نشریه مدیریت خاک و تولید پایدار
جلد سوم، شماره دوم، ۱۳۹۲
http://ejsms.gau.ac.ir

تأثیر عناصر غذایی و شوری بر رشد و کارایی باکتری‌های تجزیه‌کننده مواد نفتی

*زهرا یاراحمدی[۱]، حسین بشارتی[۲]، علیرضا فلاح[۳] و محمدرضا ساریخانی[۴]
[۱]دانشجوی دکتری گروه خاکشناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خوراسگان، [۲]دانشیار مؤسسه تحقیقات خاک و آب،
[۳]استادیار مؤسسه تحقیقات خاک و آب، [۴]استادیار گروه علوم خاک، دانشگاه تبریز
تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۱۲ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۱/۹/۲۲

چکیده

در جنوب ایران، نفت خام یکی از آلوده‌کننده‌های مهم خاک به‌شمار می‌آید. آلوده شدن خاک به نفت خام به هنگام استخراج، انتقال و پالایش آن رخ می‌دهد. آلودگی می‌تواند سبب آسیب به زیست‌بوم، جمعیت گیاهی و جانوری خاک شود. استفاده از ریزموجودات (میکروارگانیسم‌ها) می‌تواند به‌عنوان روش مناسبی برای کاهش آلودگی نفتی باشد. در این مطالعه تأثیر ٤ سویه باکتری جداسازی شده از خاک‌های استان بوشهر در شوری‌های مختلف، هم‌چنین تأثیر غلظت عناصر غذایی (نیتروژن و فسفر) در زمان‌های صفر، ٤٨، ٧٢ و ١٤٤ ساعت بر تجزیه زیستی تولوئن، فنانترن و گازوئیل مورد بررسی قرار گرفت. سویه‌های نام برده شامل *Pseudomonas stutzeri*، *Chryseobacterium sp.*، *Acinetobacter johnsonii* و *P. aeruginosa* بودند. شوری در ۳ سطح ۱، ۳ و ۵ درصد و نیتروژن و فسفر در ۳ سطح غلظت (۰/۵، ۱ و ۲) میلی‌گرم در لیتر در نظر گرفته شد. نتایج بررسی سطوح شوری در تجزیه فنانترن و تولوئن نشان داد که بهترین آن مربوط به سطح شوری ۱ درصد می‌باشد. هم‌چنین هر ٤ باکتری جداسازی شده به‌طور قابل‌توجهی قادر به رشد و تجزیه ترکیبات نفتی در سطح شوری ۱ درصد و زمان ١٤٤ ساعت بعد از تلقیح باکتری‌ها بودند. باکتری سودوموناس آئروجینوس بهترین کارایی تجزیه‌کنندگی نفت را در مقایسه با سایر باکتری‌ها دارا بود. نتایج بررسی اثر مقادیر مختلف غلظت نیتروژن در تجزیه گازوئیل نشان داد که بهترین سطح غلظت نیتروژن در تجزیه گازوئیل سطح ۲ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد و از نظر بررسی کارایی باکتری‌های اسینتوباکتر و سودوموناس ائروجینوس بهترین کارایی را در تجزیه گازوئیل دارا بود. نتایج بررسی اثر مقادیر مختلف فسفر در تجزیه گازوئیل نشان داد که بهترین مقدار فسفر در تجزیه گازوئیل مربوط به سطح ۲ میلی‌گرم در لیتر فسفر می‌باشد، هم‌چنین باکتری سودوموناس ائروجینوس بهترین کارایی را در تجزیه گازوئیل نسبت به بقیه باکتری‌ها داشت.

واژه‌های کلیدی: آلودگی خاک، تجزیه زیستی، شوری، عناصر غذایی، میکروارگانیسم‌ها

* مسئول مکاتبه: zhr_yarahmadi63@yahoo.com

مقدمه

منطقه خلیج‌فارس یکی از مناطق نفت‌خیز ایران است که بزرگ‌ترین منطقه نفتی جهان است که بیش از نیمی از ذخایر نفت و گاز جهان را در خود جای داده است (بامبی، ۱۹۹۱). مقابله با مشکلات ناشی از آلودگی نفتی و برگزیدن راه‌حل مناسب، نیازمند پژوهش و تدبر فراوان است. تأثیرات منفی ناشی از آلودگی نفتی منجر به ارایه برنامه‌ها و دستورالعمل‌هایی برای حفظ و حمایت از محیط زیست گردید که در این میان کاربرد روش‌های اصلاح زیستی (زیست‌پالایی) از میان گزینه‌های اصلاح خاک برتری دارد (کانینگهام و فیلیپ، ۲۰۰۰؛ هارایاما و همکاران، ۱۹۹۱؛ ویدالی، ۲۰۰۱؛ هامبریک، ۱۹۸۰).

زیست‌پالایی شامل روش‌های بیولوژیکی و استفاده از میکروارگانیسم‌ها به‌ویژه باکتری‌ها در جهت کاهش یا رفع آلودگی از محیط زیست می‌باشد و در میان سایر روش‌های اصلاح خاک بازده خوبی دارد، هم‌چنین باید شرایط مناسب در محیط آلوده فراهم گردد تا میکروارگانیسم‌ها رشد کرده و فعالیت‌های متابولیکی برای از بین بردن مسمومیت آلاینده‌ها انجام گیرد (فورد، ۱۹۹۹؛ الکساندر، ۲۰۰۰؛ دیبل و بارتا، ۱۹۷٦). 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، در ضمن عمل زیست‌پالایی با کنترل و بهینه‌سازی بعضی فاکتورهای محیطی می‌توان میزان و سرعت تجزیه زیستی را به گونه دلخواه افزایش داد (کوکسون، ۱۹۹۵؛ پاریش، ۲۰۰۵؛ اسپارکس، ۲۰۰۳). هدف از انجام این پژوهش، بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف عناصر غذایی (N, P) و شوری و یافتن غلظت بهینه در تجزیه آلاینده هیدروکربنی، هم‌چنین بررسی توان باکتری‌های ذکر شده در تجزیه زیستی گازوئیل، تولوئن و فنانترن در مقادیر مختلف غلظت‌های نام برده می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه ٤ سویه باکتریایی از خاک‌های استان بوشهر که به‌مدت طولانی در معرض نشت آلاینده‌های نفتی از مخازن جنوبی استان بوشهر قرار داشتند جداسازی شد. عمق نمونه‌برداری ۲۵-۰ سانتی‌متری سطح خاک در نظر گرفته شده بود. عمل جداسازی باکتری‌ها قبل از انجام بررسی عوامل محیطی 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 پذیرفته بود، ٤ سویه باکتری برتر انتخاب و مورد استفاده قرار گرفت، سویه‌های نام برده تحت عنوان سودوموناس استاتزری، کریزو باکتریوم،

اسینتو باکترجانسونی، سودوموناس آئروجینوس نام‌گذاری شدند. برای بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف نیتروژنو فسفر و شوری و یافتن غلظت بهینه در تجزیه آلاینده هیدروکربنی، هم‌چنین بررسی توان باکتری‌های ذکر شده در تجزیه زیستی گازوئیل، تولوئن و فنانترن در مقادیر مختلف غلظت‌های نام برده آزمایش‌های زیر در نظر گرفته شد.

برای انجام این مرحله از آزمایش ابتدا محیط کشت پایه معدنی مایع CFMM[1] تهیه و pH آن قبل از اتوکلاو روی ۷/۵ تنظیم شد. ترکیب این محیط کشت شامل:

۰/۸ گرم KH_2PO_4، ۲/۷۵ گرم Na_2HPO_4، ۳ گرم NH_4NO_3، ۰/۰۰۵ گرم $CaCl_2.2H_2O$، ۰/۰۱ گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۰۰۵ گرم $FeCl_3.6H_2O$، ۱ میلی‌لیتر عناصر کم‌مصرف بود، سپس ۱ میلی‌لیتر عناصر کم‌مصرف نیز به محیط کشت‌های نام برده اضافه گردید، ترکیب عناصر کم‌مصرف شامل مقادیر زیر بود.

۲/۲ گرم بر لیتر $ZnSO_4.7H_2O$، ۰/۷۲ گرم بر لیتر $CaCl_2.2H_2O$، ۰/۱۶ گرم بر لیتر $MnCl_2.4H_2O$، ۰/۴۹۹ گرم بر لیتر $FeSO_4.7H_2O$، ۰/۱۱ گرم بر لیتر $(NH_4)6Mo_7O_{24}.4H_2O$، ۰/۱۶۱ گرم بر لیتر $CuSO_4.5H_2O$، ۵ گرم بر لیتر EDTA.

از بین باکتری‌هایی که از قبل فرایند جداسازی آن‌ها در یک محیط حداقل بدون منبع کربنه و سپس شناسایی آن‌ها از خاک به انجام رسیده بود، ٤ سویه باکتری برتر انتخاب و مورد استفاده قرار گرفت، سویه‌های نام برده تحت عنوان سودوموناس استاتزری، کریزوباکتریوم، اسینتوباکتر جانسونی، سودوموناس آئروجینوس و به‌ترتیب باکتری‌های شماره ۱، ۲، ۳ و ٤ نام‌گذاری شدند، برای برداشتن باکتری‌ها آن‌ها را در پلیت‌های شامل محیط نوترینت آگار به‌صورت خطی کشت داده و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت در حدود ۱۰-۵ روز در انکوباتور قرار داده شدند. بعد از رشد باکتری‌ها از تک‌کلنی‌ها به محیط مایع نوترینت براث تلقیح و برای رسیدن به رشد مطلوب به‌مدت چند روز روی دستگاه شیکر قرار داده شدند، برای ایجاد غلظت‌های مختلف عناصر غذایی (نیتروژن و فسفر) به‌ترتیب، مقادیر ۲ گرم $(NH_4)_2SO_4$ و (KH_2PO_4) هر کدام جداگانه در ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید و به‌عنوان استوک یا محلول ذخیره غذایی (به‌ترتیب منبع نیتروژنه و فسفره) استفاده گردید. هم‌چنین برای ایجاد درصدهای مختلف شوری ابتدا مقدار ۵۰ گرم NaCl در ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و سپس از این محلول شوری مادر تهیه شد. غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر از هر

1- Carbon Free Mineral Medium

کدام از منابع نیتروژن و فسفر و شوری در محیط کشت CFMM تهیه گردید، مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری تهیه شده در محیط نوترینت براث برداشت و در سانتریفوژ با ٤٠٠٠ 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، گازوئیل، تولوئن و فنانترن نیز در تیمارها ۰/۰۱ گرم در لیتر اضافه شد، سپس بعد از عمل تلقیح باکتری‌ها در محیط CFMM جدید شامل ۰/۰۱ گازوئیل برای بررسی کارایی تجزیه ماده نفتی و هم‌چنین بهترین سطح مقدار نیتروژن برای رشد باکتری‌ها یکی از راه‌های موجود قرائت $OD_{٦٠٠}$ نانومتر در طول موج ٦٠٠ نانومتر (میزان جمعیت باکتری‌ها) و توسط دستگاه اسپکتوفتومتر می‌باشد، هم‌چنین برای بررسی کارایی تجزیه دو ماده نفتی تولوئن و فنانترن و هم‌چنین بهترین سطح شوری برای رشد باکتری‌ها جمعیت باکتری‌ها بعد از گذشت صفر، ٤٨، ٧٢، ١٤٤ ساعت شمارش گردید.

نتایج و بحث

بررسی جمعیت باکتری‌ها در محیط شامل گازوئیل

بررسی سطوح مختلف نیتروژن: با توجه به هر کدام از جدول‌های تجزیه واریانس مربوط به بررسی سطوح نیتروژن و فسفر تفاوت معنی‌دار در سطح ۱ درصد برای سویه باکتری، نیتروژن (فسفر) و زمان مشاهده می‌شود ولی هیچ‌کدام از اثرات متقابل معنی‌دار نیست (جدول‌های ۱ و ۵). مقایسه میانگین سطوح مختلف سویه باکتری، نیتروژن و زمان به روش دانکن در سطح معنی‌داری ۵ درصد انجام گرفت، هم‌چنین بیش‌ترین میانگین جمعیت باکتری در حضور سطح غلظت نیتروژن n=۲ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد و این در حالی است که تفاوت آن با سطوح ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم نیتروژن معنی‌دار نمی‌باشد (جدول ۲). بهترین بررسی کارایی نیز در بررسی سطوح نیتروژن مربوط به باکتری‌های استینو باکتر و سودوموناس آئروجینوس می‌باشد که از نظر کارایی یکسان و بهتر از باکتری‌های ۱ و ۲ بودند، هم‌چنین مقایسه میانگین تیمار زمان با استفاده از آزمون چندمرحله‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد که بهترین زمان تیمار ١٤٤ ساعت پس از لحظه تلقیح باکتری‌ها می‌باشد (شکل‌های ۱، ۲ و ۳).

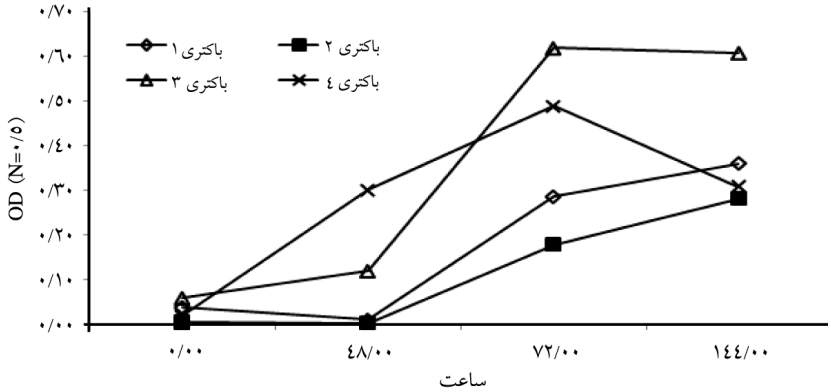
جدول ۱- تجزیه واریانس تیمارهای سویه باکتری، نیتروژن، زمان و اثر متقابل آن‌ها در محیط شامل گازوئیل.

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	سطح معنی‌داری
سویه باکتری	۳	۰/٦٢	۰/٢٠	٧/٥٦**	۰/۰۰۰۳
نیتروژن	٢	۰/٣٤	۰/١٧	٦/٢**	۰/۰٤
زمان	۳	٢/۰٨	۰/٦٩	٢٥/٣٣**	۰/۰۰١
نیتروژن × باکتری	٦	۰/۰٨	۰/۰١	۰/٥٤ns	۰/٧٧
نیتروژن × زمان	٦	۰/١٤	۰/۰٢	۰/٩۰ns	۰/٥۰
زمان × سویه باکتری	٩	۰/٥۰	۰/۰٥	٢/۰٥ns	۰/۰٥٣
زمان × سویه باکتری × نیتروژن	١٨	۰/٣٧	۰/۰٢	۰/٧٥ns	۰/٧٤

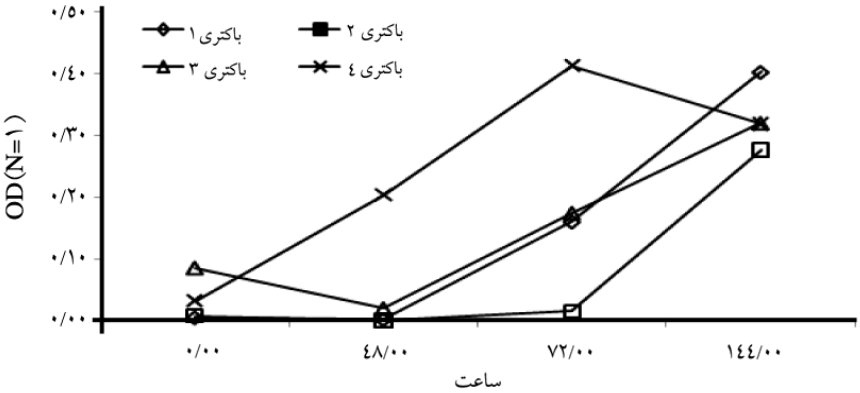
* معنی‌دار در سطح احتمال ٥ درصد، ** معنی‌دار در سطح احتمال ١ درصد و ns غیرمعنی‌دار.

جدول ۲- مقایسه میانگین OD ۳ سطح غلظت نیتروژن بر حسب میلی‌گرم در لیتر به روش دانکن در سطح ٥ درصد در محیط آلوده به گازوئیل.

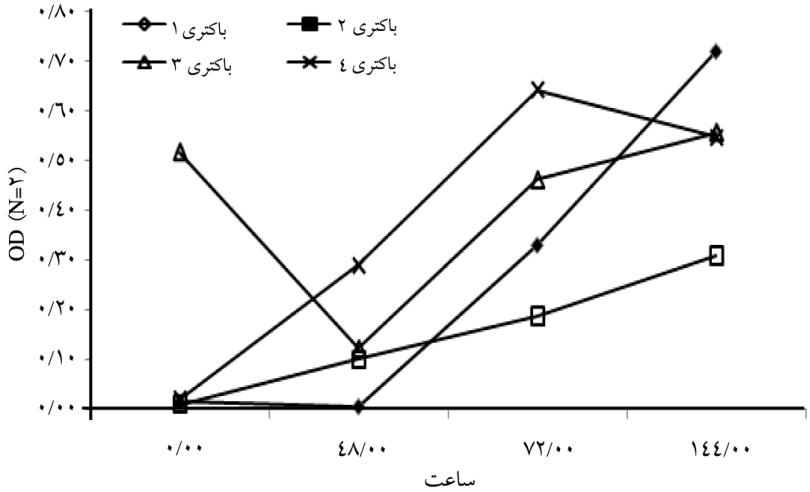
N=۰/٥	N=١	N=٢
۰/٢٣ab	۰/١٥b	۰/٣۰a



شکل ۱- میزان OD در زمان‌های مختلف و سطح N=۰/٥ میلی‌گرم در لیتر برای ٤ سویه باکتری.



شکل ۲- میزان OD در زمان‌های مختلف و سطح N=۱ میلی‌گرم در لیتر برای ٤ سویه باکتری.



شکل ۳- میزان OD در زمان‌های مختلف و سطح N=۲ میلی‌گرم در لیتر برای ٤ سویه باکتری.

بررسی سطوح مختلف فسفر: تجزیه واریانس تیمارهای سویه باکتری، فسفر، زمان و اثر متقابل آن‌ها در محیط آلوده به گازوئیل در جدول ۱ آمده است. مقایسه میانگین سطوح مختلف سویه باکتری، فسفر و زمان نیز به روش دانکن در سطح معنی‌داری ۵ درصد انجام گرفت، بهترین سطح غلظت فسفر در بررسی عامل فسفر در تجزیه گازوئیل مربوط به سطح غلظت فسفر P=۲ میلی‌گرم در لیتر است و بعد

از آن P=۰/۵ و P=۱ میلی‌گرم در لیتر قرار دارد که از نظر تأثیر در تجزیه یکسان عمل می‌کنند (جدول ٤). باکتری *P. Stutzeri* نسبت به بقیه باکتری‌ها کارایی بهتری در در بررسی اثر عامل فسفر در تجزیه گازوئیل داشت. 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 (٤٨، ٧٢، ١٤٤ ساعت) بعد از زمان تلقیح باکتری‌ها و رشد آن‌ها بعد از گذاشتن روی دستگاه شیکر و آن‌گاه، قرائت مقدار جمعیت باکتری‌ها در طول موج ٦٠٠ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر در نظر گرفته شد که بالاترین میانگین مربوط به زمان ١٤٤ ساعت و به‌ترتیب زمان‌های کوتاه‌تر میزان کم‌تری از تجزیه را نشان دادند (شکل‌های ٤، ٥ و ٦).

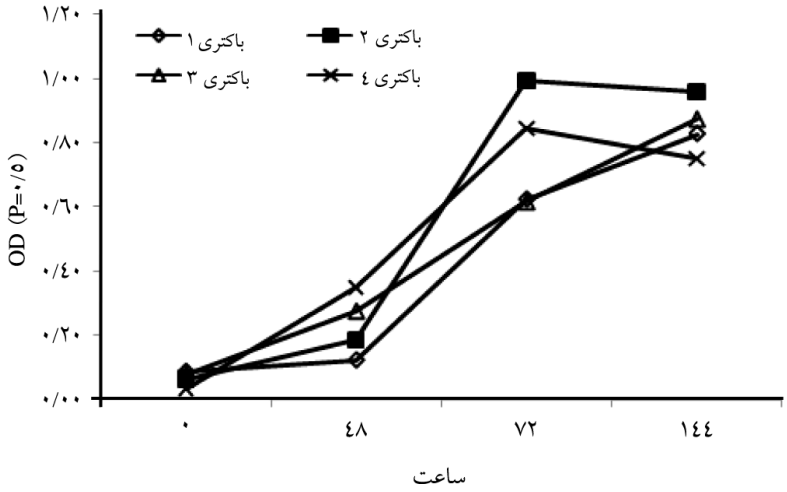
جدول ٣- تجزیه واریانس تیمارهای سویه باکتری، فسفر، زمان و اثر متقابل آن‌ها در محیط آلوده به گازوئیل.

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	سطح معنی‌داری
سویه باکتری	٣	٠/٤١	٠/١٣	٣/١١**	٠/٠٣٥
فسفر	٢	٠/٦١	٠/٣٠	٦/٨٥**	٠/٠٠٢٤
زمان	٣	١٣/٧٨	٤/٥٩	١٠٢/٠٠**	٠/٠٠٠١
فسفر × باکتری	٦	٠/٦١	٠/١٠	٢/٢٧**	٠/٠٥٢٤
فسفر × زمان	٦	٠/٥٠	٠/٠٨	١/٨٥**	٠/١٠٩
زمان × سویه باکتری	٩	٠/٥٦	٠/٠٦	١/٤٠**	٠/٢١
زمان × سویه باکتری × فسفر	١٨	٠/٦٥	٠/٠٣	٠/٨١**	٠/٦٧

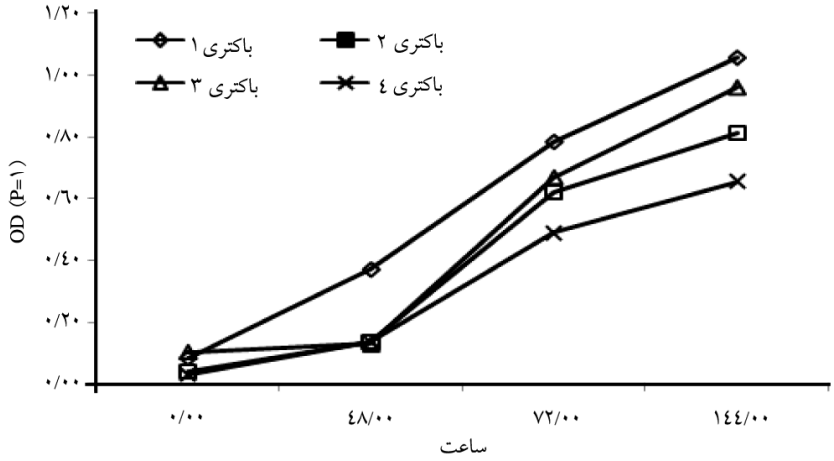
* معنی‌دار در سطح احتمال ٥ درصد، ** معنی‌دار در سطح احتمال ١ درصد و ns غیرمعنی‌دار.

جدول ٤- مقایسه میانگین OD ٣ سطح فسفر بر حسب میلی‌گرم در لیتر به روش دانکن در سطح ٥ درصد در محیط آلوده به گازوئیل.

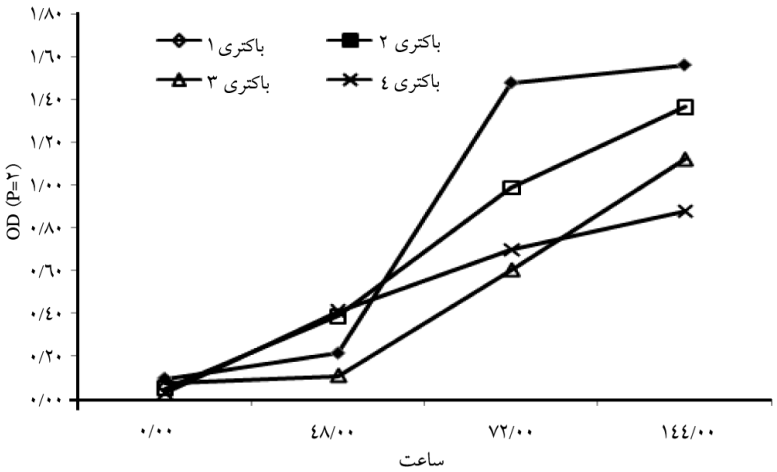
P=٠/٥	P=١	P=٢
٠/٤٨b	٠/٤٤b	٠/٦٢a



شکل ٤- میزان OD در زمان‌های مختلف و سطح P=۰/۵ میلی‌گرم در لیتر برای ٤ سویه باکتری.



شکل ۵- میزان OD در زمان‌های مختلف و سطح P=۱ میلی‌گرم در لیتر برای ٤ سویه باکتری.



شکل ٦- میزان OD در زمان‌های مختلف و سطح P=۲ میلی‌گرم در لیتر برای ٤ سویه باکتری.

بررسی جمعیت باکتری‌ها در محیط شامل تولوئن: تجزیه واریانس تیمارهای سویه باکتری، شوری، زمان و اثر متقابل آن‌ها در محیط شامل تولوئن در جدول ۵ آمده است. اثر باکتری، شوری و زمان، اثرات متقابل آن‌ها به‌جز اثر متقابل (زمان× سویه باکتری× شوری) در سطح ۱ درصد در جمعیت باکتری‌ها معنی‌دار است. مقایسه میانگین سطوح تمامی عوامل و اثرات متقابل آن‌ها معنی‌دار شد و با روش دانکن در سطح معنی‌داری ۵ درصد انجام گرفت (جدول ۵). در این بررسی زمان در ٤ سطح ۰، ٤۸، ۷۲ و ۱٤٤ ساعت و شوری در ۳ سطح (۱، ۳ و ۵) درصد در نظر گرفته شد.

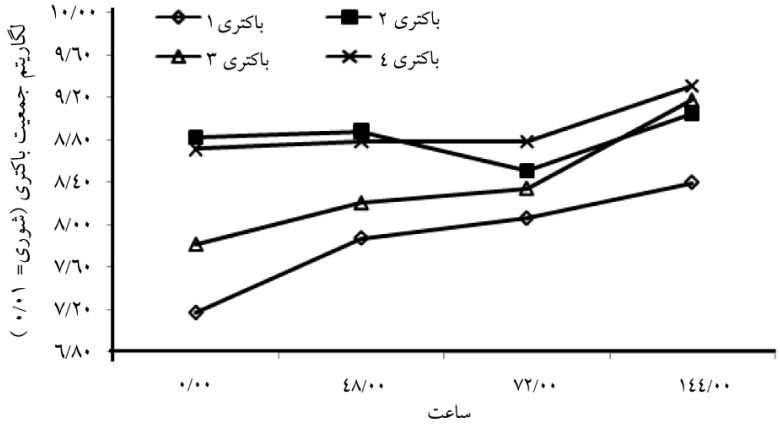
جدول ۵- تجزیه واریانس تیمارهای سویه باکتری، شوری، زمان و اثر متقابل آن‌ها در محیط شامل تولوئن.

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	سطح معنی‌داری
سویه باکتری	۳	۱۱۷۹۲۲/٦۱	۳۹۳۰۷/۵۳	۲٤/٦۲**	۰/۰۰۰۱
شوری	۲	۱۲۲۷۱۵/۳۹	٦۱۳۵۷/٦۹	۳۸/٤۳**	۰/۰۰۰۱
زمان	۳	۳۱۳۳۲۸/۷۸	۱۰٤٤٤۲/۹۲	٦۵/٤۱**	۰/۰۰۰۱
شوری× باکتری	٦	٤۷۲۲۲/۱۰	۷۸۷۰/۳۵	٤/۹۳**	۰/۰۰۰۵
شوری × زمان	٦	۳۸۵٦۹/٤۳	٦٤۲۸/۲۳	٤/۰۳**	۰/۰۰۲٤
زمان × سویه باکتری	۹	۱۰٤۹۸۸/۳٤	۱۱٦٦۵/۳۷	۷/۳۱**	۰/۰۰۰۱
زمان × سویه باکتری × شوری	۱۸	۳٦۰۹۷/۰٦	۲۰۰۵/۳۹	۱/۲٦ns	۰/۲۵۸۷

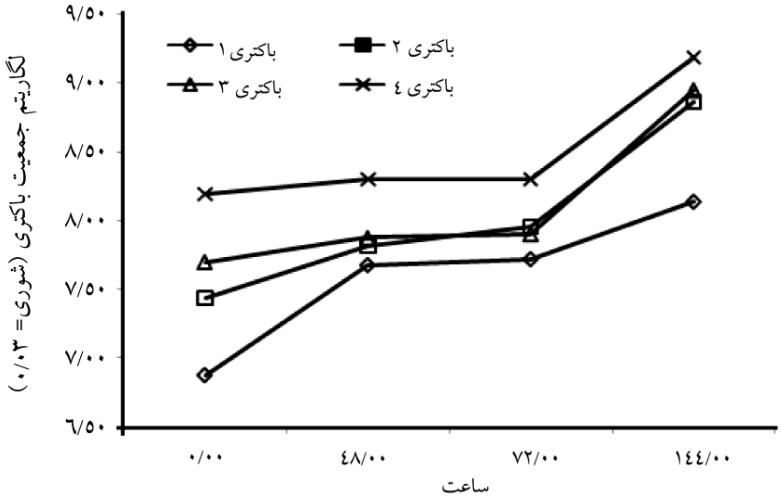
* معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد، ** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد و ns غیرمعنی‌دار.

جدول ٦- مقایسه میانگین تعداد کلونی ۳ سطح شوری به روش دانکن در سطح ۵ درصد در محیط آلوده به تولوئن ($CFU/ml \times ۱۰^{۷}$).

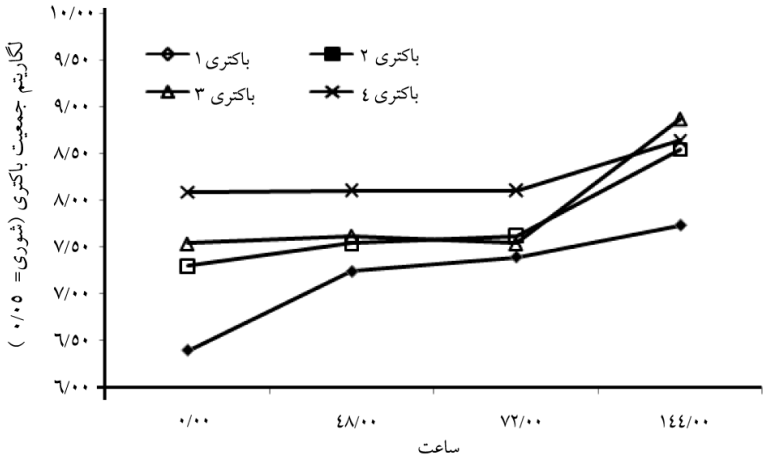
۰/۰۱	۰/۰۳	۰/۰۵
٥٦/٧٨[a]	٢٧/٢٥[b]	١٤/٠١٥[c]



شکل ۷- تعداد کلونی در زمان‌های مختلف و سطح شوری ۰/۰۱ برای ٤ سویه باکتری.



شکل ۸- تعداد کلونی در زمان‌های مختلف و سطح شوری ۰/۰۳ برای ٤ سویه باکتری.



شکل ۹- تعداد کلونی در زمان‌های مختلف و سطح شوری ۰/۰۵ برای ٤ سویه باکتری.

با توجه به جدول ٦ سطح شوری که در آن بالاترین تعداد کلونی مشاهده شد، سطح شوری ۰/۰۱ بود و بعد از آن به‌ترتیب سطوح شوری ۰/۰۳ و ۰/۰۵ قرار داشت، باکتری *P. aeroginosa* و زمان ۱٤٤ ساعت پس از لحظه تلقیح باکتری‌ها بهترین کارایی برای تجزیه تولوئن در محیط شور بود. از نظر اثرات متقابل برای (شوری × زمان) بیش‌ترین تعداد کلونی در سطح شوری ۰/۰۱ و زمان ۱٤٤ ساعت و برای اثر متقابل (سویه باکتری × زمان) بیش‌ترین میزان تجزیه برای باکتری *P. aeroginosa* و زمان ۱٤٤ ساعت مشاهده شد، هم‌چنین برای اثر متقابل (شوری × سویه باکتری) بیش‌ترین میزان تعداد کلونی در حالت سطح شوری ۰/۰۱ و برای باکتری *P. aeroginosa* مشاهده گردید (شکل‌های ۷، ۸ و ۹).

بررسی جمعیت باکتری‌ها در محیط شامل فنانترن: تجزیه واریانس تیمارهای سویه باکتری، شوری، زمان و اثر متقابل آن‌ها در محیط شامل فنانترن در جدول ۷ آمده است. مقایسه میانگین سطوح مختلف بین تمامی عوامل و اثرات متقابل آن‌ها با روش دانکن در سطح معنی‌داری ۵ درصد انجام گرفت (جدول ۸).

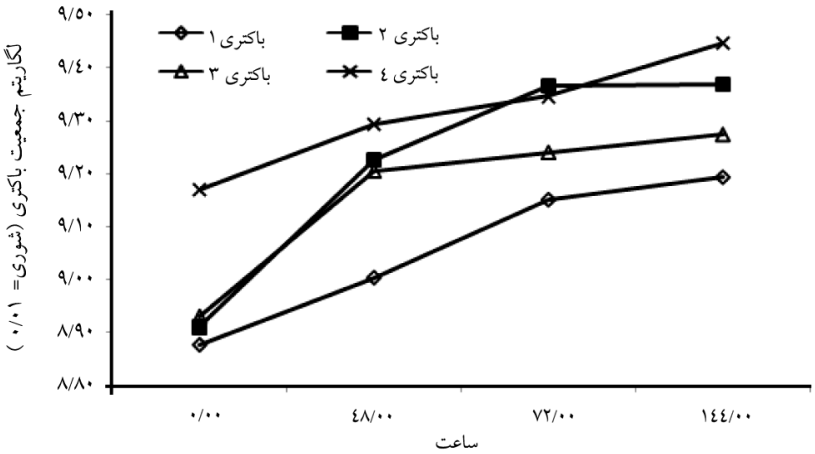
جدول ۷- تجزیه واریانس تیمارهای سویه باکتری، شوری، زمان و اثر متقابل آن‌ها در محیط شامل فنانترن.

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	سطح معنی‌داری
سویه باکتری	۳	٦٠١٧٦٦/٤٤	٢٠٠٥٨٨/٨١	١٩٥٠/٠٣**	٠/٠٠٠١
شوری	٢	٣٦٣٣٨٧/٦٤	١٨١٦٩٣/٨٢	١٧٦٦/٣٤**	٠/٠٠٠١
زمان	٣	٥٦٣٣٧٩/٦١	١٨٧٧٩٣/٢٠	١٨٢٥/٦٤**	٠/٠٠٠١
شوری× باکتری	٦	٤٦٥٤٥/٧٧	٧٧٥٧/٦٢	٧٥/٤٢**	٠/٠٠٠١
شوری× زمان	٦	٢٥٧٠٤/٣٥	٤٢٨٤/٠٥	٤١/٦٥**	٠/٠٠٠١
زمان×سویه باکتری	٩	٧١٥٨٥/٠١	٧٩٥٣/٨٩	٧٧/٣٢**	٠/٠٠٠١
زمان × سویه باکتری × شوری	١٨	٥٨٣٥٧/٨٩	٣٢٤٢/١٠	٠/٥٢٣١**	٠/٠٠٠١

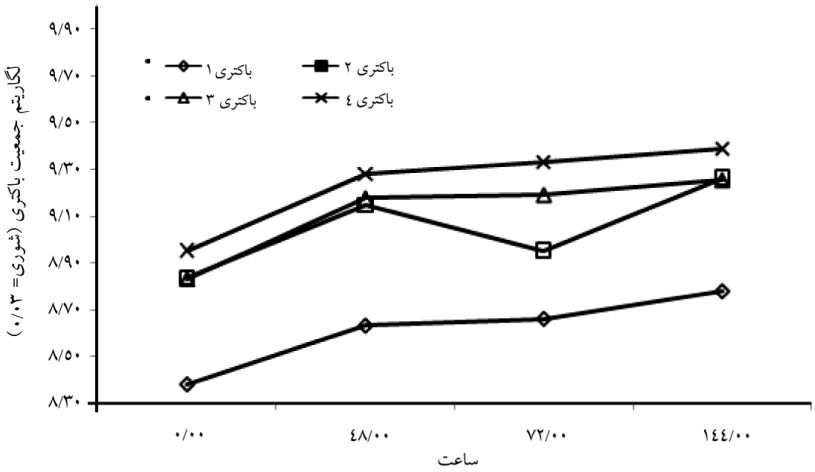
* معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد، ** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد و ns غیرمعنی‌دار.

جدول ۸- مقایسه میانگین تعداد کلونی ۳ سطح شوری به روش دانکن در سطح ۵ درصد در محیط آلوده به فنانترن (Cfu/ml×۱۰^۷).

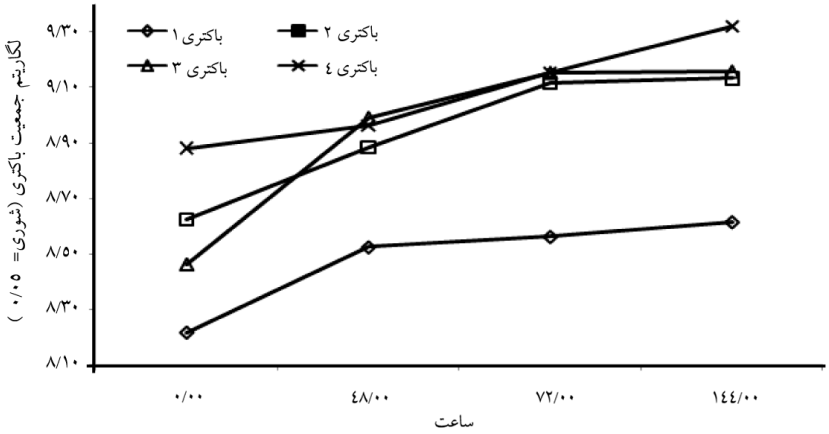
۰/۰۱	۰/۰۳	۰/۰۵
١٦٥/٢٩٥a	١٢٥/٩٠٥b	١٦٥/٢٩٥a



شکل ۱۰- تعداد کلونی در زمان‌های مختلف و سطح شوری ۰/۰۱ برای ٤ سویه باکتری.



شکل ۱۱- تعداد کلونی در زمان‌های مختلف و سطح شوری ۰/۰۳ برای ٤ سویه باکتری.



شکل ۱۲- تعداد کلونی در زمان‌های مختلف و سطح شوری ۰/۰۵ برای ٤ سویه باکتری.

بالاترین سطح شوری که در آن بالاترین تعداد کلونی مشاهده شد سطح شوری ۰/۰۱ بود و بعد از آن به‌ترتیب سطوح شوری ۰/۰۳ و ۰/۰۵ قرار داشت (جدول ۸). باکتری *P. aeroginosa* بهترین کارایی برای تجزیه فنانترن در محیط شور داشت، هم‌چنین بهترین زمان در تجزیه فنانترن زمان ۱٤۸ ساعت پس از لحظه تلقیح باکتری‌ها بود و با گذشت زمان میزان تجزیه فنانترن به‌صورت معنی‌داری

افزایش می‌یابد (شکل‌های ۱۰، ۱۱ و ۱۲). از نظر اثرات متقابل، برای اثر متقابل (شوری × زمان) بیش‌ترین تعداد کلونی در بررسی کارایی در سطح شوری ۰/۰۱ و زمان ۱٤٤ روز مشاهده گردید، هم‌چنین برای اثر متقابل (سویه باکتری × زمان) بیش‌ترین میزان تجزیه برای باکتری *P. aeroginosa* و زمان ۱٤٤ روز مشاهده شد و برای اثر متقابل (شوری × سویه باکتری) در بررسی کارایی بیش‌ترین تعداد کلونی در حالت سطح شوری ۰/۰۱ و برای باکتری *P. aeroginosa* مشاهده گردید. برای اثر متقابل (زمان × شوری × باکتری) بهترین حالت کارایی برای زمان ۷۲ روز، شوری ۰/۰۱ و باکتری *Chryseobacterium* مشاهده گردید. در بررسی اثر شوری توسط مینایی و همکاران (۲۰۰٦) اثرات شوری در غلظت‌های (۵-۰ درصد) NaCl روی تجزیه آلیفاتیک‌های نفت خام مطالعه گردید، سرعت کاهش نفت خام در غلظت‌های صفر و ۵ درصد NaCl بررسی شد و نتایج نشان داد که سرعت کاهش در نمونه‌ای که صفر و ۱ درصد NaCl داشت نسبت به نمونه‌ای که ۵ درصد NaCl داشت بالاتر بود، حداقل کاهش نیز در نمونه ۵ درصد NaCl دیده شد و با افزایش شوری تعداد کلونی‌ها در طی ۲ ماه به زیر صفر کاهش یافت، با مقایسه جمعیت میکروبی با نمونه‌ای که هیچ نفتی نداشت (شاهد) فهمیده شد که فاکتور اصلی که تعداد کلونی‌ها را کاهش می‌دهد وجود NaCl است. هم‌چنین وارد و براک (۱۹۷۸) تجزیه هیدروکربن‌ها را در شرایط شور مشاهده نموده و دریافتند که مینرالیزه شدن هیدروکربن‌ها با اضافه شدن نمک کاهش می‌یابد که این کاهش مربوط به کاهش سطح اکسیژن یا قابلیت دسترسی عناصر غذایی توسط میکروارگانیسم‌های موجود بود که قادر بودند از نفت به‌عنوان منبع کربن و انرژی استفاده کنند اما در پی شوری‌های خیلی زیاد تجزیه زیستی به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای کاهش یافت و دریافتند که سرعت متابولیسم هیدروکربن‌ها با افزایش سطوح شوری کاهش می‌یابد. شیاریز (۱۹۸۹) در مطالعه اثر شوری روی تجزیه هیدروکربن‌ها نشان داد که بین شوری و سرعت مینرالیزه شدن (معدنی شدن) فنانترن و نفتالن رابطه مثبتی وجود دارد. در شوری‌های پایین مینرالیزه شدن این دو ترکیب افزایش می‌یابد. چندین مطالعه نیز روی اثر شوری بر تجزیه هیدروکربن‌ها نشان داده که در مقادیر شور پایین سرعت متالیزه شدن نفت افزایش می‌یابد، به‌طور معمول غلظت‌های بالای نمک از رشد باکتری‌ها و تجزیه هیدروکربن‌های نفتی جلوگیری می‌کند زیرا منجر به نبود آب از سلول‌های باکتری می‌گردد و به این ترتیب مرگ سلول باکتری را منجر می‌شود (لهی و کولول، ۱۹۹۰).

به این گونه می‌توان نتیجه گرفت که با کنترل و بهینه‌سازی بعضی فاکتورهای محیطی از جمله عناصر غذایی می‌توان میزان و سرعت تجزیه زیستی را به گونه دلخواه افزایش داد چرا که میکروارگانیسم‌ها از این منابع غذایی به‌عنوان منبع کربن و انرژی بهره می‌گیرند. با توجه به نفت‌خیز بودن ایران و با توجه به آلودگی ناشی از این مواد، افکار عمومی برای رفع ناشی از این مشکل متوجه گردیده است، این پژوهش نیز با هدف دست‌یابی به استفاده از گونه‌های کارا در جهت 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.

منابع

1.Alexander, M. 2000. Aging bioavailability and overestimation of risk from environmental pollutants. 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. Microbial. Ecol. 25: 178-200.

5.Dibble, J., and Bartha, R. 1976. Biodegradation of petroleum in seawater at low temperature. J. Appl. Environ. Microbiol. 37: 163-170.

6.Ford, N. 1999. Bioremediation. Bireme. cost, Benefits and effects. Appl. Environ. 4: 1-5.

7.Harayama, S., Krishna, H., Shutsubo, K., and Ruki, K. 1999. Petroleum Biodegradation in marine Environment. J. Microbial. Biotechnol. 1: 63-70.

8.Hambrick, G.A., Delaune, R., and Patrick, J.R. 1980. Effect of estuarine sediment pH and oxidation-reduction potential on microbial hydrocarbon degradation. J. Appl. Environ. Microbial. 40: 365-369.

9.Leahy, J.G., and Colwell, R.R. 1990. Microbial degradation of Hydrocarbon. Amer. J. Microbial. Rev. 54: 305-415.

10.Minai, T.D., Herfatmanesh, A., Azari-Dehkordi, F., and Minois, S. 2006. Effect of salinity on Biodegradation of Aliphatic fractions of crude oil in soil. Biological Sciences. 8: 1531-1535.

11. Parrish, Z.D., Banks, M.K., and Schwab, A.P. 2005. Assessment of andaminantl ability during Phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon impacted soil, J. Environ. Poll. 137: 187-197.
12. Shiaris, M.P. 1999. Seasonal biotransformation of Naphthalene, Phenantherene and benzopyrene in surficial estuarine sediments. J. Appl. Environ. Microbial. 55: 1391-1399.
13. Sparks, D.L. 2003. Environmental Soil Chemistry. 2ed Academic Press. California. USA, 352p.
14. Vidali, M. 2001. Bioremediation. Pure Appl. Chem. J. Appl. Environ. Microbial. 73: 1163-1172.
15. Ward, D.M., and Brock, T.D. 1978. Hydrocarbon Biodegradation in hypersaline Environment. J. Appl. Environ. Microbial. 35: 353-359.

J. of Soil Management and Sustainable Production, Vol. 3(2), 2013
http://ejsms.gau.ac.ir

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Investigating the effect of nutrients and salt concentration on growth and performance of Petroleum-Degrading Bacteria

***Z. Yarahmadi[1], H. Besharati[2], A.R. Fallah[3] and M.R. Sarikhani[4]**
[1]Ph.D. Student, Dept. of Soil Science, Islamic Azad University, Khorasgan Branch, [2]Associate Prof., Soil and Water Research institute, [3]Assistant Prof., Soil and Water Research Institute, [4]Assistant Prof., Dept. of Soil Science, Tabriz University
Received: 02/01/2012; Accepted: 12/12/2012

Abstract

Crude oil is one of the most important soil pollutant in the south of Iran. Soil pollution takes place at the time of extraction, transferring and refining. Pollution can cause damage to the environment and zoological and plant population of the soil. Using microorganisms can be a suitable way to decrease oil products pollution. In this study effect of 4 strains of bacteria isolated from the soils of Bushehr province with different concentrations of salinity and also nutrients (nitrogen and phosphorous in 0, 48, 72, 144 hours durations in the biodegradation of Phenanthrene and toluene and gas oil was studied. The mentioned strains were named: *Pseudomonas Stutzeri*, *Chryseobacterium*, *Acinetobacter Johnsonnii*, *Pseudomonas aeroginosa*. The salinity levels were (1%, 3%, 5%) and nitrogen and phosphorous levels were (0.5, 1, 2 mgL^{-1}). The results showed that the best salinity level is 1%. Every four isolated bacteria outstandingly were able to grow and degrade petroleum in 1% salinity in 144 hours after inoculation. Also *P. aeroginosa* bacteria was more effective in the degradation process of phenanthrene and toluene and gas oil than the other bacteria. The best nitrogen concentration in biodegradation of gas oil was 2 mgL^{-1} in which the best performance is related to bacteria *acinetobacter johnsonii* and *pseudomonas aeruginosa*. The best time in biodegradation of gas oil is 144 hours. The best P concentration in biodegradation of gas oil was 2 mgL^{-1} in which the best performance is related to bacteria *pseudomonas stutzeri*.

Keywords: Bioremediation, Microorganisms, Nutrients, Soil pollution, Salinity

* Corresponding Authors; Email: zhr_yarahmadi63@yahoo.com