بررسی تجزیه زیستی نرمال- هگزادکان بوسیله باکتری‌های سودوموناس

سپیده سعیدی[1]، امیر فتوت[2]، امیر لکزیان[3]

1، 2 و3 به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، اعضاء هیات علمی گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

ایمیل: Sepide.saeidi@gmail.com

چکیده

این مطالعه به بررسی تجزیه زیستی نرمال هگزادکان بوسیله باکتری‌های سودوموناس آرژینوزا (P.A)، پوتیدا (P.P) و باکتری‌های بومی مناطق آلوده در حضور منبع غذایی در شرایط آزمایشگاهی پرداخته است. تیمارها شامل دو سطح نرمال هگزادکان (2500 و 10000 پی‌پی‌ام)، شش سطح باکتری (سودوموناس آرژینوزا (P.A) و پوتیدا (P.P)، سه جدایه از منطق آلوده اهواز (IA)، سرخس (IS) و تهران (IT) و بدون باکتری) و دو سطح کود شیمیایی (صفر و دو تن در هکتار) بودند. نتایج نشان داد که میزان تجزیه نرمال هگزادکان با گذشت زمان افزایش و همچنین در حضور کود شیمیایی از نظر آماری معنی دار بود.

کلمات کلیدی: **تجزیه زیستی، سودوموناس آرژینوزا، سودوموناس پوتیدا و کود شیمیایی**

مقدمه

هرساله مقادیر زیادی از ترکیبات آلی و غیر آلی حاصل از فعالیت های انسان در محیط رها و منجر به مشکلات زیست محیطی می شوند. فعالیت هایی نظیر استخراج، تغییر شکل، انتقال و توزیع هیدروکربن ها در خاک سبب این آلودگی ها می شوند (ولکی سپولودا، 2006). این هیدروکربن های نفتی شامل آلکان ها، آروماتیک ها و ترکیبات حلقوی آروماتیک (*PAH*) هستند که در این بین آلکان های خطی با زنجیره کربنی متوسط از مهمترین آلاینده های موجود در خاک به شمار می آیند (استرود، 2008). نرمال-هگزادکان از ترکیبات اصلی سوخت های دیزلی است که در بخش آلیفاتیک نفت خام وجود دارد و از جمله آلکان های با طول متوسط و از آلاینده های متداول خاک های آلوده می باشد (چنیر، 2003). در روش زیست پالایی (کنترل، کاهش یا حذف آلودگی از محیط زیست با استفاده از افزایش فعالیت های بیولوژیکی محیط) میکرواگانیزم ها از ترکیبات هیدروکربنی به عنوان کربن و انرژی استفاده کرده و آنها را آب و دی‌اکسید کربن تبدیل می کنند، حاصل این فرایند کاهش کل هیدروکربن های نفتی موجود در خاک می باشد (اسپینوزا، 2003). میکروارگانیزم های متعددی در این عمل نقش دارند که مهمترین آنها عبارتند از: باکتری‌ها: *Staphylococcus*، *Clostridium*، *Proteus*، *Pseudomonas*، *Bacillus*، اکتینومایست‌ها: *Nocardia* , *Actinomyces* و قارچ ها: *Phanerochaete Chrysosporium*. در میان میکروارگانیزم های فوق سودوموناس ها[1] از اهمیت بیشتری برخوردارند زیرا با وجود پلاسمید های متعدد قادر به تولید آنزیم های متعدد و تجزیه نفت هستند (اخوان سپهی، 1385). در ضمن سودوموناس ها مستقیماً در جذب هیدروکربن بوسیله تولید بیوسورفکتانت[2] به نام

[1] -*Pseudomonas*

[2] -Biosurfactant

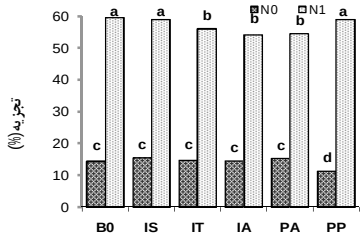
Rhamnolipid و یا بوسیله مکانیزم های چسبندگی/واجذبی به کار می روند (روزنبرگ، 1996)هدف از این مطالعه بررسی توان باکتریها در تجزیه زیستی نرمال هگزادکان بود.

مواد و روشها

این آزمایش به صورت طرح آماری فاکتوریل در قالب کاملاً تصادفی (چند مشاهده ای) با سه تکرار انجام شد. تیمار های آزمایش شامل دو سطح غلظت نرمال- هگزادکان (2500 و 10000 میلی گرم بر کیلوگرم)، شش سطح باکتری شامل اضافه نکردن باکتری، باکتری سودوموناس آرژینوزا (P.A)، پوتیدا (P.P)، جدایه‌های اهواز (IA)، سرخس (IS) و تهران (IT)، دو سطح کود (صفر و دو تن در هکتار) بود. نرمال - هگزادکان با خلوص99/8 درصد تهیه شد. باکتری سودوموناس آرژینوزا و پوتیدا به ترتیب از گروه میکروبیولوژی دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد و گروه میکروبیولوژی دانشگاه تهران تهیه شدند. بقیه جدایه‌ها از خاک های آلوده اهواز، سرخس وتهران جداسازی و خالص-سازی شدند. کودها شامل سه کود اوره، دی هیدروژن فسفات آمونیوم و سولفات پتاسیم بودند که با نسبت 20:10:10 برای تیمار کودی استفاده شدند. ابتدا خاک مورد استفاده پس از هوا خشک کردن، از الک دو میلیمتری عبور داده شد سپس نرمال - هگزادکان (Merck) با غلظت 2500 و 10000 میلی گرم بر کیلوگرم با استفاده از حلال هگزان به آن افزوده شد. سپس نمونه ها با غلظت مساوی از باکتری ها تلقیح و در رطوبت 70% ظرفیت زراعی نگهداری شدند. میزان تجزیه نرمال هگزادکان در طی 90 روز با استفاده از روش والکلی – بلاک استفاده گردید. داده های حاصل از آزمایش به وسیله نرم افزار MSTST-C و مقایسه میانگین داده ها با آزمون چند دامنه ای دانکن انجام شد.

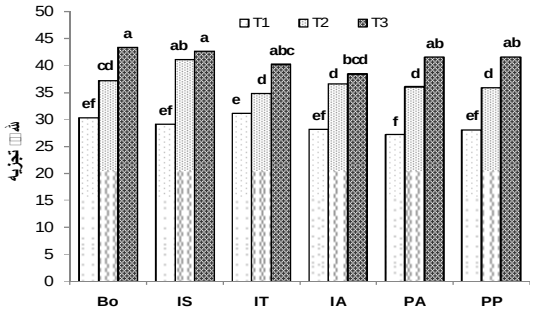
نتیجه گیری

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که کاربرد باکتری در حضور کودهای شیمیایی حاوی NPK اثر معنی داری بر میزان تجزیه داشت اما باکتری های مورد استفاده تفاوت زیادی با هم نشان ندادند. همان طور که در شکل 1 مشاهده می شود بیشترین میزان تجزیه در نمونه حاوی کود شیمیایی و فاقد باکتری تلقیحی دیده می شود (59/61%). استفاده از کود شیمیایی باعث افزایش فعالیت بیولوژیکی و در نتیجه افزایش تجزیه کربن آلی شده است. در مورد باکتری ها بنظر می رسد که میکروارگانیزم‌های بومی موجود در خاک غیر استریل باعث ایجاد تداخل در فعالیت باکتری های تلقیحی شده و روند تجزیه را کند کرده‌اند (قاسمی نقدی و همکاران، 1388). والورث و همکاران (1995) دریافتند که تجزیه هیدروکربن های خاک را می توان بوسیله کاربرد مواد غذایی ضروری مانند نیتروژن و به مقدار کمتر فسفر افزایش داد.



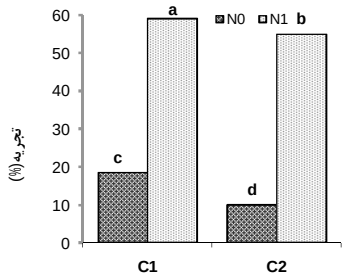
شکل 1 – اثر متقابل باکتری و کود شیمیایی بر تجزیه ی نرمال – هگزادکان

در بررسی حاضر مشاهده شد باکتری های مورد مطالعه با گذشت زمان کربن آلی را تجزیه کردند و میزان تجزیه در زمان های مختلف با یکدیگر تفاوت معنی داری را نشان داد. همچنین بیشترین سرعت تجزیه در بازه زمانی 60 روز دیده شد که در این بازه زمانی جدایه سرخس تفاوت معنی داری را در میزان تجزیه نسبت به شاهد نشان داد. میزان تجزیه توسط شاهد (فاقد باکتری تلقیحی) و جدایه سرخس به ترتیب 37/22% و 41/12% بود (شکل 2). شریفی حسینی و همکاران (1388) گزارش کردند که تجزیه نفت و افزایش جمعیت میکروبی (با اعمال تیمار کود شیمیایی) در مدت زمان 5 هفته بیشتر از 10 هفته در خاک های آلوده به نفت اهواز بود. کاتسیولا و همکاران (2005) در مطالعه زیست پالایی درجای خاک های کشاورزی آلوده به روغن موتور مشاهده کردند که تجزیه نرمال آلکان ها در طول 4 ماه اول تیماردهی به علت موجودیت جمعیت باکتری های فعال، سریعتر رخ می دهد. کولون و همکاران (2005) مشاهده کردند که در تجزیه هیدروکربن های تفتی خاک های آلوده قطب جنوب بعد از گذشت 180 روز 95-77% از کل آلکان ها و 80% از کل هیدروکربن های حلقوی آروماتیک در شرایط بهینه در دمای 10 درجه سانتیگراد بعد از افزودن منبع غذایی تجزیه شدند.



شکل 2 – اثر متقابل باکتری و زمان بر تجزیه ی نرمال – هگزادکان (30، 60 و 90 روز)

غلظت های متفاوت هگزادکان در حضور کود و عدم حضور کود تفاوت معنی داری نسبت به هم نشان دادند لیکن در حضور کود میزان تجزیه بسیار بیشتر از اضافه نکردن کود بود. همچنین نتایج بدست آمده نشان داد که میزان تجزیه در غلظت های پایین تر بیشتر از غلظت های بالاتر است به گونه ای که میزان تجزیه برای غلظت C1 در حضور و عدم حضور کود به ترتیب 59/14% و 18/54% و برای غلظت C2 به ترتیب 55/07% و 10/04% بود (شکل 3). ولکی سپولودا و همکاران (2006) دریافتند که با افزایش غلظت هگزادکان تجزیه زیستی آن درحالت جامد توسط قارچ آسپرژیلوس نیجر کاهش یافت. پرتوی نیا و همکاران (1387) در بررسی زیست سالم سازی خاک آلوده به هیدروکربن نفتی نرمال – هگزادکان در فاز دوغابی به این نتیجه رسیدند که با افزایش غاظت هگزادکان در خاک، مقدار تجزیه کاهش یافت.



شکل 3 –اثر متقابل کود وغلظت بر تجزیه ی نرمال – هگزادکان

منابع

1- اخوان سپهی ع و نورشاهی ن، 1385 . نقش میکروارگانیزم ها در حذف آلودگی های نفتی. ماهنامه نفت پارس، شماره 43. صفحه های 8 تا 9.

2- پرتوی نیا ع و نعیم پور ف، 1387 . زیست سالم سازی خاک آلوده به هیدروکربن نفتی نرمال-هگزادکان در فاز دوغابی و بررسی پارامترهای مؤثر. مجله پژوهش نفت، شماره 58. صفحه های 3 تا 10.

3- شریفی حسینی س، شهبازی ع، یزدی پور ع و کامرانفر ا، 1388 . پالایش زیستی خاک های آلوده بـه نفـت خـام بـا کودهـای شیمیایی. مجله آب و خاک، جلد 23، شماره 3. صفحه های 145 تا 155.

4- قاسمی نقدی ف، بادکوبی ا و بطحایی ز، 1388 . تجزیه زیستی هیدروکربن های نفتی در فاز دوغابی و مایع توسط کشت مخلوط. مجله فنی و مهندسی مدرس، شماره 35. صفحه های 99 تا 113.

5-Chenier MR, Beaumier D, Roy R, Driscoll BT, Lawrence JR and Greer CW, 2003. Impact of seasonal variations and nutrient inputs on nitrogen cycling and degradation of hexadecane by replicated river biofilm. Applied Environmental Microbiology 69: 5170-5177.

6-Coulon F, Pelletier E, Gourhant L and Delille D, 2005. Effects of nutrient and temperature on degradation of petroleum hydrocarbons in contaminated sub-Antarctic soil. Chemosphere 58: 1439-1448.

7-Katsivela E, Moore ERB, Maroukli D, Strompl C, Pieper D and Kalogerakis N, 2005. Bacterial community dynamics during in-situ bioremediation of petroleum waste sludge in landfarming sites. Biodegradation 16: 169-180.

8-Rosenberg E and Ron EZ, 1996. Bioremediation of petroleum contamination. In: Ronald LC, Don LC. Bioremediation: principles and applications. Cambridge University Press, UK ISBN 0521470412: 100-124.

9-Stroud L, Paton G and Sempel K, 2008. Linking chemical extraction to microbial degradation of 14C-hexadecane in soil. Environmental Pollution 156: 474-481.

10-Volke-Sepulveda TL, Gutierrez-Rojas M and Favela-Torres E, 2006. Biodegradation of high concentrations of hexadecane by *Aspergillus niger* in a solid-state system: Kinetic analysis. Bioresource Technology 97: 1583-1591.

11-Walworth JL and Reynolds CM, 1995. Bioremediation of a petroleum-contaminated cryic soil: effects of phosphorous, nitrogen, and temperature. Journal of Soil Contamination 4: 299-310.