بررسی قابلیت تجزیه زیستی برخی از فراورده‌های نفتی توسط باکتری‌های بومی ریزوسفر گیاهان

فریبا محسن زاده

همدان، دانشگاه بوعلی سینا همدان، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۹۳/۳/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۳/۵/۱۶

چکیده

برخی از باکتری‌ها قابلیت زیست‌پالائی ترکیبات نفتی را دارند. در این تحقیق باکتری‌های موجود در ریزوسفر گیاهان خاک‌های آلوده با محصولات نفتی سازگار، جداسازی و خالص‌سازی شد. سپس باکتری‌های با توانایی تجزیه زیستی این ترکیبات انتخاب شدند و با استفاده از کلیدهای تاکسونومی و تست‌های بیوشیمیایی شناسایی شدند؛ و توانایی آن‌ها در حذف فراورده‌های نفتی مقایسه گردید. در نهایت باکتری های با بالاترین توانایی تجزیه تمام فراورده‌های نفتی مورد بررسی معرفی گردید. طبق نتایج ما از خاک‌های آلوده به نفت سفید و گازوئیل، *آلکالی‌ژنز یوتروفا*، *سودوموناس آلکالی‌ژنز* و *سودوموناس آئروژنزا*، از خاک های آلوده به نفت سفید و روغن موتور، *سودوموناس آلکالی‌ژنز*، *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس کوآگولانس* و از خاک های آلوده به روغن موتور و گازوئیل، *سودوموناس آلکالی‌ژنز* جداسازی گردید. *سودوموناس آلکالی‌ژنز* توانایی تجزیه‌زیستی تمام انواع ترکیبات فراورده‌های نفتی مورد بررسی را داشت. راندمان حذف‌زیستی این ترکیبات توسط باکتری فوق در تیمارها به ترتیب ۷۲، ۶۳ و ۵۶ درصد برآورد گردید.

واژه های کلیدی: آلودگی نفتی خاک، باکتری‌های بومی، زیست‌پالائی، *سودوموناس آلکالی‌ژنز*

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۸۸۱۳۱۰۴۰ ، پست الکترونیکی: fmohsenzade@gmail.com

مقدمه

خاک اساس هستی، تولید و انبار مواد خام است و نقش مهمی را در زندگی انسان ایفا می‌کند. برنامه‌ریزی برای داشتن خاکی سالم و تولیدکننده، لازمه بقای انسان است (۷). فراورده‌های نفتی، از مهمترین آلاینده‌های آلی محیط زیست به ویژه خاک هستند (۵)، ورود این ترکیبات به طبیعت، به سبب سمی بودن و ایجاد جهش و سرطان‌زائی برای موجودات‌زنده، از مهم‌ترین نگرانی‌های حامیان محیط‌زیست است. این دسته از آلاینده‌های آلی، پایداری زیادی در خاک دارند و انباشته شدن تدریجی آن‌ها در خاک، موجب اختلال در کارکرد طبیعی خاک از جمله کاهش عملکرد محصولات کشاورزی و تغییر در ویژگی-های خاک می‌گردد (۳۳،۹). نیاز به اصلاح محیط‌های آلوده، سبب توسعه فن‌آوری‌های گوناگونی برای رفع آلودگی‌های آلی از خاک شده‌است (۷). فن آوری‌های فیزیکی و شیمیایی نظیر تصفیه حرارتی، تثبیت، سوزاندن و جامدسازی، جهت حذف آلودگی از مناطق با وسعت نسبتاً کم کاربرددارند و برای رفع آلودگی‌های گسترده، صرفه اقتصادی ندارند؛ درنتیجه نیاز به روش‌های اقتصادی‌تر پاک‌سازی خاک‌های آلوده کاملا محسوس است (۳۲،۲۷،۹،۷).

زیست‌پالائی و گیاه‌پالایی یک فن‌آوری نسبتاً نوین پالایش خاک‌های آلوده است که در آن از موجودات‌زنده و گیاهان جهت حذف یا کاهش غلظت آلاینده‌های معدنی، رادیواکتیو و آلی به‌ویژه ترکیبات‌نفتی از محیط‌زیست

Archive of SID

www.SID.ir

استفاده‌می‌شود (۴۰،۲۶). زیست‌پالائی خاک‌های آلوده به موادنفتی از جدیدترین روش‌های مطرح در زمینه پاک-سازی خاک‌ها از موادنفتی است و همچنین ابزاری مهم جهت کاهش آلودگی‌های محیط‌زیست می‌باشد (۴۹،۳۰،۱۰). پژوهش‌های متعددی در دست‌است که نشان-می‌دهد، سویه‌های مختلف باکتریایی نه‌تنها نسبت به آلودگی‌های نفتی مقاوم‌هستند، بلکه برخی از آن‌ها قادرند از این ترکیبات به عنوان منبع کربن و ماده غذایی استفاده کنند؛ بنابراین وجود آلاینده‌های نفتی نه تنها مانع رشد باکتری‌ها نمی‌شود بلکه موجب رشد بیشتر و سریعتر برخی گونه‌ها نیز می گردد (۴۵،۷).

در پژوهشی، کاریمورا و همکاران موفق به جداسازی سویه *اسفینگوموناس الوده آ* از خاک های آلوده شدند که قادر بود از کربازول و سایر ترکیبات نفتی استفاده کند. نتایج آن‌ها نشان‌داد که با افزایش میزان رشد باکتری، میزان تجزیه مواد نفتی افزایش می یابد (۲۵). پژوهشگران دیگر نیز با تحقیقاتی که در خصوص جداسازی و شناسایی باکتری-های تجزیه کننده بنزین از خاک‌های آلوده پمپ‌های بنزین انجام‌دادند، موفق به جداسازی گونه‌های *سودوموناس رودوکوکوس* و *فلاووباکتریوم* گردیدند (۲۹). در مطالعه‌ای دیگر با عنوان مصرف هیدروکربن‌های‌نفتی به کمک باکتری‌های بومی، نتایج قابل توجهی به‌دست‌آمده‌است. عمده باکتری‌های جداسازی و شناسایی‌شده را *باسیلوس مگاتریوم*، *سودوموناس پوتیدا*، *باسیلوس برئیس*، *انتروباکتر آئروژنز* و *باسیلوس پونی‌لیس* تشکیل می دادند (۳۷). همچنین در تحقیق دیگری که توسط اوکوه و همکاران (۳۵) انجام گرفت، توان گونه *بورخولدریا اسپسیا آرکیو* در تجزیه زیستی نفت خام سنگین مورد بررسی قرار گرفت. این باکتری از نفت خام به عنوان تنها منبع‌کربن استفاده-نمود و در مدت ۱۵ روز جمعیت باکتری از $۱۰^{۵}$ به $۱۰^{۸}$ cfu افزایش یافت (۳۵).

با توجه به اینکه معمولا خاک‌ها به ترکیبی از فراورده‌های نفتی آغشته می‌گردند و تاکنون هیچ تحقیقی بر روی فلور میکربی که قادر به حذف همزمان ترکیبات مختلف نفتی باشد صورت نگرفته‌است، لزوم انجام این بررسی احساس می‌شود. بنابراین پژوهش حاضر با هدف یافتن باکتری‌های ریزوسفری دارای قابلیت بالا در تجزیه‌زیستی طیف وسیعی از فراورده‌های نفتی در خاک‌های‌آلوده شهر همدان، صورت گرفت.

مواد و روشها

آماده سازی نمونه‌ها: نمونه‌هایی از خاک همراه (اطراف) ریشه گیاهان رویش یافته در خاک‌های آلوده شهر همدان، از نقاط مختلف شهر، جمع‌آوری و در پاکت‌های یک بار-مصرف جهت انجام آزمایشات‌میکروبی به آزمایشگاه منتقل‌گردید. نمونه‌های خاک پس از جداسازی موادزائد، از صافی با قطر منافذ ۲ میلی‌متری عبور داده‌شدند. سپس نمونه‌ها کاملا با هم مخلوط و یک نمونه یکنواخت تهیه گردید.

سازگار کردن باکتری‌های ریزوسفری با فراورده‌های نفتی: جهت سازگارکردن باکتری‌های موجود در نمونه‌خاک مورد بررسی، و غالب شدن سوش‌های دارای قابلیت تجزیه‌زیستی ترکیبات نفتی موجود در آن، نمونه همگن-شده به فراورده‌های نفتی مختلف (نفت سفید، گازوئیل، روغن موتور) به صورت دو به دو (نفت و گازوئیل، نفت و روغن موتور و گازوئیل و روغن موتور) در غلظت ۱ درصد (با نسبت مساوی) آغشته شدند. نمونه‌ها در دمای آزمایشگاه به مدت یک‌ماه نگهداری شدند. برای حفظ رطوبت مورد نیاز باکتری‌ها، نمونه‌ها به صورت روزانه با آب مقطر اسپری گردیدند.

کشت و جداسازی باکتری‌های خاک: بعد از گذشت یک‌ماه رقت‌های متوالی از $۱۰^{-۱}$ تا $۱۰^{-۹}$ نمونه‌های خاک در محیط‌کشت مغذی حاوی آگار غنی‌شده با ۵٪ عصاره

Archive of SID

www.SID.ir

مخمر به روش آمیخته کشت داده‌شد و به مدت یک هفته در دمای آزمایشگاه نگهداری گردیدند. سپس انواع پرگنه-های رشد کرده جداسازی و به روش کشت خطی خالص-سازی و هر سویه باکتریایی با یک کد مشخص شد.

بررسی حذف‌زیستی فراورده‌های نفتی: سترون سازی فراورده‌های نفتی: برای اینکه در نمونه‌های تیمارشده با فراورده‌های نفتی فقط عملکرد باکتری تلقیح‌شده بررسی-گردد، بایستی فراورده‌های نفتی مصرفی ابتدا سترون‌شوند. ازآن‌جا که حرارت، احتمالا موجب تبخیر یا تغییر ماهیت بخشی از مواد تشکیل‌دهنده فراورده‌های نفتی می‌گردد، عمل سترون‌سازی با استفاده از فیلتراسیون با کمک صافی-های نیتروسلولزی سترون با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرون صورت گرفت (۲۱).

آماده‌سازی باکتری‌ها جهت تلقیح: ابتدا به منظور بالابردن و یکسان‌سازی جمعیت سوش‌های باکتریائی جداشده در مرحله قبل، یک پرگنه از هر سوش در محیط نوترینت براث کشت داده شد و بعد از رسیدن به کدورتی معادل ۰/۱- ۰/۰۸، رسوبی از هر سوش باکتریائی تهیه شد(۱۸).

تهیه تیمارها جهت بررسی قابلیت حذف فراورده‌های نفتی باکتری‌های جدا شده: رسوب حاصل از هر سوش باکتری تهیه شده، به محیط کشت حاوی نمک های ضروری رشد باکتری ها (جدول ۱)، و ترکیبی از فراورده-های نفتی رایج با نسبت های مساوی (نفت و گازوئیل، نفت و روغن موتور، گازوئیل و روغن موتور و نهایتا گازوئیل، روغن موتور و نفت) با غلظت ۰/۵، ۱، ۵ درصد، تلقیح گردید. لوله‌های فاقد باکتری به عنوان شاهد تهیه-گردید (۵۱). سپس نمونه‌های فوق به مدت یک ماه در دمای ۲۵ درجه‌سانتیگراد در محیط آزمایشگاه بر روی شیکر، نگهداری‌شدند (۲۴). جهت کنترل آلودگی ثانویه تیمارها، هر هفته یک قطره از نمونه مجددا بر روی محیط کشت آگار مغذی کشت داده شد و پرگنه باکتریها با باکتری اولیه مقایسه گردید.

جدول ۱- ترکیب نمک‌های موجود در محیط کشت نمکی حداقل

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

بررسی میزان رشد باکتری‌ها: میزان رشد توده میکروبی نمونه‌های تیمار شده از طریق بررسی کدورت نمونه‌ها ارزیابی گردید. جهت این منظور میزان جذب نوری نمونه-ها بعد از مدت یک ماه توسط دستگاه اسپکتوفتومتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری و مقدار آن با محیط شاهد مقایسه گردید (۲۵،۲۴،۲۳،۱۸).

شناسایی باکتری‌های دارای پتانسیل حذف فراورده‌های نفتی: باکتریهایی که در محیط فوق قادر به ایجاد کدورت بودند، از طریق تست های بیوشیمیائی اختصاصی (اکسیداز، لوان، سیترات، تحرک، متیل‌رد، لیسیتیناز، هیدرولیز اوره، لیپاز، اندول، احیای نیترات و ...)، بررسی و شناسائی گردیدند (۲۶).

بررسی راندمان حذف فراورده‌های نفتی: برای اندازه-گیری غلظت باقیمانده فراورده‌های نفتی در گروههای تیماری، بعد از اتمام دوره آزمایش، ترکیبات نفتی باقیمانده با دی کلرومتان استخراج، و میزان جذب نوری آن در طول موج ۴۲۰ نانومتر قرائت گردید (۵۱). از آنجایی که کاهش بخشی از محصولات نفتی به دلیل فرار بودن آنها است، مقایسه غلظت ترکیبات نفتی با نمونه‌های شاهد فاقد باکتری صورت گرفت (۶). سپس غلظت‌های باقیمانده با

Archive of SID

www.SID.ir

غلظت اولیه مقایسه و به صورت درصد حذف ترکیبات نفتی محاسبه گردید (۱۵).

آنالیز آماری: مقایسه مقادیر حاصل از سنجش کدورت نمونه‌ها جهت اندازه گیری قابلیت حذف‌زیستی باکتری-های جداشده و راندمان حذف فراورده‌های نفتی توسط آن‌ها، با استفاده از نرم‌افزار SPSS ورژن ۱۹ از طریق آزمون آماری آنالیز واریانس چند جانبه در سطح احتمال ۰/۰۵ انجام گرفت.

نتایج

جداسازی و شناسائی باکتری‌های تجزیه‌کننده فراورده-های نفتی: خاک‌های اطراف ریشه جمع آوری شده از مناطق آلوده به فراورده‌های نفتی که از بخش‌های مختلف شهر همدان جمع‌آوری شده بودند، با ترکیبی از محصولات نفتی مورد مطالعه آغشته شدند و پس از سازگار کردن فلور باکتریائی آن با این محصولات، باکتری‌هایی که قادر به رشد در حضور کمپلکس موجود در آن بودند، جداسازی گردید و با غلظت های مختلفی از این فراورده‌های ترکیبی (نفت و گازئیل، نفت و روغن موتور، و نهایتا روغن موتور و گازوئیل) (۰/۵، ۱ و ۵ درصد) به مدت یک ماه تماس داده‌شد. باکتری‌هائی که قادر به استفاده همزمان از این محصولات بودند در محیط‌کشت ایجاد کدورت نمودند. نتایج حاصله نشان داد که در مجموع ۳ سوش باکتریایی در حضور نفت سفید و گازوییل رشد نمودند. در حضور گازوییل و روغن موتور یک سوش باکتریایی و در حضور نفت سفید و روغن موتور، ۳ سوش باکتریایی رشد نموده اند که جداسازی و شناسایی شدند. باکتری *سودوموناس الکالیژنز* تنها باکتری بود که در هر سه گروه تیماری مشاهده گردید و بنابر این قادر به رشد در حضور هر سه فراورده نفتی مورد آزمایش می‌باشد. خصوصیات باکتری های جداسازی‌شده در جدول ۳ آورده‌شده‌است.

جدول۲- باکتری‌های مصرف کننده ترکیبات نفتی موجود در فراورده‌های مختلف نفتی

باکتری‌های رشدکرده در نمونه‌های تیمار شده با نفت سفید و گازوئیل	*سودوموناس آلکالی‌ژنز* (*Pseudomonas alchaligenes*) *سودوموناس آئروژنز* (*Pseudomonas aerogenosa*) *آلکالی‌ژنز یوتروفا* (*Alcaligenese utrupha*)
باکتری‌های رشدکرده در نمونه‌های تیمار شده با گازوئیل وروغن موتور	*سودوموناس آلکالی ژنز*
باکتری‌های رشدکرده در نمونه‌های تیمار شده با نفت سفید و روغن موتور	*سودوموناس آلکالی ژنز* *باسیلوس کوآگولانس* (*Bacillus coagulans*) *باسیلوس سیرکولانس* (*Bacillus circulans*)

جدول ۳- مهمترین ویژگی‌های ریخت شناسی باکتری‌های شناسائی‌شده

جدایه	خصوصیات مرفولوژیکی
سودوموناس آلکالی‌ژنز	گرم منفی، میله‌ای متحرک، به شدت هوازی، پرگنه‌های بژ روشن، موکوسی، دارای هاله در اطراف، برآمدگی جزئی در مرکز و قابلیت چسبندگی به محیطکشت.
آلکالی‌ژنز یوتروفا	گرم منفی، میله‌ای متحرک، به شدت هوازی، اکسیداز مثبت، کاتالاز مثبت ، اوره‌آز مثبت، پرگنه‌های ریز، بژ رنگ با حاشیه منظم و قابلیت چسبندگی به محیطکشت.

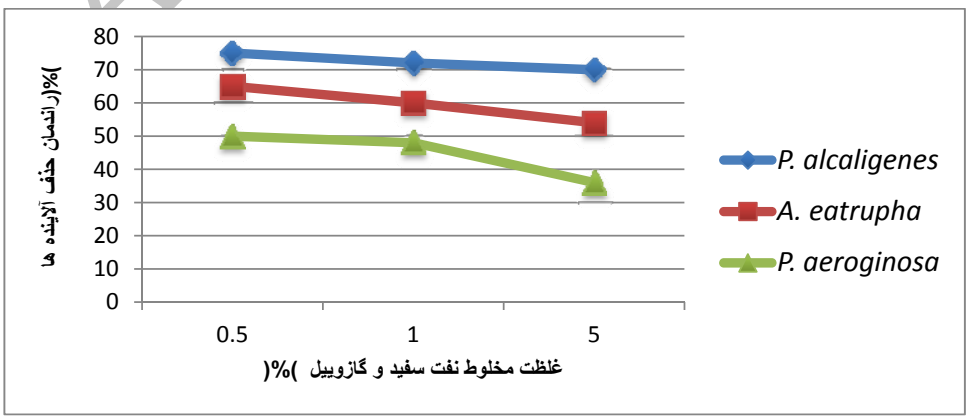
Archive of SID

www.SID.ir

سودوموناس آئروژنزا	گرم منفی، لاکتوز منفی، اکسیداز مثبت، توانایی رشد در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد و ویژگی فلوئورسانس در برابر نور فرابنفش .
باسیلوس کوآگولانس	گرم مثبت، میله‌ای متحرک، هوازی، ایجاد اندوسپور، مقاوم به عوامل فیزیکی و شیمیایی ، در فاز رشد گرم منفی ، کاتالاز مثبت، نیترات منفی، رشد اسپورها در محیط اسیدی.
باسیلوس سیرکولانس	گرم مثبت، میله‌ای، دارای اسپورهای بزرگ، کاتالاز مثبت، متحرک، تخمیرکننده گلوکز، دارای پرگنه نیمه شفاف با اندازه متغیر و متحرک، دارای مرز باریک بین پرگنه‌های اصلی و میکرو پرگنه‌ها.

اثر غلظت فراورده‌های نفتی: بعد از تماس یک ماهه هر یک از سه باکتری ایجادکننده کدورت با نفت سفید، روغن موتور و گازوئیل (*سودوموناس آلکالیژنز*، *آلکالی ژنز یوتروفا* و *سودوموناس آئروژنزا*) در غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۵ درصد ترکیب این فراورده‌ها به صورت دو به دو به نسبت مساوی (طبق گروه‌های تیماری)، حذف زیستی الاینده ها بررسی گردید. نتایج نشان داد افزایش غلظت از ۰/۵ درصد تا ۵ درصد باعث کاهش معنی‌داری در راندمان حذف زیستی آلاینده‌ها توسط هر سوش باکتریائی گردید ($p \leq ۰/۰۵$). شیب کاهش راندمان با افزایش غلظت از ۰/۵ تا ۱ درصد کمتر از میزان آن از غلظت ۱ تا ۵ درصد بود اما به طور کلی بیشترین میزان حذف در غلظت ۱ تا ۵ درصد آلاینده اتفاق افتاد. به طور متوسط بیشترین راندمان حذف آلاینده‌ها در غلظت ۰/۵ درصد و کمترین آن در غلظت ۵ درصد فراورده‌های نفتی مشاهده گردید (نمودارهای ۱ ، ۲ و ۳).

اثر سوش باکتریائی: نتایج نشان داد، کلیه باکتری‌ها در غلظت‌های مورد آزمون فراورده‌های نفتی، توانستند ترکیبات نفتی را از محیط‌کشت حذف کنند، اما در بین باکتری‌های مورد بررسی *سودوموناس آلکالی‌ژنز* بیشترین راندمان حذف را در کلیه غلظت‌ها و فراورده‌های مورد آزمون از خود نشان‌داد. تفاوت راندمان حذف آلاینده‌های باکتری مذکور با سایر باکتری‌ها معنی‌دار بود ($p \leq ۰/۰۱$) (راندمان حذف‌زیستی این ترکیبات توسط باکتری فوق در تیمارها به ترتیب ۷۲، ۶۳ و ۵۶ درصد برآورد گردید.) (نمودارهای ۱ ، ۲ و ۳).

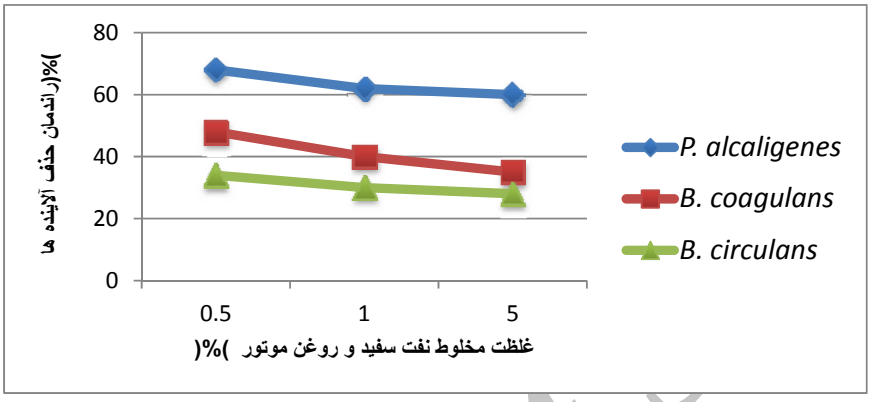


نمودار۱- (درصد) حذف فراورده‌های نفت سفید و گازوئیل توسط باکتری‌ها در غلظت‌های مختلف آلاینده‌ها (در مدت زمان تماس یک‌ماهه)

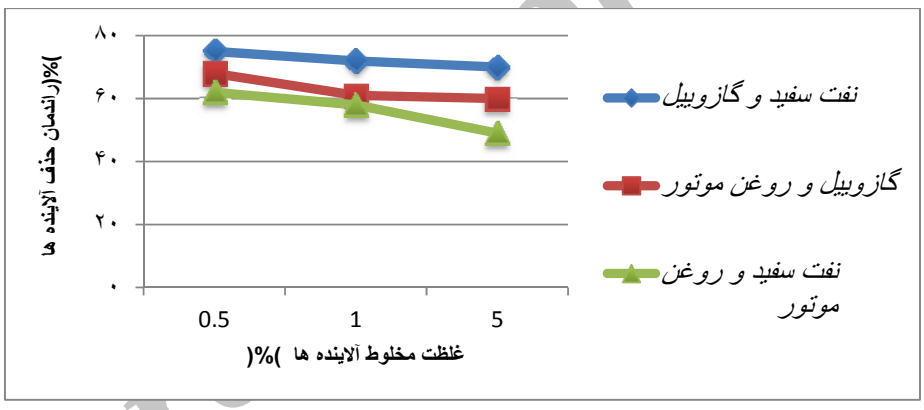
Archive of SID

www.SID.ir

بعد از *سودوموناس آلکالی‌ژنز*، در تیمارهای حاوی ترکیب نفت سفید و گازوئیل، باکتری های *آلکالی‌ژنز یوتروفا* و *سودوموناس آئروژنزا*، در تیمارهای حاوی ترکیب نفت سفید و روغن موتور، باکتری‌های *باسیلوس کوآگولانس* و *باسیلوس سیرکولانس* از نظر راندمان حذف‌زیستی در جایگاه‌های بعدی قرار گرفتند. در ترکیب روغن موتور و گازوئیل فقط باکتری *سودوموناس آلکالی‌ژنز* قادر به تجزیه‌زیستی بود (نمودار ۳).



نمودار۲- (درصد) حذف نفت سفید و روغن موتور توسط باکتری‌ها در غلظت‌های مختلف (در مدت زمان تماس یک‌ماهه)



نمودار۳- (درصد) حذف آلاینده‌ها توسط باکتری *Pseudomonas alcaligenes* در غلظت‌های مختلف آلاینده‌ها (در مدت زمان تماس یک‌ماهه)

بحث و نتیجه گیری

با مطالعه و دقت بر همه روش‌های رفع آلودگی‌های نفتی در محیط‌زیست و اشاره به اینکه سایر روش‌های حذف مثل سوزاندن و دفن‌کردن در زمین، علاوه بر هزینه‌بر بودن، در دراز مدت اثرات زیست‌محیطی نامطلوبی را به‌جا می-گذارند، می‌توان تکنولوژی "زیست‌پالایی" را به عنوان یکی از بهترین و عملی ترین روش‌های رفع آلودگی‌های نفتی در اکوسیستم‌های آبی و خشکی مطرح کرد."زیست-پالایی" یک روش قابل انعطاف، مناسب از نظر اقتصادی، پراهمیت و تکنیکی برای بهبود نواحی آلوده نفتی می باشد (۱۳).

نتایج این پژوهش نشان‌داد که در فلور باکتریائی خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی، باکتری‌های با قابلیت سازگارشدن با ترکیبات نفتی وجوددارد و این بدین معنی است که آلودگی به ترکیبات نفتی مانع رشد همه باکتری‌های خاک در محیط‌های آلوده نیست (۴۲). نتایج حاصله از پژوهش جاری، با نتایج بدست‌آمده توسط پژوهشگران متعدد پیشین همسو است (۴۶،۳۸،۳۷).

www.SID.ir

در این پژوهش از روش تلقیح باکتری بومی جداسازی‌شده از خود محیط آلوده و بکارگیری آن در زمینه سالم‌سازی زیستی آلاینده هیدروکربنی در خاک استفاده شده‌است. پژوهشگران کارائی این روش را در حذف‌زیستی آلاینده‌ها به اثبات رسانیده‌اند (۱۱) و علت این امر را سوخت‌وساز و سازگاری ژنتیکی جمعیت میکروبی در محیط‌زیست خودشان می‌دانند (۱۶،۴،۳).

طبق نتایج این پژوهش گونه‌های مختلف جنس *باسیلوس* قادر به تجزیه فراورده‌های هیدروکربنی بودند. در یک پژوهش با مقایسه میان ۵ سویه جداشده از خاک، تنها سویه *باسیلوس* قادر به مصرف بالای ترکیبات نفتی بود و توانایی این گروه در زیست‌پالایی ترکیبات‌نفتی به اثبات رسید (۳۹). در نتیجه بررسی‌های به‌عمل‌آمده از این پژوهش و تایید آن توسط سایر محققین گونه‌های باسیلوس به دلیل داشتن روکش درون سلولی از اسپور جزو گونه‌های با مقاومت بالا در برابر غلظت‌های بالای آلودگی‌های هیدروکربنی به شمار می‌آیند (۳۹).

تاثیر مثبت جنس *سودوموناس* در زیست‌پالایش فراورده-های نفتی که از نتایج تحقیق حاضر است با نتیجه بوسرت و بارتا (۱۲) هماهنگی دارد .همچنین محققان دیگر، طی پژوهش های خود تاثیر مثبت حضور باکتری سودوموناس را در زدودن آلاینده‌های آلی گزارش کرده‌اند (۴۱،۲۸). وکت و همکاران (۵۰) تاثیر مثبت *باسیلوس*ها را در تجزیه آلاینده‌های آلی نشان‌دادند. داس و ماخرجی (۱۷) بکارگیری دو گونه باکتری *باسیلوس* و *سودوموناس* را برای کاهش مجموع هیدروکربن‌های نفتی در نمونه خاکی از منطقه شمال شرقی هند بررسی نمودند. نتایج پژوهش آن‌ها حاکی از توانایی هر دو باکتری در کاهش مجموع هیدروکربن‌های نفتی بود.

نتایج ما نشان‌داد که باکتری‌های سازگار با ترکیبات‌نفتی متنوع هستند و جنس‌های مختلفی همچون *سودوموناس*، *باسیلوس*، *آلکالی‌ژنز* را شامل می شوند. محققان قبلی نیز جنس‌های مختلفی از باکتری‌ها را در خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی یافته‌اند(۵۱،۳۷،۱۴،۱). طبق نتایج ما دو جنس *سودوموناس* و *باسیلوس* در بین سوش‌های بومی باکتریائی تجزیه‌کننده نفت وجود دارند. این دو جنس توسط برخی محققان پیشین نیز گزارش گردیده است(۵۰،۴۲،۳۷،۶،۱).

نتایج ما نشان‌داد، که راندمان حذف نفت سفید در مورد کلیه باکتری‌های بررسی‌شده، در غلظت‌های نسبتا کم فراورده‌های نفتی(۰/۵درصد) بیشتر از سایر غلظت‌هااست. این نتایج با نتایج حاصل از رشد بیشتر باکتری ها در این غلظت هم‌خوانی دارد(نمودار ۱و ۲). بنابراین علت این امر را می توان در بیشتر بودن تراکم باکتری‌ها در این غلظت نسبت داد. تفاوت در میزان تحمل آلودگی نفتی باکتری‌های جداسازی شده از خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی توسط پژوهشگران متعدد گزارش شده‌است (۳۱،۲۵).

طبق نتایج ما گونه باکتریائی *سودوموناس آلکالی‌ژنز* با قابلیت تجزیه فراورده‌های نفتی از خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی مختلف جداسازی شده است. با توجه به اینکه توان رشد و قابلیت تجزیه باکتری‌ها به شرایط محیطی و آب و هوایی بستگی‌دارد(۴) می توان نتیجه‌گیری کرد که این باکتری در شرایط آب و هوایی سردسیر هم بهترین باکتری تجزیه کننده ترکیبات نفتی است. نتایج ما با یافته‌های برخی پژوهشگران که تجزیه ترکیبات نفتی توسط سویه سودوموناس آلکالی‌ژنز جدا شده از خاک‌های مناطق غیر سردسیر را تائید کرده بودند، همسوئی دارد(۵۱،۴۱،۲۵،۱۷).

نتایج آنالیز آماری نشان داد که فاکتور غلظت، سویه باکتری و اثر تعاملی آن‌ها در تمامی سطوح، معنی‌دار است و کلیه باکتری‌ها در غلظت‌های مورد آزمون فراورده‌های نفتی، توانستند آن را از محیط‌کشت حذف کنند، اما در بین باکتری‌های مورد بررسی *سودوموناس آلکالی‌ژنز* بیشترین راندمان حذف را در کلیه غلظت‌های مورد آزمون فراورده-

Archive of SID

www.SID.ir

های نفتی از خود نشان داد. راندمان حذف‌زیستی این ترکیبات توسط باکتری فوق در تیمار نفت سفید و گازوئیل بیشترین مقدار را داشت. علت این امر قابلیت تجزیه بیشتر ترکیبات موجود در این دو فراورده نفتی می‌تواند باشد (۴۸،۳۶،۲۲)، بعد از *سودوموناس آلکالی‌ژنز*، باکتری *آلکالی‌ژنز یوتروفا* و *باسیلوس کوآگولانس* و سپس بقیه باکتری‌ها به ترتیب بیشترین راندمان حذف را داشتند.

در نهایت در بین کل باکتری‌های مورد آزمون، باکتری *سودوموناس آلکالی‌ژنز* با دارا بودن رشد بیشتر و راندمان بالاتر، بیشترین راندمان حذف آلاینده را در کل غلظت‌های ترکیبات نفتی مورد آزمون، از خود نشان داد. بنابراین، این باکتری بعنوان شاخص تجزیه کننده فراورده‌های نفتی از خاک‌های آلوده، معرفی گردید. با وجود تنوع باکتریائی بیشتر خاک‌های آلوده به نفت سفید و گازوئیل، نسبت به روغن موتور، باکتری *سودوموناس آلکالی‌ژنز* به عنوان یک سوش باکتریائی همزیست با ریشه گیاهان و موثر در حذف انواع ترکیبات نفتی معرفی شد.

منابع

۱. آموزگار، م.، اخوان سپهی، ع.، اخوان سپهی، ف.، (۱۳۸۸)، جداسازی و شناسایی باکتری‌های هالوتولرانت تجزیه‌کننده از خاک چاه‌های نفت قم، فصلنامه دانش میکروب‌شناسی، ۱ (۳): ۵-۱۰.

۲. براتی، ب.، (۱۳۸۴)، دستور کار آزمایشگاه میکروب‌شناسی، انتشارات دانشگاه تهران.

۳. راهب، ج.، یخچالی، ب.، (۱۳۸۰). بررسی ژنتیکی چند سویه باکتری بومی قادر به گوگردزدائی ترکیبات نفتی. مجله زیست شناسی ایران، ۱۱ (۳): ۱-۱۱.

۴. راهب، ج.، کفایتی، م. الف.، بردانیا، ح.، (۱۳۹۱)، گوگردزدائی زیستی ترکیبات آلی گوگرددار سوخت‌های فسیلی. مجله زیست شناسی ایران، (۲): ۲۱۰-۲۰۵.

۵. طلایی، الف.، طلایی، م.، جعفرزاده حقیقی فر، ن.، (۱۳۸۸)، بهینه‌سازی بیولوژیکی فاضلاب‌های حاوی گازوئیل شناور بر روی سطح آب به روش تاگوچی، مجله آب و فاضلاب اصفهان، ۸۸ (۳): ۵۷.

۶. ناصری، س.، مصداقی‌نیا، ع.، عمرانی، ق.، رضایی، س.، ندافی، ک.، یونسیان، م.، اربابی، م.، (۱۳۸۴)، حذف هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای PAHs از خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی توسط کنسرسیوم میکروبی، گزارش نهایی طرح تحقیقاتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران.

۷. یوسفی کبریا، د.، خدادادی، الف.، کنجی دوست، ح.، بادکوبی، الف.، آموزگار، م.، (۱۳۸۸)، جداسازی باکتری بومی از خاک آلوده پالایشگاه نفت تهران با توانایی حذف گازوئیل، هشتمین کنگره بین المللی مهندسی عمران، دانشگاه شیراز، شیراز.

8. Abiola, A., Olenyk, M., (1998), Effects of organic amendment and surfactants on bioremediation of hydrocarbon contaminated soil by composting, *The 8th Annual National Composting Conference of The Composting Council of Canada, Ottawa, Ontario*; 4-6.

9. Alexander, M., (1995), How toxic are toxic chemicals in soil, *Environmental Science and Technology*, 29: 2713-2717.

10. Autry, A.R., (1991), Ellis GM. *Environmental progress*, 11: 318.

11. Bento, F.M., Camargo, F.A.O., Okeke, B., (2003), Bioremediation of soil contaminated by diesel oil, *Braz. J. of Microbiol* , 34: 65-68.

12. Boossert, I.D., Bartha, R., (1984), The fate of petroleum in soil ecosystems In: Atlas RM (ed). Petroleum Microbiology, *Mac Millan Publishing Co*; New York, 435-474.

13. Brown, J.L., Syslo, J., Lin, Y.H., Getty, S., Vemuri, R., Nadeau, R.,(1998), On-site treatment of contaminated soils: An approach to bioremediation of weathered petroleum compounds, *J. of Soil Contamination*, 7: 773-800.

14. Bundy, J.G., Paton, G.I., Campbell, C.D., (2002), Microbial communities in different soils types do not converge after diesel contamination, *J. Appl. Microbiol,* 92: 276-288.

15. Delille, D., Bassères, A., (1998), Dessommes AA. Effectiveness of bioremediation for oil-polluted Antarctic seawater, *Polar Biol*, 19: 237-241.

Archive of SID

www.SID.ir

16. Devinny, J., Chang, S.H., (2000), Bioaugmentation for soil bioremediation In: Wise, D.L.;Trantolo, D.J.(eds.) Marcel Dekker, Inc., New York, 465-488.

17. Das, K., Mukherjee, A.K., (2006), Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from north-east India, *Bioresource Technology*, 98: 1339-1345.

18. Ferguson, S.H., Franzmann, P.D., Revill, A.T., Snape, I., Rayner, J.L., (2003), The effects of nitrogen and water on mineralization of hydrocarbons in diesel-contaminated terrestrial Antarctic soils, *Cold Regions Science and Technology*, 37:197-212

19. Fredrickson, J. Balkwill, D., (1998), *Sampling and enumeration techniques*, Geesey *G &* Sayler.

20. Gibson, D.T., Subramanian, V., (1984), Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. In: Gibson, D.T. (Ed.), Microbial Degradation of Organic Compounds, *Marcel Dekkar*, New York, 181-252**.**

21. Heitkamp, M.A., Franklin, W,, Cerniglia, C.E., (1988), Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: Isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium, *Appl Environ Microbiol*, 54: 2549-2555.

22. James, G.S., (2012), Karuna KA. Bioremediation of Petroleum and Petroleum Products, *Wiley*.

23. Ijah, U.J.J., Antai, S.P., (2003), Removal of Nigerian light crude oil in soil over a 12-month period, *International Bio deterioration & Biodegradation*, 51: 93-99.

24. Khan, J.A., Rizvi, S.H.A., (2011), Isolation and characterization of microorganism contaminated sites, *Adv In Applied Sci Res*, 2(3): 455-460.

25. Kirimura, K., Nakagawa, H., Tsuji, K., Kazuya, M., Kurane, R., Usami, S.H., (1999), Selective and continuous degradation of carbazole contained in petroleum oil by resting cells of *Sphingomonas* sp., *CDH-Biosci Biotechnol Biochem*, 63(9): 1563-1568.

26. Leahy, J.G., Colwell, R.R., (1990), Microbial degradation of hydrocarbons in the environment, Microbial, 54: 305-315.

27. Lee, K., Brand, J.M., Gibson, D.T., (1995), Stereo specific sulfoxidation by toluene and naphthalene dioxygenases, *BiochemBiophys Res Commun*, 212: 9-15.

28. Lee, K., Gibson, D.T., (1996), Toluene and ethylbenzene oxidation by purified naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp., *Appl Environ Microbio,* 62: 3101-3106.

29. LU, S., (2006), Isolation and characterization of gasoline degrading bacteria from gas station leaking-contaminated soils, *J. of Environmental Sciences*, 18: 969-972.

30. Margesin, R., Zimmerbauer, A., Schinner, F., (2000), Monitoring of bioremediation by soil biological activities, *Chemosphere*, 40: 339-346.

31. Mittal, A., Singh, P., (2009), Isolation of hydrocarbon degrading Bacteria from soils contaminated with crude oil spills, *Indian J. of Exp Biology*, 47: 760-765.

32. Mohsenzadeh, F., Nasseri, S., Mesdaghinia, A., Nabizadeh, R., Zafari, D., Chehregani, A., (2009), Phytoremediation of petroleum contaminated soils: Pre screening for suitable plants and rhizospheral fungi, *Toxicological & Environmental Chemistry,* 91(8): 1443-1453.

33. Namkoong, W., Hwang, E.Y., Park, J.S., Choi, J.Y., (2002), Bioremediation of Diesel-Contaminated Soil With Composting, *Environmental Pollution*, 23-31.

34. Ojo, A.O., (2006), Petroleum hydrocarbon utilization by native bacterial population from a wastewater canal Southwest Nigeria African, *J. of Biotechnoi,* 5(4): 333-337.

35. Okoh, A.I., Ajisebutu, S., Babaloa, G., Trejo-hernandez, M.R., (2001), potential of *Burkholderia cepacia* RQ in the biodegradation of heavy crude oil, *Int Microbiol*, 4: 83-87.

36. Orji, F.A., Iblene, A.A., Dike, E.N., (2012), Laboratory scale bioremediation of petroleum hydrocarbon – polluted mangrove swamps in the Niger Delta using cow dung, *Malaysian J.l of Microbiology,* 8: 219-228.

37. Parag, A., Vaishampaya, P.P., Kanekar, P., Dhakephalkar, k., (2007), Isolation and Characterization of Arthrobacter sp. strain MCM B-436 an atrazine-degrading bacterium،from rhizospher, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 273-278.

38. Richard, J.Y., Vogel, T.M., (1999), Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel, *International Bio deterioration & Biodegradation*, 93-100.

39. Schaefer, M., Seren, O., Juliane, F., (2005), Effects of Lumbricus terrestris, Allolobo

Archive of SID

www.SID.ir

phorachlorotica and Eisenia fetida on microbial community dynamics in oil-contaminated soil. *Soil Biology&Biochemistry*, 37: 2065

40. Semple, K.T., Reid, B.J., Fermor, T.R., (2001), Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants, *Environ Pollut*, 112: 269-283.

41. Shields, M.S., Montgomery, S.O., Cuskey, S.M., Chapman, P.J., Priichard, P.H., (1991), Mutants of *Pseudomonas cepacia* G4 defective in catabolism of aromatic compounds and trichloroethylene, *Appl Environ Microbiol*, 57: 1935-1941.

42. Sorkhoh, N.A., Ibrahim, A.S., Ghannouin, M.A., (1993), High temperature hydrocarbon degradation by Bacillus strarothermophilus from oil polluted Kuwait desert, *Applied* Mi*crobiology and Biotechnology*, 39: 123-126.

43. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, (1998), 19th ed, *American Public Health Assosiation / American Works Assosiation /Water*.

44. Stirling, L.A., Watkinson. R.J., (1997), Microbial metabolism of ali-cyclic hydrocarbons: isolation and properties of a cyclohexane-degrading bacterium, *Journal of General Microbiology*, 99: 119-125.

45. Talaie, A.R., (2008), Parametric study of petroleum compounds biodegradation using microorganisms, M.Sc. Thesis of Environmental Engineering, Scince and Research -University Branch-Ahvaz.

46. Thapa, B.A., Kumar, K.C., Ghimire, A., (2012), Areview on bioremediation of petroleum hydrocarbon contamiants in soil, *Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology*, 8: 164-170.

47. Udeani, T.K.C., Obroh, A.A., Azubike, N., (2009), Isolation of bacteria from mechanic workshops soil environment contaminated with used engine oil. *African J. of Biotechnology*, 8: 6301-6303.

48. Usman, D.H., Ibrahim, A.M., Abdullahi, S., (2012), Potencials of bacterial isolates in bioremediation of petroleum refinary wastewater, *J. of aplied hytotechnology in Environmetal Sanitation*, 1: 131-138.

49. Vogel TM. Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. Current Opinion in Biotechnology 1996; 7: 311-316.

50. Wackett, L.P., Brusseau, G.A., Householder, S.R., Hanson, R.S.A., (1989), Survey of microbial oxygenases: trichloroethylene degradation by propane-oxidizing bacteria, *Appl Environ Microbiol,* 55: 2960-2964.

51. Xu, R., Obbard, J.P., (2003), Effect of nutrient amendments on indigenous hydrocarbon biodegradation in oil-contaminated beach sediments, *J. of Environmental Quality*, 32 (4): 1234-1243.

Archive of SID

www.SID.ir

Study of biodegradation ability of some petroleum derivatives by native bacteria isolated from plants rhizosphere

Mohsenzadeh F.

Biology Dept., Bu-Ali Sina University, Hamedan, I.R. of Iran

Abstract

Some bacteria present a capability in bioremediation of oil derivatives. In this study the bacteria existing in the plant rhizospere of polluted soils were isolated and purified. These bacteria were then exposed to a combination of commonly used petroleum products with different concentration. The bacteria that capable of biodegrading these compounds, were selected and determined using taxonomical keys and biochemical tests. Their efficiencies in removing the petroleum derivatives were compared. Finally, bacteria with the highest capability for degradation of all oil products were introduced . According to our results, *Alcaligenese utrupha*, *Pseudomonas alcaligenes* and *Pseudomonas aeroginosa* were isolated from rhizosphere of the soils contaminated by kerosene and gasoil; *Pseudomonas alcaligenes*, *Bacillus coagulans*, and *Bacillus circulans* were isolated from soils contaminated by kerosene and engine oil; and *Pseudomonas alcaligenes* was isolated from soils contaminated by gasoil and engine oil. *Pseudomonas alcaligenes* was able to biodegrade the all types of the studied oil products. The bioremediation efficiencies of this bactrium were 72, 63 and 56% repectively.

Key words: bioremediation, oil contamination of soil, indigenous bacteria, *Pseudomonas alcaligenes*

Archive of SID

www.SID.ir