

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرجان
دانشکده مهندسی آب و خاک

پایان نامه جهت دریافت مدرک کارشناسی ارشد در رشته مهندسی علوم خاک- بیوتکنولوژی خاک

زیست پالایی برخی از هیدروکربن های آروماتیک نفتی به وسیله کوزه های باکتریایی جدا شده از خاک های آلوده

پژوهش و نگارش:

سید محسن سنبلستان

اساتید راهنما:

دکتر محسن علمائی

دکتر مهران هودجی

استاد مشاور:

دکتر آرزو طهمورث پور

۱۳۹۰

تعهدنامه پژوهشی

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)‌های تحصیلی دانشجویان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان مبین بخشی از فعالیت‌های علمی- پژوهشی بوده و همچنین با استفاده از اعتبارات دانشگاه انجام می‌شود، بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش‌آموختگان این دانشگاه نسبت به موارد ذیل متعهد می‌شوند:

۱) قبل از چاپ پایان‌نامه (رساله) خود، مراتب را قبلاً بطور کتبی به مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه اطلاع داده و کسب اجازه نمایند.

۲) در انتشار نتایج پایان‌نامه (رساله) در قالب مقاله، همایش، اختراع و اکتشاف و سایر موارد ذکر نام دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان الزامی است.

۳) انتشار نتایج پایان‌نامه (رساله) باید با اطلاع و کسب اجازه از استاد راهنما صورت گیرد.

اینجانب **سید محسن سنبلستان** دانشجوی رشته **مهندسی علوم خاک- بیوتکنولوژی خاک** مقطع **کارشناسی ارشد** تعهدات فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده و به آن ملتزم می‌شوم.



این پایان نامه با حمایت مالی و پشتیبانی شرکت پالایش نفت اصفهان اجرا شده است.

خدایا
به تو پناه می برم از این که گمراه کنم و یا گمراه کردم، بلغزانم و یا بلغزدم، تسم کنم یا تسم بینم، به نادانی کشانم و یا خود چار آن کردم.
خدایا
مرا با علمی که به من آموختی سودمند گردان و مرا به علمی ره بنمون ساز که مرا سودمند افتد. خدایا بر مرتب علم و آگاهی من بیفزای.
خدایا
به تو پناه می برم از علمی که سودمند نیست و از قلبی که خشوع و انعطاف در برابر حق، بدان راه ندارد و از هوس که سیر و اشباع
نی کرد و از دعائی که اجابت نمی شود.

تقدیم به

محضروبی عصر (عج) که حضورش آشنای همیشه ماست

پنچین تقدیم به

پدر و مادر عزیزم

و همسر مهربانم.

"هدیه و تشکر"

سپاس خداوندیکبار که همیشه و در همه لحظات زندگی اولین یارم بوده، هست و خواهد بود. او را کلامم که توفیق عنایت فرمود تا این تحقیق را به اتمام برسانم.

بر دستان پر مهر مادر مهربان و پدرزحمتم که بیچگاه لطف و مکلشان را از من دریغ ننمودند، بوسه میزنم و از آنها برای تمام محبت ایشان صمیمانه سپاسگزارم.

ایجناب مراتب سپاس و امتنان قلبی خود را استید محترم آقای دکتر محسن علانی و آقای دکتر مهران بودی که قبول زحمت فرمودند و راهنمایی این پایان نامه را قبل نمودند ابراز می دارم. همچنین از سرکار خانم دکتر آرزو طهمورث پور بخاطر خدمات بی شائبه ایشان در امر مشاورت این پایان نامه قدردانی بعمل می آورم.

از ریاست محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان جناب آقای دکتر فروغی بخاطر موافقت ایشان برای استفاده از فضای پژوهشی و تجهیزات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی تشکر و قدردانی بعمل می آورم.

از سرکار خانم مهندس قاسمی مسئول محترم آزمایشگاه بیولوژی خاک، جناب آقای دکتر محمد مهدی قیصری مدیر محترم، بخش توسعه و تجهیزات و جناب آقای مهندس امینی مدیر محترم اداره آزمایشگاه های کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان که در فرایم نمودن امکانات مختلف جهت انجام و آماده سازی این پایان نامه، ایجناب را یاری نمودند سپاسگزار می نمایم.

از مدیران، استاد و دوستان عزیز، در شرکت پالایش نفت اصفهان که در انجام این پایان نامه همکاری نموده اند، خصوصاً جناب آقای مهندس صالحی مسئول محیط زیست، جناب آقای مهندس ناظم مدیر بخش تحقیق و توسعه و جناب آقای مهندس هدایتی کارشناس، بخش تحقیق و توسعه کمال تشکر و قدردانی را دارم.

و در نهایت از همسر مهربان و فریفته ام که از آغاز راه همواره مشوق، پشتیبان و به کام من بوده و کمک های شایانی در بر مگردانید این پایان نامه نموده، تشکر ویژه می نمایم.

سید محسن سنبلستان

تابستان ۱۳۹۰

چکیده

پساب پالایشگاه‌های نفت، در زمره مهمترین پساب‌های آلاینده محیط زیست می‌باشند. در اغلب این پساب‌ها مقادیر زیادی هیدروکربن‌های آروماتیک نفتی وجود دارد که برای تصفیه آنها اغلب از روش زیست پالایی استفاده می‌شود. نفتالن و فنانترن از مهمترین هیدروکربن‌های آروماتیک نفتی هستند. از آنجا که نفتالن و فنانترن در مقادیر زیاد برای محیط‌زیست و انسان سمی محسوب می‌گردد، حذف آنها از پساب‌ها و خاک‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. هدف از این تحقیق بررسی امکان وجود باکتری‌های حذف کننده نفتالن و فنانترن در خاک آلوده و جداسازی این باکتری‌ها برای استفاده در فرآیند تجزیه زیستی نفتالن و فنانترن می‌باشد. برای انجام این تحقیق نمونه‌های خاک آلوده به نفتالن و فنانترن از خاک‌های پالایشگاه نفت اصفهان برداشته شد. از طریق جداسازی باکتری‌های بومی که در خاک وجود داشتند، اقدام به شناسایی آنها، سازش‌پذیر کردن جدایه‌ها به نفتالن و فنانترن و حذف فنانترن و نفتالن گردید. پارامترهای pH، EC، بافت، مواد آلی، نیتروژن، فسفر و پتاسیم در نمونه‌های خاک اندازه‌گیری شد. نتایج حاکی از وجود باکتری‌های تجزیه کننده نفتالن و فنانترن در خاک‌های آلوده بود. تمامی جدایه‌های مقاوم شناسایی شده، باسیل‌های گرم مثبت بودند که مقاومترین جدایه، توانایی رشد تا میزان ۹۶ میلی‌گرم بر لیتر نفتالن و ۶۴ میلی‌گرم بر لیتر فنانترن را داشت. مقاوم‌ترین جدایه کورینه باکتریم (زئروسیس) بود. باکتری کورینه باکتریم پس از ۱۲۰ ساعت ۶۱/۶۴ درصد از ۱۷ میلی‌گرم بر لیتر نفتالن و پس از ۱۳۲ ساعت ۵۹/۵۱ درصد از ۱۶/۵ میلی‌گرم فنانترن را تجزیه کرد. مهمترین نتیجه این تحقیق آن است که با بکارگیری این جدایه‌ها به تنهایی و یا به صورت ترکیبی از چند جدایه سازگار شده با مقدار بالای نفتالن و فنانترن می‌توان میزان نفتالن و فنانترن موجود در پساب و خاک را در طی زمان کوتاهتری کاهش داد.

کلمات کلیدی: هیدروکربن‌های آروماتیک نفتی، زیست پالایی، باکتری‌های مقاوم، خاک‌های آلوده

فهرست مطالب

صفحه

عنوان

فصل اول: مقدمه

مقدمه ۲

فصل دوم: بررسی منابع

۱-۲ محیط زیست ۶

۱-۱-۲ نگاه‌ی به وضعیت محیط زیست ۶

۲-۲ آلودگی محیط زیست ۸

۱-۲-۲ تعریف محیط زیست ۹

۲-۲-۲ انواع محیط زیست ۱۰

۱-۲-۲-۲ محیط زیست طبیعی ۱۰

۲-۲-۲-۲ محیط زیست انسانی ۱۱

۳-۲-۲ تعریف آلودگی ۱۱

۴-۲-۲ تعریف آلودگی محیط زیست ۱۱

۳-۲ انواع آلودگی محیط زیست ۱۱

۱-۳-۲ آلودگی هوا ۱۱

۲-۳-۲ آلودگی آب ۱۲

۳-۳-۲ آلودگی صوتی ۱۲

۴-۳-۲ آلودگی خاک ۱۳

۴-۲ آلاینده‌های خاک ۱۳

۱-۴-۲ آلاینده‌های کشاورزی ۱۳

۲-۴-۲ آلاینده‌های صنعتی ۱۴

۳-۴-۲ آلودگی خاک به وسیله عوامل بیولوژیکی بیماری‌زا ۱۵

۴-۴-۲ آلودگی خاک به وسیله سموم شیمیایی ۱۵

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۱۶	۵-۴-۲ آلودگی خاک به وسیله ترکیبات معدنی
۱۷	۶-۴-۲ آلودگی خاک به وسیله منابع نفتی
۱۸	۱-۶-۴-۲ اثرات آلاینده‌های نفتی
۱۹	۵-۲ نفت
۱۹	۱-۵-۲ ترکیب شیمیایی نفت
۲۰	۲-۵-۲ گروه‌های تشکیل دهنده نفت
۲۰	۱-۲-۵-۲ هیدروکربن‌ها
۲۰	۲-۲-۵-۲ هیدروکربن‌های آلیفاتیک سیرشده
۲۰	۳-۲-۵-۲ هیدروکربن‌های حلقوی سیرشده
۲۱	۴-۲-۵-۲ هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی
۲۱	۵-۲-۵-۲ هیدروکربن‌های آلیفاتیک سیرنشده
۲۱	۶-۲-۵-۲ سایر هیدروکربن‌ها
۲۱	۷-۲-۵-۲ غیرهیدروکربن‌ها
۲۲	۶-۲ روش‌های حذف آلودگی‌های نفتی از خاک
۲۲	۱-۶-۲ روش‌های از بین‌برنده آلودگی نفتی
۲۲	۱-۱-۶-۲ زیست‌پالایی
۲۴	۲-۱-۶-۲ تصفیه زمینی
۲۶	۳-۱-۶-۲ دفع و تجزیه بیولوژیکی
۲۶	۴-۱-۶-۲ تهیه کمپوست
۲۶	۵-۱-۶-۲ توده‌های بیولوژیکی مهندسی
۲۷	۶-۱-۶-۲ تصفیه از طریق سوزاندن
۲۹	۷-۱-۶-۲ تهویه بیولوژیکی
۲۹	۸-۱-۶-۲ گیاه‌پالایی

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۳۱	۲-۶-۲ روش‌های انتقال جرم
۳۱	۱-۲-۶-۲ شستشوی خاک
۳۲	۲-۲-۶-۲ استخراج آلاینده‌ها با استفاده از حلال‌ها
۳۳	۳-۶-۲ روش جامد و تثبیت‌سازی
۳۵	۷-۲ اهمیت حذف آلودگی نفتی به روش زیست‌پالایی
۳۷	۱-۷-۲ عوامل موثر بر زیست‌پالایی
۳۸	۱-۱-۷-۲ در دسترس بودن اکسیژن
۳۸	۲-۱-۷-۲ مقدار ماده‌ی آلی
۳۹	۳-۱-۷-۲ میزان نیتروژن
۳۹	۴-۱-۷-۲ دما
۳۹	۵-۱-۷-۲ pH
۳۹	۶-۱-۷-۲ شوری
۴۰	۷-۱-۷-۲ میزان رطوبت
۴۰	۸-۱-۷-۲ سازش
۴۱	۹-۱-۷-۲ بیوسورفکتانت‌ها
۴۱	۸-۲ اهمیت بررسی نفتالن و فنانترن
۴۳	۹-۲ نفتالن
۴۳	۱۰-۲ فنانترن
۴۴	۱۱-۲ باکتری‌های تجزیه‌کننده نفتالن و فنانترن
۴۴	۱-۱۱-۲ سدوموناس
۴۴	۲-۱۱-۲ کورینه باکتریم
۴۵	۳-۱۱-۲ مایکوباکتریم
۴۵	۴-۱۱-۲ باسیلوس

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
	فصل سوم: مواد و روش‌ها
۴۸	۱-۳ دستگاه‌های به کار رفته
۴۸	۲-۳ مواد مورد استفاده
۴۹	۳-۳ روش تهیه محیط‌های کشت
۴۹	۱-۳-۳ محیط کشت مایع نفتالن‌دار
۴۹	۲-۳-۳ محیط کشت مایع فنانترون‌دار
۵۰	۳-۳-۳ محیط کشت جامد نفتالن‌دار
۵۰	۴-۳-۳ محیط کشت جامد فنانترون‌دار
۵۰	۵-۳-۳ محیط کشت نوترینت آگار
۵۰	۶-۳-۳ محیط کشت نوترینت براث
۵۰	۷-۳-۳ محیط کشت SIM
۵۱	۸-۳-۳ محیط کشت احیاء نیترات
۵۱	۴-۳ روش تهیه استانداردهای لازم
۵۱	۱-۴-۳ استانداردهای نفتالن
۵۲	۲-۴-۳ استانداردهای فنانترون
۵۳	۳-۴-۳ استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند
۵۳	۵-۳ تهیه معرف‌های به کار رفته
۵۳	۱-۵-۳ معرف فنل رد
۵۳	۲-۵-۳ معرف اسید سولفانیلیک
۵۳	۳-۵-۳ معرف آلفا نفتیل آمین
۵۳	۶-۳ طرز تهیه رنگ‌های رنگ آمیزی
۵۳	۱-۶-۳ کریستال ویوله
۵۴	۲-۶-۳ لوگول

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۵۴	۳-۶-۳ اتانول ۹۵٪
۵۴	۳-۶-۴ سافرانین
۵۴	۳-۷ نمونه برداری خاک
۵۶	۳-۸ اندازه گیری خصوصیات خاک
۵۶	۳-۸-۱ هدایت الکتریکی عصاره اشباع خاک
۵۶	۳-۸-۲ pH خاک
۵۶	۳-۸-۳ ماده آلی خاک
۵۷	۳-۸-۴ بافت نمونه های خاک
۵۷	۳-۸-۵ نیتروژن خاک
۵۷	۳-۸-۶ فسفر خاک
۵۷	۳-۸-۷ پتاسیم خاک
۵۸	۳-۹ اندازه گیری غلظت هیدروکربن های نفتی خاک
۵۸	۳-۱۰ روش جداسازی باکتری های تجزیه کننده
۵۸	۳-۱۰-۱ روش جداسازی باکتری های تجزیه کننده نفتالن
۵۹	۳-۱۰-۲ روش جداسازی باکتری های تجزیه کننده فناترن
۵۹	۳-۱۱ روش تعیین حداقل غلظت محدود کننده از رشد (MIC)
۵۹	۳-۱۱-۱ حداقل غلظت محدود کننده از رشد نفتالن
۶۰	۳-۱۱-۲ حداقل غلظت محدود کننده از رشد فناترن
۶۰	۳-۱۲ روش انتخاب مقاومترین جدایه از میان کلیه جدایه های جدا شده
۶۰	۳-۱۳ شناسایی میکروارگانیسم های مقاوم
۶۰	۳-۱۳-۱ روش رنگ آمیزی گرم
۶۱	۳-۱۳-۲ آزمون های مورد استفاده برای شناسایی باکتری ها
۶۱	۳-۱۳-۱-۲ حلالیت در پتاس

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۶۱ ۲-۲-۱۳-۳ آزمون کاتالاز
۶۲ ۳-۲-۱۳-۳ آزمون احیای نیترات
۶۴ ۴-۲-۱۳-۳ آزمون اوره آز
۶۵ ۵-۲-۱۳-۳ آزمون تحرک
۶۶ ۱۴-۳ منحنی رشد باکتری‌های مقاوم
۶۶ ۱۵-۳ منحنی تجزیه نفتالن
۶۷ ۱۶-۳ منحنی تجزیه فناترن

فصل چهارم: نتایج و بحث

۷۰ ۱-۴ نتایج بررسی میزان آلاینده‌ها در خاک منطقه
۷۰ ۱-۱-۴ غلظت کل هیدروکربن‌های نفتی
۷۱ ۲-۱-۴ غلظت برخی از هیدروکربن‌های چندحلقه‌ای نفتی
۷۲ ۲-۴ نتایج تجزیه خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک
۷۲ ۱-۲-۴ pH نمونه‌های خاک
۷۲ ۲-۲-۴ هدایت الکتریکی عصاره اشباع خاک
۷۳ ۳-۲-۴ مواد آلی خاک
۷۴ ۴-۲-۴ بافت خاک
۷۵ ۵-۲-۴ نیتروژن خاک
۷۶ ۶-۲-۴ فسفر خاک
۷۶ ۷-۲-۴ پتاسیم خاک
۷۷ ۳-۴ نتایج تجزیه نفتالن
۷۷ ۱-۳-۴ مشخصات مورفولوژیکی جدایه‌ها
۷۷ ۱-۱-۳-۴ مشخصات ماکروسکوپی جدایه‌ها

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
..... ۲-۱-۳-۴ مشخصات میکروسکوپی جدایه‌ها	۷۸
..... ۲-۳-۴ تعیین حداقل غلظت محدودکننده از رشد برای شناسایی مقاوم‌ترین جدایه	۷۹
..... ۳-۳-۴ شناسایی مقاوم‌ترین جدایه	۸۰
..... ۴-۳-۴ بررسی منحنی رشد باکتری کورینه باکتریم در تجزیه نفتالن	۸۱
..... ۵-۳-۴ بررسی منحنی تجزیه نفتالن توسط باکتری کورینه باکتریم	۸۳
..... ۶-۳-۴ بررسی درصد کاهش نفتالن توسط باکتری کورینه باکتریم	۸۵
..... ۴-۴ نتایج آنالیزهای فناترن	۸۷
..... ۱-۴-۴ مشخصات مورفولوژیکی جدایه‌ها	۸۷
..... ۱-۱-۴-۴ مشخصات ماکروسکوپی جدایه‌ها	۸۷
..... ۲-۱-۴-۴ مشخصات میکروسکوپی جدایه‌ها	۸۸
..... ۲-۴-۴ تعیین حداقل غلظت محدودکننده از رشد برای شناسایی مقاوم‌ترین جدایه	۸۸
..... ۳-۴-۴ شناسایی مقاوم‌ترین جدایه	۸۹
..... ۴-۴-۴ بررسی منحنی رشد باکتری کورینه باکتریم در تجزیه فناترن	۹۱
..... ۵-۴-۴ بررسی منحنی تجزیه فناترن توسط باکتری کورینه باکتریم	۹۲
..... ۶-۴-۴ بررسی درصد کاهش فناترن توسط باکتری کورینه باکتریم	۹۵
..... ۵-۴ نتیجه‌گیری	۹۸
..... ۶-۴ توصیه و پیشنهادات	۱۰۰

فهرست منابع

..... منابع فارسی	۱۰۴
..... منابع انگلیسی	۱۰۶

فهرست جداول

عنوان	صفحه
جدول ۱-۲ ترکیب عنصری نفت خام بر حسب درصد وزنی	۱۹
جدول ۱-۴ نتایج اندازه‌گیری غلظت کل هیدروکربن‌های نفتی	۷۰
جدول ۲-۴ غلظت برخی از هیدروکربن‌های چند حلقه‌ای در خاک آلوده	۷۱
جدول ۳-۴ نتایج اندازه‌گیری pH نمونه‌های خاک	۷۲
جدول ۴-۴ نتایج اندازه‌گیری EC نمونه‌های خاک	۷۲
جدول ۵-۴ نتایج اندازه‌گیری میزان مواد آلی خاک	۷۳
جدول ۶-۴ نتایج اندازه‌گیری بافت خاک	۷۴
جدول ۷-۴ بافت خاک	۷۴
جدول ۸-۴ نتایج اندازه‌گیری میزان نیتروژن خاک	۷۵
جدول ۹-۴ نتایج اندازه‌گیری میزان فسفر خاک	۷۶
جدول ۱۰-۴ نتایج اندازه‌گیری میزان پتاسیم خاک	۷۷
جدول ۱۱-۴ مشخصات میکروسکوپی جدایه‌های تجزیه کننده نفتالن	۷۸
جدول ۱۲-۴ خصوصیات میکروسکوپی جدایه‌های تجزیه کننده نفتالن	۷۸
جدول ۱۳-۴ تعیین حداقل غلظت محدودکننده از رشد جدایه‌های تجزیه کننده نفتالن	۷۹
جدول ۱۴-۴ نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی برای شناسایی مقاوم‌ترین جدایه تجزیه نفتالن	۸۰
جدول ۱۵-۴ قرائت جذب نوری برای منحنی رشد باکتری تجزیه کننده نفتالن	۸۱
جدول ۱۶-۴ قرائت جذب نوری برای منحنی تجزیه نفتالن	۸۳
جدول ۱۷-۴ غلظت نفتالن در محیط کشت برای منحنی تجزیه نفتالن	۸۴
جدول ۱۸-۴ درصد کاهش نفتالن	۸۶
جدول ۱۹-۴ مشخصات میکروسکوپی جدایه‌های تجزیه کننده فنانترن	۸۸
جدول ۲۰-۴ خصوصیات میکروسکوپی جدایه‌های تجزیه کننده فنانترن	۸۸
جدول ۲۱-۴ تعیین حداقل غلظت محدودکننده از رشد جدایه‌های تجزیه کننده فنانترن	۸۹