

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال اول، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۱، صفحه ۷۷-۸۶
تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۸/۰۸ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۰/۰۹

بررسی پتانسیل حذف میکروبی خاک‌های آلوده به گازوییل در شهر همدان

فریبا محسن زاده: استادیار مهندسی بهداشت محیط، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران، fmohsenzade@gmail.com
نسترن احمدی مسعود: دانشجوی کارشناسی ارشد آلودگی‌های محیط زیست، دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان، ایران،
nastaranahmadimasood@yahoo.com

چکیده

مقدمه: آلودگی‌های نفتی از مسائل مهم زیست محیطی هستند. گازوییل از متداول‌ترین آلاینده‌های نفتی است. زیست پالایی، فناوری جدید پاک‌سازی خاک است. برخی از میکروارگانیسم‌ها قابلیت زیست پالایی گازوییل را دارند. این پژوهش، با هدف دستیابی به میکروارگانیسم‌های بومی، با قدرت تجزیه زیستی گازوییل در شرایط آب و هوایی شهر همدان انجام شد.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های خاک آلوده به گازوییل از ۱۰ منطقه شهر همدان جمع‌آوری و باکتری‌های آن جداسازی و براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و آزمایش‌های بیوشیمیایی دسته‌بندی شد. توانایی هر دسته در مصرف گازوییل در محیط کشت نمکی حداقل و غلظت‌های مختلف آلاینده (۰/۱، ۰/۵، ۱، ۳ درصد) از طریق کدورت سنجی در طول موج ۶۰۰ نانومتر بررسی شد. نتایج از طریق آزمون آماری تحلیل واریانس چندعاملی با هم مقایسه شد.

نتایج: در این تحقیق، ۱۰ سویه مختلف باکتریایی از خاک‌های آلوده به گازوییل شهر همدان یافت شد. نتایج کدورت سنجی نشان داد که اثر عامل زمان، غلظت آلاینده، نوع باکتری و اثر تعاملی آن‌ها در تمامی نمونه‌های تیمار شده معنی‌دار می‌باشد. در غلظت خاص آلاینده، با افزایش زمان ماند، کدورت نمونه‌ها بیش‌تر شده که این میزان افزایش از غلظت ۰/۱ تا ۱ درصد چشمگیرتر از غلظت ۱ تا ۳ درصد آلاینده است. افزایش غلظت از ۳ درصد به بالا موجب کاهش کدورت در برخی نمونه‌ها شده که می‌تواند کاهش راندمان حذف میکروبی آلاینده در این غلظت را به دنبال داشته باشد. سه سوش جدا شده نسبت به سایر سوش‌ها در کلیه غلظت‌ها و زمان‌های ماند کدورت بیشتری ایجاد کردند.

بحث و نتیجه‌گیری: در بین سه سوش جدا شده، بیش‌ترین کدورت ایجاد شده به باکتری شماره ۳ مربوط بود که پس از شناسایی، به‌عنوان *سودوموناس آيرووژنز*، گزارش شد. این باکتری به‌عنوان بهترین تجزیه‌کننده گازوییل از خاک‌های آلوده در شرایط آب و هوایی شهر همدان انتخاب شد.

واژه‌های کلیدی: زیست پالایی، آلودگی خاک، گازوییل، باکتری، *سودوموناس آيرووژنز*، همدان

مقدمه

خاک یکی از منابع مهم و ارزشمند طبیعت است، که ۹۵ درصد غذای انسان‌ها از آن بدست می‌آید. با توجه به محدود بودن منابع خاک، آلودگی خاک از انواع مهم آلودگی‌های زیست محیطی به شمار می‌رود (۱). آلودگی خاک توسط نفت و محصولات نفتی مانند بنزین و گازوییل، به عنوان یکی از شایع‌ترین و جدی‌ترین مشکلات محیط زیست شناخته شده است (۲). از پیامدهای آلودگی نفتی می‌توان به حذف پوشش‌های گیاهی و در نتیجه فرسایش خاک و خالی شدن ساختار اجتماعات گیاهی، افزایش نفوذپذیری خاک نسبت به آلاینده‌ها و در آخر، آلودگی منابع آب‌های سطحی و زیرزمینی اشاره نمود (۳). زیست‌پالایی خاک‌های آلوده به مواد نفتی با روش‌های تحریک زیستی و تلقیح نوع خاص یا گونه‌های مختلف باکتری به محیط خاک انجام می‌شود (۴ و ۵). از آنجایی که گازوییل به عنوان یکی از پر مصرف‌ترین کاربردی‌ترین محصولات نفتی در ایران و بسیاری از کشورها مطرح است، حجم در خور توجهی از آن در مخازن زیرزمینی و ایستگاه‌های سوخت نگهداری می‌شود و در اثر نشت از این مخازن می‌تواند خاک و آب‌های زیرزمینی مجاور را آلوده کند. از این رو در این تحقیق، حذف زیستی گازوییل به عنوان یک آلاینده هیدروکربنی که جزو آلاینده‌های زیست محیطی خاک نیز محسوب می‌شود، بررسی خواهد شد.

خان و همکاران در تحقیقی با عنوان مطالعه بر روی پتانسیل حذف زیستی نفت توسط باکتری *باسیلوس جدا* شده از خاک‌های آلوده به نفت در هندوستان نشان دادند که باکتری‌ها حداقل ۲۷ درصد از آلودگی خاک آلوده به نفت را پس از انکوباسیون طی ۷ روز مورد

تخریب و تجزیه زیستی قرار می‌دهند (۶). در تحقیقی با عنوان اصلاح هیدروکربن‌های خاک‌های آلوده به نفت خام در آفریقای جنوبی که توسط اوجو انجام شد، بررسی‌ها نشان داد میکروارگانیسم‌های خاک قادر به پاک‌سازی زیستی خاک‌های آلوده به نفت خام هستند و می‌توانند آلودگی خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌ها را مورد تجزیه زیستی قرار دهند (۷). در تحقیقی دیگر، ۳۶۸ سویه متعلق به نژاد *باسیلوس* از نمونه‌های جمع‌آوری شده از بیابان گزارش شده است (۸). بر اساس سایر مطالعه‌های انجام گرفته، کارایی روش تلقیح باکتری بومی جداسازی شده از محیط آلوده و بکارگیری آن در زمینه زیست‌پالایی آلاینده گازوییل در خاک ثابت شده است (۹). علت این امر افزایش میزان سوخت و ساز و سازگاری ژنتیکی جمعیت میکروبی در محیط زیست خودشان گزارش شده است که نقش به‌سزایی در موفقیت زیست‌پالایی محیط‌های آلوده دارد (۱۰). با توجه به این‌که فلور میکروبی خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی، در شرایط آب و هوایی و زیستی مختلف، متفاوت است و همچنین، عوامل مختلفی از جمله غلظت آلاینده و دمای رشد می‌تواند عملکرد تجزیه میکروبی آلاینده را تحت تأثیر قرار دهد، و با توجه به عدم انجام پژوهش مشابه در شرایط آب و هوایی شهر همدان، لزوم انجام این تحقیق در شرایط آب و هوایی شهر همدان و تحت شرایط مختلف زیست میکروبی احساس می‌شود. هدف از این پژوهش، در مرحله اول جداسازی باکتری‌های بومی موجود در خاک‌های آلوده به گازوییل شهر همدان، بررسی توانایی این باکتری‌ها در تجزیه زیستی گازوییل به عنوان منبع کربن و در آخر تعیین ویژگی‌ها و شناسایی باکتری‌های دارای توان زیست‌پالایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

محل نمونه برداری

حدود ۱۰ منطقه از مناطق آلوده به گازوییل شهر همدان به شکل تصادفی انتخاب شد. تعمیرگاه‌های ماشین آلات سنگین، اطراف مخازن گازوییل و لکه‌های نفتی خاک اطراف جاده‌های شهر همدان به عنوان محل نمونه برداری در نظر گرفته شد.

جمع آوری نمونه‌های خاک آلوده به گازوییل

جمع آوری نمونه‌ها در فصل بهار و از عمق صفر تا ۲۰ سانتی‌متری مناطق آلوده انجام شد. نمونه‌های خاک جمع آوری شده، در پاکت‌های یک بار مصرف قرار داده و برای انجام آزمایش‌های میکروبی به آزمایشگاه منتقل شد.

آماده‌سازی نمونه‌ها

نمونه‌های خاک پس از جداسازی ریشه‌ها و مواد زاید، از الک دو میلی‌متری عبور داده شد و به‌طور کامل با هم مخلوط شدند، سپس تا زمان انجام آزمایش‌ها در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تهیه محیط‌های کشت باکتری

محیط کشت نوترینت آگار^۱

این محیط کشت، یک محیط مغذی محتوی آگار است که طبق دستور شرکت سازنده تهیه شد. سپس در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع به مدت ۱۵ دقیقه سترون و پس از رسیدن تا دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در پلیت‌های استریل توزیع شد. پس از انعقاد محیط‌های کشت شده، پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در حرارت ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرم‌گذاری شدند (۱۱).

محیط کشت نمکی حداقل^۲

این محیط کشت، حاوی حداقل نمک‌های مغذی و ضروری برای رشد باکتری‌ها می‌باشد (جدول ۱). این محیط، پس از تهیه، در لوله‌های سایز بزرگ به میزان ۱۰ میلی‌لیتر توزیع شد و پس از پنبه‌گذاری و فویل‌گذاری درب لوله‌ها، لوله‌ها در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع به مدت ۱۵ دقیقه سترون شدند.

جدول ۱- ترکیب نمک‌های موجود در محیط کشت نمکی حداقل

کلرید	کلرید	کلرید	فسفات	سولفات	سولفات	کلرید	ماده
سدیم	پتاسیم	کلسیم	سدیم	منیزیم	آهن	آمونیم	
۰/۸	۰/۸	۰/۱	۲	۲	۱	۲	غلظت در محیط کشت (گرم بر لیتر)

تهیه شود. به همین ترتیب رقت‌های متوالی کاهشی از 10^{-3} تا 10^{-9} تهیه شد (۱۲).

کشت نمونه‌های رقیق شده

در این مرحله به دسته پلیت‌های استریل سه تایی، یک میلی‌لیتر از هر رقت اضافه شد. سپس در هر یک از پلیت‌های فوق به میزان ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت آگار سترون، حاوی عصاره مخمر اضافه و

تهیه رقت‌های مختلف نمونه‌های خاک

برای تهیه رقت‌های مختلف، ابتدا یک گرم از نمونه خاک آلوده را وزن کرده و برای تهیه رقت‌های مختلف در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل شد، تا رقت 10^{-1} از نمونه بدست آید، سپس یک میلی‌لیتر از این رقت در ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی حل شده، به مدت یک دقیقه روی شیکر لوله ای قرار داده شد تا رقت 10^{-2} از نمونه

ابتدا از هر سوش یک پرگنه به عنوان نماینده انتخاب شد. به منظور بالابردن جمعیت باکتری در زمان تلقیح، ابتدا باکتری در محیط نوترینت براث کشت داده، پس از رسیدن به کدورتی معادل (۰/۱ تا ۰/۰۸)، رسوبی از باکتری تهیه شد (۱). سپس به محیط کشت نمکی حداقل تهیه شده و غلظت‌های مختلف گازوییل سترون شده (۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۳ درصد) و هریک از رسوبات حاصل از سوش‌های باکتریایی متفاوت اشاره شده در همین بخش، اضافه شد. لوله‌های فاقد باکتری به عنوان شاهد به ازای هر غلظت از آلاینده تهیه شد (۱۵). سپس محیط کشت‌های به مدت چهار هفته و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در گرم‌خانه مجهز به شیکر گرماگذاری شدند (۱۶). برای کنترل آلودگی ثانویه، تیمارها در هر نوبت کنترل کدورت نمونه‌ها، یک قطره از نمونه دوباره بر روی محیط کشت آگار مغذی کشت داده، پرگنه باکتری‌ها با باکتری اولیه مقایسه شدند.

بررسی میزان کدورت نمونه‌ها

میزان رشد توده میکروبی نمونه‌های تیمار شده از طریق بررسی کدورت نمونه‌ها ارزیابی شد. برای این منظور، میزان جذب نوری نمونه‌ها، طی مدت چهار هفته، در فاصله‌های زمانی مختلف (لحظه زمان صفر قرائت باکتری تلقیح شده به محیط کشت، هفته اول، هفته دوم، هفته سوم و هفته چهارم) از طریق بررسی کدورت حاصله توسط دستگاه اسپکتوفتومتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۱۲، ۱۷، ۱۸ و ۱۹).

تحلیل آماری نتایج بدست آمده

مقایسه مقادیر حاصل از سنجش کدورت نمونه‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS، نسخه ۱۹ از طریق آزمون آماری تحلیل واریانس چندعاملی انجام شد (۲۰).

به‌طور کامل با نمونه مخلوط شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از این مدت کلونی‌های تشکیل شده در سطح پلیت قابل رویت و جداسازی بود (۱۳).

جداسازی پرگنه‌ها

پس از طی دوره انکوباسیون پرگنه‌های رشد کرده بررسی و مشاهده شدند. پرگنه‌های مشاهده شده، توسط لوپ استریل در کنار شعله، به پلیت‌های حاوی نوترینت آگار، برای خالص‌سازی منتقل شدند (۱۴). به این ترتیب دوباره پلیت‌های حاوی کشت خالص به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. شایان ذکر است در این مطالعه، خالص‌سازی میکروارگانیسم‌های جدا شده به روش کشت خطی انجام شد (۱۲).

گروه بندی کشت‌های خالص

بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی از جمله رنگ، اندازه، کناره، ارتفاع و قوام کلونی و انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی از جمله کاتالاز، اکسیداز، گرم، اندول و سترات کشت‌های خالص شده گروه بندی شد.

سترون‌سازی گازوییل

برای این که در نمونه‌های تیماری فقط عملکرد باکتری تلقیح شده بررسی شود، باید گازوییل مصرفی ابتدا سترون شود. از آنجا که حرارت ممکن است موجب فراریت بخشی از مواد سازنده گازوییل شود، عمل سترون‌سازی به کمک فیلتراسیون و با صافی‌های نیتروسولوزی سترون با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرون انجام شد (۱۱).

بررسی پتانسیل حذف آلاینده توسط سوش‌های

باکتریایی جدا شده

تیمار محیط کشت حداقل با غلظت‌های مختلف

آلاینده و انواع سوش‌های باکتریایی

شناسایی باکتری‌های دارای پتانسیل حذف

گازوییل

باکتری‌هایی که در محیط ذکر شده، بیشترین کدورت را در زمان‌ها و غلظت‌های مختلف آلاینده ایجاد کردند، به‌عنوان شاخص میکروبی تجزیه‌کننده گازوییل در شهر همدان انتخاب شدند. این باکتری‌ها طبق دستور کتاب راهنمای برگ‌گی، شناسایی شدند.

نتایج

نتایج حاصل از جداسازی باکتری‌های موجود در خاک‌های آلوده

پس از کشت خاک‌های جمع‌آوری شده از مناطق آلوده به گازوییل اطراف شهر همدان و جداسازی باکتری‌های آن‌ها، براساس ویژگی‌های ماکروسکوپی و تفاوت در ظاهر کلونی‌های ایجاد شده (جدول ۲) و همچنین، براساس نتایج حاصل از آزمایش‌ها و آزمایش‌های بیوشیمیایی (جدول ۳)، ۱۰ سویه مختلف باکتریایی در خاک‌های آلوده به گازوییل شهر همدان جداسازی و به‌عنوان باکتری‌های تجزیه‌کننده گازوییل از شماره ۱ تا ۱۰ نام‌گذاری شدند^۳ (DDB₁₋₁₀).

جدول ۲- بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناسی کلونی باکتری‌های جداسازی شده

DDB ₁₀	DDB ₉	DDB ₈	DDB ₇	DDB ₆	DDB ₅	DDB ₄	DDB ₃	DDB ₂	DDB ₁	آزمایش‌ها
کوکسی	کوکو باسیل	باسیل	باسیل	کوکسی	کوکسی	کوکسی	باسیل	کوکو باسیل	باسیل	ریخت‌شناسی
سفید	صورتی	سفید	کرم روشن	سفید	کرم روشن	کرم روشن	شیری رنگ	شیری رنگ	شیری رنگ	رنگ کلونی
کوچک	کوچک	متوسط	متوسط	کوچک	کوچک	متوسط	متوسط	کوچک	متوسط	اندازه کلونی
صاف	صاف	صاف	ناصاف	صاف	ناصاف	ناصاف	ناصاف	ناصاف	صاف	کناره کلونی
محدب	محدب	محدب	غیر محدب	محدب	غیر محدب	غیر محدب	محدب	محدب	غیر محدب	ارتفاع کلونی
کره ای	غیر کره ای	غیر کره ای	کره ای	کره ای	کره ای	کره ای	کره ای	غیر کره ای	کره ای	قوام کلونی

جدول ۳- بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی کلونی باکتری‌های جداسازی شده

DDB ₁₀	DDB ₉	DDB ₈	DDB ₇	DDB ₆	DDB ₅	DDB ₄	DDB ₃	DDB ₂	DDB ₁	باکتری‌های مورد آزمایش
-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	گرم
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	کاتالاز
-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	تحریک
-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	اسپور
-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	اکسیداز
+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	سیترات
-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	اندول
-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	لاکتوز

نتایج حاصل از بررسی میزان کدورت تیمارها

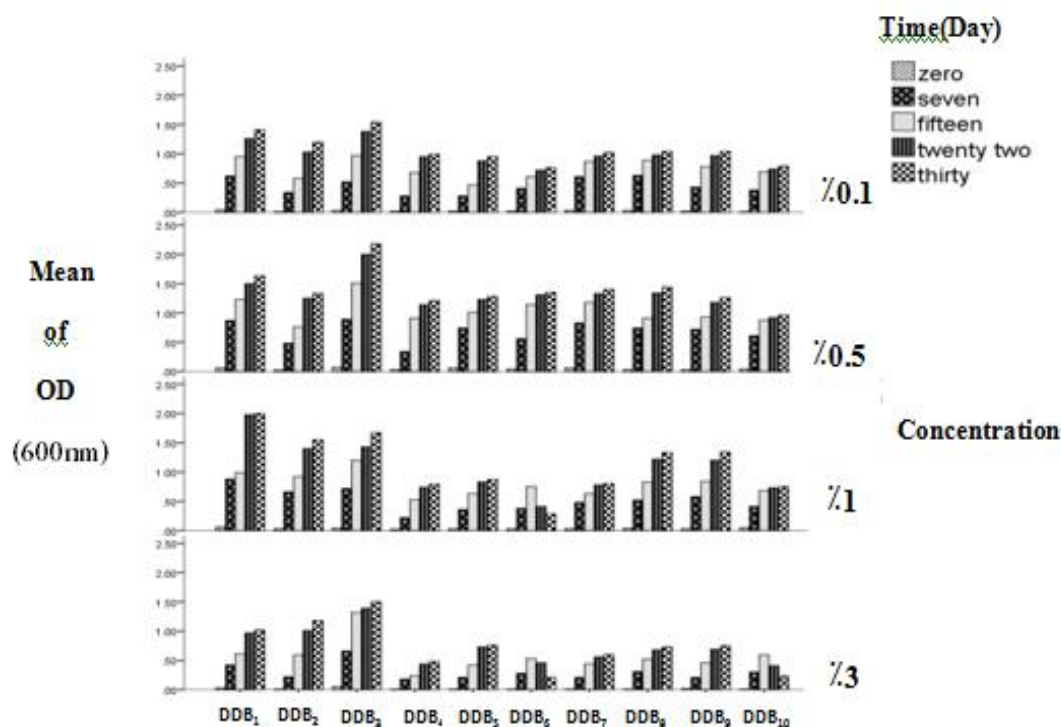
بررسی میزان کدورت در زمان‌های مختلف

پس از تیمار محیط‌های کشت حداقل نمکی با غلظت‌های مختلف آلاینده و سوش‌های مختلف باکتریایی، میزان کدورت حاصل در چهار هفته متوالی به این شرح بود: در یک غلظت خاص با افزایش زمان تا هفته سوم کدورت نمونه‌ها بیش‌تر شده و این میزان افزایش از غلظت ۰/۱ تا ۱ درصد چشمگیرتر از غلظت ۱ تا ۳ درصد آلاینده است. در یک غلظت خاص پس از هفته سوم افزایش کدورت متوقف یا کاهش یافته است.

کاهش کدورت نمونه‌ها از هفته سوم به بعد در مورد غلظت سه درصد آلاینده بیش‌تر مشاهده شده است (نمودار ۱).

بررسی میزان کدورت در غلظت‌های مختلف آلاینده

با افزایش غلظت از ۰/۱ تا ۳ درصد کدورت نمونه‌ها بیش‌تر شده است. افزایش غلظت از سه درصد به بالا موجب کاهش کدورت در برخی نمونه‌ها شده که می‌تواند کاهش راندمان حذف میکروبی آلاینده در این غلظت را به دنبال داشته باشد (شکل ۱).



شکل ۱- نمودار بررسی کدورت حاصله از تیمارهای باکتریایی (۱۰ سویه باکتری جداسازی شده) در غلظت‌های مختلف آلاینده و زمان‌های مختلف

بررسی میزان کدورت در تیمارهای باکتریایی متفاوت

در غلظت ۰/۱ درصد آلاینده: به ترتیب باکتری‌های (۳، ۱ و ۲) و در نهایت، سایر باکتری‌ها بیش‌ترین میزان کدورت را نشان دادند.

در غلظت ۰/۵ درصد آلاینده: به ترتیب باکتری‌های (۳ و ۱) و در نهایت، سایر باکتری‌ها بیش‌ترین میزان کدورت را نشان دادند.

سویه‌های جداسازی شده، در غلظت‌های فوق رشد نکردند (شکل ۱).

شناسایی باکتری‌های دارای پتانسیل حذف گازوییل

در نهایت سویه باکتریایی شماره ۳ که بالاترین میزان کدورت را در محیط کشت ایجاد کرده بود، به عنوان باکتری شاخص مصرف کننده گازوییل در خاک‌های آلوده شهر همدان انتخاب شد. این سویه در مرحله پایانی با انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی مختلف طبق دستور برگی شناسایی شد (۲۱). با استفاده از کلیدهای شناسایی باکتری‌ها (جدول‌های ۲، ۳ و ۴) این سویه شناسایی و به عنوان *Sordomonas* آیزنر^۴، گزارش شد.

در غلظت یک درصد آلاینده: بهترین باکتری‌های (۱، ۳ و ۲) و در نهایت، سایر باکتری‌ها بیش‌ترین میزان کدورت را نشان دادند.

در غلظت سه درصد آلاینده: به ترتیب باکتری‌های (۳، ۲ و ۱) و در نهایت، سایر باکتری‌ها بیش‌ترین میزان کدورت را نشان دادند.

بنابراین، پس از کشت جداگانه این باکتری‌ها در محیط نمکی حداقل، حاوی غلظت‌های مختلف گازوییل، سه سویه (باکتری ۲، باکتری ۳ و باکتری ۴) از باکتری‌های جداسازی شده در غلظت یک درصد و دو سویه (باکتری ۳ و باکتری ۴) در سایر غلظت‌ها (۳، ۱ و ۵/۰ درصد) قادر به کدورت بودند و کدورت در خور توجهی در محیط کشت ایجاد نمودند، در حالی که سایر

جدول ۴- نتایج آزمایش‌های تخصصی انجام شده برای شناسایی نهایی جدایه (باکتری ۳) تجزیه کننده گازوییل

آزمایش	حساسیت به KOH	کاتابولیسیم اکسیداسیون	اکسیداز	آزمایش لوان	آزمایش سترات	هیدرولیز نشاسته	هیدرولیز کازین
نتیجه	+	+	+	-	+	-	-
آزمایش	تحرك	آزمایش متیل رد	آزمایش وگوس- پروسکویر	هیدرولیز اوره	لیپاز	مصرف ژلاتین	فسفات
نتیجه	+	-	-	+	+	+	+
آزمایش	اندول	تولید H ₂ S از سیستین	تولید کتولاکتوز	دی آمیناز فنیل آلانین	تولید گاز از گلوکز	تولید اسید از گلوکز	فعالیت پکتولیتیکی
نتیجه	-	+	-	+	-	+	-
آزمایش	دکربوکسیلاز لیزین	کاتالاز	رشد در دمای چهار درجه	رشد در دمای ۴۱ درجه	مقاومت به نمک سه درصد	مقاومت به نمک پنج درصد	مقاومت به نمک ۷ درصد
نتیجه	-	+	-	+	+	+	+

بحث و نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که در خاک‌های آلوده به گازوییل شهر همدان باکتری وجود دارد. به این معنی که آلودگی با ترکیبات نفتی و گازوییل مانع از رشد باکتری‌ها در خاک و محیط‌های آلوده به ترکیبات نفتی (گازوییل) نمی‌شود. نتایج حاصل از پژوهش جاری، با

نتایج به دست آمده توسط پژوهشگران متعدد پیشین همسو است و آن‌ها نیز توانسته‌اند از خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی، باکتری‌ها را جداسازی کنند. این امر بیانگر این مسئله است که باکتری‌ها قادر به تحمل ترکیبات نفتی در غلظت‌های موجود در خاک‌های

نانومتر بررسی نمودند و کارایی آن را در تجزیه ترکیبات نفتی نشان دادند.

نتایج تحلیل آماری نشان داد که عامل زمان، غلظت و سوش باکتریایی و اثر تعاملی آن‌ها در سطوح (۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۳ درصد) در تمام تیمارها معنی‌دار است و تمام باکتری‌ها در غلظت‌های مختلف آلاینده و زمان‌های مختلف قادر به رشد بودند. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت باکتری‌های جداسازی شده نسبت به آلودگی خاک با گازوییل مقاوم هستند که در بین آن‌ها باکتری ۳ از مقاومت بیش‌تری برخوردار بود. توان رشد این باکتری و نیز توان تجزیه گازوییل در غلظت‌های مختلف بررسی شد. نتایج این بررسی نشان داد که باکتری ۳ در غلظت ۰/۵ درصد بیش‌ترین کدورت را دارد و از بین سایر باکتری‌های جداسازی شده به عنوان باکتری شاخص تجزیه کننده گازوییل در خاک‌های آلوده شهر همدان معرفی می‌شود. با توجه به این که توان رشد و قابلیت تجزیه باکتری‌ها علاوه بر تراکم آلاینده به شرایط محیطی و آب و هوایی نیز بستگی دارد (۱۱)، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که باکتری ۳ در شرایط آب و هوایی منطقه همدان قابلیت استفاده در تجزیه گازوییل و پاک‌سازی خاک‌های آلوده به گازوییل را دارد. با توجه به موارد فوق به جا است که با اندازه‌گیری میزان کارایی این باکتری در تجزیه زیستی انواع ترکیبات نفتی از جمله گازوییل، از طریق اندازه‌گیری میزان آلاینده باقیمانده در انتهای آزمایش، با روش‌های مناسب از قبیل استفاده از گاز کروماتوگرافی (GC)، نسبت به کاربردی کردن نتایج این پژوهش اقدام شود.

آلوده هستند و ممکن است در تجزیه ترکیبات نفتی در شرایط مختلف آب و هوایی مؤثر باشند (۱۹ و ۲۲).

نتایج ما نشان داد که باکتری‌های جداسازی شده نسبت به غلظت‌های پایین گازوییل مقاوم هستند و تعداد بیش‌تری از سویه‌های باکتریایی قادر به تحمل غلظت‌های پایین گازوییل هستند. این امر می‌تواند ناشی از تفاوت‌های ژنتیکی و در نتیجه تفاوت در سیستم آنزیمی آن‌ها باشد. به طوری که غلظت‌های بالای گازوییل (پنج درصد) از آستانه تحمل ژنتیکی برخی از باکتری‌ها فراتر است؛ اما در مقابل، سویه ۳، غلظت‌های بالاتری از گازوییل را تحمل می‌کند. تفاوت در آستانه تحمل ژنتیکی باکتری‌های جداسازی شده از خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی توسط پژوهشگران متعدد گزارش شده است (۱۰، ۱۵ و ۲۳).

پژوهش‌های متعددی در دست است که نشان می‌دهد سویه‌های مختلف باکتریایی نه تنها نسبت به آلودگی‌های با ترکیبات نفتی و مشتقات آن مقاوم هستند، بلکه برخی از آن‌ها قادرند از ترکیبات نفتی به عنوان منبع کربن و ماده غذایی استفاده کنند و بنابراین، وجود آلودگی نفتی و مشتقات آن نه تنها مانع رشد آن‌ها نمی‌شود بلکه وجود آن‌ها موجب رشد بیشتر و سریع‌تر باکتری‌های مقاوم می‌شود. کایریمورا و همکاران (۱۹۹۹) در پژوهشی موفق به جداسازی سویه اسفینگوموناساز خاک‌های آلوده شدند که قادر بود از کربازول و سایر ترکیبات نفتی از قبیل ان-هگزا دکان استفاده غذایی کنند. نتایج آزمایش آن‌ها نشان داد که با افزایش تعداد و رشد باکتری (افزایش کدورت محیط کشت) میزان تجزیه مواد نفتی افزایش می‌یابد. امتیازی و همکاران (۲۰۰۵) نیز تجزیه ترکیبات مختلف نفتی به وسیله سویه‌ای از *پرودموناس* در مدت زمان ۹ روز از طریق سنجش منحنی رشد باکتری را در طول موج ۶۰۰

References:

- (1) Mandri T, Lin J. Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microorganism in Kwazulunatal, south africa. *African J of Biotechnol* 2007; 6(1): 023-7.
- (2) Udeani TKC, Obroh AA, Azubike N. Isolation of bacteria from mechanic workshops soil environment contaminated with used engine oil. *African J Biotechnol* 2009; 8(22): 6301-03.
- (3) Schaefer M, Seren O, Petersen J. Effects of *Lumbricusterrestris*, *Allolobophorachlorotica* and *Eiseniafetida* on microbial community dynamics in oil-contaminated soil. *Soil Biology & Biochemistry* 2005; 37: 2065.
- (4) Margesin R, Zimmerbauer A, Schinner F. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere* 2000; 40: 339-46.
- (5) Vogel T M. Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. *Current Opinion in Biotechnology* 1996; 7: 311-16.
- (6) Khan JA, Rizvi SHA. Isolation and characterization of microorganism contaminated sites. *Adv In Applied Sci Res* 2011; 2(3):455-60.
- (7) Ojo AO. Petroleum hydrocarbon utilization by native bacterial population from a wastewater canal South west Nigeria African. *J Biotechnol* 2006; 5(4): 333-7.
- (8) Sorkhoh NA, Ibrahim AS, Ghannouin MA. High temperature hydrocarbon degradation by *Bacillus stearothermophilus* from oil polluted Kuwait desert. *Applied Microbiology and Biotechnolog* 1993; 39: 123-6.
- (9) Ijah UJJ, Antai SP. Removal of nigerian light crude oil in soil over a 12-month period. *International Biodeterioration & Biodegradation*; 2003; 51: 93-9.
- (10) Okoh, A.I., Trejo-Hernandez, M.R. Remediation of petroleum polluted systems: Exploiting the bioremediation strategies. *African Journal of Biotechnology* 2006; 5(25): 2520-25.
- (11) Mohsenzadeh F, Nasser S, Mesdaghinia A, Nabizadeh R, Zafari D, Chehregani A. Phytoremediation of petroleum contaminated soils: Prescreening for suitable plants and rhizospheral fungi. *Toxicological & Environmental Chemistry* 2009; 91(8): 1443-53.
- (12) Talaie AR. Parametric study of petroleum compounds biodegradation using microorganisms. [Dissertation] Islamic Azad University, Science and Research Branch, Ahvaz.; 2008.
- (13) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 19th ed*, New Yourk: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 1998.
- (14) Fredrickson JK. & D.L. Balkwill. Sampling and enumeration techniques. In: Burlage R S, Atlas R, Stahl D, Geesey G & Sayler G (Eds). *Techniques in Microbial Ecology* (pp 239-254), New Yourk: Oxford University Press, 1998.
- (15) Mittal A, Singh P. Isolation of hydrocarbon degrading Bacteria from soils contaminated with crude oil spills. *Indian J Exp Biology* 2009; 47:760-5.
- (16) Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-54.
- (17) Marquez-Rocha FJ, Hernandez-Rodri V, Teresa-Lamela M. Biodegradation of diesel oil in soil by a microbial consortium. *Water, Air, and Soil Pollution*; 2001; 128 (3-4): 313-320.
- (18) Delille D, Bassères A, Dessommes AA. Effectiveness of bioremediation for oil-polluted Antarctic sea water. *Polar Biol* 1998; 19: 237-41.

- (19) Emtiazi G, Shakarami H, Mirdamadian SH. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas* sp. And transformed *Escherichia coli*. *Africa Journal of Biotechnology* 2005; 4(2): 172-6.
- (20) Daneshvar N, Khataee AR, Rasoulifard M, Pourhassan M. Biodegradation of dye solution containing Malachite Green: Optimization of effective parameters using Taguchi method. *Journal of Hazardous Materials* 2007; 143 (1-2): 214-9.
- (21) *Bergey's Manual Trust*; Manual of systematic Bacteriology. Second edition, 2004. Available at: http://mibi.unimuenster.de/imperia/md/content/biologie_immb/_v/download/fgmtaxonomiews10-11/bergey.pdf
- (22) Norris RD, Hincsee RE, Brown RA, McCarty PL, Semprini L, Wilson JT, et al. *Hand book of Bioremediation*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1994.
- (23) Kirimura K, Nakagawa H, Tsuji K, Kazuya M, Kurane R, Usami Sh. Selective and continuous degradation of carbazole contained in petroleum oil by resting cells of *Sphingomonas* sp. *CDH-BiosciBiotechnolBiochem* 1999; 63(9): 1563-68.

¹. Nutrient agar

². Minimal salt medium

³. Diesel-degrading bacteria

⁴. *Pseudomonas aerogenesis*

A Study on potential microbial removal of diesel oil from contaminated soil in Hamedan city

Fariba Mohsenzadeh *

Assistant professor of Environmental Health Engineering, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran, fmohsenzade@gmail.com

Nastaran Ahmadi Masoud

M.Sc. student of Environment pollutions, Islamic Azad University, Hamedan, Iran, nastaranahmadimasood@yahoo.com

Abstract

Introduction: Environmental contamination with petroleum is an important issue. Diesel oil is a common pollutant. Bioremediation is a new technology to clean up soils. This study was aimed to achieve microorganisms with power of soil cleaning.

Materials and Methods: The bacteria of the contaminated soil with diesel oil were isolated based on morphological and biochemical characteristics. The degradation ability of the isolated bacteria was checked for the consumption of diesel fuel in the minimal salt medium containing different concentrations of diesel fuel (0.1, 0.5, 1 and 3%). Through the checking process, the turbidity due to the bacterial growth with the control tubes was compared.

Results: In the study, 10 different bacterial strains were found. Turbidity measurement results showed that the factors of time, concentration of the pollutant, bacterial strains and interactions between them were significant in all treated samples. In a particular pollutant concentration, as the time passed, the turbidity of the samples was exceeded. The increase rate of turbidity in the concentrations 0.1-1% was more dramatic than the 1-3% concentrations. 3 of the isolated strains in all concentrations caused a higher turbidity than other strains.

Discussion and Conclusion: In the treated samples, the maximum turbidity was caused by the bacterium number 3, which late on, was identified as *Pseudomonas aerogenensis*. This bacterium was chosen as the best diesel oil degrader of the polluted soils with respect to the climatic conditions of as Hamedan's.

Key words: Bioremediation, Soil pollution, Diesel fuel, Bacterium, *Pseudomonas aerogenensis*, Hamedan

* Corresponding Author

Received: October 29, 2012/ **Accepted:** December 29, 2012