



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

\*زهرا یاراحمدی<sup>۱</sup>، حسین بشارتی<sup>۲</sup>، علیرضا فلاح<sup>۳</sup> و محمدرضا ساریخانی<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup>دانشجوی دکتری گروه خاکشناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خوراسگان، آدانشیار مؤسسه تحقیقات خاک و آب،

<sup>۲</sup>استادیار مؤسسه تحقیقات خاک و آب، <sup>۳</sup>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 ۴ سویه باکتری جداسازی شده از خاک‌های استان بوشهر در شوری‌های مختلف، هم‌چنین تأثیر غلظت عناصر غذایی (نیتروژن و فسفر) در زمان‌های صفر، ۴۸، ۷۲ و ۱۴۴ 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 ۴ باکتری جداسازی شده به‌طور قابل‌توجهی قادر به رشد و تجزیه ترکیبات نفتی در سطح شوری ۱ درصد و زمان ۱۴۴ 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 اسیتوباکتر و سودوموناس آئروجینوس 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 آئروجینوس 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 خلیج فارس یکی از مناطق نفت خیز 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 راه حل مناسب، نیازمند پژوهش و تدبیر 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، ۱۹۷۶). 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 ۴ 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 سانتی متری 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، ۴ سویه باکتری برتر انتخاب و مورد استفاده قرار گرفت، سویه‌های نام برده تحت عنوان سودوموناس استاتزرری، کریزو باکتریوم،

اسیتتو باکترجانسونی، سودوموناس آئروجینوس نام‌گذاری شدند. برای بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف نیتروژن 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<sup>1</sup> تهیه و pH آن قبل از اتوکلاو روی ۷/۵ تنظیم شد. ترکیب این محیط کشت شامل:

۰/۸ گرم  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ، ۲/۷۵ گرم  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ، ۳ گرم  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ، ۰/۰۰۵ گرم  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۰۱ گرم  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۰۰۵ گرم  $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ، 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  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۷۲ گرم بر لیتر  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۱۶ گرم بر لیتر  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۴۹۹ گرم بر لیتر  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۱۱ گرم بر لیتر  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۱۶۱ گرم بر لیتر  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ، 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، ۴ سویه باکتری برتر انتخاب و مورد استفاده قرار گرفت، سویه‌های نام برده تحت عنوان سودوموناس استاتزری، کریزوباکتریوم، اسیتتوباکتر جانسونی، سودوموناس آئروجینوس و به ترتیب باکتری‌های شماره ۱، ۲، ۳ و ۴ نام‌گذاری شدند، برای برداشتن باکتری‌ها آن‌ها را در پلیت‌های شامل محیط نوترینت آگار به صورت خطی کشت داده و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت 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 به مدت چند روز روی دستگاه شیکر قرار داده شدند، برای ایجاد غلظت‌های مختلف عناصر غذایی (نیتروژن و فسفر) به ترتیب، مقادیر ۲ گرم  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  و  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  هر کدام جداگانه در ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید و به عنوان استوک یا محلول ذخیره غذایی (به ترتیب منبع نیتروژن و فسفر) استفاده گردید. هم‌چنین برای ایجاد درصدهای مختلف شوری ابتدا مقدار ۵۰ گرم  $\text{NaCl}$  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 میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری تهیه شده در محیط نوترینت برات برداشت و در سانتیفریژ با ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳ دقیقه سانتیفریژ شد و رسوب باقی مانده به ارلن های ۲۵۰ سی سی شامل ۵۰ میلی لیتر از محیط های تهیه شده (تیمارها) اضافه گردید، گازوئیل، تولوئن و فنانترون نیز در تیمارها ۰/۰۱ گرم در لیتر اضافه شد، سپس بعد از عمل تلقیح باکتری ها در محیط CFMM جدید شامل ۰/۰۱ گازوئیل برای بررسی کارایی تجزیه ماده نفتی و همچنین بهترین سطح مقدار نیتروژن برای رشد باکتری ها یکی از راه های موجود قرائت OD<sub>۶۰۰</sub> نانومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر (میزان جمعیت باکتری ها) و توسط دستگاه اسپکتوفتومتر می باشد، همچنین برای بررسی کارایی تجزیه دو ماده نفتی تولوئن و فنانترون و همچنین بهترین سطح شوری برای رشد باکتری ها جمعیت باکتری ها بعد از گذشت صفر، ۴۸، ۷۲، ۱۴۴ ساعت شمارش گردید.

## نتایج و بحث

### بررسی جمعیت باکتری ها در محیط شامل گازوئیل

بررسی سطوح مختلف نیتروژن: با توجه به هر کدام از جدول های تجزیه واریانس مربوط به بررسی سطوح نیتروژن و فسفر تفاوت معنی دار در سطح ۱ درصد برای سویه باکتری، نیتروژن (فسفر) و زمان مشاهده می شود ولی هیچ کدام از اثرات متقابل معنی دار نیست (جدول های ۱ و ۵). مقایسه میانگین سطوح مختلف سویه باکتری، نیتروژن و زمان به روش دانکن در سطح معنی داری ۵ درصد انجام گرفت، همچنین بیشترین میانگین جمعیت باکتری در حضور سطح غلظت نیتروژن  $n=2$  میلی گرم در لیتر مشاهده شد و این در حالی است که تفاوت آن با سطوح ۰/۵ و ۱ میلی گرم نیتروژن معنی دار نمی باشد (جدول ۲). بهترین بررسی کارایی نیز در بررسی سطوح نیتروژن مربوط به باکتری های استینو باکتر و سودوموناس آئروجینوس می باشد که از نظر کارایی یکسان و بهتر از باکتری های ۱ و ۲ بودند، همچنین مقایسه میانگین تیمار زمان با استفاده از آزمون چندمرحله ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد که بهترین زمان تیمار ۱۴۴ ساعت پس از لحظه تلقیح باکتری ها می باشد (شکل های ۱، ۲ و ۳).

## زهرا یاراحمدی و همکاران

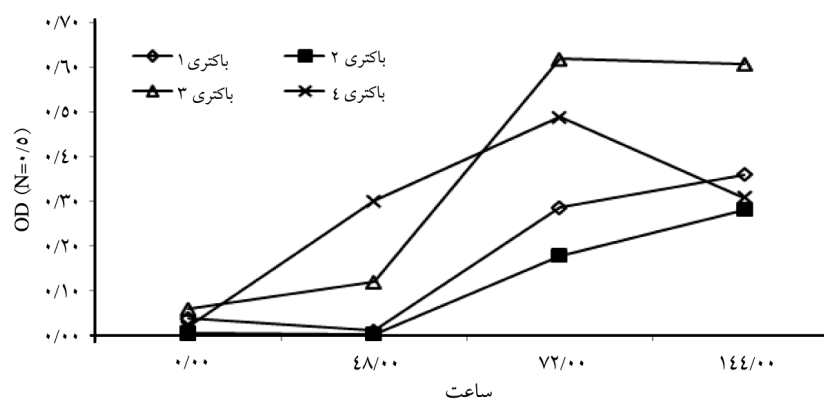
جدول ۱- تجزیه واریانس تیمارهای سویه باکتری، نیتروژن، زمان و اثر متقابل آن‌ها در محیط شامل گازوئیل.

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	سطح معنی داری
سویه باکتری	۳	۰/۶۲	۰/۲۰	۷/۵۶**	۰/۰۰۰۳
نیتروژن	۲	۰/۳۴	۰/۱۷	۶۲**	۰/۰۴
زمان	۳	۲/۰۸	۰/۶۹	۲۵/۳۳**	۰/۰۰۱
نیتروژن × باکتری	۶	۰/۰۸	۰/۰۱	۰/۵۴ <sup>ns</sup>	۰/۷۷
نیتروژن × زمان	۶	۰/۱۴	۰/۰۲	۰/۹۰ <sup>ns</sup>	۰/۵۰
زمان × سویه باکتری	۹	۰/۵۰	۰/۰۵	۲/۰۵ <sup>ns</sup>	۰/۰۵۳
زمان × سویه باکتری × نیتروژن	۱۸	۰/۳۷	۰/۰۲	۰/۷۵ <sup>ns</sup>	۰/۷۴

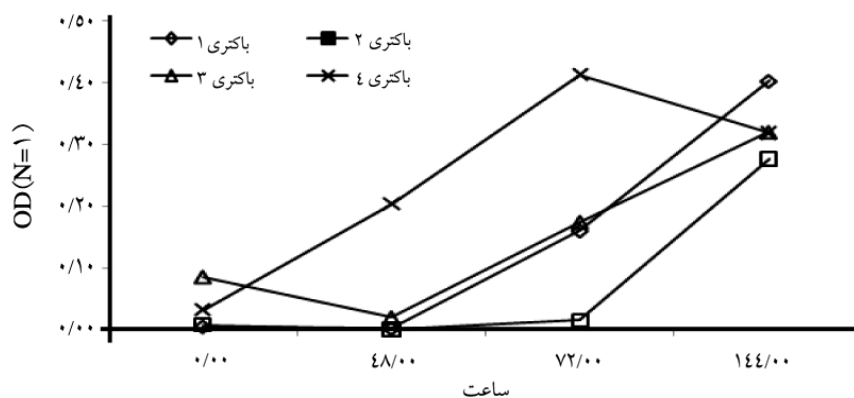
\* معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد، \*\* معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد و <sup>ns</sup> غیر معنی دار.

جدول ۲- مقایسه میانگین OD ۳ سطح غلظت نیتروژن بر حسب میلی گرم در لیتر به روش دانکن در سطح ۵ درصد در محیط آلوده به گازوئیل.

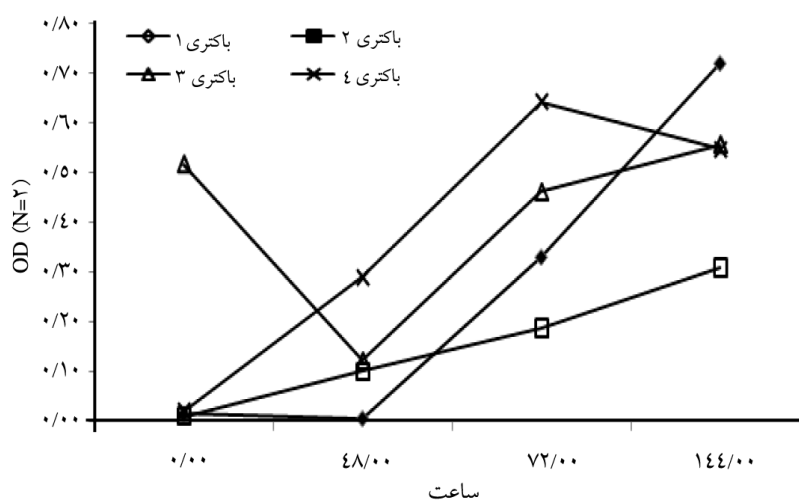
N=۲	N=۱	N=۰/۵
۰/۳۰ <sup>a</sup>	۰/۱۵ <sup>b</sup>	۰/۲۳ <sup>ab</sup>



شکل ۱- میزان OD در زمان‌های مختلف و سطح N=۰/۵ میلی گرم در لیتر برای ۴ سویه باکتری.



شکل ۲- میزان OD در زمان‌های مختلف و سطح N=۱ میلی‌گرم در لیتر برای ۴ سویه باکتری.



شکل ۳- میزان OD در زمان‌های مختلف و سطح N=۲ میلی‌گرم در لیتر برای ۴ 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  $P=0/5$  و  $P=1$  میلی گرم در لیتر قرار دارد که از نظر تأثیر در تجزیه یکسان عمل می کنند (جدول ۴). باکتری *P. Stutzeri* نسبت به بقیه باکتری ها کارایی بهتری در بررسی اثر عامل فسفر در تجزیه گازوئیل داشت. رنج های زمانی در نظر گرفته در ۴ رنج زمانی مختلف شامل، لحظه صفر (لحظه تلقیح باکتری ها قبل از رشد و گذاشتن ارلن ها روی شیکر) و رنج های زمانی بعدی (۴۸، ۷۲، ۱۴۴ ساعت) بعد از زمان تلقیح باکتری ها و رشد آن ها بعد از گذاشتن روی دستگاه شیکر و آن گاه، قرائت مقدار جمعیت باکتری ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر در نظر گرفته شد که بالاترین میانگین مربوط به زمان ۱۴۴ ساعت و به ترتیب زمان های کوتاه تر میزان کمتری از تجزیه را نشان دادند (شکل های ۴، ۵ و ۶).

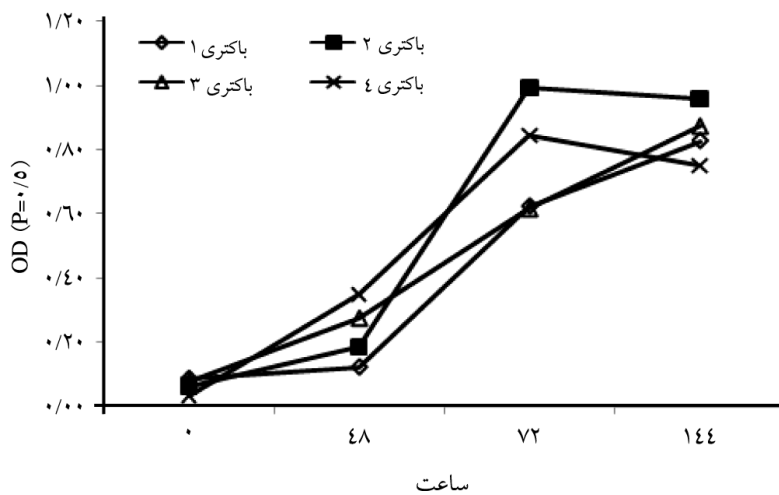
جدول ۳- تجزیه واریانس تیمارهای سویه باکتری، فسفر، زمان و اثر متقابل آن ها در محیط آلوده به گازوئیل.

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	سطح معنی داری
سویه باکتری	۳	۰/۴۱	۰/۱۳	۳/۱۱**	۰/۰۳۵
فسفر	۲	۰/۶۱	۰/۳۰	۶/۸۵**	۰/۰۰۲۴
زمان	۳	۱۳/۷۸	۴/۵۹	۱۰۲/۰۰**	۰/۰۰۰۱
فسفر × باکتری	۶	۰/۶۱	۰/۱۰	۲/۲۷**	۰/۰۵۲۴
فسفر × زمان	۶	۰/۵۰	۰/۰۸	۱/۸۵**	۰/۱۰۹
زمان × سویه باکتری	۹	۰/۵۶	۰/۰۶	۱/۴۰**	۰/۲۱
زمان × سویه باکتری × فسفر	۱۸	۰/۶۵	۰/۰۳	۰/۸۱**	۰/۶۷

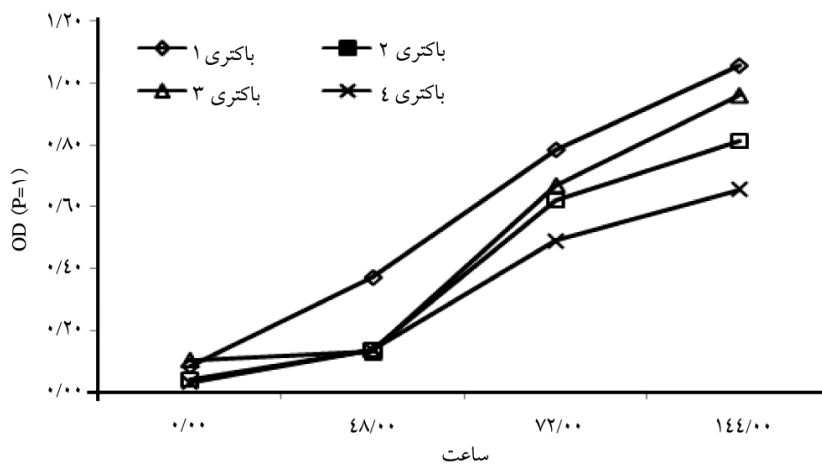
\* معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد، \*\* معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد و <sup>ns</sup> غیر معنی دار.

جدول ۴- مقایسه میانگین OD ۳ سطح فسفر بر حسب میلی گرم در لیتر به روش دانکن در سطح ۵ درصد در محیط آلوده به گازوئیل.

P=۲	P=۱	P=۰/۵
۰/۶۲ <sup>a</sup>	۰/۴۴ <sup>b</sup>	۰/۴۸ <sup>b</sup>

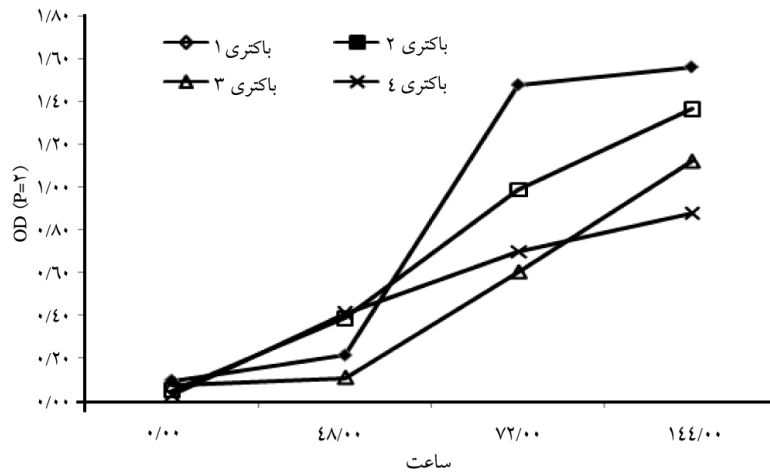


شکل ۴- میزان OD در زمان‌های مختلف و سطح  $P=0.05$  میلی‌گرم در لیتر برای ۴ سویه باکتری.



شکل ۵- میزان OD در زمان‌های مختلف و سطح  $P=1$  میلی‌گرم در لیتر برای ۴ سویه باکتری.





شکل ۶- میزان OD در زمان‌های مختلف و سطح P=۲ میلی‌گرم در لیتر برای ۴ 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 به جز 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 ۴ سطح ۰، ۴۸، ۷۲ و ۱۴۴ ساعت و شوری در ۳ سطح (۱، ۳ و ۵) درصد در نظر گرفته شد.

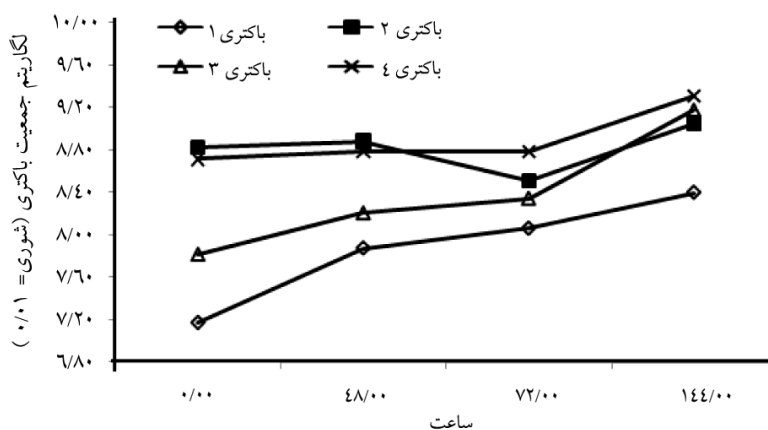
جدول ۵- تجزیه واریانس تیمارهای سویه باکتری، شوری، زمان و اثر متقابل آن‌ها در محیط شامل تولوئن.

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	سطح معنی‌داری
سویه باکتری	۳	۱۱۷۹۲۲/۶۱	۳۹۳۰۷/۵۳	۲۴/۶۲**	۰/۰۰۰۱
شوری	۲	۱۲۲۷۱۵/۳۹	۶۱۳۵۷/۶۹	۳۸/۴۳**	۰/۰۰۰۱
زمان	۳	۳۱۳۳۲۸/۷۸	۱۰۴۴۴۲/۹۲	۶۵/۴۱**	۰/۰۰۰۱
شوری × باکتری	۶	۴۷۲۲۲/۱۰	۷۸۷۰/۳۵	۴/۹۳**	۰/۰۰۰۵
شوری × زمان	۶	۳۸۵۶۹/۴۳	۶۴۲۸/۲۳	۴/۰۳**	۰/۰۰۲۴
زمان × سویه باکتری	۹	۱۰۴۹۸۸/۳۴	۱۱۶۶۵/۳۷	۷/۳۱**	۰/۰۰۰۱
زمان × سویه باکتری × شوری	۱۸	۳۶۰۹۷/۰۶	۲۰۰۵/۳۹	۱/۲۶ <sup>ns</sup>	۰/۲۵۸۷

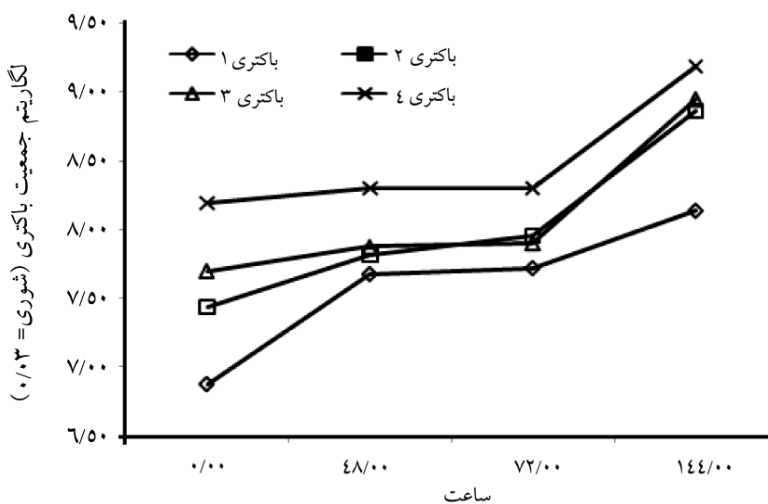
\*\* معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد، \*\* معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد و <sup>ns</sup> غیرمعنی‌دار.

جدول ۶- مقایسه میانگین تعداد کلونی ۳ سطح شوری به روش دانکن در سطح ۵ درصد در محیط آلوده به تولوئن (CFU/ml × 10<sup>۶</sup>).

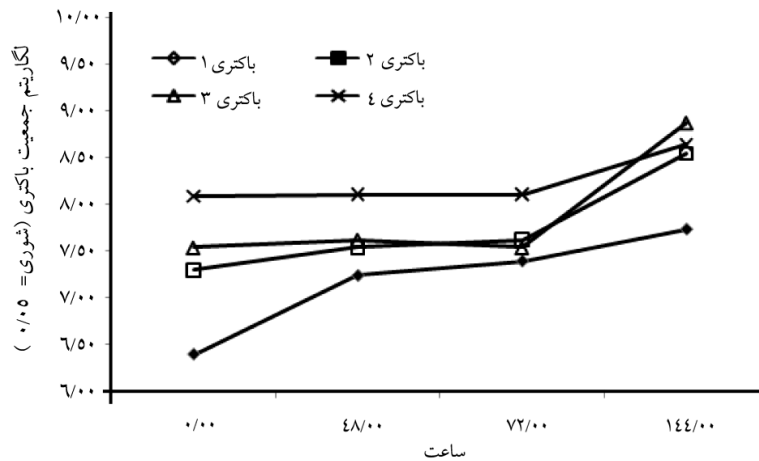
۰/۰۵	۰/۰۳	۰/۰۱
۱۴/۰۱۵ <sup>c</sup>	۲۷/۲۵ <sup>b</sup>	۵۶/۷۸ <sup>a</sup>



شکل ۷- تعداد کلونی در زمان‌های مختلف و سطح شوری ۰/۰۱ برای ۴ سویه باکتری.



شکل ۸- تعداد کلونی در زمان‌های مختلف و سطح شوری ۰/۰۳ برای ۴ سویه باکتری.



شکل ۹- تعداد کلونی در زمان‌های مختلف و سطح شوری ۰/۰۵ برای ۴ سویه باکتری.

با توجه به جدول ۶ سطح شوری که در آن بالاترین تعداد کلونی مشاهده شد، سطح شوری ۰/۰۱ بود و بعد از آن به ترتیب سطوح شوری ۰/۰۳ و ۰/۰۵ قرار داشت، باکتری *P. aeruginosa* و زمان ۱۴۴ 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 ۱۴۴ ساعت و برای اثر متقابل (سویه باکتری × زمان) بیش‌ترین میزان تجزیه برای باکتری *P. aeruginosa* و زمان ۱۴۴ ساعت مشاهده شد، همچنین برای اثر متقابل (شوری × سویه باکتری) بیش‌ترین میزان تعداد کلونی در حالت سطح شوری ۰/۰۱ و برای باکتری *P. aeruginosa* مشاهده گردید (شکل‌های ۷، ۸ و ۹).

بررسی جمعیت باکتری‌ها در محیط شامل فناترن: تجزیه واریانس تیمارهای سویه باکتری، شوری، زمان و اثر متقابل آن‌ها در محیط شامل فناترن 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).

نشریه مدیریت خاک و تولید پایدار جلد (۳)، شماره (۲) ۱۳۹۲

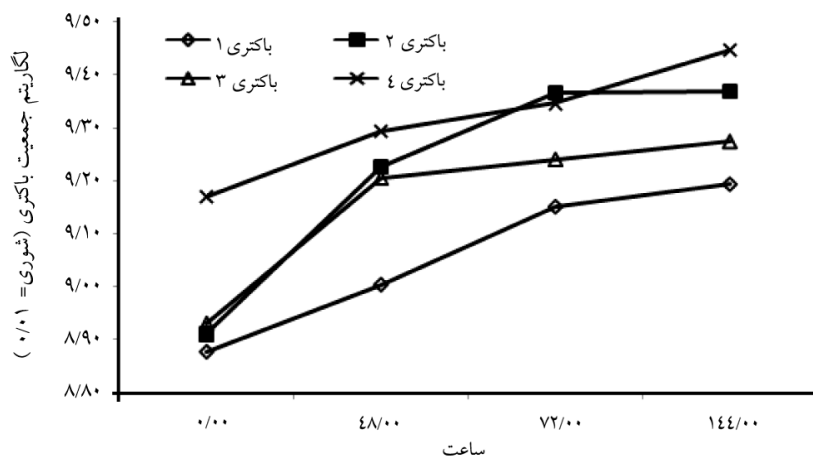
جدول ۷- تجزیه واریانس تیمارهای سویه باکتری، شوری، زمان و اثر متقابل آن‌ها در محیط شامل فناترن.

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	سطح معنی داری
سویه باکتری	۳	۶۰۱۷۶۶/۴۴	۲۰۰۵۸۸/۸۱	۱۹۵۰/۰۳**	۰/۰۰۰۱
شوری	۲	۳۶۳۳۸۷/۶۴	۱۸۱۶۹۳/۸۲	۱۷۶۶/۳۴**	۰/۰۰۰۱
زمان	۳	۵۶۳۳۷۹/۶۱	۱۸۷۷۹۳/۲۰	۱۸۲۵/۶۴**	۰/۰۰۰۱
شوری × باکتری	۶	۴۶۵۴۵/۷۷	۷۷۵۷/۶۲	۷۵/۴۲**	۰/۰۰۰۱
شوری × زمان	۶	۲۵۷۰۴/۳۵	۴۲۸۴/۰۵	۴۱/۶۵**	۰/۰۰۰۱
زمان × سویه باکتری	۹	۷۱۵۸۵/۰۱	۷۹۵۳/۸۹	۷۷/۳۲**	۰/۰۰۰۱
زمان × سویه باکتری × شوری	۱۸	۵۸۳۵۷/۸۹	۳۲۴۲/۱۰	۰/۵۲۳۱**	۰/۰۰۰۱

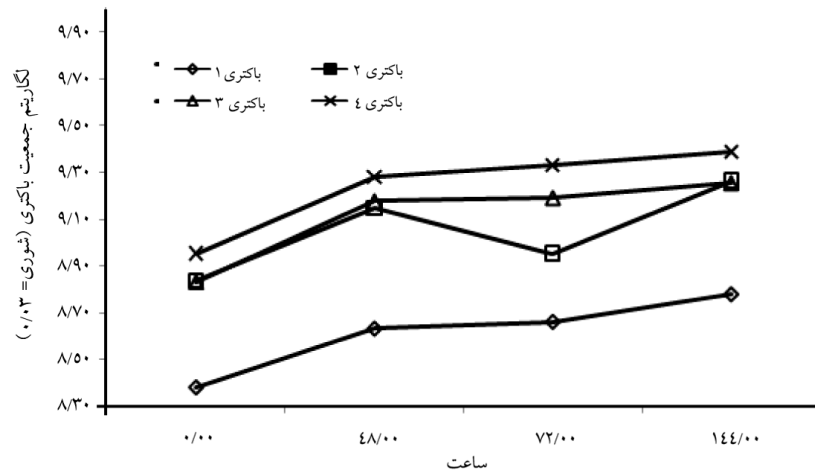
\*\* معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد، \*\* معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد و <sup>ns</sup> غیر معنی دار.

جدول ۸- مقایسه میانگین تعداد کلونی ۳ سطح شوری به روش دانکن در سطح ۵ درصد در محیط آلوده به فناترن ( $Cfu/ml \times 10^7$ ).

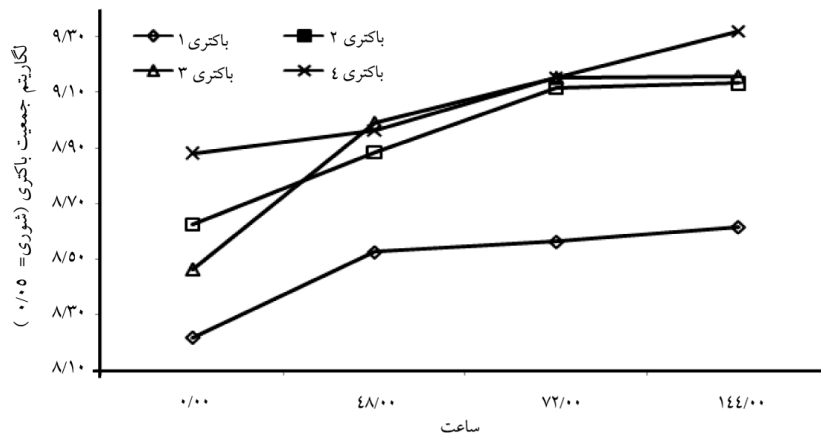
۰/۰۱	۰/۰۳	۰/۰۵
۱۶۵/۲۹۵ <sup>a</sup>	۱۲۵/۹۰۵ <sup>b</sup>	۱۶۵/۲۹۵ <sup>a</sup>



شکل ۱۰- تعداد کلونی در زمان‌های مختلف و سطح شوری ۰/۰۱ برای ۴ سویه باکتری.



شکل ۱۱- تعداد کلونی در زمان‌های مختلف و سطح شوری ۰/۰۳ برای ۴ سویه باکتری.



شکل ۱۲- تعداد کلونی در زمان‌های مختلف و سطح شوری ۰/۰۵ برای ۴ سویه باکتری.

بالاترین سطح شوری که در آن بالاترین تعداد کلونی مشاهده شد سطح شوری ۰/۰۱ بود و بعد از آن به ترتیب سطوح شوری ۰/۰۳ و ۰/۰۵ قرار داشت (جدول ۸). باکتری *P. aeruginosa* بهترین کارایی برای تجزیه فنانتون در محیط شور داشت، هم‌چنین بهترین زمان در تجزیه فنانتون زمان ۱۴۸ ساعت پس از لحظه تلقیح باکتری‌ها بود و با گذشت زمان میزان تجزیه فنانتون به صورت 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 ۱۴۴ روز مشاهده گردید، هم‌چنین برای اثر متقابل (سویه باکتری × زمان) بیش‌ترین میزان تجزیه برای باکتری *P. aeruginosa* و زمان ۱۴۴ 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. aeruginosa* 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 (۲۰۰۶) 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. شپاریز (۱۹۸۹) در مطالعه اثر شوری روی تجزیه هیدروکربن‌ها نشان داد که بین شوری و سرعت مینرالیزه شدن (معدنی شدن) فناترن 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. Microbiol.* 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. Microbiol.* 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.





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

**\*Z. Yarahmadi<sup>1</sup>, H. Besharati<sup>2</sup>, A.R. Fallah<sup>3</sup> and M.R. Sarikhani<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Ph.D. Student, Dept. of Soil Science, Islamic Azad University, Khorasgan Branch,

<sup>2</sup>Associate Prof., Soil and Water Research institute, <sup>3</sup>Assistant Prof., Soil and Water Research Institute, <sup>4</sup>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 Johnsonii*, *Pseudomonas aeruginosa*. The salinity levels were (1%, 3%, 5%) and nitrogen and phosphorous levels were (0.5, 1, 2 mgL<sup>-1</sup>). 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. aeruginosa* 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<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> 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

