تکنیک زیست فزونی در حذف زیستی گازوییل از خاک

مهری حسینی، عباس اخوان سپهی* و میترا صالحی

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، ایران

تاریخ دریافت: ۹۲/۸/۶ تاریخ پذیرش: ۹۳/۷/۲۲

چکیده

روش‌های فیزیکی و شیمیایی مورد استفاده برای پاک‌سازی آلاینده‌های نفتی، روش‌هایی بسیار دشوار، خطرناک و پرهزینه هستند. ولی بیوتکنولوژی، بسیاری از اوقات راهکارهای موثرتری را برای آلودگی زدایی از محل‌های آلوده فراهم می‌آورد. هدف از این پژوهش، ارزیابی تکنیک زیست فزونی در حذف آلاینده‌های نفتی می‌باشد. در این پژوهش خاک‌های آلوده به گازوییل به مدت ۱۰۰ روز در ستون‌های مکعب مستطیل به ابعاد m ۱×۱×۱ در دمای محیط و رطوبت نسبی ۵۰٪ تحت عمل زیست فزونی با میکروب‌ها قرار گرفت و با نمونه خاک آغشته به گازوییل بدون تلقیح میکروبی مقایسه گردید و در نهایت جدایه به‌دست آمده توسط تست‌های بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی شد. نتایج شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها و آنالیز گاز کروموتوگرافی بیان‌گر این واقعیت است که در مدت ۱۰۰ روز پس از تلقیح میکروبی ستون‌های خاک مورد نظر، جمعیت میکروبی خاک از ۲×۱۰^{۶} به $۲/۶ \times ۱۰^{۱۰}$ cfu افزایش داشته است که با توجه به نتایج تست‌های بیوشیمیایی و مولکولی، مشخص شد که در این بین باسیل‌های گرم منفی اکسیداز مثبت (پسودوموناس آئروژینوزا)، جمعیت غالب را تشکیل می‌دهند. آنالیز کیفی و کمی به کمک دستگاه گاز کروموتوگرافی نشان می‌دهد که برخی از اجزاء موجود در نمونه تحت درمان، توسط زیست فزونی از بین رفته یا کاهش یافته‌اند. بررسی‌های انجام شده روی نمونه‌های آغشته به گازوییل توسط دستگاه گاز کروموتوگرافی نشان‌دهنده پاک‌سازی زیستی آلاینده گازوییل توسط میکروب‌های به‌دست آمده از مرحله غربال‌گری می‌باشد.

کلمات کلیدی: پاک‌سازی زیستی، زیست فزونی، گازوییل، آلاینده‌های نفتی، خاک

مقدمه

امروزه آلودگی محیط زیست از مسائل مهمی است که جوامع مختلف با آن روبرو هستند و آلاینده‌ها از عوامل ایجاد اختلال در محیط زیست به شمار می‌روند. آلودگی خاک و آب‌های زیرزمینی به مواد ارگانیک و سمی یک مشکل شایع محیط زیست است. در این میان محصولات نفتی یکی از مهم‌ترین آلاینده‌های محیط زیست محسوب می‌شود [۱]. گازوییل یکی از پرمصرف‌ترین محصولات نفتی در ایران و بسیاری از کشورهای جهان است. بنابراین در صورت نشت از مخازن و یا وقوع حوادث جاده‌ای، می‌تواند به‌عنوان یکی از مهم‌ترین آلاینده‌های منابع خاکی مطرح باشد. از این رو در این پژوهش، گازوییل به‌عنوان آلاینده هیدروکربنی انتخاب گردید [۲].

*مسؤول مکاتبات
آدرس الکترونیکی akhavansepahy@Gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

به دلیل نفت خیز بودن و مصرف بالای مواد نفتی در ایران، آلودگی خاک به مواد نفتی یکی از معضلات اساسی می‌باشد. پاک‌سازی آلودگی از خاک‌های آلوده، یکی از گام‌های اساسی در داشتن محیط زیست سالم و پایدار می‌باشد، چرا که آلاینده‌های مختلف با محدود کردن منابع در دسترس، تولید را با مخاطراتی جبران‌ناپذیر مواجه می‌سازند [۳].

۳۰۰ میلیون هکتار از سطح خاک در معرض آلودگی با مواد شیمیایی است. در زمان‌های گذشته پس از نشت آلودگی نفتی، فعالیت میکروارگانیسم‌های بومی و یا عواملی همچون فوتواکسیداسیون، منجر به حذف آلودگی می‌شد. اما افزایش جمعیت جهان و استفاده بی‌رویه از این ماده، به مرور زمان باعث شد که عوامل طبیعی قادر به حذف این مقدار آلودگی نباشند [۶-۴]. فرآیندهای فیزیکی و شیمیایی بسیاری برای آلودگی‌زدایی از مکان‌های آلوده به‌کارمی‌رود. متأسفانه روش‌های موجود برای آلودگی‌زدایی دارای مشکلاتی است که استفاده از آن روش‌ها را محدود به شرایط خاصی می‌نماید. روش‌های بیولوژیکی، بسیاری از اوقات راهکارهای آسان، دائمی، ارزان و موثر را برای آلودگی‌زدایی از محل‌های آلوده فراهم می‌آورند. زیست فزونی[1] از روش‌هایی است که امروزه برای پاک‌سازی خاک و آب زیرزمینی آلوده به هیدروکربن‌های نفتی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این روش با استفاده از میکروارگانیسم‌هایی که به‌صورت طبیعی در خاک یافت می‌شوند، آلاینده‌ها معدنی شده و یا تجزیه می‌گردند. در پایان روند معدنی شدن، آب و دی اکسید کربن تولید می‌شود. این فرآیند شامل وارد کردن میکروارگانیسم‌های غیربومی به محیط طبیعی است که با هدف افزایش سرعت و یا گسترش تجزیه زیستی انجام می‌شود. این روش معمولاً زمانی استفاده می‌شود که میکروارگانیسم‌های محیط قادر به تجزیه نباشند و یا اینکه ماده آلوده‌کننده محیط ساختاری پیچیده داشته و از طیف وسیعی از ترکیبات تشکیل شده باشد. در این صورت به دلیل کم بودن جمعیت میکروارگانیسم‌ها و سرسخت بودن و یا دیر تجزیه شدن ماده شیمیایی هدف، از روش زیست فزونی استفاده می‌شود. به همین منظور باکتری‌هایی که توانایی انجام فعالیت مورد نظر به‌طور طبیعی و یا با استفاده از تکنیک‌های مهندسی ژنتیک را داشته باشند، مستقیماً وارد منطقه آلوده می‌کنند. در نتیجه زیست فزونی، به معنی تلقیح میکروارگانیسم‌ها به داخل محیط‌های آلوده جهت افزایش تجزیه مواد آلاینده می‌باشد [۹-۷].

متجاوز از ۲۰ سال است که تجزیه زیستی گسترش و به‌عنوان یک استراتژی اقتصادی برای پاک‌سازی خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی با استفاده از باکتری‌های تجزیه کننده، مورد استفاده قرار گرفته است. پاک‌سازی زیستی نه فقط در تجزیه آلودگی‌ها می‌تواند مؤثر واقع شود، بلکه می‌توان از آن برای پاک‌سازی مواد ناخواسته از هوا، خاک، آب و همچنین ماده خام از مواد زاید صنعتی استفاده کرد [۱].

عوامل محدودکننده متعددی نیز روش حذف بیولوژیکی آلاینده‌ها توسط میکروارگانیسم‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهند و کارآیی این روش را محدود می‌سازند. برخی از عوامل محدود کننده عبارتند از: غلظت آلاینده، دسترسی به مواد آلاینده، شرایط مناسب برای بقاء و رشد میکروارگانیسم از جمله pH مناسب، دما و رطوبت مناسب، اکسیژن کافی، مواد غذایی مناسب و عدم وجود مواد سمی و کشنده میکروارگانیسم‌ها. با این وجود تکنیک زیست فزونی درحذف آلاینده‌ها به‌علت توانایی حذف کامل آلاینده‌ها و تبدیل آنها به ترکیبات معدنی بی‌ضرر و سازگار با محیط زیست مانند دی اکسیدکربن و آب و همچنین هزینه‌های کمتر، بسیار مورد توجه می‌باشد. [۴ و ۶] باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها می‌توانند انرژی مورد نیاز برای تکثیر و بقای خود را از نفت به‌دست آورند.

1. Bioaugmentation

Archive of SID

www.SID.ir

فعالیت این باکتری‌ها در دامنه دمایی ۲- تا ۶۰ °C و pH ۵/۵ تا ۱۰ صورت می‌گیرد. [۹] در میان باکتری‌ها، سودوموناس‌ها توانایی بالایی در حذف هیدروکربن‌های نفتی دارند [۱۰].

در زمینه پاک‌سازی بیولوژیکی، کیم و هائو، لی و گیبسون، لی و همکاران و شیلدز و همکاران طی پژوهش‌های خود، تاثیر مثبت حضور باکتری سودوموناس را در زدودن آلاینده‌های آلی گزارش کرده‌اند [۱۴-۱۱]. بوسرت و بارتا باکتری‌های سودوموناس، آرتروباکتر، کورینه باکتریوم، فلاوباکتریوم، آکروموباکتر، میکروکوکوس و نوکاردیاو مایکوباکتریوم را به‌عنوان فعال‌ترین گونه‌های باکتریایی در تجزیه هیدروکربن‌ها در خاک گزارش کردند [۱۵].

منابع آب و خاک بخش حیاتی زندگی بشر هستند، اما مدت‌هاست که مواد نفتی و مشتقات آن در اثر استخراج، حمل و نقل، ذخیره سازی یا استفاده نادرست موجب آلودگی خاک شده است [۱۶]. از این رو اتخاذ یک استراتژی صحیح جهت از بین بردن مشکل آلودگی و دست‌یابی به توسعه پایدار در این زمینه ضروری است. به همین منظور، در این پژوهش روش زیست فزونی خاک‌های آلوده مورد ارزیابی قرار گرفته تا به‌عنوان مناسب‌ترین و کم خطرترین روش پاک‌سازی زیستی به کار برده شود و در صورت امکان، نتایج تحقیق برای حذف آلاینده‌ها در مقیاس وسیع مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش

در این پژوهش ۱۴ نمونه خاک آلوده به گازوییل از مناطق مختلف استان کرمان به‌صورت مقطعی جمع‌آوری شد. از مجموع نمونه‌های مورد نظر، تعدادی باکتری جداسازی گردید و بهترین سویه‌های مؤثر در تجزیه زیستی گازوییل از نظر امولسیفیکاسیون، کاهش کشش سطحی و رشد در حضور سوبسترای گازوییل در محیط حداقل نمکی مورد بررسی و جداسازی قرار گرفت. برای ارزیابی درمان‌های میکروبی، ۳ ستون مکعب مستطیل به ابعاد ۱×۱×۱ m طراحی شد.

ستون شماره یک : خاک آغشته به گازوییل بدون تلقیح میکروبی به‌عنوان کنترل

ستون شماره دو : خاک خشک بدون گازوییل

ستون شماره سه : خاک آغشته به گازوییل با تلقیح میکروبی به‌عنوان درمان

کف ستون‌ها تا ارتفاع ۱ m از خاک شن پر شد. خاک مورد استفاده در این پژوهش از حومه شهر کرمان انتخاب و به منظور جداسازی ذرات درشت از یک الک عبور داده شد. سپس روی خاک ستون‌های ۱ و ۳ به میزان ۳ l گازوییل به تدریج اضافه شد و به‌طور کامل و یکنواخت در خاک توزیع گردید. جدایه‌های به‌دست آمده در مرحله غربال‌گری به میزان ۱ l به خاک افزوده شد که از محلول باکتری‌های فوق به میزان $۱/۵\times۱۰^{۸}$ باکتری در هر ۱ cc محلول تلقیح و در شرایط دمایی ۳۰-۱۵ °C نگهداری شد. دما و رطوبت به‌صورت روزانه و pH به‌صورت هفتگی اندازه‌گیری و ثبت گردید. شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها به‌روش پور پلیت (کشت صفحه‌ای) هر ده روز یک بار انجام شد.

نمونه خاک پیش از تلقیح میکروبی و۱۰۰ روز پس از تلقیح و همچنین نمونه خاکی که بلافاصله با گازوییل آغشته شده بود (به‌عنوان کنترل)، توسط دستگاه کروموتوگرافی گازی Shimadzu مدل 14A با استفاده از ستون مویین DB-5 به طول ۳۰ m و قطر داخلی ۰/۲۵ mm آنالیز شد. دتکتور مورد استفاده در این روش FID بوده و از یک برنامه حرارتی برای تغییر دمای ستون استفاده گردید.

نمونه‌ها در دی کلرومتان به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق شده و حجم ۱ µl از نمونه‌های رقیق شده به دستگاه تزریق گردید. برای استخراج اجزای گازوییل از نمونه‌های خاک، از دی کلرومتان استفاده شد. بدین‌ترتیب پس از اینکه نمونه به مدت ۵ دقیقه در حمام اولتراسوند در دمای آزمایشگاه مخلوط گردید،

Archive of SID

www.SID.ir

با استفاده از فیلتر PTFE صاف شد و از نمونه‌های صاف شده به دستگاه تزریق گردید و بر اساس نتایج گاز کروموتوگراف، کارایی میکروارگانیسم‌ها در تجزیه زیستی گازوییل بررسی گردید. میکروارگانیسمی که بیشترین میزان تجزیه گازوییل را از خود نشان دارد، با تست‌های بیوشیمیایی و مولکولی مورد شناسایی قرار گرفت.

به منظور شناسایی مولکولی سویه جداسازی شده، ژنوم باکتریایی استخراج و سپس توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) تکثیر شد. در مرحله استخراج DNA، ml ۱/۵ از کشت شبانه در °C ۳۷ سانتریفیوژ شده و از رسوب حاصل با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت سیناژن با شماره سریال DNP Tm و بر اساس پروتکل مربوطه، ژنوم استخراج گردید. سپس برای تایید صحت استخراج DNA نمونه‌های منتخب، تکنیک الکتروفورز در ژل آگاروز صورت گرفت و محصولات در ۱٪ ژل آگاروز آغشته به اتیدیوم بروماید قرار داده شد و باندهای حاصل بررسی گردید. سپس DNA استخراج شده برای PCR آماده شد.

برای تکثیر ژن SrRNA 16 از آنزیم Taq پلیمراز و DNA ژنومی به‌عنوان الگوی دو پرایمر عمومی 27F و 338R (از شرکت سیناژن) که از پرایمرهای یونیورسال (جدول شماره ۱) می‌باشند، استفاده شد. برنامه PCR نیز در ۳۰ دور و مطابق جدول شماره ۲ صورت گرفت.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR

پرایمر	توالی ′۳ ---- ′۵
۲۷ F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
۳۳۸ R	GCTGCCTCCCGTAGGAGT

جدول ۲- برنامه PCR

مرحله	زمان (min)	دما (°C)
دناتوراسیون اولیه	۳	۹۶
دناتوراسیون	۰/۵	۹۶
اتصال	۰/۵	۵۹
طویل شدن	۱	۶۵
طویل شدن نهایی	۱۰	۶۵

در ادامه به منظور اطمینان از دست‌یابی به باندهای 16S rRNA سویه‌های منتخب، با انجام الکتروفورز (با شاهد مثبت و منفی PCR) نتایج بررسی شد و برای تعیین ترادف ژنتیکی، نمونه به شرکت Macrogene کره جنوبی ارسال گردید. سپس توالی‌های حاصل از Sequencing با استفاده از برنامه Chromas Pro ویرایش شده و در فرمت FASTA ذخیره گردید.

پس از شناسایی ترادف سویه منتخب، نتایج حاصل با BLAST خوانده شد و توالی حاصل با توالی‌های موجود در بانک اطلاعات زیستی NCBI مقایسه گردید تا درصد تشابه سویه‌های به‌دست آمده با انواع شناخته شده آنها تعیین گردد.

نتایج و بحث

pH، رطوبت و دما طی آزمایشات، تغییرات چندانی نداشته و به ترتیب در محدوده pH=۷-۸، رطوبت بین ۵۰-۳۰٪ و دما بین °C ۳۰-۱۵ تغییر نمودند که در روند رشد میکروب‌ها تداخل ایجاد نمی‌نماید. در صورت کاهش رطوبت، این پارامتر از طریق آب‌پاشی در حد ثابتی تنظیم گردید. نتایج شمارش کلی میکروب‌های مزوفیل انجام شده در ستون‌های مورد نظر در جدول ۳ و خصوصیات و ویژگی‌های بیوشیمیایی سودوموناس آئروژینوزا در جدول ۴ ارائه شده است. نتایج حاصل از شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها نشان‌دهنده افزایش جمعیت میکروبی در ستون شماره ۳ است. همچنین تنوع میکروبی در ستون شماره ۳ نسبت به نمونه کنترل، خاک خشک و خاک آلوده به گازوییل بدون تلقیح میکروبی بیشتر است و جمعیت غالب آن باسیل گرم منفی اکسید از مثبت می‌باشد.

پس از انجام مطالعات فیزولوژیک و بیوشیمیایی، ژنوم استخراجی سویه مربوطه توسط تکنیک PCR تکثیر و باندهای حاصل به وسیله الکتروفورز بررسی گردید. شکل ۱ تایید کننده تکثیر ژن 16S rRNA سویه منتخب می‌باشد که حدود bp ۳۱۱ طول دارد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳- میانگین تعداد باکتری‌های مزوفیل (cfu/g*) در نمونه مورد بررسی

نمونه / روز	خاک خشک	خاک با گازوییل بدون تلقیح میکروبی	خاک با گازوییل با تلقیح میکروبی
۱	۲×۱۰^{۴}	۶×۱۰^{۶}	۲×۱۰^{۶}
۱۰	$۶/۷\times۱۰^{۵}$	$۴/۴\times۱۰^{۵}$	$۳/۲\times۱۰^{۷}$
۲۰	۶×۱۰^{۵}	$۴/۵\times۱۰^{۵}$	$۲/۲\times۱۰^{۷}$
۳۰	$۱/۸\times۱۰^{۵}$	$۳/۷\times۱۰^{۶}$	$۲/۱\times۱۰^{۷}$
۴۰	$۱/۸\times۱۰^{۶}$	۳×۱۰^{۶}	$۷/۸\times۱۰^{۸}$
۵۰	$۲/۴\times۱۰^{۷}$	$۲/۳\times۱۰^{۷}$	$۵/۴\times۱۰^{۸}$
۶۰	$۴/۱\times۱۰^{۶}$	$۲/۵\times۱۰^{۶}$	$۴/۷\times۱۰^{۹}$
۷۰	$۱/۹\times۱۰^{۶}$	$۱/۵\times۱۰^{۷}$	۱×۱۰^{۱۰}
۸۰	$۱/۵\times۱۰^{۶}$	$۶/۵\times۱۰^{۶}$	$۱/۸\times۱۰^{۹}$
۹۰	$۲/۹\times۱۰^{۶}$	$۱/۱\times۱۰^{۷}$	$۶/۲\times۱۰^{۱۰}$
۱۰۰	$۳/۶\times۱۰^{۶}$	۲×۱۰^{۷}	$۶/۲\times۱۰^{۱۰}$

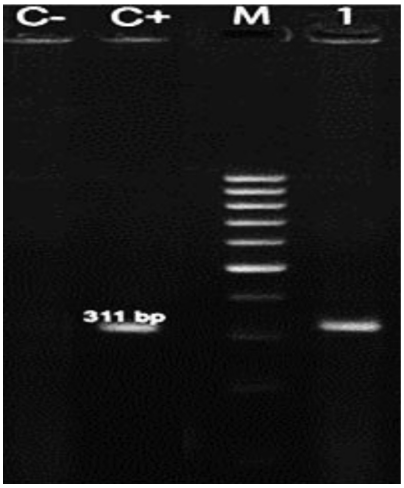
* colony forming unit

جدول ۴- خصوصیات و ویژگی‌های بیوشیمایی سودوموناس آئروژینوزا

نوع آزمون	
اکسیداز	+
حرکت	+
ایندول	-
هیدرولیز سیترات	-
واکنش در محیط TSI	ALK/ALK
رشد بر روی تایوگلیکولات	رشد در سطح (هوازی)
رشد بر روی مک کانکی آگار	+
واکنش در محیط OF با قند گلوکز	اکسید کننده
هیدولیز آرژنین	+
هیدرولیز اوره	-
هیدولیز ژلاتین	-
حساسیت به پلی میکسین B	+
حساسیت به پنی سیلین	-
رشد در ۴۲ °C	+
رشد در ۴ °C	-
کاتالاز	+

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- تکثیر DNA حاوی ژن SrRNA16 توسط PCR. اندازه قطعه مورد نظر ۳۱۱ جفت باز است. باندهایی که مشاهده می‌شود از چپ به راست کنترل منفی،کنترل مثبت ژن SrRNA16، مارکر یک کیلو بازی و ژن SrRNA16 سویه زیست فزونی می‌باشند.

سویه به‌دست آمده در پژوهش حاضر توسط تکنیک ترادف یابی ژنی 16SrRNA که متداول‌ترین شاخص مورد استفاده در زمینه سیستماتیک میکروبی است، مورد مطالعه قرار گرفت [۱۷ و ۱۸].

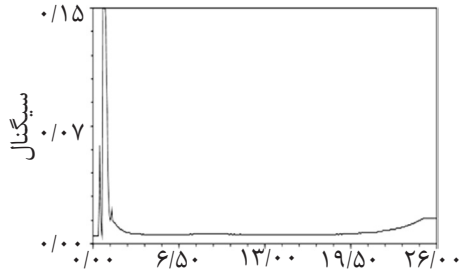
نتایج حاصل از آزمون ژنتیکی بر پایه 16SrRNA Sequencing، آنالیز فیلوژنتیکی داده‌ها و سپس خواندن نتایج با BLAST و مقایسه با توالی‌های موجود در بانک اطلاعات زیستی NCBI مشخص نمود که سویه منتخب متعلق به pseudomonase aeruginosa سویه IAM 12369 بود. میزان تشابه ترادف 16SrRNA برای سویه منتخب ۹۹٪ به دست آمد.

آنالیز گاز کروماتوگرافی خاک خشک در شکل ۲ نشان داده شده است. به منظور بررسی تأثیر تلقیح میکروبی در زیست فزونی گازوییل، کروماتوگرام خاک گازوییلی بدون تلقیح میکروبی (شکل ۳) به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد و کروماتوگرام حاصل از فعالیت میکروبی خاک‌های آغشته به گازوییل با تلقیح میکروبی (شکل‌های ۴ و ۵) با آن مقایسه گردید. سطح زیر منحنی و درصد آن در زمان‌های احتباس مختلف در نمونه خاک گازوییلی کنترل بانمونه تحت درمان مقایسه شد. پیک‌ها نشان‌دهنده آلکان‌های موجود در خاک گازوییلی یا نمونه کنترل با وزن مولکولی متفاوت است که هرچه وزن مولکولی آلکان بیشتر باشد، در زمان احتباس طولانی‌تر از ستون خارج شده است . نتایج نشان می‌دهد که پیک‌های دقیقه ۲/۴۸، ۲/۷۴، ۴/۰۹، ۱۱/۳۷، ۱۳/۸۹، ۲۰/۴۷، ۲۱/۲۹، ۲۲/۰۹، ۲۲/۸۴، ۵۶/۲۳ آلودگی درنمونه در میان به‌طور کامل حذف شده است و در پیک‌های دقیقه ۶/۵۷، ۸/۶۵، ۱۰/۳۸، ۱۱/۸۹، ۱۳/۲۵، ۱۴/۴۹، ۱۵/۶۴، ۱۵/۷۷، ۱۶/۷۱، ۱۷/۷۳، ۱۸/۱۹، ۱۹/۶۰ آلودگی کاهش قابل توجهی داشته است که بیان‌گر توانایی تجزیه گازوییل توسط میکروارگانیسم‌های موجود در خاک می‌باشد. بنابراین باکتری‌های موجود در تجزیه گازوییل، عملکرد مناسبی دارند.

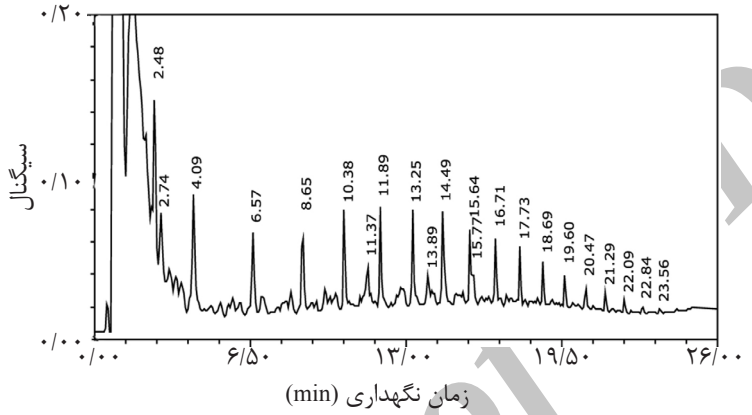
در پایان سویه جدا شده نهایی در این تحقیق با بررسی‌های ماکروسکوپی، میکروسکوپی و تست‌های بیوشیمیایی و در نهایت تخلیص DNA و تعیین 16SrRNA آن، شناسایی گردید که با احتمال ۹۹٪ سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد. فاسندو و همکارانش در مطالعه‌ای دریافتند که ۱۳ روز پس از تلقیح باکتری و کاربرد کود نیترات آمونیوم، آلودگی خاک به گازوییل به میزان ۹۰٪ کاهش می‌باشد. این نتیجه به‌وسیله مقایسه سطح زیر منحنی پیک‌های گاز کروماتوگرافی به‌دست آمد که نشان‌دهنده مصرف گازوییل به‌وسیله جمعیت باکتری و افزایش فعالیت میکروبی در خاک آلوده در اثر تلقیح خاک به باکتری و کاربرد کود می‌باشد [۱۹].

Archive of SID

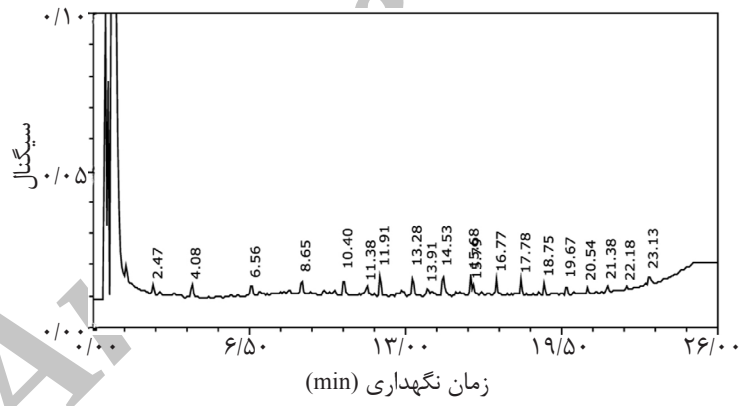
www.SID.ir



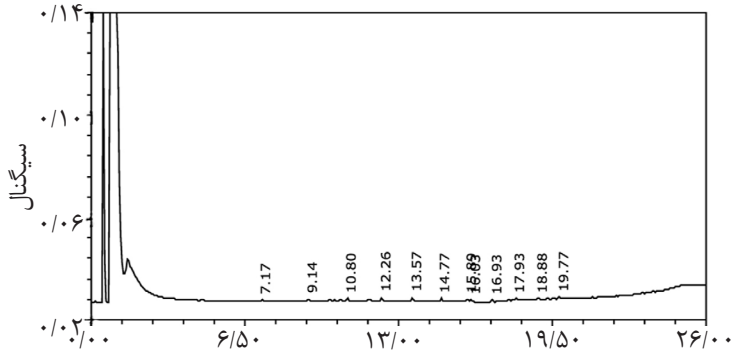
شکل ۲- آنالیز گاز کروماتوگرافی خاک خشک



شکل ۳- آنالیز گاز کروماتوگرافی نمونه خاک آغشته به گازوییل



شکل ۴- آنالیز گاز کروماتوگرافی نمونه خاک آغشته به گازوییل، با زیست فزونی در روز پنجاهم



شکل۵- آنالیز گاز کروماتوگرافی نمونه خاک آغشته به گازوییل، با زیست فزونی در روز صدم

www.SID.ir

در تحقیق حاضر نیز ملاحظه گردید که در مدت ۵۰ روز پس از تلقیح باکتری به خاک آلوده به گازوییل، بیش از ۹۰٪ آلودگی گازوییلی از خاک حذف شده است.

بهرامی‌نژاد و همکارانش در ارزیابی تکنیک زیست فزونی درمقیاس آزمایشگاهی در مدت ۷۰ روز به این نتیجه رسیدند که رشد میکروب‌ها تا ۳۰ روز افزایش چشم‌گیری می‌یابد. همچنین با مقایسه سطح زیر منحنی پیک‌های کروماتوگرافی گازی متوجه شدند که حداکثر تجزیه میکروبی در ۳۰ روز اولیه رخ می‌دهد. در زمان ۷۰ روز نیز تجزیه میکروبی تا حدودی افزایش می‌یابد. در نهایت با انجام تست‌های بیوشیمیایی مشخص شد که حداکثر تجزیه زیستی توسط سویه سودوموناس صورت گرفته است [۲۰]. در این تحقیق نیز بیشترین رشد میکروبی ۵۰ روز پس از تلقیح میکروبی ملاحظه شد و همچنین با انجام تکنیک کروماتوگرافی در روزهای ۵۰ و ۱۰۰ مشخص شد که بیشترین حذف در زمان ۵۰ روز صورت گرفته است.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش از طریق کشت میکروبی و شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها (خاک آغشته به گازوییل با تلقیح میکروبی و بدون تلقیح میکروبی) هر ۱۰ روز یک‌بار در محیط آگار مغذی و گرم‌خانه گذاری به مدت ۷۰ ساعت در دمای ۳۰ °C، افزایش در تعداد میکروارگانیسم‌ها طبق جدول ۳ به وضوح مشاهده شد که نشانه تاثیر تلقیح میکروبی در رشد میکروارگانیسم‌ها می‌باشد.

نتایج شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها و آنالیز گاز کروماتوگرافی بیان‌گر این واقعیت است که در مدت ۱۰۰ روز پس از تلقیح میکروبی ستون‌های خاک مورد نظر جمعیت میکروبی خاک از ۲×۱۰^{۶} به $۲/۶\times۱۰^{۱۰}$ افزایش داشته است که با توجه به نتایج تست‌های بیوشیمیایی و مولکولی مشخص شد که در این بین باسیل‌های گرم منفی اکسیداز مثبت (پسودوموناس آئروژینوزا) جمعیت غالب را تشکیل داده‌اند. آنالیز کیفی و کمی به کمک دستگاه گاز کروموتوگرافی نشان می‌دهد که برخی از اجزای موجود در نمونه تحت درمان توسط زیست فزونی از بین رفته یا کاهش یافته‌اند. بررسی‌های انجام شده روی نمونه‌های آغشته به گازوییل توسط دستگاه گاز کروماتوگرافی نشان‌دهنده پاک‌سازی زیستی آلاینده گازوییل توسط میکروب‌های به‌دست آمده از مرحله غربال‌گری می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با همکاری دلسوزانه استاتید محترم و همچنین مسئوول آزمایشگاه ایرانیان غذا آزما استان کرمان انجام گرفته است که بدین‌وسیله از تمامی این عزیزان به خاطر زحمات و راهنمایی‌های مفیدشان کمال قدردانی را دارم.

مراجع

[1]. Hua J., *"Biodegradation of dispersed marine fuel oil in sediment under engineered pre-spill application strategy," Ocean Engineering*, 33: pp. 152–167, 2010.

[2]. The Future of Diesel Fuel, The Potential for a National Diesel Fuel Standard EA Engineering Science, and Technology Inc. of ATAF. 1998.

[3]. Onifade A. K. and Abubakar F. A., *"Characterization of hydrocarbon- degrading Microorganisms isolation from crude oil contaminated soil and remediation of the soil by enhanced natural attenuation," Research Journal of Biological Sciences*, 2 [1], pp. 36-40, 2007.

[4]. Kermanshahi pour A. Karamanev D. and Margaritis A., *"Biodegradiation of petroleum hydrocarbons in an im*

Archive of SID

www.SID.ir

mobilized cell airlift bioreactor," Water Res. 39, pp.3704-3714, 2005.

[5]. Shafie P., *"Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons in the Shadegan pond,"* M.Sc. Dissertation Tarbiat Modares University, Faculty of Engineering, p. 107, 1382.

[6]. Mills M. A. Bonner J. S. McDonald T. J. Page C. A. and Autenrieth R. L., *"Intrinsic bioremediation of a petroleum impacted wetland," Marine Pollutin Bulletin*, 46: pp. 887-899, 2009.

[7]. Trindade P. V. O. Sobral L. G. Laite S. G. F. and Lemos J. L. S. *"Evaluation of the biostimulation and bioaugmentation Techniques in the bioremediation process of petroleum hydrocarbons contaminanted soil,"* In Proceedings of the 9th International Petroleum Environmental Conference, New Mexico, USA.

[8]. Seyyed alikhani S. and Sharfa M., *"Biological treatment of hydrocarbon contaminated soils within the production efficiency of bacterial diseases,"* National Energy Conference, 1388.

[9]. Mendelssohn I. A. and Lin Q., *"Development of bioremediation for oil spill cleanup in costal wetland,"* OCS Study. MMS. pp. 2002-2048, 2009.

[10]. Prince R. C. Lessard R. R. and Clark J. R., *"Bioremediationof oil spill," Oil & Gas and Technology-Rev*., 58 [4], pp. 463-468. 2008.

[11]. Kim M. H and Hao O. J., *"Co-metabolic degradation of chlorophenols by Acinetobacter species," Water Res*. 33, 562-574, 1999.

[12]. Lee K. and Gibson D.T., *"Toluene and ethylbenzene oxidation by purified naphthalene dioxygenase from Pseudomonas sp. Strain NCIB 9816-4," Appl. Environ. Microbiol*., 62, pp. 3101-3106, 1996.

[13]. Lee K., Brand J. M., and Gibson D. T,. *"Stereospecific sulfoxidation by toluene and naphthalene dioxygenases," Biochem. Biophys. Res. Commun*., 212, pp. 9-15, 1995.

[14]. Shields M. S. Montgomery S. O. Cuskey S. M. Chapman P. J. and Priichard P. H., *"Mutants of Pseudomonas cepacia G4 defective in catabolism of aromatic compounds and trichloroethylene," Appl. Environ. Microbiol*., 57, pp. 1935-1941, 1991.

[15]. Boossert I. D. and Bartha R., *The fate of petroleum in soil ecosystems,* In: Atlas RM [ed]. Petroleum Microbiology, Mac Millan Publishing Co., New York. pp. 435-474, 1984.

[16]. Abd-Elsalam H. E., Hafez E. E., Hussain A. A. , Amany G. A., and Hanafy A. A., *"Isolation and identification of Three- rings polyaromatic hydrocarbons [Anthracene and phenanthrene] degrading bacteria," American- Eurasian J. Agric. & Environ. Sci*., 5 [1], pp. 31-38, 2009 .

[17]. Amann R. I. Ludwing W. and Schleifer H. K., *"Phylogeneticidentififi cation and insito detection of individual microbialcells without cultivation," Microbiol Reviews*. 59, pp.143-169, 1995.

[18]. Stackebrandt E. and Goebel B. M. , *"Taxonomic note: aplace for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequenceanalysis in the present species defifinition in bacteriology," Int. JSyst. Bacteriol*., 44, pp. 846-849, 1994.

[19]. Facundo J., Marquez R., Hernandez V., and Teresa Lamela M. A., *"Biodegraradation of diesel oil in soil by a microbial consortium,"* Water, Air, and Soil Pollution, Vol. 128, ISSue 3, 4, pp. 313-320, June 2001.

[20]. Bahraminejad M., *"Evaluation of the bioventing and bioaugmentation techniques in the bioremediation process of gasoil contaminated soils,"* M.Sc. Dissertation, Faculty of Sciences, Islamic Azad University of Jahrom, pp. 102-103, 1390.

Archive of SID

www.SID.ir