نشریه دانش آب و خاک / جلد 26 شماره 3/1 صفحه‌های 175 تا 185/ سال 1395

جداسازی و مطالعه باکتری‌های بومی خاک‌های آلوده جنوب پالایشگاه تهران جهت زیست پالایی آلودگی‌های نفتی

اکبر قویدل[1*]، سمیه ناجی راد[2]، حسینعلی علیخانی[3]

تاریخ دریافت: 93/07/15 تاریخ پذیرش: 95/03/16

[1]- استادیار گروه علوم و مهندسی خاک، دانشگاه محقق اردبیلی

[2]-استادیار گروه کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل

[3]- استاد گروه علوم و مهندسی خاک، دانشگاه تهران

[*] مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Ghavidel@uma.ac.ir

چکیده

رشد روزافزون جمعیت و به‌دنبال آن توسعه صنایع و پالایشگاه‌ها، سبب ورود حجم عظیمی از ترکیبات آلاینده هیدروکربنی به محیط زیست شده است. زیست پالایی یا حذف بیولوژیک هیدروکربن‌های نفتی در خاک یا آب، کارآمدتر از سایر فناوری‌های فیزیکی و شیمیایی پالایش می‌باشد. در این میان، باکتری‌های بومی خاک‌های آلوده نفتی به‌دلیل سازگاری و تماس طولانی مدت با آلاینده‌های هیدروکربنی حائز اهمیت می‌باشند. هدف از این تحقیق، جداسازی و مقایسه کارآیی باکتری‌های برتر تجزیه کننده نفت از خاک‌های آلوده جنوب پالایشگاه تهران می‌باشد. بدین منظور، شش نمونه خاک آلوده نمونه‌برداری و طی سه مرحله آزمایشگاهی، سویه‌های برتر باکتری‌های تجزیه کننده نفت جداسازی گردیدند. در مرحله اول جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های بومی نفت‌خوار در محیط کشت اختصاصی عصاره خاک-آگار، در مرحله دوم مطالعه کارایی جدایه‌ها در محیط‌کشت پایه معدنی مایع همراه با 7% حجمی نفت گاز به‌عنوان منبع هیدروکربنی و در مرحله سوم مقایسه میزان تنفس سویه‌های باکتریایی در محیط حاوی 3% وزنی نفت گاز انجام شد. در پایان این سه مرحله آزمایشگاهی، از بین تمام جدایه‌های تجزیه‌کننده مواد نفتی، دو جدایه باکتریایی BJ.1 و BM.1 با میزان تنفس به‌ترتیب؛ 2/1 و 1/8 میلی گرم CO_2 در هر گرم شن-پرلیت در ماه، به‌عنوان برترین و توانمندترین باکتری-های تجزیه کننده نفت گاز انتخاب شدند.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های تجزیه کننده نفت، تجزیه زیستی، زیست‌پالایی، نفت گاز، هیدروکربن‌های نفتی

Isolation and Study of Indigenous Bacteria of the Contaminated Soils in Southern of Tehran Oil Refinery plant for Bioremediation of Oil ontaminations

A Ghavidel[1*] , S Najirad[2], HA Alikhani[3]

Received: 7 October 2014 Accepted: 5 June 2016
[1-]Assist. Prof., Soil Science and Engineering Dept. University of Mohaghegh Ardabili, Iran
[2-]Assist. Prof., Agriculture Dept. Islamic Azad University Ardabil Brach, Iran
[3-]Prof., Soil Science and Engineering Dept. University of Tehran, Iran
* Correspoding Author, Email: Ghavidel@uma.ac.ir

Abstract

Increasing growth of population and consequent development of industries and refinery plants cause high amounts of hydrocarbon pollutants enter to environment. Bioremediation or biological removal of petroleum hydrocarbons from soil or water is more efficient than the other physical and chemical remediation technologies. Indigenous bacteria are important because of their long term exposure and compatibility to hydrocarbon contaminants. Therefore, the aim of this study was isolation and comparison of oil consuming bacteria efficiency in the oil contaminated soils in southern of Tehran oil refinery plant. Six samples from the contaminated soil were collected and then the superior oil degrading bacteria were isolated through three laboratory steps: i) Isolation and purification of indigenous oil degrading bacteria in a soil extract agar as a selective media, ii) The study of efficiency of the isolates in a liquid mineral based media with 7% (V/V) of gas oil. iii) The comparison of the respiration rates of the isolates in a media containing 3% (W/W) gas oil. At the end of three steps, among all the oil degrading isolates, two isolates of BJ.1 and BM.1 with respiration rates of 2.1 and 1.8 mg CO2 per gram sand-perlite per month, were ultimately selected as the most powerful and efficient isolates for oil degradation, respectively.

Keywords: Biodegradation, Bioremediation, Gasoil, Oil degrading bacteria, Petroleum Hydrocarbons

مقدمه

آلودگی نفتی یکی از معمول‌ترین و شایع‌ترین نوع از آلودگی‌ها در اکوسیستم‌های خشکی و آبی است (اسچافر و همکاران 2005). کشور ایران یکی از مناطق مهم نفت‌خیز جهان می‌باشد و در مناطقی که استخراج نفت انجام می شود، همواره خطر آلودگی خاک به نفت خام و مشتقات آن وجود دارد. با ورود این آلاینده‌ها به محیط‌زیست، بخشی از آلاینده‌ها، خصوصاً قسمتی که از لحاظ ساختاری شبیه به ترکیبات طبیعی هستند، سریعاً توسط ریزموجودات آب و خاک و یا تحت تأثیر عوامل فیزیکی، تجزیه و حذف می‌شوند. اما بخش عمده آنها، به‌کندی تجزیه می‌گردد و در نتیجه در محیط زیست ماندگار می شوند و تهدیدی جدی برای سلامت انسان، موجودات و اکوسیستم‌های زنده است (میرسال 2008). ترکیبات هیدروکربنی، گروه بزرگ و متنوعی از مولکول‌های آلی هستند که دارای طیف گسترده‌ای از خواص متفاوت از نظر وزن مولکولی، ساختار، حلالیت آبی، درجه فرار بودن، ضریب جذب، و غیره می‌باشند

(جیوردانو و همکاران 2005). تحقیقات بر روی روش-های مختلف رفع آلودگی‌های هیدروکربنی، از جمله چالش‌های اساسی پیش روی کارشناسان محیط‌زیست در دنیا می‌باشد (میرسال 2008). پاک‌سازی محیط از آلاینده‌های نفتی بسیار پرهزینه و وقت‌گیر می‌باشد و روش‌های به‌کار گرفته شده برای اصلاح این خاک‌ها، معمولا ناکارآمد است؛ روش‌های اصلاح فیزیکی و شیمیایی برای کاهش و یا حذف آلودگی‌های نفتی، تنها قادرند آلاینده را به یک ترکیب کم ضررتر تبدیل نمایند و لذا لازم است ماده حاصله مجدداً پالایش گردد. فرآیندهای بیولوژیکی برای حذف آلاینده‌ها، به‌علت توانایی آن در حذف کامل آلاینده‌های آلی و سمی و تبدیل آن‌ها به ترکیبات معدنی غیرسمی و نهایتاً آب و دی اکسیدکربن یا مواد فرار بی‌ضرر و سازگار با محیط زیست که عموما کم هزینه می‌باشند، بسیار مورد توجه هستند (کینگ و همکاران 1997، ماتری کول 1994). به‌عبارت دیگر، در اغلب موارد به‌نظر می‌رسد که زیست پالایی یا حذف زیستی این نوع آلاینده‌ها، یک راهکار مناسب نسبت به سایر روش‌های فیزیکی و شیمیایی پالایش باشد (سارتروز و همکاران 2005، اسچافر و همکاران 2005). پالایش زیستی روشی است که بر مبنای تخریب زیستی ذاتی و خودبه‌خودی ریزموجودات، همراه با کاهش محدودیت‌های زیست محیطی برای ریزموجودات تجزیه کننده، بنا نهاده شده است (یانگ وهمکاران 2009). اصطلاح پالایش زیستی، بیان کننده مراحل تجزیه آلاینده‌ها در محیط زیست به‌وسیله روش‌های بیولوژیکی است، که بر مبنای توانایی متابولیکی ریزموجودات استوار است. پالایش زیستی می‌تواند برای محدوده متفاوتی از ترکیبات آلی به‌کار گرفته شود (اسکراگ 2005). زیست پالایی یک ابزار ایمن، کارا، دوستدار طبیعت و اقتصادی برای حذف آلاینده‌ها در خاک‌های آلوده بدون نیاز به جابجایی خاک، در نظر گرفته می‌شود (ویدالی 2001، دابسون و همکاران 2004، لینچ و موفات 2005). میکروارگانیسم ها به‌علت ظرفیت متابولیکی بالایی که برای استفاده از آلاینده‌ها به‌عنوان منبع کربن و انرژی دارند، می‌توانند در محیط‌های آلوده رشد و تکثیر یابند، لذا میزان آلودگی منطقه مورد نظر کاهش می‌یابد. در سال‌های اخیر، توجه به ریزموجودات نفت‌خوار بومی مناطق آلوده هیدروکربنی و نحوه جداسازی و خالص-سازی آن‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده است (اسماعیلی و همکاران 1391، ابراهیمی و همکاران 1392). با شناسایی و تکثیر گونه‌های مختلف ریزموجودات بومی مقاوم به آلاینده‌های نفتی، می‌توان گام موثری در راستای نیل به اهداف پاک‌سازی زیستی مناطق آلوده به نفت برداشت. لذا هدف از این تحقیق، جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های بومی تجزیه کننده هیدروکربنهای نفتی از خاک‌های آلوده به نفت در جنوب پالایشگاه تهران و نهایتاً، بررسی کارآیی آنها در تجزیه و مصرف کل هیدروکربن‌های نفتی[1] خاک می باشد. در این تحقیق جهت بررسی تجزیه زیستی هیدروکربنی، توسط جدایه‌های باکتریهای بومی خاک آلوده مورد آزمایش، از "نفت گاز[2]" به‌عنوان آلاینده هیدروکربنی استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

ابتدا 6 نمونه نمونه خاک، از مناطق آلوده جنوب پالایشگاه تهران که به‌مدت طولانی در معرض نشت آلاینده‌های نفتی از مخازن پالایشگاه تهران قرار داشتند، نمونه‌برداری شدند. عمق نمونه‌برداری 25 – 0 سانتی‌متر سطحی خاک بود. نمونه‌ها بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شدند. بخشی از هر یک از نمونه‌های خاک تا شروع مراحل مختلف جداسازی باکتری‌های نفت خوار، جهت حفظ جامعه میکروبی آن به یخچال (دمای 4 °C) انتقال داده شدند؛ جداسازی، خالص سازی و انتخاب جدایه‌های برتر باکتری در تجزیه و مصرف

[1] TPHs: Total Petroleum Hydrocarbons
[2] Gas oil

هیدروکربن‌های نفتی، طی سه مرحله آزمایش مجزا انجام گردید. این سه مرحله شامل؛

مرحله اول: جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های بومی نفت خوار جهت زیست‌پالایی خاک آلوده هیدروکربنی، در محیط کشت اختصاصی Soil Extract Agar. برای جداسازی باکتری‌های نفت خوار هر نمونه خاک، از عصاره همان نمونه خاک به‌علاوه آگار (1/5 درصد) استفاده گردید. برای عصاره گیری از خاک، ابتدا سوسپانسیون 1:1 (خاک و آب) از هر نمونه، تهیه شد. سوسپانسیون حاصله در دمای 75 درجه سانتی‌گراد و به‌مدت 30 دقیقه خوب مخلوط گردید تا ضمن افزایش لزوجت هیدروکربن‌ها، برای وارد شدن آنها به فاز آبی، هیدروکربن‌های سمی، سبک‌تر و فرار نیز ضمن هم زدن، از محیط خارج شوند. سپس سوسپانسیون مذکور، توسط قیف بوخنر و تحت مکش، عصاره‌گیری شد. به عصاره خاک به‌دست آمده، به میزان 15 گرم بر لیتر آگار اضافه و سپس محیط کشت حاصله در اتوکلاو استریل گردید. محیط کشت استریل شده در ظروف پتری استریل، پلیت شدند. در محیط کشت‌های تهیه شده، آلودگی‌های هیدروکربنی عصاره گیری شده از خاک، در واقع به‌عنوان منبع کربن مورد استفاده باکتری‌های تجزیه کننده قرار می‌گیرند. غلظت هیدروکربن ها در این مرحله احتمالا یکسان نبوده است. زیرا در این مرحله جداسازی از خاک های مختلف مد نظر بوده است و هر جدایه از خاک مربوطه جداسازی شده است؛ بنابراین احتمالا هر خاک غلظتهای متفاوتی از هیدروکربن ها را داشته است. با توجه به این که هدف از این مرحله صرفا جداسازی و غربالگری سویه های برتر از هر خاک بود، لذا در این مرحله غلظت هیدروکربنهای نمونه های خاک ممکن است متفاوت بوده باشد.

سپس از نمونه خاک‌های نگهداری شده در یخچال، سری‌های رقت[3] تهیه شد و جهت جداسازی باکتری‌های نفت خوار، رقت‌های تهیه شده هر نمونه خاک بر محیط کشت تهیه شده از همان خاک، تلقیح شدند. ظروف پتری حاوی محیط کشت (Soil Extract Agar)، از رقت 10^{-4} تا 10^{-7} و در سه تکرار تلقیح شدند. پلیت های کشت شده به مدت 20 روز در انکوباتور دمای 2 ± 27 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. باکتری‌های برتر با توجه به سرعت رشد کلنی‌های باکتری و بیشینه اندازه کلنی انتخاب شدند (ایلینا و همکاران 2003، کارامالیدیس و همکاران 2010). لذا تعداد و قطر کلنی‌ها به‌صورت روزانه اندازه گیری و ثبت شد. پس از طی مدت زمان مذکور، از بین باکتری‌های 6 نمونه خاک، جمعاً 41 جدایه انتخاب شدند. برای خالص سازی باکتری‌ها، در چند نوبت تجدید کشت شدند. ضمناً شکل کلنی‌ها، مشاهدات میکروسکوپی و دیگر بررسی‌ها (رنگ‌آمیزی گرم و ...) برای تائید خالص بودن باکتری‌ها انجام پذیرفت.

مرحله دوم؛ بررسی میزان کارایی سویه‌های مختلف باکتری در محیط‌کشت پایه معدنی مایع[4] با منبع هیدروکربنی (7% حجمی (V/V) منبع هیدروکربنی نفت گاز) (ایلینا و همکاران 2003، موکرد و همکاران 2008، آیدیس و همکاران 2010)

جهت انجام این مرحله از آزمایش، ابتدا محیط کشت پایه معدنی مایع با ترکیبات زیر (به ازای 1000 میلی‌لیتر آب مقطر) تهیه گردید (مارکوئز روچا و همکاران 2000)؛ 1/71 گرم دی پتاسیم هیدروژن فسفات (K_2HPO_4)، 1/32 گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات (KH_2PO_4)، 1/26 گرم آمونیوم کلراید (NH_4Cl)، 0/011 گرم منیزیم کلراید آبدار ($MgCl_2.6H_2O$)، 0/02 گرم کلسیم کلراید ($CaCl_2$)، 5 میلی‌لیتر محلول عناصر کم مصرف و 70 میلی‌لیتر آلاینده هیدروکربنی نفت گاز به عنوان تنها منبع کربن، محیط‌کشت مایع حاصله در اتوکلاو استریل شد و سپس یک لوپ از هر یک از جدایه های باکتریایی نفت‌خوار خالص‌سازی شده از مرحله

[3] Serial Dilution

[4] Liquid Mineral Media

اول، با رعایت شرایط استریل (درون لامینار) به ارلن های جداگانه حاوی محیط‌کشت پایه معدنی مایع (حاوی آلاینده نفت گاز) تلقیح گردیدند. یک ارلن حاوی محیط کشت به‌عنوان تیمار شاهد (بدون تلقیح باکتری) و برای هر کدام از کشت ها اعم از کشت جدایه‌ها یا شاهد، سه تکرار در نظر گرفته شد. نمونه های کشت شده به مدت 15 روز در دمای 2 ± 27 درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر سرعت 200 دور در دقیقه (rpm) قرار گرفتند و در انتهای هر پنج روز، کدری[5] آنها توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (Shimadzu -UV 3100) در طول موج 540 nm قرائت می گردید (ایلینا و همکاران 2003). سپس بر اساس کدری نمونه‌ها در انتهای روز پانزدهم، با استفاده از استاندارد مک فارلند[6] جمعیت باکتری‌ها برآورد گردید (کاپوچینو و شرمان 1987). در پایان این مرحله نیز، بر اساس مقایسه کدری ناشی از باکتریها و جمعیت آن‌ها، برترین جدایه‌های باکتریایی (چهار جدایه) در مصرف و تجزیه هیدروکربن‌های نفتی انتخاب شدند.

مرحله سوم؛ مقایسه میزان تنفس جدایه‌های برتر در محیط حاوی 3% وزنی (W/W) نفت گاز به عنوان معیاری جهت مقایسه کارآیی آن‌ها در مصرف هیدروکربن‌های نفتی.

یکی از روش‌های اصلی جهت تخمین میزان تجزیه زیستی هیدروکربن‌های نفتی، روش معدنی شدن و تولید گاز CO_2 است که در این روش، با اندازه‌گیری تنفس باکتریایی در خاک، مقدار کاهش هیدروکربن‌ها قابل تخمین است. این روش ساده، دقیق و موثر در تعیین غیرمستقیم مقدار تجزیه زیستی هیدروکربنها می-باشد. جهت جلوگیری از اثرات آنتی باکتریال بعضی مواد ناشناخته درون سیستم خاک و از طرفی وجود ریزموجودات خاکزی، که هر دو مورد سبب می‌شوند نتوان میزان تنفس واقعی مربوط به جدایه‌های باکتریهای مورد نظر را به‌دست آورد، از انجام آزمایش بر روی خاک صرف‌نظر کرده و به جای آن از مخلوط شن- پرلیت[7] (که با نسبت وزنی 1:9، شن:پرلیت تهیه شده است) استفاده شد. 10 گرم از مخلوط شن- پرلیت آماده شده، جهت استریل به‌مدت 24 ساعت در آون 150 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. جهت تأمین عناصر لازم جهت رشد بهینه باکتری‌های منتخب، یک میلی‌لیتر از محیط کشت پایه معدنی مایع با 3% وزنی نفت گاز (تنها منبع کربن برای باکتریهای مذکور)، به شن- پرلیت اضافه گردید. سپس ظروف حاوی شن- پرلیت با یک میلی‌لیتر سوسپانسیون جدایه های باکتریایی با جمعیت 3×10^9 عدد در هر میلی‌لیتر تلقیح شدند. در داخل هر کدام از ظروف یک بشر حاوی 50 میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم 0/05 مولار قرار داده شد. ظرف‌ها به مدت شش هفته در انکوباتور با دمای 2 ± 27 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در پایان هر هفته درب ظروف باز شده و تیتراسیون محلول هیدروکسید سدیم در نمونه‌ها و شاهد با استفاده از اسید کلریدریک 0/05 مولار انجام می‌شد. در نهایت داده‌های حاصل از شش هفته پس از کسر مقدار مربوطه در شاهد به صورت یک عدد واحد گزارش شدند (الف و پائولو 1995). پس از گذشت مدت زمان مذکور، میزان تنفس باکتری‌ها بر حسب میلی گرم CO_2 تولید شده بر وزن شن- پرلیت خشک در ماه محاسبه شد. این مرحله تحقیق با 6 تیمار و 3 تکرار (مجموعا 18 واحدآزمایشی) در قالب یک طرح کاملاً تصادفی (CRD) انجام پذیرفت. 4 تیمار آن شامل 4 جدایه باکتریایی برتر و منتخب و 2 تیمار آن، تیمارهای شاهد (شاهد بدون باکتری، شاهد بدون شن- پرلیت و باکتری) بودند. برای محاسبه قرائت شاهد، از مجموع دو شاهد فوق استفاده گردید. داده های حاصله توسط نرم افزار SAS نسخه 9/1 تحلیل آماری شدند و مقایسه میانگین تیمارها با روش آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال 0/01 انجام پذیرفت ($P<0.01$).

[5] Turbidity
[6] McFarland Barium Sulfate Standard
[7] Sand-Perlite

نتایج و بحث

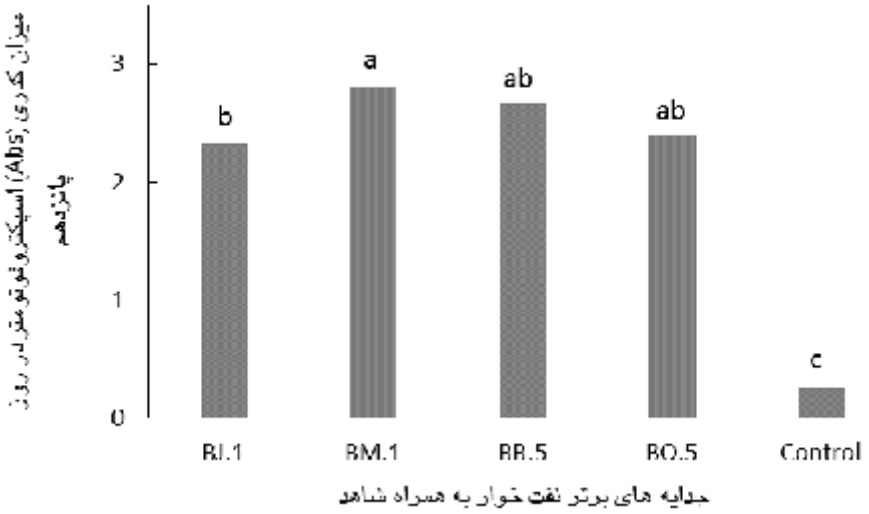
مرحله اول؛ همان‌طور که اشاره شد جهت جداسازی اولیه جدایه‌های برتر تجزیه‌کننده نفت، از روش‌کشت کلنی بر محیط کشت اختصاصی با منبع هیدروکربنی استفاده شد. پس از گذشت مدت زمان مذکور (20 روز)، کلنی‌ها به‌صورت کاملا واضح بر روی محیط کشت حاوی هیدروکربن نفتی ظاهر شده بودند که نشان‌گر توانایی آن‌ها در مصرف و تجزیه هیدروکربن‌های نفتی می‌باشد (کارامالیدیس و همکاران 2010). چون محیط کشت‌های ذکر شده حاوی عصاره همان خاک‌های آلوده نفتی بودند، لذا می‌توان گفتباکتری‌هایی که توانایی بقاء و زیست در محیط‌های هیدروکربنی را دارند و قادر به استفاده از کربن آنها به عنوان منبع انرژی می‌باشند، می‌توانند در این محیط کشت‌ها به خوبی رشد کنند. در تحقیقات پیشین، دو عامل اصلی شامل؛ i) سرعت رشد روزانه و افزایش قطر کلنی و ii) بیشینه قطر کلنی‌ها، مناسب‌ترین عامل در غربالگری جدایه‌های باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت معرفی شده است (اسماعیلی و همکاران 1391، ابراهیمی و همکاران 1392، ایلینا و همکاران 2003). در انتهای روز بیستم از بین تمام باکتری‌های رشد یافته بر روی پلیت‌های مربوط به هر خاک، بر اساس "سرعت رشد روزانه و حداکثر قطر کلنی"، در مجموع 41 سویه باکتری، جداسازی و خالص‌سازی شد که تعداد جدایه های نفت خوار برتر در هر نمونه خاک و نیز تعداد کل باکتری‌های زنده نفت خوار درون هر نمونه خاک، در جدول 1 ارائه شده است.

مرحله دوم؛ یکی از روش‌های بررسی میزان و روند رشد میکروارگانیسم‌ها، اندازه گیری روند تغییرات دانسیته نوری (OD) آنها با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر است. با افزایش تعداد سلول‌ها در داخل محیط کشت، درصد جذب نور نیز افزایش می‌یابد و لذا، مقدار نور جذب شده، بیانگر تعداد سلول در داخل محیط است. به جدایه‌های برتر جداسازی شده از مرحله قبل، اجازه داده شد تا در محیط کشت مایع (با منبع هیدروکربنی) در مدت زمانی مشخص رشد کنند. میزان کدری حاصله در محیط‌کشت پس از پایان آزمایش، نمایانگر میزان رشد باکتری‌هاست و از آنجایی که تنها منبع کربنی این محیط، نفت گاز (7% حجمی (V/V) منبع هیدروکربنی نفت گاز) می‌باشد، لذا بیان‌گر توانایی باکتری‌ها در تجزیه و مصرف آلاینده هیدروکربنی است (اسماعیلی و همکاران 1391، ابراهیمی و همکاران 1392، ایلینا و همکاران 2003، آیدیس و همکاران 2010). رشد باکتری در محیط مایع، با کدر شدن محیط مشخص می‌شود، از طرفی نیز ایجاد متابولیت‌های اسیدی حاصل از تجزیه نفت گاز به‌وسیله سویه‌های باکتریایی، باعث افت محسوس pH محیط کشت‌ها می‌گردد (نامچی و همکاران 2006).

جدول 1- جدایه های باکتری‌های تجزیه کننده نفت طی مرحله اول.

شماره نمونه خاک	جمعیت باکتریهای تجزیه کننده نفت Oil Degrading CFU g^{-1} Soil	تعداد ایزوله‌های باکتریایی جداسازی شده از هر خاک
1	$3/4 \times 10^7$	5
2	$3/05 \times 10^7$	7
3	$8/96 \times 10^7$	5
4	$2/5 \times 10^6$	10
5	$8/8 \times 10^4$	9
6	$6/8 \times 10^7$	5

جدول 2 میزان کدری قرائت شده دستگاه اسپکتروفوتومتر (روز پنجم، روز دهم و روز پانزدهم) برای 41 جدایه باکتری نفت‌خوار جداسازی شده از مرحله قبل و نیز جمعیت 41 جدایه باکتری را بر اساس کدری آن‌ها در انتهای روز پانزدهم و با استفاده از روش استاندارد مک فارلند به‌صورت تقریبی نشان می-دهد. قابل ذکر است که در تیمار شاهد که هیچ باکتری کشت نشده بود، احتمالا به‌علت هم زدن و تخریب جزئی خود به خودی نفت گاز و به‌دنبال آن افزایش حلالیت در محیط آبی، اندکی کدری نسبت به روز اول ایجاد شده بود که این میزان کدری از کدورت سایر نمونه‌های باکتریایی کسر شد. احتمالا بر اثر تجزیه باکتری‌ها، آلاینده نفت گاز تغییر شکل داده و حلالیت آن در فاز آبی افزایش یافته بود. در واقع در روز اول که نفت گاز و محیط کشت مایع در دو فاز کاملاً مجزا از هم قرار داشتند و نفت گاز به‌علت چگالی کمتر از آب، در سطح محیط کشت مایع قرار گرفته بود، در انتهای روز پانزدهم در تعداد زیادی از جدایه‌ها، تنها اندکی نفت گاز آن هم در فاز آبی سوسپانسیون قابل مشاهده بود. در انتهای روز پانزدهم، جمعیت باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت گاز افزایش یافته بود. باکتری‌هایی که رشد بیشتر و نیز توان بالاتری در تجزیه نفت گاز داشتند، جذب نوری (OD) بالاتر و pH محیط کشت کمتری داشتند، از این رو برای ادامه آزمایش انتخاب گردیدند. مشابه این روش و این نتایج در تحقیقات دیگر دانشمندان نیز به-چشم می‌خورد (نامچی و همکاران 2006). نهایتاً بر اساس میزان کدری ایجاد شده توسط جدایه‌های باکتریایی و نتایج قرائت شده دستگاه اسپکتروفوتومتر (جدول 2) ، چهار سویه برتر انتخاب شدند. این نکته حائز اهمیت است که در انتهای روز پانزدهم، یعنی آخرین قرائت توسط دستگاه، در سطح محیط کشت‌های حاوی چهار سویه برتر، آلاینده نفت گاز دیده نمی‌شد که نشان‌گر مصرف باکتری‌ها از نفت گاز به‌عنوان منبع کربنی می‌باشد. شکل 1، مقایسه میزان کدورت را برای چهار جدایه مذکور در انتهای روز پانزدهم نشان می‌دهد و در شکل 2، تغییرات رشد این چهار جدایه برتر تجزیه کننده نفت بر اساس جمعیت آنها در روزهای قرائت آمده است.



شکل 1- مقایسه میزان کدری (Abs) اسپکتروفوتومتر در انتهای روز پانزدهم.

جدول 2- نتایج کدر سنجی 41 جدایه باکتری تجزیه کننده نفت (اعداد بر ا ساس میزان جذب[9] دستگاه اسپکتروفوتومتر می‌باشد).

ردیف	نام جدایه	روز پنجم (Abs)	روز دهم (Abs)	روز پانزدهم (Abs)	جمعیت باکتری در هر میلی لیتر در روز پانزدهم	ردیف	نام جدایه	روز پنجم (Abs)	روز دهم (Abs)	روز پانزدهم (Abs)	جمعیت باکتری در هر میلی لیتر در روز پانزدهم
1	BM.1	1/550	2/431	2/812	$10^9 \times 8/63$	22	BX.2	0/430	0/441	0/452	$10^9 \times 1/55$
2	BB.5	1/425	2/292	2/659	$10^9 \times 8/17$	23	BJ.4	0/400	0/418	0/436	$10^9 \times 1/5$
3	BO.5	1/642	2/270	2/398	$10^9 \times 7/39$	24	BI.3	0/384	0/401	0/418	$10^9 \times 1/45$
4	BJ.1	1/612	2/216	2/320	$10^9 \times 7/16$	25	BO.1	0/385	0/399	0/413	$10^9 \times 1/43$
5	BQ.1	0/980	1/720	2/010	$10^9 \times 6/23$	26	BU.3	0/379	0/391	0/403	$10^9 \times 1/4$
6	BV.6	0/865	1/500	1/950	$10^9 \times 6/05$	27	BI.4	0/365	0/382	0/399	$10^9 \times 1/39$
7	BQ.6	0/854	1/423	1/851	$10^9 \times 5/7$	28	BJ.6	0/365	0/380	0/395	$10^9 \times 1/38$
8	BI.5	0/754	1/060	1/220	$10^9 \times 8/3$	29	BC.4	0/336	0/356	0/376	$10^9 \times 1/32$
9	BM.2	0/652	0/800	0/865	$10^9 \times 2/79$	30	BA.4	0/338	0/355	0/372	$10^9 \times 1/31$
10	BN.5	0/634	0/767	0/832	$10^9 \times 2/69$	31	BE.4	0/332	0/348	0/364	$10^9 \times 1/29$
11	BK.4	0/620	0/655	0/710	$10^9 \times 2/33$	32	BY.5	0/307	0/328	0/349	$10^9 \times 1/24$
12	BH.6	0/615	0/653	0/706	$10^9 \times 2/31$	33	BE.2	0/301	0/321	0/341	$10^9 \times 1/22$
13	BK.2	0/599	0/638	0/681	$10^9 \times 2/22$	34	BD.6	0/299	0/316	0/333	$10^9 \times 1/19$
14	BF.2	0/590	0/620	0/650	$10^9 \times 2/15$	35	BL.2	0/294	0/306	0/318	$10^9 \times 1/15$
15	BG.1	0/571	0/604	0/637	$10^9 \times 2/11$	36	BQ.4	0/287	0/289	0/309	$10^9 \times 1/12$
16	BS.4	0/570	0/589	0/608	$10^9 \times 2/02$	37	BR.4	0/277	0/289	0/301	$10^9 \times 1/1$
17	BG.4	0/549	0/571	0/593	$10^9 \times 1/97$	38	BS.3	0/271	0/284	0/297	$10^9 \times 1/09$
18	BK.5	0/495	0/541	0/587	$10^9 \times 1/96$	39	BA.3	0/270	0/282	0/294	$10^9 \times 1/08$
19	BL.5	0/449	0/471	0/493	$10^9 \times 1/67$	40	BZ.5	0/250	0/270	0/290	$10^9 \times 1/07$
20	BB.3	0/435	0/456	0/477	$10^9 \times 1/63$	41	BI.2	0/255	0/265	0/275	$10^9 \times 1/02$
21	BH.5	0/428	0/447	0/466	$10^9 \times 1/59$	42	Blank	0/245	0/255	0/260	.....

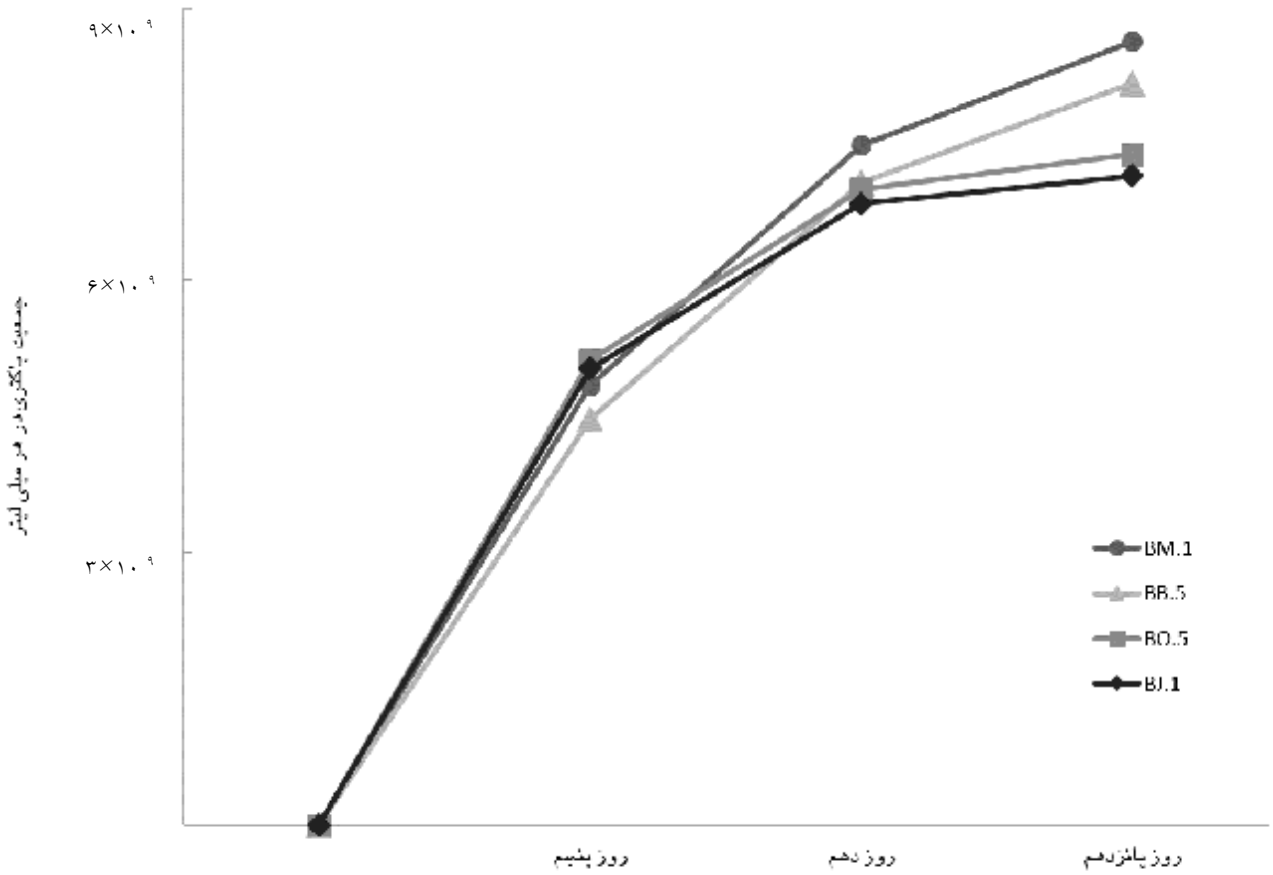
مرحله سوم؛ در اثر تنفس چهار جدایه باکتری منتخب در محیطی با 3% وزنی (W/W) نفت گاز به عنوان تنها منبع کربن برای باکتری‌ها، گاز دی اکسید کربن تولید می‌شود که تنفس باکتری در واقع بیان‌گر بقا و رشد در این محیط و مصرف نفت گاز به‌عنوان سوبسترا است؛ لذا جدایه‌هایی که میزان تنفس و تولید گاز CO_2 بیشتری داشته باشد، با محیط بیشتر سازگار شده و توانایی بیشتری از لحاظ رشد در این محیط را داشته است. مقدار تنفس مربوط به هر جدایه (میلی‌گرم CO_2 آزاد شده به ازای هر گرم شن-پرلیت طی یک ماه)، نمایان‌گر کارایی آن در میزان مصرف و کاهش آلاینده نفت گاز است. نتایج تجزیه واریانس (جدول 3) حاصل از مرحله سوم آزمایش، نشان می‌دهد که بین تیمارها از لحاظ مقدار CO_2 آزاد شده، تفاوت معنی داری در سطح احتمال 0/01 وجود دارد ($P<0.01$).

[9] Absorbance

جدول 3- جدول تجزیه واریانس میزان تنفس باکتری‌ها.

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات (SS)	میانگین مربعات (MS)	F
تیمار	3	6/662	2/221 **	123/01
خطا	8	0/144	0/018	
کل	11	6/806		

** معنی دار در سطح احتمال 0/01



شکل 2- منحنی تغییرات رشد جمعیت جدایه‌های برتر طی پانزده روز.

مقایسه میانگین تیمارها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام پذیرفت که نشان می‌دهد، دو تیمار باکتریایی BJ.1 و BM.1 تفاوت معنی‌داری (در سطح احتمال 0/01) با دو تیمار دیگر دارند ولی بین این دو باکتری اختلاف معنی‌داری وجود ندارد (جدول 4).

جدول 4- مقایسه میانگین شدت تنفس 4 سویه برتر.

نام جدایه باکتری	شدت تنفس (میلی‌گرم CO_2 تولید شده بر گرم شن- پرلیت خشک در ماه)			میانگین شدت نفس
	تکرار 1	تکرار 2	تکرار3	
BJ.1	2/05	2/21	2/02	[a]2/1
BM.1	1/94	1/76	1/68	[b]1/8
BB.5	0/4	0/75	0/75	[c]0/63
BO.5	0/32	0/39	0/3	[d]0/34

اختلاف اعدادی که دارای حروف متفاوتی هستند در سطح احتمال 0/01 معنی دار می باشد.

شدت تنفس چهار سویه برتر تجزیه‌کننده نفت در جدول 4 ارائه شده است. شدت تنفس بین چهار جدایه برتر تجزیه کننده نفت گاز، مختلف می باشد و از 0/34 تا 2/1 میلی گرم CO_2 در هر گرم شن-پرلیت در ماه می باشد. جدایه های BJ.1 و BM.1 بالاترین میزان تنفس را به ترتیب؛ 2/1 و 1/8 میلی گرم CO_2 در هر گرم شن-پرلیت در ماه دارا بودند.

در نهایت از بین خاک‌های نفتی جمع‌آوری شده، دو جدایه باکتریایی BJ.1 و BM.1، به‌عنوان برترین و توانمندترین باکتری‌های تجزیه کننده نفت گاز در خاک‌های آلوده اطراف پالایشگاه تهران انتخاب شدند. باکتری‌های به‌دست آمده و خالص شده در این تحقیق، در بانک ژن آزمایشگاه بیولوژی و بیوتکنولوژی پردیس کشاورزی دانشگاه تهران نگهداری می‌شوند تا در پروژه‌های بعدی بتوان در نقاط آلوده به نفت در کشور، از آن‌ها استفاده کرد.

منابع مورد استفاده

ابراهیمی م، ساریخانی م و فلاح ع، 1392. تجزیه زیستی هیدروکربنهای نفتی گازوئیل، تولوئن و فنانترن توسط سه گونه Pseudomonas fluorescencs CHAO،Pseudomonas putida P13 و Pantoea agglomerans P5. نشریه دانش آب و خاک، جلد 23، شماره 2، صفحه‌های 29 تا 41.

اسماعیلی ع، پوربابایی ا و علیخانی ح، 1391. تجزیه زیستی الیگواتیلن توسط ریزموجودات جدا شده از خاک مکان‌های دفن زباله. مجله تحقیقات آب و خاک ایران، جلد 43، شماره 2، صفحه‌های 221 تا 229.

Alef K and Nannipieri P, 1995. Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. 576 p. Academic Press, Cambridge.

Cappuccino JG and Sherman N, 2005. Microbiology: A Laboratory Manual: Benjamin/Cummings, New York.

Dobson R, Schroth MH, Schuermann A, and Zeyer J, 2004. Methods to assess the amenability of petroleum hydrocarbons to bioremediation. Environmental Toxicology and Chemistry, 23(4): 929-937.

Giordano A, Stante L, Pirozzi F, Cesaro R, Bortone G, 2005. Sequencing batch reactor performance treating PAH contaminated lagoon sediments. Journal of Hazardous Materials 119(1): 159–166.

Idise O, Ameh J, Yakubu S, and Okuofu C, 2010. Modification of Bacillus cereus and Pseudomonas aeruginosa isolated from a petroleum refining effluent for increased petroleum product degradation. African Journal of Biotechnology 9(22): 3303-3307.

Ilyina A, Castillo SMI, Villarreal SJA, Ramirez EG, and Candelas R, 2003. Isolation of soil bacteria for bioremediation of hydrocarbon contamination. Vestnik Moskovskogo Universiteta Seriya 44(1): 88-91

Karamalidis AK, Evangelou AC, Karabika E, Koukkou AI, Drainas C, and Voudrias EA, 2010. Laboratory scale bioremediation of petroleum-contaminated soil by indigenous microorganisms and added Pseudomonas aeruginosa strain spet. Bioresource Technology 101(16): 6545-6552.

King RB, Long GM, and Sheldon JK, 1997. Practical Environmental Bioremediation. 184 p. Lewis Publisher. New York, USA.

Lynch JM, and Moffat AJ, 2005. Bioremediation–prospects for the future application of innovative applied biological research. Annals of Applied Biology 146(2), 217-221.

Márquez-Rocha F, Hernández-Rodrí V, and Lamela MT, 2001. Biodegradation of diesel oil in soil by a microbial consortium. Water, Air, and Soil Pollution 128(3-4): 313-320.

Mattney Cole G, 1994. Assesment and Remediation of Petroleum Contaminated Sites, 1st Ed., 360 p. Lewis Publisher, New York, USA.

Mirsal IA, 2008. Soil Pollution: Origin, Monitoring and Remediation. 312 p. Springer. Berlin Heidelberg.

Mukred AM, Hamid AA, Hamzah A, and Yusoff, WMW, 2008. Development of three bacteria consortium for the bioremediation of crude petroleum-oil in contaminated water. Online Journal of Biological Sciences, 8(4), 73-79.

Nnamchi CI, Obeta JAN, Ezeogu LI 2006. Isolation and characterization of some poly aromatic hydrocarbon degrading bacteria from Nsukka soils In Nigeria. International Journal of Environmental Science and Technology 3(2): 181-190.

Sartoros C, Yerushalmi L, Béron P, and Guiot SR, 2005. Effects of surfactant and temperature on biotransformation kinetics of anthracene and pyrene. Chemosphere 61(7): 1042-1050.

Schaefer M, Petersen SO, and Filser J, 2005. Effects of Lumbricus terrestris, Allolobophora chlorotica and Eisenia fetida on microbial community dynamics in oil-contaminated soil. Soil Biology and Biochemistry 37(11): 2065-2076.

Scragg A, 2005. Environmental Biotechnology. 456 p. Second Edition. Oxford University Press. London.

Vidali M, 2001. Bioremediation. An overview. Pure and Applied Chemistry 73(7): 1163-1172.

Yang SZ, Jin HJ, Wei Z, He RX, Ji YJ, Li XM, and Yu SP, 2009. Bioremediation of oil spills in cold environments: a review. Pedosphere 19(3): 371-381.