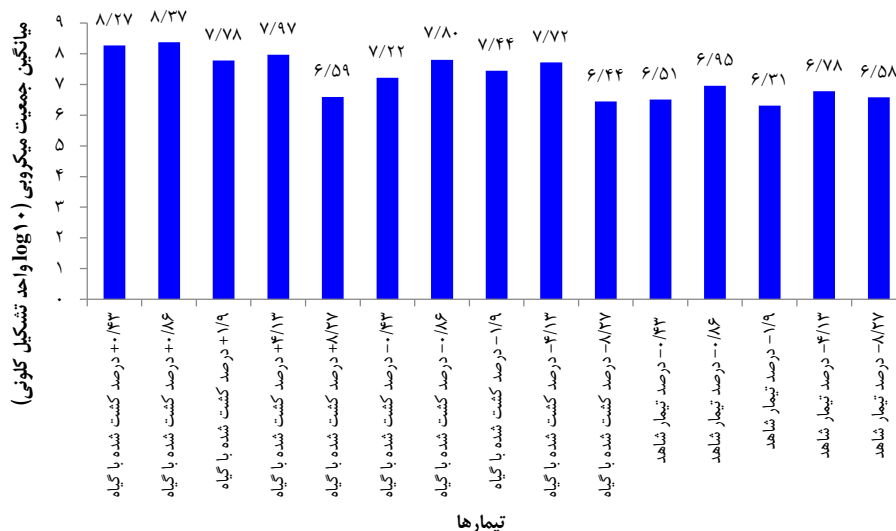
شکل ۱. میانگین جمعیت میکروبی تیمارهای مختلف در ماه اول علامت + و - به ترتیب نشان دهنده دریافت و عدم دریافت مواد مغذی است.



شکل ۲. میانگین جمعیت میکروبی تیمارهای مختلف در ماه سوم  
علامت + و - به ترتیب نشان دهنده دریافت و عدم دریافت مواد مغذی است.

واحد تشکیل کلونی بر گرم) اختصاص یافت (شکل ۳). در پایان ماه نیز میانگین جمعیت میکروبی در کل تیمارهای کشت شده با گیاه  $7/55 \log_{10}$  واحد تشکیل کلونی بر گرم) به طور معنی داری بیشتر از میانگین میکروبی در تیمارهای شاهد  $6/62 \log_{10}$  واحد تشکیل کلونی بر گرم) بود. همچنین، میانگین جمعیت میکروبی در پایان ماه ششم در تیمارهای دریافت کننده مواد مغذی و بدون مواد مغذی به ترتیب  $7/9 \log_{10}$  و  $6/97 \log_{10}$  واحد تشکیل کلونی بر گرم به دست آمد که اختلاف معنی دار بین دو گروه را نشان می دهد ( $P < 0/05$ ).

نتایج آزمون Independent t نشان داد که میانگین جمعیت میکروبی در کل تیمارهای کشت شده با گیاه  $6/93 \log_{10}$  واحد تشکیل کلونی بر گرم) به طور معنی داری بیشتر از میانگین میکروبی در تیمارهای شاهد  $6/23 \log_{10}$  واحد تشکیل کلونی بر گرم) بود. بیشترین میانگین جمعیت میکروبی در پایان ماه ششم به تیمارهای کشت شده با Sorghum و دریافت کننده مواد مغذی و آلوده به غلظت ۸۶ درصد وزنی- وزنی نفت خام  $8/37 \log_{10}$  واحد تشکیل کلونی بر گرم) و کمترین آن به تیمارهای شاهد با آلودگی ۱/۹ درصد وزنی- وزنی نفت خام  $6/31 \log_{10}$



شکل ۳. میانگین جمعیت میکروبی تیمارهای مختلف در ماه ششم  
علامت + و - به ترتیب نشان دهنده دریافت و عدم دریافت مواد مغذی است.

## بحث

میکروبی سایر تحقیقات گیاه پالایی و در بعضی موارد نیز بیشتر بود. تفاوت در جمعیت میکروبی پژوهش حاضر با سایر مطالعات می‌تواند به متغیرهای زیادی از جمله نوع گیاه، وضعیت کوددهی، شرایط آب و هوایی، نوع بافت خاک و... مربوط باشد. آنچه مسلم است این که آگاهی از میزان جمعیت میکروبی و ایجاد شرایط مناسب جهت تحریک حداکثر جمعیت میکروبی، می‌تواند در بهبود کارایی فرایند گیاه پالایی مؤثر واقع گردد؛ چرا که یکی از مکانیسم‌های مهم فرایند گیاه پالایی، تجزیه ریزوسفری می‌باشد که در آن میکروب‌های ناحیه ریشه گیاه، باعث حذف آلاینده‌ها از محیط زیست می‌گردد.

## نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که گیاه در تحریک جمعیت میکروبی به طور مؤثری مفید است؛ به طوری که جمعیت میکروبی در تیمارهای کشت شده با گیاه به طور معنی‌داری بیشتر از تیمارهای شاهد بود. ریشه گیاهان با ترشح ترکیبات آلی مانند گلوکز، آنزیم و کربوهیدرات‌های پیچیده، منبع مناسبی از کربن و انرژی را برای میکروارگانیسم‌های ناحیه ریشه فراهم می‌سازد (۱۳). همچنین، بر اساس نتایج به دست آمده، افزودن مواد مغذی به طور مؤثری سبب تحریک جمعیت میکروبی و در نتیجه، بهبود کارایی گیاه پالایی می‌شود. از طرف دیگر، در مطالعه حاضر ارتباط مشخص و ثابتی بین میزان درصد آلودگی خاک و جمعیت میکروبی مشاهده نگردید که دلیل این امر را می‌توان به عواملی همچون سمی بودن غلظت بالای آلودگی در ماه‌های نخست برای میکروب‌ها، سازگار شدن میکروب‌ها با غلظت‌های بالای آلودگی با گذشت زمان و کمتر شدن مواد هیدروکربنی مورد نیاز میکروب‌ها در غلظت‌های کمتر آلودگی با گذشت زمان نسبت داد.

## تشکر و قدردانی

بدین وسیله از شرکت مناطق نفت‌خیز جنوب به جهت حمایت مالی، از مرکز تحقیقات کشاورزی استان خوزستان به دلیل در اختیار قرار دادن گلخانه و همچنین، از کارکنان آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه جندی شاپور اهواز که در انجام آزمایش‌های پژوهش همکاری و مشارکت نمودند، تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

اشکال مختلفی از میکروارگانیسم‌ها در خاک ریزوسفری (ناحیه اطراف ریشه گیاه) مشاهده می‌شوند که این میکروب‌ها نقش مهمی در اکوسیستم و تصفیه خاک ایفا می‌کنند (۱۶). هدف اصلی از انجام مطالعه حاضر، بررسی تغییرات جمعیت میکروبی در ناحیه ریزوسفر (اطراف ریشه گیاه) و خاک شاهد (بدون گیاه) در مدت شش ماه بود. علاوه بر این، تأثیر متغیرهایی مانند «مواد مغذی» و «درصد نفت خام خاک» بر روی جمعیت میکروبی مورد بررسی قرار گرفت. بررسی تغییرات جمعیت میکروبی در فرایند گیاه پالایی به دلیل اثر مفید میکروب‌ها در تجزیه آلاینده‌های خاک، از اهمیت ویژه‌ای در فرایند گیاه پالایی برخوردار است.

مطالعات زیادی نیز در این زمینه صورت گرفته است. تفاوت مهم تحقیق حاضر با سایر پژوهش‌های مرتبط، نوع بافت خاک مورد مطالعه می‌باشد که از نوع رسی و شور بود و می‌تواند تأثیر منفی در تحریک جمعیت میکروبی داشته باشد. Fan و همکاران در تحقیق خود، جمعیت میکروبی ناحیه ریشه گیاه Alfalfa در یک خاک آلوده به ۰/۰۵ درصد پیرن (Pyrene) را پس از دو ماه با استفاده از روش HPC اندازه‌گیری کردند. میانگین جمعیت میکروبی در خاک ریزوسفری مورد مطالعه آن‌ها حدود  $10^7 \times 15$  واحد تشکیل کلونی بر گرم به دست آمد که بیشتر از جمعیت میکروبی تیمارهای بدون گیاه بود (۱۷). Wang و همکاران میانگین لگاریتم جمعیت میکروبی ریزوسفری سه گیاه Eleusine Pannicum indica (L.) Gearth و Tall fescue را در ماه سوم مطالعه خود، ۵/۵ واحد تشکیل کلونی بر گرم برآورد نمودند (۱۸). نتایج پژوهش Parrish و همکاران گزارش کرد که جمعیت میکروبی ریزوسفری تجزیه کننده هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی پس از گذشت ۱۲ ماه از رشد گیاه، ۱۰۰ برابر بیشتر از تیمارهای شاهد (بدون گیاه) بود. همچنین، آن‌ها دریافتند که با افزایش فاصله از ریزوسفر گیاه، تجزیه فانترن کاهش می‌یابد (۱۹).

در مطالعه حاضر نیز با گذشت زمان و در پایان ماه ششم، جمعیت میکروبی تیمارها به روند رو به رشد خود ادامه داد؛ هرچند این ضریب رشد در مقایسه با ماه سوم (نسبت به ماه اول) کمتر بود. دلیل این امر را می‌توان به کاهش مواد غذایی هیدروکربنی با گذشت زمان برای میکروب‌ها ارتباط داد. جمعیت میکروبی تیمارهای مختلف در بررسی حاضر، تا حدودی در محدوده میزان جمعیت

## References

1. Doni S, Macci C, Peruzzi E, Arenella M, Ceccanti B, Masciandro G. In situ phytoremediation of a soil historically contaminated by metals, hydrocarbons and polychlorobiphenyls. *J Environ Monit* 2012; 14(5): 1383-90.
2. Koch M, Liebich A, Win T, Nehls I. Certified reference materials for the determination of mineral oil hydrocarbons in water, soil and waste [Online]. [cited 2005]; Available from: URL: [http://cordis.europa.eu/project/rcn/67213\\_en.html](http://cordis.europa.eu/project/rcn/67213_en.html).
3. Nathanail CP, Bardos RP. Reclamation of contaminated land. New York, NY: John Wiley & Sons; 2005.
4. Dermont G, Bergeron M, Mercier G, Richer-Lafleche M. Soil washing for metal removal: A review of physical/chemical technologies and field applications. *J Hazard Mater* 2008; 152(1): 1-31.
5. Huang XD, El-Alawi Y, Gurska J, Glick BR, Greenberg BM. A multi-process phytoremediation system for decontamination of persistent total petroleum hydrocarbons (TPHs) from soils. *Microchem J* 2005; 81(1): 139-47.
6. Vance CP. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. *Plant nutrition in a world of declining renewable resources*. *Plant Physiol* 2001; 127(2): 390-7.
7. Kennedy A. The rhizosphere and spermosphere. In: Sylvia DM, Editor. Principles and applications of soil microbiology. upper saddle river, NJ: Prentice Hall, 1998. p. 389-407.
8. Toal ME, Yeomans C, Killham K, Meharg AA. A review of rhizosphere carbon flow modelling. *Plant and Soil* 2000; 222(1-2): 263-81.
9. Pradhan SP, Conrad JR, Paterek JR, Srivastava VJ. Potential of phytoremediation for treatment of PAHs in Soil at MGP sites.

- Journal of Soil Contamination 1998; 7(4): 467-80.
10. Wiltse CC, Rooney WL, Schwab CZ, Banks MK. Greenhouse evaluation of agronomic and crude oil-phytoremediation potential among alfalfa genotypes. *J Environ Qual* 1996; 27(1): 169-73.
  11. Lee SH, Lee WS, Lee CH, Kim JG. Degradation of phenanthrene and pyrene in rhizosphere of grasses and legumes. *J Hazard Mater* 2008; 153(1-2): 892-8.
  12. Wang J, Xu H, Guo S. Isolation and characteristics of a microbial consortium for effectively degrading phenanthrene. *Petroleum Sci* 2007; 4(3): 68-75.
  13. Van Reeuwijk L. Procedures for soil analysis: Wageningen, Netherlands: International Soil Reference and Information Centre; 1993.
  14. United States Environmental Protection Agency. Total petroleum hydrocarbons (TPH) as gasoline and diesel: SW-846 method 8015B [Online]. [cited 1996]; Available from: URL: <https://www.epa.gov/quality/total-petroleum-hydrocarbons-tph-gasoline-and-diesel-sw-846-method-8015b-revision-2-december>.
  15. American Public Health Association. APHA. Standard methods for examination of water and wastewater. In: Eaton AD, Franson AH, Editors. Standard methods for the examination of water & wastewater. Washington, DC: American Public Health Association; 2005.
  16. Shim H, Chauhan S, Ryoo D, Bowers K, Thomas SM, Canada KA, et al. Rhizosphere competitiveness of trichloroethylene-degrading, poplar-colonizing recombinant bacteria. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66(11): 4673-8.
  17. Fan S, Li P, Gong Z, Ren W, He N. Promotion of pyrene degradation in rhizosphere of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Chemosphere* 2008; 71(8): 1593-8.
  18. Wang J, Zhang Z, Su Y, He F, Song H. Phytoremediation of petroleum polluted soil. *Pet Sci* 2008; 5(2): 167-71.
  19. Parrish ZD, Banks MK, Schwab AP. Effect of root death and decay on dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of yellow sweet clover and tall fescue. *J Environ Qual* 2005; 34(1): 207-16.

## Assessment of Microbial Population Changes in the Phytoremediation of Soil Contaminated with Crude Oil

Nadali Alavi<sup>1</sup>, Mehdi Ahmadi<sup>2</sup>, Nematollah Jafarzadeh<sup>3</sup>, Kheibar Fallahinejad<sup>4</sup>,  
Majid Hashemi<sup>5</sup>, Maryam Alamdari<sup>6</sup>, Iman Parseh<sup>7</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Phytoremediation is an effective and cost-effective technique for the treatment of polluted soil. To better implement phytoremediation, it is necessary to know the microbial population variation trend. In the present study, microbial population changes were evaluated in rhizosphere and control soil.

**Methods:** The experimental soil was divided into 5 parts, and was polluted with 0.43, 0.86, 1.9, 4.13, and 8.27% (w/w) concentrations of Total Petroleum Hydrocarbons (TPHs). Microbial population variation and initial crude oil concentration were measured using heterotrophic plate count (HPC) and gas chromatography (GC) methods, respectively.

**Findings:** According to the results, the average microbial population in planted (7.55 log<sub>10</sub>CFU/g) and with nutrient treatments (7.79 log<sub>10</sub>CFU/g) were significantly ( $P < 0.05$ ) higher than the treatments without plants (6.629 log<sub>10</sub>CFU/g) and without nutrients (6.97 log<sub>10</sub>CFU/g). Moreover, the maximum microbial populations were observed in treatments polluted with 0.86% (w/w) of TPHs (8.372 log<sub>10</sub>CFU/g).

**Conclusion:** Due to their micronutrient secretion for bacteria, plants and nutrients can increase the microbial population and efficiency of phytoremediation.

**Keywords:** Biodegradation, Environmental pollution, Petroleum, Soil microbiology

**Citation:** Alavi N, Ahmadi M, Jafarzadeh N, Fallahinejad K, Hashemi M, Alamdari M, et al. **Assessment of Microbial Population Changes in the Phytoremediation of Soil Contaminated with Crude Oil.** J Health Syst Res 2017; 13(3): 285-91.

1- Associate Professor, Department of Environmental Health Engineering, School of Health, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2- Associate Professor, Department of Environmental Health Engineering, School of Health, Ahvaz University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

3- Professor, Department of Environmental Health Engineering, School of Health, Ahvaz University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

4- Department of Management of Environment, School of Agriculture and Natural Resources, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran

5- PhD Candidate, Department of Environmental Health Engineering, School of Health, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

6- Department of Educational Sciences, School of Educational Sciences, Farhangian University, Kowsar Pardis, Yasuj, Iran

7- PhD Candidate, Student Research Committee AND Department of Environmental Health Engineering, School of Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

**Corresponding Author:** Iman Parseh, Email: iparseh97@gmail.com