مجله مدیریت خاک و تولید پایدار
جلد دوم، شماره دوم، ۱۳۹۱
http://ejsms.gau.ac.ir

گزارش کوتاه علمی

تأثیر غلظت فسفر بر باکتری‌های تجزیه‌کننده مواد نفتی جداسازی شده از خاک‌های استان بوشهر در حضور فنانترن

*زهرا یاراحمدی[۱]، حسین بشارتی[۲]، علیرضا فلاح‌نصرت‌آباد[۲] و محمدرضا ساریخانی[۳]
[۱]دانشجوی دکتری گروه خاک‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی خوراسگان،
[۲]استادیار مؤسسه تحقیقات خاک و آب، کرج، ایران، [۳]استادیار گروه خاک‌شناسی، دانشگاه تبریز
تاریخ دریافت: ۹۰/۸/۱۵ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۱/۵/۱۹

چکیده

در میان راه‌کارهای ارایه شده ناشی از مشکلات آلودگی نفتی و تأثیرات ویران‌گر آن، استفاده از میکروارگانیسم‌ها برای تجزیه زیستی در بیش‌تر کشورهای پیشرفته مورد استفاده قرار می‌گیرد. به‌کارگیری این روش در رفع آلودگی مناطق آلوده به‌وسیله تعدادی از پارامترهای زیست‌محیطی محدود می‌شود که از جمله این پارامترها عناصر غذایی می‌باشند. در این پژوهش ٤ سویه باکتریایی از خاک استان بوشهر جداسازی شد، عمل جداسازی باکتری‌ها قبل از انجام بررسی عوامل محیطی از جمله بررسی اثر غلظت فسفر در یک محیط حداقل بدون منبع کربنه به انجام رسیده بود و از بین باکتری‌هایی که از قبل فرایند جداسازی و سپس شناسایی آن‌ها از خاک صورت گرفته بود، ٤ سویه باکتری برتر انتخاب و مورد استفاده قرار گرفت، سویه‌های نام برده با عنوان سودوموناس استاتزری، کریزوباکتریوم، اسینتوباکترجانسونی، سودوموناس‌آئروجینوس نام‌گذاری شدند. این باکتری‌ها از نظر کارایی در تجزیه فنانترن و در غلظت‌های مختلف فسفر در طی زمان‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفتند. در این بررسی زمان در ٤ سطح ۰، ٤٨، ۷۲ و ١٤٤ ساعت و فسفر در ۳ سطح غلظت ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر در نظر گرفته شد، نتایج به‌صورت فاکتوریل، در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد آنالیز قرار گرفت. نتایج بررسی اثر مقادیر مختلف فسفر در تجزیه فنانترن نشان داد که بهترین سطح

* مسئول مکاتبه: zhr_yarahmadi63@yahoo.com

غلظت فسفر در تجزیه فنانترن سطح ۲ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد. همچنین باکتری سودوموناس ائروجینوس بهترین کارایی را در تجزیه فنانترن نسبت به بقیه باکتری‌ها داشت. بهترین زمان نیز در تجزیه فنانترن زمان ۱٤٤ ساعت پس از تلقیح باکتری‌ها می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آلودگی خاک، تجزیه زیستی، فسفر، میکروارگانیسم‌ها

مقدمه

خاک یکی از منابع ارزشمند طبیعت بوده و پالاینده طبیعی محسوب می‌شود، اما مدت‌هاست که مواد نفتی و مشتقات آن در اثر استخراج، حمل و نقل، ذخیره‌سازی یا استفاده نادرست موجب آلودگی خاک شده است (اسپارکس، ۲۰۰۳). تأثیرات منفی ناشی از آلودگی نفتی خاک منجر به ارایه برنامه‌ها و دستورالعمل‌هایی برای حفاظت از محیط زیست گردید که در این میان کاربرد روش‌های زیستی در میان گزینه‌های اصلاح خاک برتری دارد (کانینگهام و فیلیپ، ۲۰۰۱؛ الکساندر، ۲۰۰۰).

در ضمن عمل زیست‌پالایی با کنترل و بهینه‌سازی بعضی فاکتورهای محیطی می‌توان میزان و سرعت تجزیه زیستی را به گونه دلخواه افزایش داد (پاریش و همکاران، ۲۰۰۵). میکروارگانیسم‌ها نیاز به شرایط مناسبی برای رشد و زنده ماندن خود دارند که این فاکتورها شامل pH مناسب، دما، اکسیژن، شوری و عناصر غذایی می‌باشد (کوکسون، ۱۹۹۵؛ لهی و کولول، ۱۹۹۰). یکی از فاکتورهای مهم و تأثیرگذار روی تجزیه هیدروکربن‌های نفتی منبع فسفر، غلظت آن است که بر بیوماس و تولیدات باکتری‌ها مؤثر است (سعیدخلیل و مورتر، ۲۰۰۸). منطقه خلیج‌فارس از مناطق نفت‌خیز ایران و بزرگ‌ترین منطقه نفتی جهان است که بیش از نیمی از ذخایر نفت و گاز جهان را در خود جای داده است، در این پژوهش باکتری‌های جداسازی شده تجزیه‌کننده مواد نفتی از خاک‌های استان بوشهر، از نظر بررسی کارایی در سطح‌های مختلف غلظت فسفر و در تجزیه فناترن در زمان‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

برای انجام این مرحله از آزمایش ابتدا محیط کشت پایه معدنی مایع CFMM (Carbon Frace Minral Medium) تهیه و pH آن قبل از اتوکلاو روی ۷/۵ تنظیم شد. ترکیب این محیط کشت شامل

۰/۸ گرم بر لیتر KH_2PO_4، ۲/۷۵ گرم بر لیتر Na_2HPO_4، ۳ گرم بر لیتر NH_4NO_3، ۰/۰۰۵ گرم بر لیتر $CaCl_2.2H_2O$، ۰/۰۱ گرم بر لیتر $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۰۰۵ گرم بر لیتر $FeCl_3.6H_2O$، ۱ میلی‌لیتر Trace mineral بود، پس یک میلی لیتر عناصر کم مصرف نیز به محیط کشتهای مذکور اضافه گردید، ترکیب عناصر کم مصرف شامل مقادیر زیر بود:

۵ گرم بر لیتر EDTA، ۰/۱۶۱ گرم بر لیتر $COSO_4.5H_2O$، ۰/۱۱ گرم بر لیتر $6MO_7 O_{24}.4H_2O$ (NH_4)، ۰/۴۹۹ گرم بر لیتر $FeSO_4.7H_2O$، ۰/۱۶ گرم بر لیتر $MnCl_2.4H_2O$، ۰/۷۲ گرم بر لیتر $CaCl_2.2H_2O$ و ۲/۲ گرم بر لیتر $ZnSo_4.7H_2O$.

از بین باکتری‌هایی که از قبل فرایند جداسازی و سپس شناسایی آن‌ها از خاک انجام شده بود، ٤ سویه باکتری برتر انتخاب و مورد استفاده قرار گرفت، سویه‌های نام برده با عنوان سودوموناس استاتزری، کریزوباکتریوم، اسینتوباکتر جانسونی، سودوموناس آئروجینوس و به‌ترتیب باکتری‌های شماره ۱، ۲، ۳ و ٤ نام‌گذاری شدند. این باکتری‌ها از نظر کارایی در تجزیه فنانترن و در غلظت‌های مختلف فسفر در طی زمان‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفتند. باکتری‌ها در پلیت‌های شامل محیط نوترینت آگار به‌صورت خطی کشت داده و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت چند روز در انکوباتور قرار داده شدند. بعد از رشد باکتری از تک‌کلنی‌ها به محیط مایع نوترینت براث تلقیح و در انکوباتور به‌مدت چند روز قرار داده شد تا جمعیت آن‌ها به 10^7 در هر سانتی‌مترمکعب برسد. برای ایجاد غلظت‌های مختلف فسفر مقدار ۲ گرم (KH_2PO_4) در ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید و به‌عنوان استوک (مادر) منبع فسفره استفاده گردید. غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر از هر کدام از منبع فسفر در محیط کشت CFMM تهیه گردید، مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری تهیه شده در محیط نوترینت براث برداشت و با ٤۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ شد و رسوب باقی‌مانده به ارلن‌های ۲۵۰ سی‌سی شامل ۵۰ میلی‌لیتر از محیط‌های تهیه شده (تیمارها) اضافه گردید، سپس به‌میزان ۰/۰۱ گرم در لیتر فنانترن (۵۰۰ ماکرولیتر) و در شرایط استریل به محتویات ارلن‌ها اضافه گردد، برای تهیه فنانترن به این صورت عمل شد که ۰/۵ گرم فنانترن وزن شد و در ۱۰ میلی‌لیتر DMSO که نوعی حلال ماده نفتی (فنانترن) می‌باشد حل گردید، سپس ارلن‌ها روی شیکر و با دور ۱۵۰ rpm و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس جمعیت باکتری‌ها بعد از گذشت رنج‌های زمانی صفر، ٤۸، ۷۲ و ۱٤٤ ساعت شمارش گردید. نتایج برای با استفاده از نرم‌افزار SPSS مورد آنالیز قرار گرفت و مقایسه میانگین سطوح مختلف تیمارهای سویه باکتری، فسفر و زمان به روش دانکن در سطح معنی‌داری ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

جدول تجزیه واریانس نشان می‌دهد که تأثیر باکتری، سطوح فسفر و زمان و اثـرات متقابـل آن‌هـا در جمعیت باکتری‌ها در سطح ۱ درصد معنی‌دار است (جدول ۱). باکتری *P. aeroginosa* نسبت بـه بقیـه کارایی بهتری در تجزیه فنانترن داشت (جدول ۲). بهترین سطح غلظت فسفر P=۲ میلی‌گرم بر لیتر است و بعد از آن P=۰/۵ و P=۱ قرار دارد که از نظر تأثیر در تجزیه یکسان عمل می‌کنند (جدول ۳). جمعیـت باکتری‌ها در هر سه زمان نسبت به زمان صفر معنی‌دار بوده ولی با هم تفاوتی ندارند (جدول ٤).

جدول ۱- تجزیه واریانس تیمارهای سویه باکتری، فسفر، زمان و اثر متقابل آن‌ها در محیط آلوده به فنانترن.

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	سطح معنی‌داری
سویه باکتری	۳	۱۱۰٤۱۱۵/۳٦	۳٦۸۰۳۸/٤٥**	۱٦۰/۳٦	۰/۰۰۰۱
فسفر	۲	٤۹٤٤۱/۰۰	۲٤۷۲۰/۵۰**	۱۰/۷	۰/۰۰۰۱
زمان	۳	۲۰۷٤٦۳/٦۱	٦۹۱۵٤/۵۳**	۳۰/۱۳	۰/۰۰۰۱
فسفر × باکتری	٦	۱۸۵۰۵۳/۹۱	۳۰٤۸۲/۳۱**	۱۳/٤٤	۰/۰۰۰۱
فسفر × زمان	٦	٤۳۷۵۰/۱٦	۷۲۹۱/٦۹**	۳/۱۸	۰/۰۱۰
زمان × سویه باکتری	۹	۳۷٤۰۵٦/٤۲	٤۱۵٦۱/۸۲**	۱۸/۱۱	۰/۰۰۰۱
زمان × سویه باکتری × فسفر	۱۸ ۳٦	٤٦۰۵٦/۹۱	۲۵۵۸/۷۱ns	۱/۱۱	۰/۳٦۷۸

**معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد و ns غیرمعنی‌دار.

جدول ۲- مقایسه میانگین تعداد کلونی ٤ نوع باکتری به روش دانکن در سطح ۵ درصد در محیط آلوده به فنانترن (Cfu/ml×۱۰^۷).

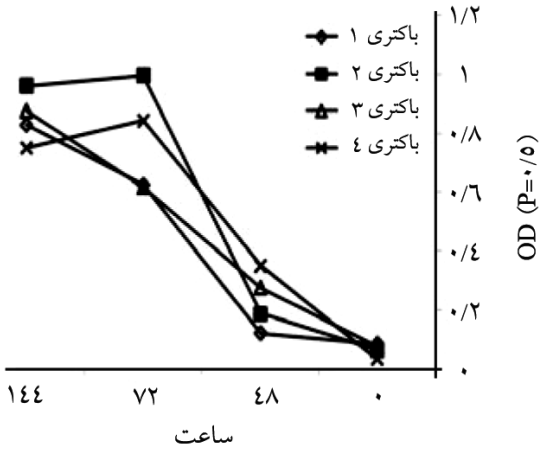
P. aeroginosa	*Acinetobacter*	*Chryseobacterium*	*P. Stutzeri*
۲۰۰/۱۹a	۵۰/۸۳۵d	۱۰۳/٦۰۵c	۱۲٤/۳۱۵b

جدول ۳- مقایسه میانگین تعداد کلونی ۳ سطح فسفر به روش دانکن در سطح ۵ درصد در محیط آلوده به فنانترن (Cfu/ml×۱۰^۷).

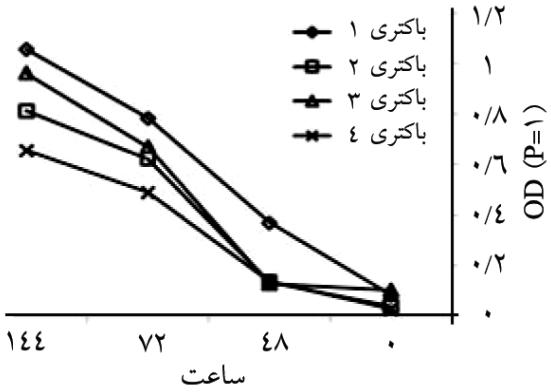
P=۰/۵	P=۱	P=۲
۱۱۰/٦۷b	۱۱۲/۷۹۵b	۱۳۵/۷۳۵a

جدول ٤- مقایسه میانگین تعداد کلونی در ٤ زمان مختلف به روش دانکن درسطح ٥ درصد در محیط آلوده به فنانترن (Cfu/ml×۱۰^۷).

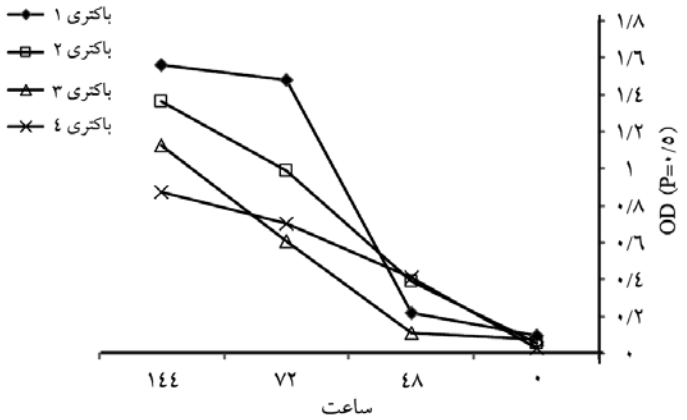
۱٤٤	۷۲	٤۸	۰
۱٤۱/٦۲٥[a]	۱۲۸/٦۰٥[a]	۱۲٥/۱۲٥[a]	۸۰/٥۸٥[b]



نمودار ۱- مقایسه رشد ٤ باکتری در سطح P=۰/٥ میلی‌گرم در لیتر.



نمودار ۲- مقایسه رشد ٤ باکتری در سطح P=۱ میلی‌گرم در لیتر.



نمودار ۳- مقایسه رشد ٤ باکتری در سطح P=۲ میلی‌گرم در لیتر.

بهترین حالت برای اثر متقابل زمان، فسفر و باکتری به‌ترتیب زمان ۱٤٤ ساعت، غلظت P=۲ و سویه باکتری *Pseudomonas aeroginosa* مشاهده گردید، در آزمایش انجام شده، رنج‌های زمانی در نظر گرفته در ٤ رنج زمانی مختلف شامل، لحظه صفر (لحظه تلقیح باکتری‌ها قبل از رشد و گذاشتن ارلن‌ها روی شیکر) و رنج‌های زمانی بعدی (٤۸، ۷۲ و ۱٤٤ ساعت) بعد از زمان تلقیح باکتری‌ها و رشد آن‌ها بعد از گذاشتن روی دستگاه شیکر و آن‌گاه، شمارش کلنی‌ها روی پلیت در نظر گرفته شد، ممکن است با افزایش جمعیت تجزیه هم بیش‌تر گردد ولی نمی‌شود گفت که حتماً جمعیت افزایش می‌یابد، اگر مواد غذایی محیط کشت ما کم باشد جمعیت هم کاهش می‌یابد، مواد غذایی در آزمایش یاد شده طوری انتخاب شده بود که تا زمان ۱٤٤ ساعت برای مصرف باکتری‌ها کافی بود و ما سطوح بالاتر از این رنج زمانی را مورد بررسی قرار ندادیم. این پژوهش نیز با هدف دست‌یابی به استفاده از گونه‌های کارا برای رفع آلودگی‌های نفتی به‌خصوص در جنوب کشور است، امید است ضمن رعایت تمام مسایل زیست‌محیطی و جلوگیری از افزایش هرچه بیش‌تر آلودگی‌ها در محیط زیست با افزایش علم و دانش خود در زمینه کاهش فیزیکی و شیمیایی، به‌خصوص بیولوژیکی آلودگی‌ها بتوانیم قدم مؤثری در بهبود رفع مشکلات زیست‌محیطی داشته باشیم. در پایان پیشنهاد می‌گردد سویه‌های بیش‌تری از باکتری‌ها برای بررسی انتخاب و همچنین در زمان بیش‌تری مطالعه انجام شود.

منابع

1.Alexander, M. 2000. Aging biovailabity and overestimation of risk from environmental pollutant so. Environmental. Appl. Environ. Microbial. 34: 4259-4265.
2.Bamby, F. 1991. The environmental impact of the Persian Gulf War the ecologist. J. Environ. Sci. Environ. 21: 166-172.
3.Cunningham, C.J., and Philip, J.C. 2000. Comparison of Bioaugmentation and Biostimulation in ex situ Treatment of Diesel contaminated soil. Land Contamination and Reclamation, University of Edinburgh, Scotland. J. Environ. Sci. Technol. Environ. 35: 1663-1667.
4.Cookson, J.T. 1995. Bioremediation Engineering Designee and Application. MC Graw-Hill, New York, Ny, USA. J. Microbiol. Ecol. 25: 178-200.
5.Leahy, J.G., and Colwell, R.R. 1990. Microbial degradation of Hydrocarbon. Amer. J. Microbial. Rev. 54: 305-415.
6.Parrish, Z.D., Banks, M.K., and Schwab, A.P. 2005. Assessment of andaminantl ability during Phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon impacted soil, Environ. Pollution. 137: 187-197.
7.Sparks, D.L. 2003. Environmental Soil Chemistry. 2ed Academic Press. California. USA.
8.Sahaid Kalil, H.S., and Mortar, Y. 2008. Effect of nitrogen source and carbon to nitrogen ratio on hydrogen production using acctobutylicum. Amer. J. Biochem. and Biotechnol. 4: 393-401.

J. of Soil Management and Sustainable Production, Vol. 2(2), 2012
http://ejsms.gau.ac.ir

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Effect of phosphorous concentration on isolated petrolum-degrading bacteria from Boushehr Province soil in presence of phenanthrene

***Z. Yarahmadi[1], H. Besharati[2], A.R. Fallah Nosratabad[2] and M.R. Sarikhani[3]**

[1]M.Sc. Student, Dept. of Soil Science, Islamic Azad University, Khorasgan,
[2]Assistant Prof., Educational Staff of Soil and Water Research, Karaj, Iran,
[3]Assistant Prof., Dept. of Soil Science, Tabriz University
Received: 11/06/2011; Accepted: 08/09/2012

Abstract

Using microorganisms among the suggested remedies for oil pollution problembs and its destructive effects is a way which is used as the title of bioremediation in most developed countries. Using bioremediation to remove pollution from polluted areas is limited by means of some bioenvironmental parameters. Nutrients are one of these elements. In this study four types of bacteria were isolated from the Boushehr Soils. The mentioned kinds were nominated as *Pseudomonas stutzeri*, *Chryseo bacterium Sp*, *Acinetobacter Johnsonii*, *Pseudomonas aeruginosa*. These bacteria were studied from the aspect of their ability to degrade phenanthrene in different P concentrations and in different periods of time. The results showed that the best phosphorus concentration in biodegradation of phenanthrene equals to 2 mgr/lit, and the best performances is related to bacterial pseudomonas aeruginosa, and the best of time in biodegradation phenanthrene is 144 hours.

Keywords: Bioremediation, Microorganisms, Nutrients, Soil pollution

* Corresponding Authors; Email: zhr_yarahmadi63@yahoo.com