دوازدهمین کنگره علوم خاک ایران
تبریز، 12 الی 14 شهریور 1390
(بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک)

بررسی اثر سطوح مختلف نیتروژن بر روی رشد باکتری های تجزیه کننده مواد نفتی در حضور گازوئیل

زهرا یاراحمدی[1*]، حسین بشارتی[2]، علیرضا فلاح[3] و محمدرضا ساریخانی[4]
دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد کرج ، [2]اعضائ هیات علمی موسسه تحقیقات خاک و آب [3]عضو هیات علمی دانشگاه تبریز
Email:zhr_yarahmadi63@yahoo.com

چکیده:

امروزه آلودگی های ناشی از تصادفات تانکر های نفتکش، جنگ،صنایع وابسته به نفت و غیره مشکلات زیادی را در زمینه محیط زیست کشورهای جهان به وجود آورده است.تلاش برای رفع این آلودگی های نفتی خاک با استفاده از روش های مختلف، بخصوص بوسیله میکروارگانیسم های تجزیه کننده مواد نفتی، وسیع وروز افزون است و تلاش های زیادی در جهت رفع این آلودگی ها در کشور های مختلف جهان صورت گرفته است،یکی از این روش ها که هم از لحاظ اقتصادی کم هزینه و هم از لحاظ زیست محیطی مناسب می باشد، استفاده از باکتری ها در جهت رفع آلودگی های نفتی خاک می باشد، ازخاک منطقه بوشهر کشور در این مطالعه چهار سویه باکتریایی غربال سازی شد، نتیجه بدست آمده حاکی ازآن است که این باکتری ها قادرند ترکیبات نفتی را به طور موثری معدنی نمایند، ، تجزیه زیستی در حضور چهار باکتری مختلف به نام‌های *Pseudomonas stutzeri*، *P. aeruginosa*، *Acinetobacter johnsonii* و *Chryseobacterium sp.* که از خاکهای آلوده به نفت بوشهر جداسازی شده بودند صورت گرفت ،نتایج بررسی اثر سطوح مختلف نیتروژن در تجزیه گازوئیل نشان داد که سطح نیتروژن 2میلی گرم بر لیتر ،هم چنین بهترین زمان در تجزیه گازوئیل زمان 144 ساعت می باشد،هم چنین باکتری های *P. aeruginosa* و*Acinetobacter johnsonii* بهترین کارایی را در تجزیه گازوئیل دارند.

کلید واژه: آلودگی خاک -تجزیه زیستی–فاکتورهای محیطی - نیتروژن

نوسینده مسئول : زهرا یار احمدی آدرس : همدان خیابان جوادیه – کوچه مقدم – پلاک 127-تلفن 08118278915

مقدمه:

خاک یکی از منابع و ارزشمند طبیعت است و 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 مهم ترین موادی است که امروزه بعنوان ماده تامین کننده انرژی استفاده می شود،در کشور ما ایران بدلیل نفت خیز بودن و مصرف بالای مواد نفتی ،آلودگی خاک به مواد نفتی یکی از معضلات اساسی می باشد(Bamby،1991).

در ضمن عمل زیست پالایی با کنترل و بهینه سازی بعضی فاکتورهای محیطی می توان میزان و سرعت تجزیه زیستی را به گونه دلخواه افزایش داد (sparks،2003).

مواد و محیط های کشت

محیط کشتCFMM (carbon frace minral medium) شامل:

$MgSO_4.7H_2O$ ،$Cacl_2.2H_2O$ 0/005gr،NH_4NO_3 3gr ، Na_2HPO_4 2/75 gr،KH_2PO_4 0/8gr

. ml1 trace mineral،$Fecl_3.6H_2O$ 0/005gr،0/01gr

-محیط نوترینت براس

مواد و روش ها :

-بررسی میزان کارایی استفاده از گازوئیل و رشد سویه های مختلف باکتری در محیط کشت پایه معدنی مایع و با استفاده از سطوح مختلف نیتروژن

بعد از مشخص شدن بهینه ترین میزانpH برای رشد باکتری ها،در داخل ارلن های 250 میلی لیتری به مقدار 50 میلی لیتری از محیط CFMM با که از قبل روی میزان pH بهینه7/5 تنظیم گردیده بود و در شرایط استریل ریخته گردید،سپس به میزان 0/01گازوئیل و در شرایط استریل به محتویات ارلن ها اضافه گردد،در مرحله بعد و برای اضافه کردن منبع نیتروژنه به محتویات ارلن ها ، مقدار 2 گرم (NH4)2SO4در 20 میلی لیتر آب مقطر حل گردید و بعنوان استوک تهیه و سپس استریل گردید،سپس از این استوک تهیه شده غلظت های 0،1/5 و 2 میلی گرم بر لیتر به محتویات ارلن های حاوی محیط CFMM اضافه گردید،در مرحله بعد و برای اضافه کردن باکتری ها،بعد از رشد باکتری ها داخل ارلن های 250 میلی لیتری حاوی محیط نوترینت براس،داخل ویال های استریل از هر کدام از باکتری ها و در 2 تکرار به مقدار 1/5میلی لیتر و در شرایط استریل ریخته گردید،سپس ویال ها با دور 4000 در دقیقه و بمدت 3 دقیقه سانتریفوژگردیدند،بعد از رسوب دادن و عمل سانتریفوژرسوب باقی مانده ویال ها ورتکس داده گردید و آنگاه رسوب باقی مانده ویال ها به محتویات ارلن های 250 میلی لیتری حاوی محیط CFMM اضافه گردید،در مرحله بعد و بعد از عمل تلقیح باکتری ها در محیطCFMM جدید حاوی 0/01گازوئیل برای بررسی کارایی تجزیه ماده نفتی و هم چنین بهترین سطح مقدار نیتروژن برای رشد باکتری ها یکی از راه های موجود قرائت OD 600 نانومتر در طول موج 600 نانومتر و توسط دستگاه سانتریفوژمی باشد.

نتایج و بحث:

-بررسی سطوح مختلف نیتروژن

در این بررسی زمان در 4 سطح 0، 48، 72 و 144 ساعت و ازت در سه سطح غلظت 0/5، 1 و 2 میلی گرم بر لیتردر نظر گرفته شد نتایج برای 4 سویه باکتری به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت (جدول 4-1).

جدول 4-1 تجزیه واریانس تیمار های سویه باکتری، نیتروژن، زمان و اثر متقابل آنها در محیط آلوده به گازوئیل

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	سطح معنی داری
سویه باکتری	3	0/62	0/20	7/56**	0/0003
نیتروژن	2	0/34	0/17	6/2**	0/04
زمان	3	2/08	0/69	25/33**	0/001
نیتروژن × باکتری	6	0/08	0/01	0/54 ns	0/77
نیتروژن× زمان	6	0/14	0/02	0/90 ns	0/50
زمان× سویه باکتری	9	0/50	0/05	2/05 ns	0/053
زمان× سویه باکتری× نیتروژن	18	0/37	0/02	0/75 ns	0/74
	36				

*،** و ns به ترتیب معنی داری در سطح احتمال 5و 1 درصد وغیر معنی داری را نشان می دهد

با توجه به ستون سطح معنی داری تفاوت معنی دار در سطح 1 درصد برای سویه باکتری، نیتروژن و زمان مشاهده می شود ولی هیچکدام از اثرات متقابل معنی دار نیست.

مقایسه میانگین سطوح مختلف سویه باکتری، نیتروژن و زمان به روش دانکن در سطح معنی داری 5 درصد انجام گرفت (جداول 4-2، 4-3 و 4-4).

جدول 4-2 مقایسه میانگین OD چهار نوع باکتری به روش دانکن در سطح 5 درصد در محیط آلوده به گازوئیل

P.Stutzeri (باکتری 1)	Chryseobacteriu (باکتری 2)	Acinetobacter (باکتری 3)	P.aeroginosa (باکتری 4)
0/19a	0/11 b	0/31 a	0/29 a

با توجه به جدول 4-2 باکتری 3 و 4(Acinetobacter,P.aeroginosa) از نظر کارائی یکسان و بهتر از باکتریهای 1 و 2بودند.

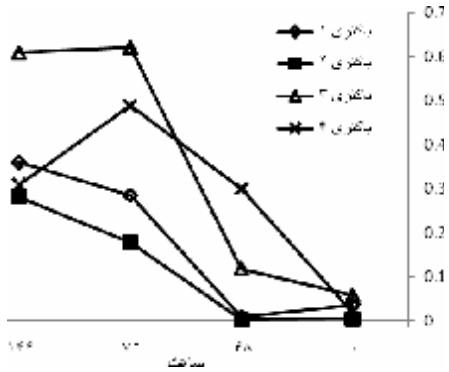
جدول 4-3 مقایسه میانگین OD 3 سطح غلظت نیتروژن بر حسب میلی گرم در لیتر به روش دانکن در سطح 5 درصد در محیط آلوده به گازوئیل

N=0/5	N=1	N=2
0/23ab	0/15 b	0/30 a

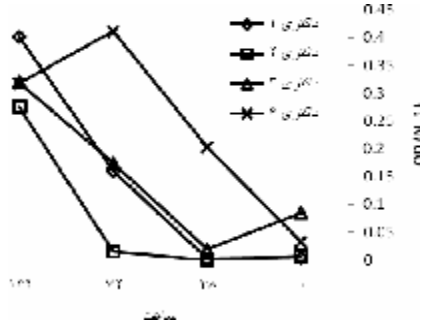
با توجه به جدول 4-3 بیشترین میانگین جمعیت باکتری در حضور سطح غلظت نیتروژن n=2 میلی گرم در لیترمشاهده شدو این در حالی است که تفاوت آن با سطوح0/5 و1 میلی گرم نیتروژن معنی دار نمی باشد.

جدول 4-4 مقایسه میانگین OD چهار زمان مختلف برحسب ساعت به روش دانکن درسطح 5 درصد در محیط آلوده به گازوئیل

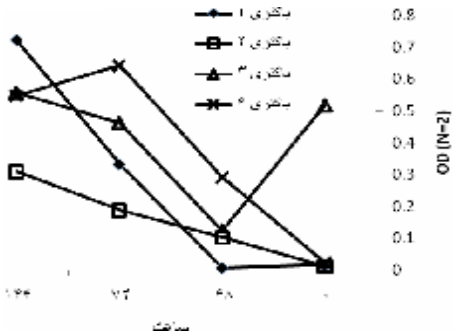
0	48	72	144
0/060 b	0/10 b	0/33 a	0/41 a



نمودار 1 میزان OD در زمانهای مختلف و سطح 0/5 =N میلی گرم در لیتر برای 4 سویه باکتری



نمودار 2 میزان OD در زمانهای مختلف و سطح 1 =N میلی گرم در لیتر برای 4 سویه باکتری



نمودار 3 میزان OD در زمانهای مختلف و سطح2=N میلی گرم در لیتر برای 4 سویه باکتری

Cunningham (2001)بیان کرد که بوسیله بکار بردن عناصر غذایی همچون نیتروژن و فسفر بعنوان منبع کربن و انرژی برای میکروارگانیسم ها می توان زیست پالایی هیدرو کربن های نفتی را بهبود بخشید.

منابع:

1. Bamby , F. , 1991. The environmental impact of the Persian gulf war " the ecologist . 21(4) , PP : 166 – 172
2. Cunnigham ,j.A. et al . 2001 . Enhanced in situ bioremidation of BTEX – contaminated groundwater by combined injection of nitgrate and sulfate. Environ. Sci .Technol .15 , 35 (8) : 1663 – 7.
3. Sparks, DL. 2003. Environmental Soil Chemistry. 2ed Academic Press. California. USA.