

Experimental study of the microbial removal of benzene by indigenous microorganisms of the groundwater in the presence of calcium peroxide and without it.(Case Study Shiraz Refinery)

Mohammad Mehdi Tavakkoli^{1*} ; Milad Tavakkoli²

- *1. MSc, Department of Environmental Engineering, Faculty of Civil Engineering, Islamic Azad University, Estahban Branch, Estahban, Iran.
 2. MSc, Department of Chemistry Education, Faculty of Basic Sciences, Shahid Rajaee Teacher Training University, Tehran, Iran
- * Email Address: fur.fural@yahoo.com

Article Info

Article Type:

Research Paper

Article history:

Received Date:

2024/05/23

Revised Date:

2024/06/10

Accepted Date

2024/06/16

Published Date

2024/10/27

Keywords:

Underground Water,
Benzene,
Calcium Peroxide,
Shiraz Refinery,

ABSTRACT

This research was an experimental study of the microbial removal of benzene by the indigenous microorganisms of the underground water in the area around the Shiraz refinery, in the presence of calcium peroxide and without it. Benzene solution with a concentration of 105 mg/liter was prepared as the initial concentration. For each of the treatments (in the presence of calcium peroxide and without calcium peroxide), 16 samples were considered. 8 of the samples after one week of incubation and 8 of them after two weeks of incubation were sent to the accredited environmental laboratory to measure the residual benzene. In order to analyze the results of the experiments, the analysis of variance test was used with repeated measurements with a confidence level of 1%. The effect of measurement time on benzene concentration was significant ($F(2,28)=21303.369$, $P<0.01$). But the interaction effect between time and group was not significant. ($F(2,28)=1.124$, $P>0.01$). The effect of the group on the changes in benzene concentration was also not significant ($F(1,14)=0.636$, $P>0.01$). Therefore, these findings indicate the microbial removal of benzene by indigenous microorganisms of underground water with the passage of time, but no significant difference was observed between the removal of benzene in the presence of calcium peroxide and without it. It can be said that calcium peroxide, although it favors the conditions for the activity of aerobic microorganisms, but its negative effect on the activity of anaerobic benzene-decomposing microorganisms causes no difference in the total removal of benzene in the two mentioned treatments. Therefore, more research in this field and investigation of the combined role of aerobic and anaerobic microorganisms in the removal of groundwater pollutants will be necessary.

Cite this article:

Mohammad Mehdi Tavakkoli, Milad Tavakkoli (2024), Experimental study of the microbial removal of benzene by indigenous microorganisms of the groundwater in the presence of calcium peroxide and without it. (Case Study Shiraz Refinery), Journal of Environmental Sciences Studies, 10(1), Pages 9804 – 9811.

EXTENDED ABSTRACT

Introduction

The main reason for oil pollution is leakage from tanks and transmission pipelines used in oil and oil refining industries. The solubility of some volatile petroleum, such as benzene, toluene, xylene, which are typically toxic and carcinogenic substances, is between 150 to 1800 mg/l in water. In some cases, even after environmental protection operations such as pumping, groundwater pollution is still transferred with the underground water. (Whiteside, 1993; Aminian, Ameri, 2000; Hokstad, 2000; Galvez, 2001; Theodorakis, Walker, 2014). Due to the high cost of physical, mechanical and chemical methods and the possibility of producing secondary toxic compounds, there is a need for a safer and cost-effective method. One of the types of bioremediation is biological stimulation. In this method, the pollutant-decomposing microbial population is present in the environment, but the environmental conditions are not suitable for their activity. With the improvement of the conditions, the rate of pollution decomposition increases as a result of the stimulation of native microorganisms. Due to the low level of dissolved oxygen in underground water, oxygen-releasing compounds (OCR) have been used for the biological stimulation of pollutant-consuming microorganisms (Chevalier, McCann, 2008; Thapa, 2012). In this research, the experimental study of the microbial removal of benzene by indigenous groundwater microorganisms in the presence of calcium peroxide and without it has been investigated.

Materials and methods

Sampling of underground water in the area of Shiraz Refinery for microbial tests was done in accordance with the ISIRI-4208 standard. Benzene was prepared with a concentration of 105 mg/l as the initial concentration of the microbial removal tests. The method used in the production of calcium peroxide in this research was based on the method of producing calcium peroxide by Khodaei. (2019), with some changes. To investigate the microbial removal of benzene 10 ml of water sampled with a sterile pipette was added to 16 glass bottles containing 100 ml of benzene aqueous solution with a temperature of 4°C which was prepared before. For biological stimulation, 5 cc of nutrient broth medium was added to the collection. The samples were then incubated at 22°C. 8 of the samples were kept in an incubator for one week and 8 of them were kept in an incubator for two weeks to measure the remaining values. To investigate the microbial removal of benzene by indigenous microorganisms in the underground water of the Shiraz refinery area in the presence of calcium peroxide, later operations repeated. Then 1 gram of pre-prepared calcium peroxide was poured into a sterilized test tube and 5 cc of distilled water was added to it and placed inside each of the 16 bottles from the previous step. Experiments were performed under the microbiology hood. The samples were then kept in a incubator at a temperature of 22°C. 8 of the samples were kept in a incubator for one week and 8 of them were kept in a incubator for two weeks to measure the remaining values. Samples was sent to the certified environmental laboratory.

Results and discussion

In order to analyze the results of the experiments, the analysis of variance test with repeated measurements was used with a confidence level of 1%. The effect of measurement time on benzene concentration was significant ($F(2,28)=21303.369, P<0.01$). But the interaction effect between time and group was not significant ($F(2,28)=1.124, P>0.01$). The effect of the group on the changes in benzene concentration was also not significant ($F(1,14)=0.636, P>0/01$).).

Conclusion

According to findings, it indicates the indigenous microorganisms of underground water can remove benzene from it. But no significant difference was observed between benzene removal in the presence of calcium peroxide and without it. This conclusion is consistent with the research conducted by Gholami. (2019). In the research conducted by them, calcium peroxide changed the indigenous microbial diversity of underground water and caused an increase in some microbial species and a decrease in some other microorganisms. Therefore, more research in this field and investigating the Simultaneous role of aerobic and anaerobic microorganisms in removing groundwater pollutants will be necessary.



بررسی آزمایشگاهی حذف میکروبی بنزن توسط میکروارگانیسیم‌های بومی آب‌های زیرزمینی، در حضور پراکسید کلسیم و بدون آن (مطالعه موردی پالایشگاه شیراز)

محمد مهدی توکلی^{۱*}، میلاد توکلی^۲

*۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه آموزشی مهندسی محیط زیست، دانشکده عمران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد استهبان

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه آموزشی آموزش شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت دبیر شهید رجایی، تهران

*ایمیل نویسنده مسئول: fur.fural@yahoo.com

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله علمی پژوهشی	این پژوهش با هدف مطالعه آزمایشگاهی حذف میکروبی بنزن توسط میکروارگانیسیم‌های بومی آب زیر زمینی منطقه اطراف پالایشگاه شیراز، در حضور پراکسید کلسیم و بدون آن انجام گرفت. بمنظور دستیابی به اهداف پژوهش از چاه آب کشاورزی محدوده پالایشگاه نمونه برداری انجام گرفت. محلول با غلظت ۱۰۵ میلی گرم بر لیتر بنزن به عنوان غلظت شروع آزمایشات حذف میکروبی تهیه شد. برای هر کدام از تیمارها (در حضور پراکسید کلسیم و بدون پراکسید کلسیم)، ۱۶ نمونه در نظر گرفته شد. تعداد ۸ تا از نمونه‌ها پس از یک هفته گرمخانه گذاری و تعداد ۸ عدد از آن‌ها پس از دو هفته گرمخانه گذاری، جهت اندازه گیری مقادیر باقی مانده بنزن به آزمایشگاه معتمد محیط زیست ارسال گردید. به منظور تحلیل نتایج آزمایشات از آزمون تحلیل واریانس با اندازه گیری مکرر با سطح اطمینان ۱ درصد استفاده شد. تاثیر زمان اندازه گیری بر غلظت بنزن معنی دار بود. $(F(2,28)=21303.369, P<0.01)$. اما اثر تعامل بین زمان و گروه معنادار نبود. $(F(2,28)=1.124, P>0.01)$. تاثیر گروه بر تغییرات غلظت بنزن نیز معنادار نبود. $(F(1,14)=0.636, P>0/01)$. بنابر این یافته‌ها نشان دهنده حذف میکروبی بنزن توسط میکروارگانیسیم‌های بومی آب زیر زمینی با گذشت زمان است ولی تفاوت معناداری بین حذف بنزن در حضور پراکسید کلسیم و بدون آن مشاهده نشد. در تبیین این یافته می‌توان گفت پراکسید کلسیم اگرچه شرایط را برای فعالیت میکروارگانیسیم‌های هوازی مساعد می‌کند اما تاثیر منفی آن بر فعالیت میکروارگانیسیم‌های بی‌هوازی تجزیه کننده بنزن، باعث می‌شود، میزان حذف کلی بنزن در دو تیمار گفته شده تفاوت نداشته باشد. بنابر این تحقیقات بیشتر در این زمینه و بررسی نقش توأم میکروارگانیسیم‌های هوازی و بی‌هوازی در حذف آلاینده‌های آب زیر زمینی ضروری خواهد بود.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۱۷	
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۳/۲۱	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۲۷	
تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۰۸/۰۶	
کلید واژه‌ها: آب زیرزمینی، بنزن، پراکسید کلسیم، پالایشگاه شیراز،	

هرکشوری برای رشد اقتصادی نیاز به انرژی دارد. در واقع انرژی زیربنای همه فعالیت های اقتصادی است که بدون آن محصولی تولید نمی شود و خدمتی انجام نمی گردد. سهم مصرف جهانی هر یک از منابع انرژی های اولیه در سال ۲۰۲۲ به ترتیب شامل ۳۱ درصد نفت، ۲۷ درصد زغال سنگ، ۲۳ درصد گاز طبیعی، ۸ درصد انرژی های تجدید پذیر و ۷ درصد برق آبی و ۴ درصد انرژی هسته ای می باشد. (BP, 2023). نفت از ترکیبات شیمیایی مختلفی تشکیل شده است. بعضی از ترکیبات تشکیل دهنده نفت خاصیت سرطانزایی برای انسان دارند. عده ای از این مواد می تواند جمعیت میکروبی خاک را تحت تاثیر قرار داده و از حاصلخیزی خاک بکاهد و شماری از آن ها می توانند باعث آلودگی هوا شوند و اکوسیستم یک محیط را بالاخص در نزدیکی پالایشگاهها با خطر مواجه سازند. بعضی ترکیبات سمی و محلول در آب موجود در نفت و فرآورده های آن به منابع آب زیر زمینی نفوذ کرده و براحتی میتوانند با جریان آب انتقال یابند و آلودگی را گسترش دهند (Hokstad, 2000; Galvez, 2001). دلیل اصلی آلودگی های مربوط به مواد نفتی، نشتی از مخازن و خطوط لوله های انتقال مورد استفاده در صنایع نفت و پالایش نفت می باشد. زمانی که نشتی رخ میدهد، فرآورده نفتی خاک را آلوده می سازد، قسمتی از مواد نفتی نشت شده در خاک جذب شده و قسمتی از طریق منافذ خاک به سمت پایین حرکت می کنند که بارندگی نیز با انجام شستشو به حرکت آنها سرعت می دهد. این مواد بر اساس سطح ایستایی به آب زیر زمینی نفوذ می کنند. قسمتی از آلودگی در آب حل می شود. حلالیت بعضی از ترکیبات نفتی فرار مانند بنزن، تولوئن، زایلن که موادی نوعا سمی و سرطان زا هستند، بین ۱۵۰ تا ۱۸۰۰ ملی گرم در لیتر آب می باشد. در بعضی موارد آلودگی آب زیر زمینی حتی پس از عملیات حفاظتی زیست محیطی نظیر پمپاژ به بیرون همچنان همراه با آب زیرزمینی انتقال می یابد. (Whiteside, 1993; Aminian, Ameri, 2000; Hokstad, 2000; Galvez, 2001) بسته به مدت زمان استفاده از مخازن فرآورده های نفتی، با افزایش زمان بهره برداری مخزن، خطر نشتی آن ها افزایش می یابد. بر اساس آمار سال ۲۰۱۱ آژانس حفاظت از محیط زیست آمریکا، ۷۱ درصد مخازن نگهداری که بیشتر از ۱۰ سال مورد بهره برداری قرار داشتند، دچار نشتی شدند. (USEPA, 2011). علاوه بر این فرآورده های نفتی، محتوی کربن آلی خاک را افزایش می دهد و موجب تغییرات در خواص فیزیکی و شیمیایی خاک، جمعیت، تنوع، ساختار و عملکرد میکروبی می شود (Song, 2014). آژانس بین المللی تحقیق روی سرطان (IARC)، بنزن را به عنوان عامل سرطان زا در نظر گرفته است و در طبقه بندی گروه یک قرار داده است چرا که باعث سرطان خون می شود (IARC, 2012). آلوده شدن مناطق غیر اشباع خاک و آب های زیرزمینی به هیدروکربن های نفتی خطر تهدید سلامتی انسان و اثرات منفی بر محیط زیست، آب های زیر زمینی، آب های سطحی، خاک، کشاورزی، رسوبات کف و غیره دارد. از آنجا که آب شرب و کشاورزی از منابع آب زیر زمینی تامین می شود، یافتن راه حلی برای حذف آلودگی هیدروکربنی نفتی از آن ضرورت دارد. (Theodorakis, Walker, 2014). اگر چه یک روش عمومی برای حذف آلودگی های نفتی از مناطق آلوده در سطح جهانی پیشنهاد نشده است اما در دهه های اخیر تکنیک هایی برای تصفیه آن ها به کار رفته است. این روش ها به دو صورت در محل و خارج از محل انجام می شوند. روش های فیزیکی و مکانیکی نظیر هوادهی و جذب و حرارت و شستشوی خاک، روش های شیمیایی نظیر اکسیداسیون و روش های بیولوژیکی عمده ترین روش های مورد استفاده در حذف آلودگی ها می باشند. روش فیزیکی مانند اعمال حرارت می تواند باعث کاهش جمعیت میکروارگانیسم های زنده از جمله میکروب های تجزیه کننده مواد نفتی شود. همچنین آلودگی هوا و سمیت مواد هیدروکربنی باقیمانده از فرآیند اثرات منفی این روش است (Nwangwu, Okoye, 1981). روش شیمیایی شامل تزریق مستقیم اکسید کننده های شیمیایی به محیط، ماهیت طبیعی و ساختار شیمیایی آن را تغییر می دهد. روش های شیمیایی می تواند از فعالیت های میکروبی در اثر آسیب به غشای سلولی و انعقاد و تغییر در آنزیم ها جلوگیری کند. (Mentzer, Eber, 1996). با توجه به مشکلاتی نظیر آنچه گفته شد و هزینه بر بودن روش های فیزیکی و مکانیکی و شیمیایی و امکان تولید ترکیبات سمی ثانویه، نیاز به روشی که ایمن تر بوده و از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه باشد، مورد نیاز است. تحقیقات بسیاری در ارتباط با زیست پالایی یا تجزیه زیستی با استفاده از میکروارگانیسم ها برای حذف موثر آلودگی هیدروکربنی مکان های آلوده انجام شده است (Thapa, 2012). در روش زیست پالایی میکروارگانیسم ها از ترکیبات ایجاد کننده آلودگی به عنوان منابع جرم و انرژی مورد نیاز رشد و تکثیر خود استفاده می کنند و آن ها را به مواد غیر سمی یا با سمیت کمتر تبدیل می کنند. این روش هزینه پایین و کارایی بالایی دارد و بر خلاف روش های فیزیکی و شیمیایی دوستدار محیط زیست است و از سال ۱۹۴۰ مورد استفاده قرار گرفته است (Ajona, 2021). یکی از انواع زیست پالایی تحریک زیستی است. در این روش محمولات جمعیت میکروبی تجزیه کننده آلاینده در محیط حضور دارد ولی شرایط محیطی برای فعالیت آن ها مناسب نیست. با بهبود ای شرایط سرعت تجزیه آلودگی در نتیجه تحریک میکروارگانیسم های بومی افزایش می یابد. با توجه به پایین بودن میزان اکسیژن محلول در آب های زیر زمینی برای تحریک زیستی میکروارگانیسم های مصرف کننده آلاینده ها از ترکیبات آزاد کننده اکسیژن (OCR) استفاده شده است (Chevalier

(McCann, 2008) در تحقیقی که انجام گرفت، حذف آلودگی نفتی آب زیرزمینی به تولوئن در حضور پراکسید کلسیم به عنوان ترکیبات آزاد کننده اکسیژن، توسط باکتری *BTEX s spPseudomona30* جدا شده از آب زیر زمینی آلوده به ترکیبات نفتی در محدوده پالایشگاه تهران در مقیاس آزمایشگاهی بطور موثری انجام گرفت. بطوریکه غلظت اولیه 30 ppm از آلاینده طی روز سیزدهم به 10 ppm کاهش یافت. (خدایی، ۱۳۹۹) در تحقیقی دیگر که در مقیاس آزمایشگاهی انجام شد. برای بررسی قابلیت حذف آلودگی نفتالین توسط میکروارگانیسم های بومی موجود در آب زیرزمینی، از عمق 100 متری منطقه دهکده المپیک در تهران نمونه های آب تهیه شد. در حضور 200 میلی گرم بر لیتر نانو ذرات پراکسید کلسیم، 75.85 درصد از نفتالین طی 30 روز حذف شد. با افزایش غلظت پراکسید کلسیم در محیط، شرایط قلیایی شد و تنها میکروارگانیسم های تحمل کننده شرایط قلیایی امکان فعالیت داشتند و سرعت حذف نفتالین کاهش یافت. افزایش pH محیط بر فعالیت میکروارگانیسم ها تاثیر منفی گذاشت. (غلامی، ۱۳۹۹) در تحقیق انجام گرفته تاثیر افزایش پراکسید کلسیم بر تنوع باکتریایی آب زیر زمینی مورد بررسی قرار گرفت. پراکسید کلسیم باعث افزایش جمعیت برخی میکروارگانیسم های بومی شد. همچنین جمعیت تعدادی از گونه های میکروبی کاهش یافتند. (Gholami, 2019). هر آبخوان شرایط محیطی مخصوص به خود دارد. در شرایط طبیعی افزایش ترکیبات OCR به آب زیر زمینی شرایط را برای فعالیت میکروارگانیسم های هوازی افزایش می دهد اما میکروارگانیسم های بی هوازی تجزیه کننده آلاینده ها نیز حضور دارند که غلظت بالای اکسیژن از فعالیت آن ها جلوگیری میکند. بنابراین لازم است تاثیر این ترکیبات بطور همزمان بر حذف میکروبی آلاینده نظیر بنزن در شرایط هوازی و بی هوازی، مورد بررسی قرار گیرد. لذا در این تحقیق مطالعه آزمایشگاهی حذف میکروبی بنزن توسط میکروارگانیسم های بومی آب زیر زمینی در حضور پراکسید کلسیم و بدون آن، پرداخته شده است. به عنوان مطالعه موردی از آب زیر زمینی منطقه اطراف پالایشگاه شیراز نمونه برداری انجام گردید. جهت افزایش تحریک زیستی محیط کشت نوترینت برات نیز در محیط های آزمایشی مورد استفاده قرار گرفت. آزمایشات بصورت غیر پیوسته انجام گرفت. تجزیه و تحلیل آماری با نرم افزار SPSS نسخه 26 انجام گرفت. برای حذف تاثیرات منفی افزایش pH ، پراکسید کلسیم در لوله آزمایش جداگانه در محیط قرار داده شد.

۲- روش انجام تحقیق

• ترکیبات شیمیایی مورد استفاده

محیط کشت نوترینت برات، کلرید کلسیم دو آبه، محلول آمونیاک 25% ، پراکسید هیدروژن 35% و تیترازول هیدروکسید سدیم 1 نرمال از شرکت مرک و بنزن با خلوص 99.7% از شرکت سیگما تهیه شد.

• آماده سازی مواد

تهیه محیط کشت نوترینت برات : طبق دستورالعمل سازنده :

در ابتدا مقدار 13 گرم از پودر محیط کشت نوترینت را در 1000 سی سی آب مقطر حل شد. بعد از حل شدن و ترکیب کامل مخلوط در دمای 121 درجه سانتی گراد به مدت 15 دقیقه اتوکلاو گردید. در این پژوهش 100 میلی لیتر از محیط کشت، داخل بطری های شیشه ای قابل اتوکلاو 250 سی سی استریل شد. پس از خنک شدن در یخچال نگهداری گردید.

آب زیر زمینی: نمونه برداری از آب زیر زمینی محدوده پالایشگاه شیراز جهت آزمایشات میکروبی، مطابق با استاندارد ISIRI-4208 انجام گرفت. از یکی از چاه های در دسترس، نمونه برداری انجام گرفت. نمونه ها در بطری شیشه ای قابل اتوکلاو 1 لیتری و استریل جمع آوری گردید و در ظرف حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل و در یخچال نگهداری شد. کشت میکروبی در محیط کشت نوترینت برات تحت شرایط استریل انجام گردید. در همه نمونه ها در اثر فعالیت میکروارگانیسم ها پس از 24 ساعت گرمخانه گذاری در دمای 37 درجه سانتی گراد کدورت ایجاد شد و بیوفیلم نیز در سطح محیط کشت تشکیل شد. در شکل 1 فعالیت میکروارگانیسم ها در محیط مذکور نشان داده شده است.



شکل ۱ - کدورت و بیوفیلم ناشی از فعالیت میکروارگانیسم ها در محیط کشت نوترینت برات

بنزن: با افزودن ۱۲۰ میکرو لیتر بنزن ۹۹٫۷٪ به آب مقطر و رساندن حجم به ۱ لیتر در بطری های شیشه ای استریل با درپنج تفلون، محلول با غلظت ۱۰۵ میلی گرم بر لیتر بنزن به عنوان غلظت شروع آزمایشات حذف میکروبی تهیه شد و در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

سنتر پراکسید کلسیم: روش مورد استفاده در تولید پراکسید کلسیم در این تحقیق، بر اساس روش تولید پراکسید کلسیم توسط خدایی (۱۳۹۹)، با کمی تغییرات انجام گرفت. بطوریکه ۹ گرم کلرید کلسیم دو آبه در ۹۰ میلی لیتر آب مقطر داخل ارلن ۲۵۰ سی سی حل شد. سپس ۴۵ میلی لیتر محلول آمونیاک ۲۵٪ به آن اضافه شد. ۴۵ میلی لیتر پراکسید هیدروژن ۳۵٪ بصورت قطره ای همراه با هم زدن به محیط افزوده گردید. سپس تیتراول ۱ نرمال هیدروکسید سدیم تا تشکیل رسوب سفید رنگ اضافه شد. پس از صاف کردن محلول، رسوب باقی مانده روی کاغذ صافی در دمای اتاق به مدت ۱ شبانه روز خشک گردید و در ظرف شیشه ای تیره ریخته شد و تا انجام آزمایشات در یخچال نگهداری شد.

• روش اجرای آزمایشات

برای بررسی حذف میکروبی بنزن توسط میکروارگانیسم های بومی آب زیرزمینی منطقه پالایشگاه شیراز بدون حضور پراکسید کلسیم، به میزان ۱۰ میلی لیتر از آب نمونه برداری شده با پی پت استریل به ۱۶ عدد بطری شیشه ای حاوی ۱۰۰ میلی لیتر از محلول آبی بنزن با دمای ۴⁰C که از قبل تهیه شده بود اضافه گردید. جهت تحریک زیستی میزان ۵ سی سی محیط نوترینت برات به مجموعه افزوده شد. آزمایشات زیر هود میکروبیولوژی انجام گرفت. نمونه ها سپس در دمای ۲۲ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند. تعداد ۸ تا از نمونه ها پس از یک هفته گرمخانه گذاری و تعداد ۸ عدد از آن ها پس از دو هفته گرمخانه گذاری، جهت اندازه گیری مقادیر باقی مانده بنزن به آزمایشگاه معتمد محیط زیست ارسال گردید. برای بررسی حذف میکروبی بنزن توسط میکروارگانیسم های بومی آب زیرزمینی منطقه پالایشگاه شیراز در حضور پراکسید کلسیم، به میزان ۱۰ میلی لیتر از آب نمونه برداری شده با پی پت استریل به ۱۶ عدد بطری شیشه ای حاوی ۱۰۰ میلی لیتر از محلول آبی بنزن با دمای ۴⁰C که از قبل تهیه شده بود اضافه گردید. جهت تحریک زیستی میزان ۵ سی سی محیط نوترینت برات به مجموعه افزوده شد. سپس ۱ گرم پراکسید کلسیم تهیه شده از قبل، داخل لوله آزمایش استریل شده به حجم ۱۰ سی سی ریخته شده و ۵ سی سی آب مقطر به آن افزوده شد و داخل هر ۱۶ عدد بطری مرحله قبل قرار داده شد. آزمایشات زیر هود میکروبیولوژی انجام گرفت. نمونه ها سپس در دمای ۲۲ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند. تعداد ۸ تا از نمونه ها پس از یک هفته گرمخانه گذاری و تعداد ۸ عدد از آن ها پس از دو هفته گرمخانه گذاری، جهت اندازه گیری مقادیر باقی مانده بنزن به آزمایشگاه معتمد محیط زیست ارسال گردید.

۳- نتایج

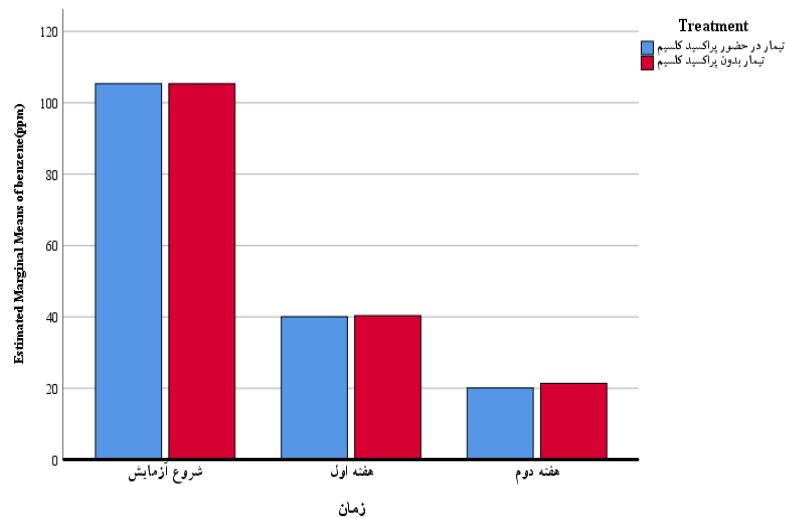
• تجزیه و تحلیل یافته ها

به منظور تحلیل نتایج آزمایشات از آزمون تحلیل واریانس با اندازه گیری مکرر با سطح اطمینان ۱ درصد استفاده شد. در این تحلیل دو گروه آزمایشی به عنوان عامل بین آزمودنی و زمان اندازه گیری متغیر غلظت بنزن به عنوان عامل درون آزمودنی در نظر گرفته شدند. قبل از اجرای تحلیل، نی پیش فرض های نرمال بودن توزیع و همگنی واریانس ها محاسبه شد. نتایج آزمون لون برای هیچ کدام از متغیر های ملاک معنادار نبود. (P>0.01) بنابراین فرض همسانی واریانس غلظت ها برقرار بود. در نهایت آزمون کولموگروف اسمیرنوف (P>0.01) نان دهنده توزیع نرمال داده ها بود. همچنین آزمون موچلی نشان داد که مفروضه کرویت برای اثر های مربوط به زمان، زمان و گروه و گروه رعایت شده است. (P>0.01) همان طور که در جدول ۱ مشخص است، تاثیر زمان اندازه گیری بر غلظت بنزن معنی دار بود. (F(2,28)=21303.369, P<0.01). اما اثر تعامل بین زمان و گروه معنادار نبود. (F(2,28)=1.124, P>0.01). تاثیر گروه بر تغییرات غلظت بنزن نیز معنادار نبود. (F(1,14)=0.636, P>0/01). بنابراین یافته ها نشان دهنده حذف میکروبی بنزن توسط میکروارگانیسم های بومی آب زیر زمینی با گذشت زمان است ولی تفاوت معناداری بین حذف بنزن در حضور پراکسید کلسیم و بدون آن مشاهده نشد.

جدول ۱ نتایج تحلیل واریانس با اندازه گیری مکرر

Sig	F	منبع تغییر	
0	21303.369	زمان	غلظت بنزن
0.371	1.124	زمان و گروه	
0.47	0.639	گروه	

در شکل ۲ کاهش غلظت بنزن در هفته اول و دوم پس از شروع آزمایش برای دو تیمار در حضور پراکسید کلسیم و بدون آن بصورت نمودار ستونی نشان داده شده است.



شکل ۲- کاهش غلظت بنزن در هفته اول و دوم پس از شروع آزمایش برای دو تیمار در حضور پراکسید کلسیم و بدون آن

۴- نتیجه گیری

هدف این پژوهش با هدف مطالعه آزمایشگاهی حذف میکروبی بنزن توسط میکروارگانیسم های بومی آب زیر زمینی منطقه اطراف پالایشگاه شیراز، در حضور پراکسید کلسیم و بدون آن انجام گرفت. نتایج نشان داد که میکروارگانیسم های بومی این منطقه قادر به حذف بنزن با گذشت زمان می باشند. اما در مقایسه با زمانی که پراکسید کلسیم بکار نرفت، تفاوت معناداری در حذف میکروبی بنزن ایجاد نشد. در تبیین این یافته میتوان گفت پراکسید کلسیم اگرچه شرایط را برای فعالیت میکروارگانیسم های هوایی مساعد می کند اما تاثیر منفی آن بر فعالیت میکروارگانیسم های بی هوایی تجزیه کننده بنزن، باعث می شود کارایی حذف میکروبی بنزن تغییری نداشته باشد. این نتیجه گیری با تحقیقی که انجام گرفت همسو می باشد (Gholami, 2019). در پژوهش انجام گرفته توسط ایشان پراکسید کلسیم، تنوع میکروبی آب زیر زمینی را تغییر داد و باعث افزایش برخی گونه های میکروبی و کاهش برخی دیگر از میکروارگانیسم های بومی آب زیر زمینی شد. بنابر این تحقیقات بیشتر در این زمینه و بررسی نقش توام میکروارگانیسم های هوایی و بی هوایی در حذف آلاینده های آب زیر زمینی ضروری خواهد بود.

منابع

- Ajona, M., Vasanthi, P. 2021. Bioremediation of petroleum contaminated soils : A review, Materials Today Proceedings, Vol.45, P.7117-7122.
- Aminian, k., Ameri, S. 2000. Evaluation of the petroleum technology-based dry soil barrier, Journal of Petroleum Science & Engineering, 26, Elsevier Science.,
- BP Statistical Review of World Energy. 2022. 72st edition.
- Chevalier, L., McCann, C.D., 2008. Feasibility of calcium peroxide as an oxygen releasing compound in treatment walls. International Journal of Environment and Waste Management, Vol.2, P.245-256.
- Galvez, E.E. 2001. SPE Paper 69445, presented at the SPE Latin American and Caribbean Petroleum Engineering Conf., Buenos Aires, Argentina, 25-28 March.
- Gholami, F., et al. 2019. The impact of calcium peroxide on groundwater bacterial diversity during naphthalene removal by permeable reactive barrier (PRB). Environ Sci Pollut Res Int.; Vol.26, P.35218-35226. doi: 10.1007/s11356-019-06398-y. Epub 2019 Nov 6. PMID: 31691896.
- Hokstad, J.N, et al. 2000. SPE Paper 61468, presented at SPE Int. Conf. on Health, Safety & Environment in Oil & Gas Exploration & Production, Stavanger, Norway, 26-28 June.

- IARC.2012. A Review of Human Carcinogens In International Agency for Research on Cancer (IARC) Monograph,Chemical Agents and Related Occupations; IARC: Lyon, France, 249–285.
- ISIRSI-4208.2009.Water quality-Sampling for microbiological examination of water-Code of practice,Institute of Standard and Industrial Research Iran 4208, 1th revision.ICS: 13/060/45,07/100/20.
- Liu, J., et al.2014. Petroleum pollution and the microbial community structure in the soil of Shengli Oilfield. Chin J Appl Ecol, Vol.25,P.850–856.
- Mentzer E, Ebere D.1996. Remediation of hydrocarbon contaminated sites. Proceeding of 8th Biennial International Seminar on the Petroleum Industry and the Nigerian Environment, Nov. Port Harcourt.
- Nwangwu, U., Okoye, NV. 1981. Environmental pollution in the Nigerian oil industry: The role of research and development. Proceeding of NNPC/FMWH Joint Conference on The Petroleum Industry and the Nigerian Environment. Warri, Nigeria.
- S.E. Whiteside.1993. SPE Paper 26399, presented at the 68th Ann. Conf. of Exhibition of Society of Petroleum Engineers, Texas, 3-9 October.
- Thapa, B.,et al..2012. A review on bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil. Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology.Vol.8,P. 164-170.
- Theodorakis, C.,Walker, T.D. 2014. Environmental processes in encyclopedia of toxicology. Third Edition3 (Amsterdam, Netherlands: Elsevier). doi:10.1016/B978-0-12-386454-3.01011-32.
- USEPA, Office of Underground Storage Tanks2011. Washington, DC, USA.
- خدایی، ک.همکاران، ۱۳۹۹. استفاده از نانوپراکسید کلسیم در سد بیولوژیکی برای حذف آلودگی نفتی آب زیرزمینی. فصلنامه علوم زمین.سال ۱۸، شماره ۲، ص ۱۵۱-۱۶۴.
- غلامی، ف.،همکاران، ۱۳۹۹. استفاده از نانوذرات پراکسید کلسیم در حذف نفتالین از آب زیرزمینی: بررسی تأثیر دما و pH بر بازدهی حذف. زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس.سال ۱۱، شماره ۴، ص ۱۰۵-۱۱۹.