مقایسه کارآیی باکتریهای تجزیه کننده مواد نفتی در حضور سه ماده نفتی (گازوئیل، تولوئن و فنانترن)

میترا ابراهیمی [*1]، علیرضا فلاح [2]، محمدرضا ساریخانی [3] و محمد طاهر نظامی [4]

1- دانشجوی کارشناسی ارشد خاکشناسی- دانشکده کشاورزی- دانشگاه آزاد واحد کرج

2- استادیار خاکشناسی – بخش بیولوژی خاک – موسسه تحقیقات آب و خاک تهران

3- استادیار گروه خاکشناسی (بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک)- دانشکده کشاورزی- دانشگاه تبریز

4- استاد یار گروه خاکشناسی – دانشکده کشاورزی- دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج
(mtrr_ebrahimi@yahoo.com)

چکیده

زیست پالائی یکی از روشهای متکی به توان میکروبی خاک و وابسته به فرایندهای زیستی است که برای برطرف سازی آلودگی آلاینده‌های نفتی از منابع خاک و آب می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. در این تحقیق به مقایسه کارآیی 19 جدایه جداسازی شده از مناطق آلوده به نفت استان بوشهر، در محیط مایع حداقل عاری از کربن و در حضور سه ماده نفتی گازوئیل (2 درصد)، تولوئن (1 درصد) و فنانترن (0/05 درصد) پرداخته شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی به انجام رسید و نتایج نشان داد که از بین باکتریهای *Pseudomonas aeruginosa*، *Achromobacter xylosoxidans*، *Serattia odorifera*، *Entrobacter cloacae*، *Pseudomons stutzeri*، *Stenotrophomonas maltophilia*، *Acinetobacter johnsonii*، *Zymomonas*، *Vibrio* sp، *Paracoccus* sp.، *Chryseobacterium* sp.، *Pseudomonas alcaligenes*، *Ralstonia* sp.، *Pantoea* sp.، *Sphingobacterium* sp. مورد استفاده بیشترین تجزیه مربوط به ماده نفتی گازوئیل و در حضور باکتریهای *Serratia odorifera* و *Entrobacter cloacae* بوده است.

کلمات کلیدی زیست پالایی، گازوئیل، تولوئن، فنانترن، محیط حداقل (CFMM)

مقدمه

خاک پالاینده طبیعی محسوب می‌شود و این ویژگی را مرهون خواص فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی خود است، اما مدت‌ها است که مواد نفتی و مشتقات آن در اثر حمل و نقل یا ذخیره سازی موجب آلودگی خاک شده‌اند. پاک‌سازی محیط از آلاینده‌هایی مثل پلی‌هیدروکربن در خاک بسیار پرهزینه و وقت‌گیر است و اکثر روش‌های به کاررفته برای اصلاح آنها ناکارآمد بوده است. فرایندهای فیزیکی و شیمیایی زیادی برای آلودگی‌زدایی جزیی یا کامل از خاک‌های آلوده به کار می‌روند. در مقایسه با روش‌های حذف فیزیکی و شیمیایی، تجزیه زیستی برای حذف آلاینده‌های نفتی مقرون به صرفه‌تر و در عین حال بی‌ضررتر است. این روش در پاک‌سازی محیط زیست از اهمیت به سزائی برخوردار است (Onifade and Abubakar , 2007).

در این مقاله به بررسی کارایی برخی از ایزوله‌های جداسازی شده از خاکهای آلوده به مواد نفتی بوشهر می‌پردازیم و توان تجزیه آنها را در حضور سه ماده نفتی مختلف یعنی گازوئیل، فنانترن و تولوئن مقایسه خواهیم کرد.

مواد و روشها

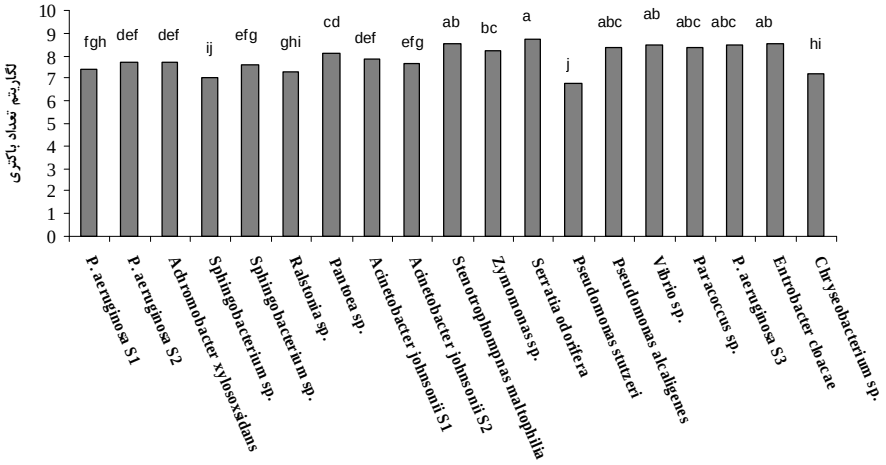
جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی 19 باکتری مورد استفاده در این آزمایش بعد از نمونه‌برداری و غربالگری در محیط عاری از منبع کربن در حضور مواد نفتی صورت پذیرفت (ابراهیمی، 1389). پس از کشت شبانه باکتریهای فوق در

محیط NB و یکسان‌سازی OD[1] آنها، حدود 1/5 میلی‌لیتر از باکتری کشت شده در دور 3000 rpm رسوب داده شد و بعد از دور ریختن محلول رویی، رسوب باکتری را با محیط CFMM[2] (ابراهیمی، 1389) مجدداً حل نموده سپس در داخل ارلن مایر250 سی‌سی حاوی 50 میلی‌لیتر محیط کشت CFMM به ترتیب حاوی 2 درصد گازوئیل، 1 درصد تولوئن، و 500 mg/L فنانترن اضافه شد. آزمایش در شرایط استریل و به صورت فاکتوریل (فاکتور باکتری: شامل 19 باکتری و فاکتور ماده نفتی: در 3 سطح شامل گازوئیل، فنانترن و تولوئن) در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو تکرار صورت پذیرفت. برای بررسی کارایی باکتریها در تجزیه ماده نفتی از پایش رشد باکتریها به صورت شمارش تعداد باکتری یا مشاهده کدورت محیط در حد فاصل زمان‌های مشخص استفاده شد. قرائت OD در طول موج 600 نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر انجام پذیرفت و برای انجام شمارش باکتری اقدام به تهیه سری رقت از سوسپانسیون میکروبی کرده و از رقت نهائی به محیط نوترینت آگار اضافه شد (Emtiazi et al., 2005).

نتایج و بحث

کارآیی رشد باکتریها در حضور هر سه ماده نفتی در محیط مایع مقایسه شد تا برترین باکتری از لحاظ استفاده از هر سه ماده نفتی به طور همزمان مشخص گردد. در این آزمایش رشد و تکثیر باکتری در حضور ماده نفتی که نشان دهنده توانایی استفاده باکتری از ماده نفتی و تجزیه آن می‌باشد، در زمانهای مختلف یادداشت برداری شد. نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که همه منابع تغییر در سطح 1% معنی‌دار هستند، به جز زمان که در سطح 5% اثر معنی‌داری داشت.

در شکل 1 میانگین مربوط به تعداد باکتریها در حضور سه ماده نفتی آورده شده است که به مقایسه 19 جدایه استفاده شده در آزمایش می‌پردازد. از بین جدایه‌های مختلف بیشترین میانگین رشد باکتری در حضور سه ماده نفتی مربوط به ***Serratia odorifera*** و کمترین آن مربوط به ***Pseudomonas stutzeri*** می‌باشد.

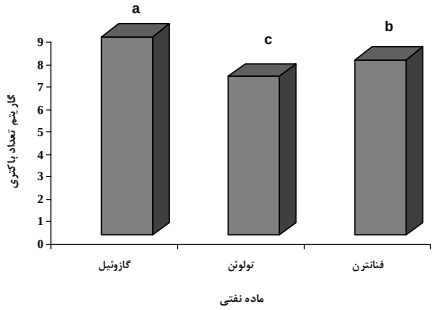


شکل 1- مقایسه تعداد باکتریهای رشد یافته در حضور سه ماده نفتی (اثر فاکتور باکتری).

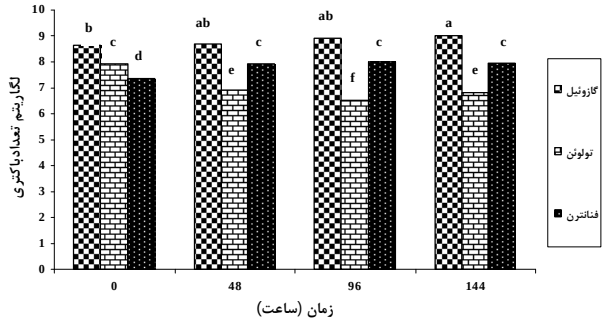
مقایسه میانگین مربوط به سه ماده نفتی نشان داد (شکل 2) که گازوئیل در مقایسه با فنانترن و تولوئن ماده سهل التجزیه‌ای بوده و به راحتی در اختیار باکتریها قرار گرفته و رشد و تکثیر باکتریها را پشتیبانی نموده در صورتیکه در حضور تولوئن کمترین تعداد باکتری به دست آمده است و با گذشت زمان از جمعیت اولیه باکتری تلقیح شده در محیط به مرور کاسته شده است. نتایج به دست آمده در شکل 3 (همچنین شکل 4) نشان می‌دهد که در حضور

[1] Optical Density
[2] Carbon Free Minimal Medium

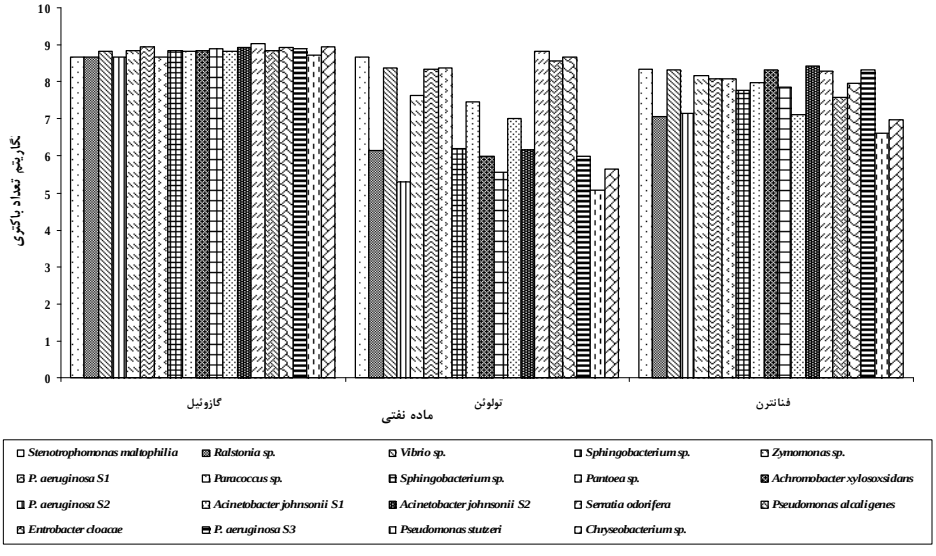
گازوئیل با گذشت زمان بر تعداد باکتری افزوده شده است، چنین روندی نیز در مورد فنانترن مشاهده می‌شود. در مقایسه میانگین فاکتور متقابل باکتری در زمان بالاترین میانگین مربوط به باکتری ***Serratia odorifera*** در زمان سوم بوده و اختلاف معنی داری با باکتری ***Entrobacter cloacae*** در زمان چهارم ندارد (شکل 5).



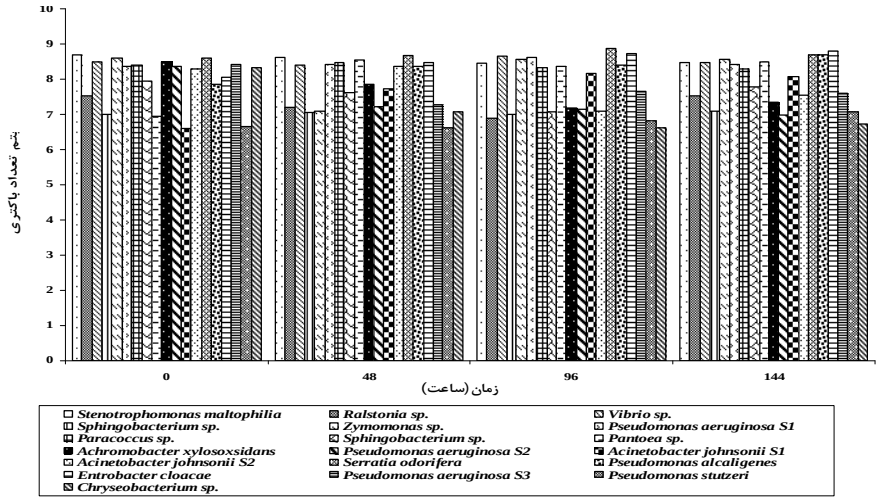
شکل 2- مقایسه تعداد باکتریهای رشد یافته در حضور سه ماده نفتی (اثر فاکتور ماده نفتی).



شکل 3- تعداد باکتریهای رشد یافته در زمانهای مختلف در حضور سه ماده نفتی (اثر متقابل ماده نفتی× زمان).



شکل 4- مقایسه میانگین کارآیی باکتریها در حضور سه ماده نفتی (اثر باکتری در ماده نفتی).



شکل 5- مقایسه میانگین کارآیی باکتریها در حضور هر سه ماده نفتی (اثر متقابل باکتری × زمان).

در مقایسه میانگین سه فاکتور باکتری در زمان در ماده نفتی بیشترین میانگین مربوط به باکتری *Serratia odorifera* با ماده نفتی گازوئیل در زمان سوم می‌باشد و اختلاف معنی‌داری با باکتریهای *Entrobacter cloacae* ، *Acinetobacter johnsonii*، *Chryseobacterium* sp. که همگی آنها با گازوئیل و در زمان چهارم می باشند، ندارد. بنابراین بیشترین میانگین تجزیه مربوط به ماده نفتی گازوئیل و برترین باکتری متعلق به جنس *Serratia odorifera* و *Entrobacter cloacae* در حضور ماده نفتی گازوئیل می باشد.

Onifade و Abubakar (2007) توان باکتریهای *Lactobacter* sp. ، *Arthrobacter* sp. ، *Bacillus* sp. ، *Pseudomonas* sp. و *Micrococcus* sp. را در تجزیه زیستی نفت خام در نمونه‌های خاک آلوده به ماده نفتی مورد بررسی قرار دادند و مشاهده شد که باکتریهای تجزیه کننده نفت خام در مدت زمان 18 هفته جمعیتشان از cfu/ml 5×10^3 به $7/60\times10^4$ افزایش یافت.

نتیجه‌گیری

از جمع‌بندی نتایج می‌توان اینگونه عنوان نمود که رفتار باکتریها در حضور مواد نفتی مختلف گازوئیل، فنانترن و تولوئن یکسان نبوده و گازوئیل به راحتی مورد استفاده باکتریها قرار گرفته اما در مورد تولوئن نتایج نشان می‌دهد که باکتریها در تجزیه این ماده موفق نبوده‌اند و دلیل این تفاوت را بایستی در ساختمان و ماهیت ترکیبات نفتی جستجو کرد و همین موضوع باعث شده تا از آنها به مواد سهل‌التجزیه و سخت تجزیه یاد شود. همچنین تجزیه این مواد نیاز به زمان دارد و با گذشت زمان میزان تجزیه برخی از این مواد (گازوئیل و فنانترن) افزایش می‌یابد. بعلاوه از بین باکتریهای جداسازی شده در حضور سه ماده نفتی بهترین پاسخ مربوط به باکتری *Serratia odorifera* و *Entrobacter cloacae* بوده است.

منابع

ابراهیمی م. 1389. جداسازی، خالص سازی و شناسایی برخی از باکتریهای تجزیه کننده مواد نفتی از خاک های آلوده و مقایسه کارآیی آنها. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج.

Emtiazi G, Shakarami H, Nahvi I and Mirdamadian SH, 2005. Utilization of petroleum hydrocarbons by Pseudomonas sp. And transformed Escherichia coli. Africa Journal of Biotechnology, 4 (2): 172-176.

Onifade AK and Abubakar FA, 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.