



## جداسازی و بررسی کارایی باکتریهای تجزیه کننده گازوئیل از خاکهای آلوده به مواد نفتی

### استان بوشهر

میترا ابراهیمی<sup>۱</sup>، علیرضا فلاح<sup>۲</sup>، محمد رضا ساریخانی<sup>۳</sup>، محمد طاهر نظامی<sup>۴</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد خاک شناسی، دانشگاه آزاد واحد کرج ۲- عضو هیات علمی موسسه تحقیقات آب و خاک، تهران ۳-

عضو هیات علمی گروه خاک شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز ۴- عضو هیات علمی گروه خاک شناسی، دانشکده

کشاورزی، دانشگاه آزاد واحد کرج

\* نویسنده مسئول: میترا ابراهیمی، دانشگاه آزاد واحد کرج

(mtr\_ebrahimi@yahoo.com)

### چکیده

آلودگی نفتی منابع طبیعی یکی از مشکلات عمده تهدیدکننده محیط زیست و همچنین بهداشت عمومی است. روش تجزیه زیستی و استفاده از باکتریها در جهت رفع آلودگیهای نفتی روشی کم هزینه و سازگار با محیط زیست می باشد، تا بتوان محیط پایداری را رقم زد و چرخه تولید را سالم نگه داشت. بر این اساس در این مطالعه ۱۹ سویه باکتری گرم منفی به نامهای PDB1-19 از نمونه خاک آلوده به مواد نفتی در منطقه بوشهر جداسازی شد. این باکتریها قادر بودند ترکیبات نفتی همانند گازوئیل را به نحو موثری معدنی نمایند. کارایی این سویهها در ازلنهای حاوی محیط کشت مایع حداقل، با حذف هر گونه منبع کربن و استفاده از گازوئیل به عنوان منبع کربن و انرژی، به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با اعمال ۲ تکرار بررسی شد. در این مطالعه کدروت سنجی در طول موج nm ۶۰۰ در زمانهای ۰، ۴۸، ۱۶۸، ۲۱۶ و ۳۱۲ به عنوان شاخص رشد باکتری و تجزیه گازوئیل توسط باکتری اندازه گیری شد. نتایج آنالیز آماری نشان داد که فاکتورهای آزمایشی از قبیل باکتری، زمان و اثر متقابل آنها در سطح ۱ درصد معنی دار می باشد. مقایسات میانگین به روش دانکن نشان داد که از بین سویههای باکتری، سویه PDB19 اختلاف معنی داری از لحاظ تجزیه گازوئیل با سایر سویهها دارد و با گذشت زمان (قرائت پنجم) تجزیه گازوئیل کامل تر انجام می شود، نتایج اثر متقابل باکتری و زمان نیز موید این موضوع بود. واژگان کلیدی: تجزیه زیستی، گازوئیل، آلودگی نفتی، باکتریهای تجزیه کننده نفت

### مقدمه

خاک یکی از منابع مهم و ارزشمند طبیعت بوده و به عنوان پالاینده طبیعی محسوب می شود. اما مدت هاست که مواد نفتی و مشتقات آن در اثر استخراج، حمل و نقل، ذخیره سازی یا استفاده نادرست موجب آلودگی خاک شده است. نفت یکی از مهمترین موادی است که امروزه به عنوان ماده تامین کننده انرژی استفاده می شود، این ماده نه تنها به عنوان انرژی بلکه به عنوان ماده اولیه ساخت بسیاری از مواد مورد استفاده بشر کاربرد دارد. با توجه به سرطان زا بودن بسیاری از آلاینده ها و امکان ورود آنها به چرخه غذایی انسان ها توجه به اصلاح خاک های آلوده به آلاینده های آلی امری ضروری است (Abd-El Salam et al., 2009). در کشور ما ایران به دلیل نفت خیز بودن و مصرف بالای مواد نفتی، آلودگی خاک به مواد نفتی یکی از معضلات اساسی می باشد.

برطرف سازی آلودگی از خاکهای آلوده یکی از گامهای اساسی در داشتن محیط زیست سالم و پایدار می باشد چرا که آلاینده های مختلف با محدود کردن منابع در دسترس، تولید را با مخاطراتی جبران ناپذیر مواجه می سازند. یکی از روش های بازیابی این مناطق



و وارد نمودن آنها در چرخه تولید محصول سالم، حذف آلاینده ها با روش های زیستی یا غیر زیستی است که از این میان روش تجزیه زیستی با توجه به استفاده از توان طبیعی و پتانسیل های نهفته طبیعت بیشتر مورد توجه بوده است (Onifade et al., 2007). تا کنون تعداد زیادی از باکتریهای تجزیه کننده مواد نفتی جداسازی شده است (Supaka et al., 2001). ولی با این وجود تعداد کمی در تجزیه مواد نفتی نقش موثر داشته اند. این مطالعه با هدف جداسازی باکتریهای تجزیه کننده نفت و بررسی کارایی آنها در تجزیه مواد نفتی انجام پذیرفت، نتایج نشان داد که سویه های جداسازی شده نقش موثری در تجزیه گازوئیل دارند و می توانند ترکیبات سمی نفت را به بیوماس میکروبی، گاز کربنیک و آب تبدیل نمایند که نه تنها برای محیط زیست بی خطر است بلکه به عنوان پالاینده خاک به حساب آمده و خاک را برای تولید محصول سالم آماده می نماید.

### مواد و روش ها

نمونه برداری از عمق (۰-۳۰ cm) خاک های آلوده به مواد نفتی از منطقه بوشهر صورت گرفت. به منظور جداسازی باکتریها ابتدا اقدام به غنی سازی باکتری موجود در نمونه خاک گردید، به این ترتیب که حدود ۲ گرم از نمونه مورد نظر به ۴۵ میلی لیتر از محیط CFMM<sup>۱</sup> اصلاح شده اضافه شد (Supaka et al., 2001) و به مدت یک هفته بر روی شیکر انکوباتور با دور ۱۵۰ rpm و دمای ۲۸ درجه سانتی گراد تکان داده شد. سپس حدود ۵ میلی لیتر از این سوسپانسیون به ۴۵ میلی لیتر محیط CFMM حاوی ۲٪ گازوئیل اضافه گردید و ارلن ها به روی شیکر انکوباتور با شرایط قبلی به مدت یک هفته منتقل شدند. در مرحله بعد از محیط CFMM جامد حاوی گازوئیل برای جداسازی باکتریها استفاده شد، بدین ترتیب که ابتدا اقدام به تهیه سری رقت نموده و از رقت نهایی به اندازه ۰/۱ میلی لیتر به محیط ذکر شده اضافه شد. بعد از تفکیک کلنی ها با توجه به ویژگیهای مورفولوژیکی و رنگدانه به منظور خالص سازی هر کدام از باکتریها از محیط نوترینت آگار (NA) استفاده گردید. برای بررسی کارایی جدایه های باکتری در تجزیه زیستی گازوئیل از محیط مایع CFMM حاوی گازوئیل استفاده شد اما به منظور بالا بردن جمعیت باکتری در زمان تلقیح ابتدا باکتری در محیط NB رشد داده شد و بعد از رسیدن به OD=1 رسوبی از باکتری تهیه شد و تلقیح با آن صورت گرفت (Mandari and Lin, 2007). تمامی ارلن ها به مدت تقریباً دو هفته بر روی شیکر انتقال داده شدند و در طی این مدت در فاصله زمانی مختلف با توجه به رشد باکتری ها و کدورت حاصله اقدام به قرائت OD در ۶۰۰ نانومتر (Emtiaz, 2005). به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتری گردید. آنالیز آماری داده های مربوط به آزمایش فوق (آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی) با استفاده از نرم افزار MSTATC انجام پذیرفت.

### نتایج و بحث

در این آزمایش با توجه به روش اتخاذ شده برای جداسازی باکتریهای تجزیه کننده نفت، ۱۹ سویه باکتری به نامهای PDB 1-19<sup>۲</sup> بر اساس ویژگیهای مورفولوژیکی و رنگدانه شناسایی شدند، شناسایی بیشتر بر روی این باکتریها شامل تستهای مختلف بیوشیمیایی در حال انجام می باشد.

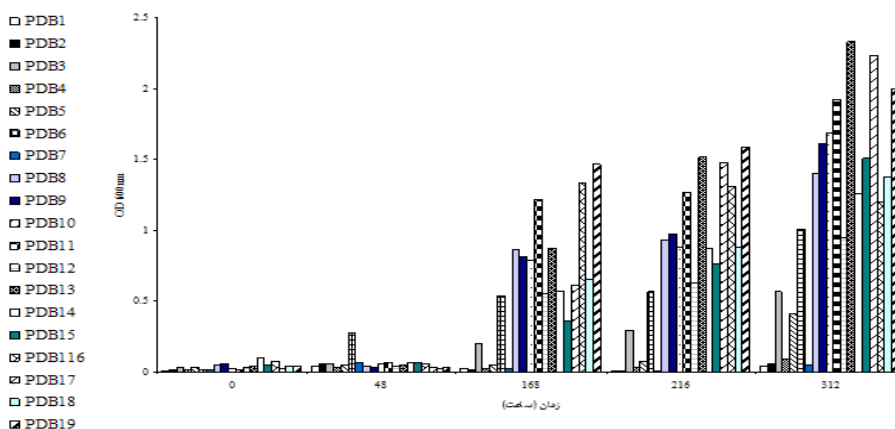
نتایج آنالیز آماری بعد از تبدیل داده مناسب بر روی داده ها نشان داد که فاکتورهای باکتری، زمان و اثر متقابل آنها (باکتری× زمان) در سطح ۱٪ معنی دار می باشند (جدول ۱). مقایسات میانگین فاکتورهای معنی دار به روش دانکن نشان داد که با گذشت زمان استفاده از گازوئیل به عنوان تنها ماده کربنی در محیط افزایش می یابد و تجزیه این ماده رشد بیشتر باکتری را به دنبال دارد. بیشترین میانگین

مربوط به زمان ۳۱۲ ساعت بعد از تلقیح اولیه باکتری بود. در بین جدایه ها، بیشترین میانگین OD مربوط به باکتری PDB19 بود هر چند که بین این باکتری و PDB6 و باکتریهای PDB8-18 تفاوت معنی داری وجود نداشت. در این میان کمترین رشد در حضور ماده نفتی و تجزیه آن برای باکتریهای PDB1، PDB2، PDB4، PDB7 به دست آمد. از میان اثرات متقابل (ترکیب تیماری باکتری × زمان) بالاترین میانگین ها مربوط به زمان پنجم قرائت و باکتری های PDB13، PDB16، PDB19، PDB11، PDB9، PDB10 و زمان چهارم باکتری PDB19 بود، در حالی که بین آنها اختلاف معنی داری مشاهده نشد. آنچه از نتایج استنباط می شود آن است که باکتری PDB19 به نظر از میان سایر باکتریها باکتری کارآتری در تجزیه ماده نفتی مورد آزمایش می باشد (نمودار ۱). با توجه به تداخل حروف در بالای ستونها از آوردن آنها در نمودار صرفنظر شده است.

جدول ۱- تجزیه واریانس داده های (تبدیل شده) مربوط به بررسی کارایی تجزیه گازوئیل در حضور باکتری

منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	مقدار F
فاکتور باکتری	۱۸	۲۸/۴۳۲	۱/۵۸۰	۴۴/۵۴۴**
فاکتور زمان	۴	۳۴/۴۴۹	۸/۶۱۲	۲۴۲/۸۶۸**
اثر متقابل باکتری × زمان	۷۲	۱۶/۳۴۶	۰/۲۲۷	۶/۴۰۲**
خطا	۹۵	۳/۳۶۹	۰/۰۳۵	
جمع	۱۸۹	۸۲/۵۹۶		

ضریب واریانس: ۲۰/۷۸٪، \*\*: معنی دار بودن در سطح ۱ درصد



نمودار ۱- اثر متقابل باکتری × زمان بر روی تجزیه گازوئیل



Kirimura و همکاران (۱۹۹۹) موفق به جداسازی سویه *Sphingomonas sp.* شدند که قادر به استفاده از کربازول و سایر ترکیبات نفتی از قبیل n- هگزاکان بود. نتایج آزمایش آنها نشان داد که با تغییر میزان OD محیط و افزایش رشد باکتری میزان تجزیه مواد نفتی افزایش می یابد. توان گونه *Burkholderia cepacia* RQ1 در تجزیه زیستی نفت خام سنگین به وسیله Okoh و همکاران (۲۰۰۱) مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد که این باکتری از نفت خام به عنوان تنها منبع کربن استفاده نمود و در مدت ۱۵ روز جمعیت باکتری از  $10^5$  به  $10^8$  cfu/ml افزایش یافت. Emtiazi و همکاران (۲۰۰۵) نیز تجزیه ترکیبات مختلف نفتی را به وسیله سویه *Pseudomonas* در مدت زمان ۹ روز از طریق منحنی رشد باکتری (OD<sub>600nm</sub>) بررسی نمودند.

### نتیجه گیری کلی

نتایج حاصل از بررسی کارایی ۱۹ سویه باکتری در تجزیه زیستی گازوئیل نشان داد که بالاترین رشد باکتری و تجزیه گازوئیل در طی مدت زمان انجام آزمایش مربوط به سویه گرم منفی PDB19 با رنگدانه زرد مایل به قهوه ای و با کلنی های کروی شکل می باشد. این سویه از لحاظ رشد و تجزیه گازوئیل در این مدت اختلاف معنی داری با سایر سویه ها نشان داده است.

### منابع

1. Abd-Elsalam, H.E., Hafez, E.E., Hussain, A.A., Amany, G.A and Hanafy, A.A. 2009. Isolation and identification of Three- rings polyaromatic hydrocarbons ( Anthracene and phenanthrene) degrading bacteria. American- Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 5(1): 31-38.
2. Emtiazi, G., Shakarami, H., Nahvi, I and Mirdamadian, S.H. 2005. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas sp.* And transformed *Escherichia coli*. Africa Journal of Biotechnology, 4(2): 172-176.
3. Kirimura, K., Nakagawa, H., Tsuji, K., Kazuya, M., Kurane, R and Usami, Sh. 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.
4. Mandari, T and Lin, J. 2007. Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms n Kwazulu- Natal, South Africa. African Journal of Biotechnology, 6(1): 023-027.
5. Okoh, A., Ajisebutu, S., Babalola, G., and Trejo-herandez, M.R. 2001. potential of *Burkholderia cepacia* RQ1 in the biodegradation of heavy crude oil. Int Microbiol, 4: 83-87.
6. Onifade, A.K and Abubakar, F.A. 2007. 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): 36-40.
7. Supaka, N., Pinphanichakarn, P., Pattaragulwanit, K., Thanivavarn, S., Omori, T and Juntongjin, k. 2001. Isolation and characterization of phenanthrene degrading *sphingomonas sp.* Strain p<sub>2</sub> and its ability to degrade fluoranthene and pyrene via cometabolism, Research article, 27: 21-28.



## Isolation and efficiency assessment of gasoline degrading bacteria from oil-polluted soils of Bushehr

Mitra Ebrahimi<sup>1</sup>, Alireza Fallah<sup>2</sup>, Mohammad Reza Sarikhani<sup>3</sup>, Mohammad Taher Nazemi<sup>4</sup>

1- M.Sc student, Soil science, Azad university of Karaj 2- Faculty member of Water and Soil Research Institute, Tehran 3- Faculty member of university of Tabriz, Tabriz 4- Faculty member of Azad university of Karaj.

\* Corresponding author: Mitra Ebrahimi  
(mtr\_ebrahimi@yahoo.com)

### Abstract

Contamination by oil is one of great environment concerns. Bioremediation and application of oil degrading bacteria is a very low cost and environment-friendly method to establish safe and sustainable production cycles. In this study 19 negative bacteria by name PDB1-19 were isolated from Bushehr oil-polluted soils. They were effectively able to degrade petroleum compounds such as gasoline. Efficiency of isolated strains was investigated in carbon free minimal medium (CFMM) by removing carbon source and application of gasoline as an only source of carbon and energy. Research was performed in factorial experiment in completely randomized design with 2 replications. In this study turbidimetry at 600nm as an index for bacterial growth in presence of gasoline and also gasoline degrading was measured in different times 0, 48, 168, 216, 312 h. Results showed that factors includes bacterium, time and their interaction effect were significant ( $P < 0.01$ ). Mean comparison by Duncan's method showed that stain PDB19 has highest mean and could effectively growth in presence of gasoline, and gasoline degrading increased with increasing time (312h), and also results of interaction effect was similar.

**Keywords:** Bioremediation, Gasoline, Oil contamination, Oil degrading bacteria.