نشریه دانش آب و خاک / جلد23 شماره2 صفحه‌های 29 تا 41/ سال 1392

بررسی تجزیه‌زیستی هیدروکربن‌های نفتی گازوئیل، تولوئن و فنانترن توسط سه گونه باکتری *Pseudomonas fluorescens* CHAO، *Pseudomonas putida* P13 و *Pantoea agglomerans* P5

میترا ابراهیمی[1]، محمدرضا ساریخانی[2] و علیرضا فلاح[3]

تاریخ دریافت:90/11/04 تاریخ پذیرش: 91/01/22

[1] دانشجوی دکترای بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان

[2] استادیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

[3] استادیار گروه علوم خاک، بخش بیولوژی خاک، موسسه تحقیقات آب و خاک تهران

[*] مسئول مکاتبه: Email: sarikhani@tabrizu.ac.ir

چکیده

آلودگی خاک و آب به آلاینده‌های نفتی یکی از معضلات محیط زیست به شمار می‌رود. زیست‌پالایی یکی از روش‌های برطرف‌سازی این آلاینده‌ها است که متکی بر میکروارگانیسم‌های بومی و غیربومی می‌باشد. با توجه به نقش مثبت باکتری‌های جنس *سودوموناس* در زیست‌پالایی، در این مطالعه توانایی دو گونه باکتری بومی و غیربومی از جنس *سودوموناس* به ترتیب به نام‌های *Pseudomonas putida* P13، *Pseudomonas fluorescens* CHAO و یک گونه غیر *سودوموناس* به نام *Pantoea agglomerans* P5 به عنوان باکتری‌های استفاده‌کننده از هیدروکربن‌ها در حضور مواد نفتی مختلف از قبیل گازوئیل (2 درصد)، تولوئن (1 درصد) و فنانترن (0/05 درصد) برآورد شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار با بکارگیری مایه تلقیح میکروبی (با جمعیت 10^8 CFU/ml) در هر دو محیط مایع و جامد انجام پذیرفت. برای این منظور از محیط حداقل عاری از کربن (CFMM) و جایگزین نمودن مواد نفتی مختلف به عنوان منبع کربن استفاده شد. بررسی توانایی باکتری‌ها در محیط جامد بر اساس سنجش قطر کلنی و در محیط مایع بر اساس کدورت سنجی و شمارش جمعیت باکتری‌ها انجام پذیرفت. نتایج نشان داد که بیشترین رشد و تجزیه مواد نفتی توسط باکتری‌های جنس *سودوموناس* اتفاق می‌افتد و هر دو گونه سودوموناس رفتار و رشد یکسانی را در حضور هر سه ماده نفتی نشان دادند در حالی که گونه *Pantoea agglomerans* P5 کمترین رشد را داشت. از میان مواد نفتی استفاده شده بالاترین تجزیه مربوط به ماده نفتی گازوئیل و به دنبال آن به ترتیب فنانترن و تولوئن بود. همچنین توانایی باکتری‌ها در تجزیه مواد نفتی با گذشت مدت زمان انکوباسیون افزایش یافت. نتایج این آزمایش توانایی گونه‌های *سودوموناس* را در زیست‌پالایی محیط‌های آلوده شده به هیدروکربن‌ها به ویژه هیدروکربن‌های آلیفاتیک نشان داد.

واژه‌های کلیدی: زیست‌پالایی، *سودوموناس*، گازوئیل، محیط حداقل

Assessment of Biodegradation of Gas Oil, Toluene and Phenantherene in Presence of *Pseudomonas Fluorescens* CHAO, *Pseudomonas Putida* P13 and P5 *Pantoea Agglomerans*

M Ebrahimi[1], MR Sarikhani[2] and AR Fallah[3]

Received: 24 January 2012 Accepted: 10 April 2012
[1] Ph.D Student of Soil Biology and Biotechnology, Faculty of Agric., Bu-Ali Sina Univ., Hamadan.Iran.
[2] Assist. Prof.,of Soil Biology and Biotechnology, Dept. of Soil Sci., Faculty of Agric., Univ. of Tabriz.Iran
[3]Assist. Prof., of Soil Biology, Dept. of Soil Biology, Soil and Water Research Institute, Tehran. Iran.
*Coressponding Author Email: sarikhani@tabrizu.ac.ir

Abstract

Soil and water contamination by oil is one of the great environmental concerns. Bioremediation is one of principal strategies for remediation, wherein the pollutants can be removed by use of microorganism or any biological process that uses native or exogenous microorganisms. According to the positive role of Pseudomonas genus in bioremediation, in this study the potential of two Pseudomonad bacteria, including *Peudomonas fluorescens* CHAO, *P. putida* P13 and a non-Pseudomonad *Pantoea agglomerans* as hydrocarbon utilizing bacteria were estimated in presence of three compounds including gas oil (2%), toluene (1%) and phenanthrene (0.05%). Bacterial inoculum containing 10^8 cfu/ml was used in plate and liquid assays, which were performed in factorial experiment based on completely randomized design with three replications. Results showed that in CFMM plate assay, diameter of colony is not affected by any of bacterial isolates and compounds. In broth assay, *P. putida* P13 and *P. fluorescence* CHAO had similar behavior in the presence of Gas oil, toluene and phenanthrene and trend of bacterial growth was the same at different times, while with *P. agglomerans* P5 the lowest number of bacteria was achieved. Among three compounds the highest degradability was recorded to the gas oil, followed by phenanthrene and toluene. The ability of bacteria in degradation of oil-compounds increased by increasing time of incubation. To conclude, this study suggests the potential use of two *Pseudomonas* isolates for bioremediation of hydrocarbon-contaminated environments especially with aliphatic hydrocarbon.

Keywords: Bioremediation, Gas oil, Minimal medium, Pseudomonas

مقدمه

آلودگی‌های مواد نفتی، پتانسیل بالفعل خاک‌ها برای استفاده های بهینه در زمینه کشاورزی و تولید محصول را شدیداً کاهش می دهند. زیرا رها شدن ترکیبات نفتی در خاک سبب از بین رفتن پوشش و تنوع گیاهی و جانوری خاک می‌شود. از طرف دیگر گسترش آلودگی و انتقال آن از طریق شستشو با آب باران موجب گسترش آلودگی به آبهای زیرزمینی می‌گردد

(المندرف و همکاران 1994). علاوه بر اثر سمیت این هیدروکربن‌ها بر رشد و نمو گیاه، مواد نفتی باعث افت خصوصیات فیزیکی خاک (گسیختگی خاکدانه‌ها، کاهش خلل و فرج و افزایش وزن مخصوص ظاهری خاک) نیز می‌شوند.

برای برطرف نمودن آلاینده‌های نفتی راه‌حل‌های زیستی و غیرزیستی مطرح می‌باشند. ترکیبات موجود در نفت خام شامل هیدروکربن‌های اشباع (آلکان‌ها)، هیدروکربن‌های آروماتیک، رزین‌ها و آسفالتین‌ها هستند. بسیاری از میکروارگانیسم‌ها قادرند از ترکیبات نفتی به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده کنند و آنها را به موادی از قبیل CO_2 و H_2O تبدیل نمایند (مینایی تهرانی و همکاران 1384، سوپاکا و همکاران 2001). روند تجزیه آلاینده‌ها یکسان نبوده و گروهی سریعاً توسط میکروارگانیسم‌ها تجزیه و حذف می‌شوند اما بخش عمده آن به کندی تجزیه می‌گردد و در نتیجه در محیط زیست باقی‌مانده و تجمع می‌یابند. تجمع این ترکیبات شیمیایی در محیط زیست تهدید جدی بر سلامت انسان و دیگر موجودات است (میرسال 2004).

زیست‌پالایی عبارت است از استفاده از موجودات زنده شامل باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمرها یا گیاهان جهت مدیریت یا پالایش خاک‌ها یا آبهای آلوده، یا به عبارتی دیگر زیست‌پالایی به عنوان راهکاری برای کاهش آلودگی‌ها از طریق استفاده از فرایندهای بیولوژیکی می‌باشد (اولوآروتیووا و همکاران 2007). میکروارگانیسم‌های زیادی به منظور تجزیه زیستی هیدروکربن‌ها در خاک مورد مطالعه و ارزیابی قرار گرفته اند (مصداقی‌نیا و همکاران 2005، لیانگلی و هونگچن 2009، ساریخانی و همکاران 2011).

اولوآروتیووا و همکاران (2007) موفق به جداسازی دو باکتری به نام‌های *Bacillus subtilis*، *Pseudomonas aeruginosa* و قارچ *Penicillium funiculosum* از آب آلوده به روغن دیزل شدند. نتایج مطالعات آنها نشان داد که قارچ جداسازی شده بیشتر از بقیه در عمل زیست‌پالایی روغن دیزل موثر بوده به صورتی که بعد از گذشت 15 روز مقدار ماده نفتی باقی‌مانده از 1/5 میلی‌لیتر در شروع آزمایش به حدود 0/2 میلی‌لیتر کاهش یافت.

رشیداشمق و همکاران (2009) به بررسی مدل تجزیه زیستی فنانترن در خاک‌های آلوده توسط *Acinetobacter* پرداختند. در این تحقیق ابتدا از خاک آلوده به ترکیبات نفتی باکتری‌های مستعد تجزیه PAH[1] ها جداسازی شدند، سپس قابلیت آنها در تجزیه زیستی فنانترن در محیط مایع بررسی گردید. آنها با استفاده از باکتری *Acinetobacter* مدل تجزیه زیستی فنانترن را در مقیاس آزمایشگاهی در خاک بررسی کردند. آنها گزارش کردند که میزان حذف فنانترن به غلظت اولیه آلاینده بستگی دارد و با افزایش غلظت اولیه نرخ حذف فنانترن افزایش می‌یابد.

انیفاد و ابوبکر (2007) مطالعاتی در زمینه ویژگی‌های میکروارگانیسم‌های جدا شده از خاک‌های آلوده به نفت خام با قابلیت تجزیه کنندگی هیدروکربن را انجام دادند و توانستند پنج گونه باکتری جداسازی و شناسایی نمایند. آنها برای جداسازی از محیط حداقل استفاده کردند و نفت خام به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده شد. میکروارگانیسم‌های جدا شده شامل باکتری‌های *Lactobacter*، *Arthrobacter*، *Bacillus*، *Pseudomonas* و *Micrococcus* و دوگونه قارچ به نام‌های *Articulospora inflate* و *Zoopage mitospora* بودند.

مصداقی‌نیا و همکاران (2005) در مطالعه‌ای موفق به جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده PAH در خاک‌های آلوده ایران شدند و با توجه به تست‌های انجام شده، باکتری‌های جدا شده عبارت بودند از *Serratia liquefaciens*، *Pseudomonas fluorescence*، *Bacillus* و *Micrococcus* و به این نتیجه رسیدند که

[1] Polyaromatic Hydrocarbons

زیست‌پالایی خاک‌های آلوده در ایران یک روش کاملاً اجرایی و کاربردی می‌باشد.

کیریمورا و همکاران (1999) موفق به جداسازی سویه *Sphingomonas* sp. شدند که قادر به استفاده از کربازول و سایر ترکیبات نفتی از قبیل n – هگزادکان بود. نتایج آزمایش آنها نشان داد که با تغییر میزان OD[1] محیط و افزایش رشد باکتری میزان تجزیه مواد نفتی افزایش می‌یابد. همچنین توان گونه *Burkholderia cepacia* RQ1 در تجزیه زیستی نفت خام سنگین به وسیله اکو و همکاران (2001) بررسی و مشاهده شد که این باکتری از نفت خام به عنوان تنها منبع کربن استفاده نموده و در مدت 15 روز جمعیت باکتری از 10^5 CFU/ml به 10^8 افزایش یافت. امتیازی و همکاران (2005) نیز تجزیه ترکیبات مختلف نفتی را به وسیله سویه *Pseudomonas* در مدت زمان 9 روز از طریق منحنی رشد باکتری (OD_{600nm}) بررسی نمودند.

ایران یکی از کشورهای نفت‌خیز جهان است که سالانه مقدار زیادی نفت از نقاط جنوبی آن استخراج و در مناطق دیگر پالایش می‌شود. همین موضوع باعث شده است که منابع خاک و اراضی آن در معرض آلودگی ناشی از مواد نفتی قرار داشته باشد (مصداقی‌نیا 2005، شفیعی و همکاران 2006). استفاده از میکروارگانیسم‌های خاک و به ویژه باکتری‌ها در تجزیه ترکیبات نفتی به عنوان راه حلی برای برطرف-سازی آلاینده‌های نفتی مطرح می‌باشد. گزارشاتی مبنی بر توانایی جنس *Pseudomonas* در تجزیه مواد نفتی وجود دارد، با در نظر داشتن این نکته در آزمایشی به مقایسه سه باکتری از جمله دو گونه بومی و غیربومی متعلق به این جنس و یک گونه غیر وابسته به جنس *Pseudomonas* پرداخته شد تا رفتار آنها در حضور مواد نفتی مختلف (تینگ و همکاران 2009، ونگسا و همکاران 2004) مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

دو گونه باکتری *Pseudomonas putida* P13 و *Pantoea agglomerans* P5 از شرکت زیست فناور سبز و باکتری *Pseudomonas fluorescence* CHAO از آزمایشگاه بیولوژی خاک دانشگاه تبریز تهیه شدند. در ابتدا باکتری‌ها در محیط نوترینت براس کشت داده شدند و از کشت شبانه باکتری‌ها برای تلقیح در محیط جدید CFMM[2] (جدول 1) استفاده شد. از کشت شبانه باکتری‌ها با در نظر گرفتن OD=1 یکسان به مقدار 1/5 میلی‌لیتر سوسپانسیون میکروبی برای سانتریفوژ در دور 3000 به مدت 3 دقیقه استفاده شد بعد از دور ریختن محلول رویی (به منظور حذف هر گونه مواد مربوط به محیط کشت اولیه، یک‌بار از محیط CFMM برای شناورسازی مجدد و تخلیه روشناور بعد از سانتریفوژ نمودن استفاده شد)، رسوب باکتری مجدداً در 750 میکرولیتر محیط مایع CFMM حل شده و پس از انجام سانتریفوژ تحت شرایط فوق از آن برای تلقیح در محیط جدید استفاده شد.

بررسی کارایی تجزیه مواد نفتی در حضور این سه باکتری به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در دو محیط جامد و مایع انجام شد. بررسی تجزیه مواد نفتی در محیط مایع با تلقیح مایه تلقیح باکتری‌ها به ارلن استریل 250 میلی‌لیتری دارای 50 میلی‌لیتر محیط CFMM حاوی مواد نفتی مختلف (گازوئیل 2 درصد، تولوئن 1 درصد یا فنانترن 0/05 درصد) انجام شد. بعد از تلقیح، ارلن‌ها به مدت 10 روز بر روی شیکر انکوباتور با دمای 28 درجه سلسیوس با دور 150 rpm انتقال داده شدند. برای بررسی کارایی باکتری‌ها در محیط حاوی گازوئیل از کدورت سنجی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری (قرائت OD_{600nm} در زمان‌های 0، 72، 144و 216 ساعت) استفاده شد. برای بررسی کارایی باکتری‌ها در محیط مایع حاوی فنانترن و تولوئن از شمارش جمعیت باکتری‌ها بعد از تهیه

[1]Optical density

[2]Carbon free minimal medium

سری رقت و انتقال آنها بر روی محیط جامد NA استفاده شد. بعد از قرائت OD_{600nm} مربوط به محیط مایع حاوی گازوئیل با استفاده از جدول مک فارلند (جدول 2) تعداد جمعیت باکتری برآورد شد، تا در مرحله بعد بتوان با تعداد باکتری‌های حاصل از شمارش کلنی در پلیت (در حضور مواد نفتی فنانترن و تولوئن) مقایسات را انجام داد.

جدول1- مواد تشکیل دهنده محیط CFMM (سوپاکا و همکاران 2001)

مواد شیمیایی	گرم در لیتر
NH_4NO_3	۳
$CaCl_2.7H_2O$	۰/۰۰۵
KH_2PO_4	۰/۸
Na_2HPO_4	۲/۲
$MgSO_4.7H_2O$	۰/۰۱

به منظور بررسی توانایی باکتری‌ها در محیط جامد بعد از تهیه سوسپانسیون میکروبی (مایه تلقیح میکروبی به روشی که در بالا شرح داده شد) 10 میکرولیتر از این سوسپانسیون بر روی محیط جامد CFMM حاوی مواد نفتی انتقال داده شد. لازم به توضیح می‌باشد که بعد از افزودن مواد نفتی (گازوئیل، فنانترن و تولوئن به صورت جداگانه) به محیط جامد، ابتدا پلیت‌ها به مدت 1 روز در داخل انکوباتور قرار گرفت تا ماده نفتی به خوبی جذب محیط شود. بعد از انتقال قطره سوسپانسیون مورد نظر پلیت‌ها برای بررسی رشد و افزایش قطر کلنی در طول 3 هفته به داخل انکوباتور در دمای 28 درجه سلسیوس انتقال داده شدند.

برای استفاده از ماده نفتی فنانترن در این مطالعه از حلال دی متیل سولفوکسید[1] استفاده شد.

جدول2- جدول مک فارلند (کاپوچینو و شرمن 1987)

لوله	کلرید باریم 1%	اسید سولفوریک 1%	OD_{600}	تعداد باکتری در هر میلی‌لیتر
1	0/1	9/9	0/066	3×108
2	0/2	9/8	0/145	6×108
3	0/3	9/7	0/25	9×108
4	0/4	9/6	0/43	1/2×109
5	0/5	9/5	0/6	1/5×109
6	0/6	9/4	0/75	1/8×109
7	0/7	9/3	0/89	2/1×109
8	0/8	9/2	1/1	2/4×109
9	0/9	9/1	1/3	2/7×109
10	1	9	1/5	3×109

تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده از نرم افزار آماری MSTATC انجام شد (مقایسه میانگین از طریق آزمون چند دامنه ای دانکن انجام پذیرفت) و نمودارهای حاصله از طریق نرم افزار Excel رسم شد.

نتایج و بحث

از نتایج آنالیز آماری چنین برآمد که بین سه باکتری کشت داده شده در محیط جامد از نظر قابلیت رشد و استفاده از مواد هیدروکربن‌های مختلف اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. اما در محیط مایع رفتار این سه باکتری به شکلی دیگر بود. استفاده از روش سنجش قطر کلنی باکتری (یا تولید هاله شفاف) در انتخاب باکتری‌های کارآمد روشی مرسوم می‌باشد که ممکن است در موارد مختلف استفاده شود. نمونه بارز آن را در بررسی قطر کلنی و هاله شفاف اطراف کلنی در جداسازی باکتری‌های حل‌کننده فسفات می‌توان مشاهده نمود (ملبوبی و همکاران 2009). تینگ و همکارانش (2009) در بررسی فعالیت تجزیه زیستی

[1] DMSO

گونه *P. lundensis* UTAR FPE2 از محیط BH[1] به صورت مایع و جامد استفاده نمودند. آنها مشاهده کردند که در محیط جامد، هاله شفاف در اطرف کلنی باکتری فوق در حضور پارافین دارای قطر بیشتری بوده و در رتبه بعدی روغن معدنی و نفت خام قرار داشت.

یکی از روش‌های بررسی تاثیرگذاری میکروارگانیسم‌ها در تجزیه ترکیبات نفتی، اندازه‌گیری روند تغییرات دانسیته نوری یا OD با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر می‌باشد (امتیازی و همکاران 2005). هر چه میزان تجزیه‌پذیری ماده برای باکتری بیشتر باشد با افزایش جمعیت سلولی در داخل محیط کشت، درصد جذب نور نیز افزایش می‌یابد و بدین ترتیب، مقدار نور جذب شده معرف تجزیه بیشتر ماده نفتی خواهد بود (کیریمورا و همکاران 1999). کارآیی این سویه‌ها در ارلن‌های حاوی محیط کشت مایع حداقل، با حذف هر گونه منبع کربن و استفاده از گازوئیل (2 درصد)، تولوئن (1 درصد) و فنانترن (0/05 درصد) به عنوان منبع کربن و انرژی، در زمان‌های 0، 48، 168 و 216 ساعت مورد مطالعه قرار گرفت. در این مطالعه، کدورت‌سنجی در طول موج 600 نانومتر به عنوان شاخص رشد باکتری و تجزیه گازوئیل توسط باکتری اندازه‌گیری گردید، بعلاوه شمارش جمعیت باکتری به عنوان شاخص رشد و مورد استفاده قرار گرفتن فنانترن و تولوئن توسط باکتری در نظر گرفته شد. نتایج حاصل‌از آنالیز آماری و جدول تجزیه واریانس روی داده‌های حاصل از کارآیی باکتری‌ها در حضور سه ماده نفتی حاکی از آن است که فاکتورهای اصلی نوع باکتری، نوع ماده نفتی همچنین فاکتور زمان و اثرات متقابل آنها با همدیگر در سطح احتمال 1 درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول 3). برای انجام آنالیز آماری تبدیل داده لگاریتمی انجام پذیرفت.

جدول 3- نتایج تجزیه واریانس (داده‌های تبدیل شده).

منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات
باکتری	2	9/177	4/588**
ماده نفتی	2	18/380	9/190**
باکتری× ماده نفتی	4	19/580	4/895**
زمان	3	8/874	2/958**
باکتری× زمان	6	1/077	0/180**
ماده نفتی × زمان	6	3/040	0/507**
باکتری× ماده نفتی× زمان	12	4/064	0/339**
خطا	72	4/572	0/063
کل	107	68/765	

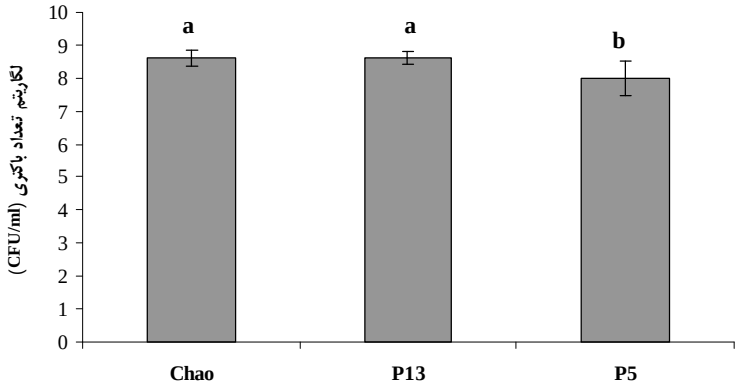
** معنی‌دار در سطح 1%

مقایسه میانگین اثر اصلی فاکتور باکتری به روش دانکن نشان داد که بیشترین میانگین مربوط به باکتری *P. fluorescence* CHAO بوده و بین این باکتری با باکتری *P. putida* P13 اختلاف معنی‌داری وجود ندارد و کمترین رشد و میانگین مربوط به باکتری *P. agglomerans* P5 می‌باشد. بیشترین تعداد باکتری در هر میلی‌لیتر محیط های مایع در حضور مواد نفتی مربوط به *P. putida* P13 و *P. fluorescence* CHAO و کمترین آن برای باکتری *P. agglomerans* P5 به ترتیب با تعداد $3/9\times10^8$ CFU/ml و $7/94\times10^7$ حاصل شد (شکل1).

در بررسی مقایسه تجزیه مواد نفتی مختلف مشاهده شد که بیشترین تجزیه مربوط به ماده نفتی گازوئیل می‌باشد و اختلاف معنی‌داری با تجزیه سایر ترکیبات نفتی دارد و کمترین تجزیه مربوط به تولوئن است (شکل 2). استفاده باکتری‌ها از تولوئن در سنجش محیط مایع به عنوان منبع کربن در میان این سه ماده حداقل بود و تعداد کلنی باکتری در هر میلی‌لیتر $6/3\times10^7$ بود. این در حالی بود که بیشترین تعداد باکتری بازیافتی از محیط کشت مایع در حضور مواد نفتی با تعداد $6/3\times10^8$ و 4×10^8 به ترتیب در حضور گازوئیل و فنانترن به دست آمد (شکل 2). استفاده

[1]Bushell and Haas

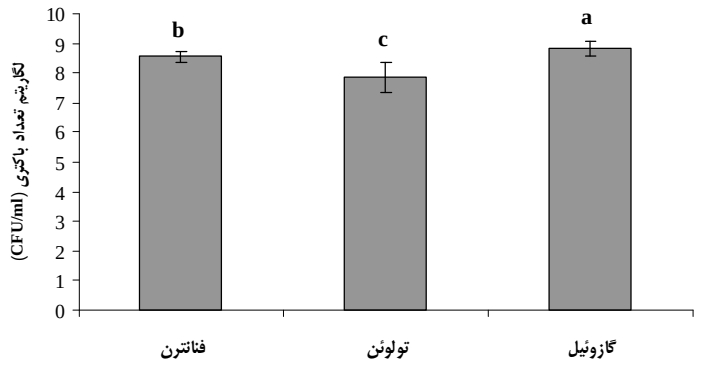
بیشتر از گازوئیل نسبت به مواد نفتی دیگر و اینکه چرا کمترین جمعیت بازیافتی باکتری در حضور تولوئن به دست آمد را می‌توان با دلایل زیر توجیه کرد. اولاً ماهیت مواد نفتی از هم متفاوت بوده و برخی از ترکیبات نفتی شکل خطی داشته و اصطلاحاً آلیفاتیک می‌باشند (نظیر گازوئیل) و استفاده آنها برای باکتری‌ها راحت‌تر می‌باشد اما در مقابل برخی به دلیل وجود حلقه‌های آروماتیک سخت‌تر تجزیه می‌شوند (فوق و همکاران 1990، لی و همکاران 2000) و مشاهده می‌شود که با افزایش تعداد حلقه‌ها مقاومت ماده نفتی به تجزیه نیز افزایش می‌یابد (چایلان و همکاران 2004). جمعیت کمتر باکتری در حضور تولوئن (دارای یک حلقه آروماتیک) در برابر فنانترن (با سه حلقه آروماتیکی) را می‌توان به غلظت بیشتر این ماده یعنی غلظت 1 درصد در برابر 0/05 درصد نسبت داد. با این حال در تحقیقات محققان مختلف شاهد جداسازی و بکارگیری باکتری‌های با توان مختلف در تجزیه مواد نفتی هستیم به شکلی که کلوس و واکر (1964) گزارش نمودند که موفق به جداسازی دو جنس باکتری *Pseudomonas* و *Achromobacter* از خاک‌های آلوده به تولوئن شدند و این باکتری‌ها قادر به استفاده از تولوئن به عنوان منبع کربن و انرژی بودند.



شکل 1- مقایسه میانگین رشد باکتری‌ها در حضور مواد نفتی مختلف (فاکتور باکتری) (آزمون دانکن $p<0/01$).

سوسئو و همکاران (2009) طی مطالعات کلی که در زمینه تجزیه هیدروکربن‌های آروماتیک داشتند نشان دادند که تجزیه زیستی فنانترن توسط میکروارگانیسم‌ها به کمک یک سری از آنزیم‌ها انجام شده ودر نهایت به مواد غیر سمی تبدیل می‌گردد.

شفیعی و همکاران (2006) به بررسی تجزیه پنج نوع ماده نفتی (فنانترن، آنتراسن، پیرن، فلورن و فلورانتن) در حضور مخلوطی از میکروارگانیسم‌ها پرداختند نتایج نشان داد که مخلوط میکروبی باعث تجزیه زیستی کامل فنانترن شد ولی فلورانتن کمترین تجزیه را به خود اختصاص داد. آنها به این نتیجه رسیدند که با افزایش حلقه بنزنی در PAHها تجزیه زیستی توسط میکروارگانیسم‌ها کاهش می‌یابد.

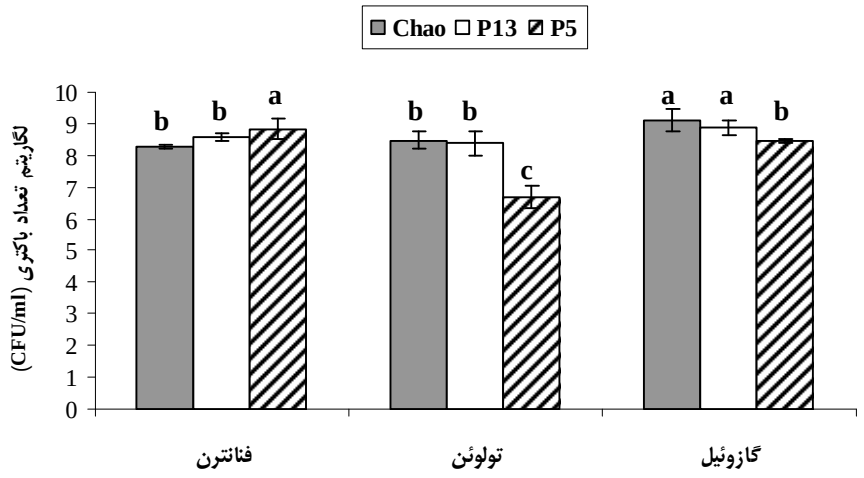


شکل 2- مقایسه میانگین تجزیه مواد نفتی از طریق حمایت از رشد باکتری‌ها (فاکتور مواد نفتی) (آزمون دانکن $p<0/01$).

در بررسی میانگین اثر متقابل باکتری در ماده نفتی بیشترین میانگین مربوط به سویه CHAO باکتری *P. fluorescence* و *P. putida* P13 در حضور ماده نفتی گازوئیل می‌باشد و اختلاف معنی‌داری در حضور سایر مواد نفتی نشان داده است. در مورد باکتری *P. agglomerans* P5 بیشترین میانگین در حضور فنانترن به دست آمد (شکل 3). سویه CHAO دارای بیشترین تعداد باکتری بازیافتی در حضور گازوئیل (10^9CFU/ml) بود و با افزایش زمان روند رو به رشدی را نشان داد. باکتری‌های جنس سودموناس به کار گرفته شده در این آزمایش به صورت موثری قادر به تجزیه و استفاده از مواد کربنه ساده نظیر گازوئیل بودند. بهترین نتایج زمانی حاصل شد که از ترکیبات آلیفاتیک در حضور این باکتری‌ها استفاده شد در مقایسه با زمانی که ترکیبات آروماتیک نیز استفاده شدند (شکل 3). نتایج مشابهی را در استفاده از ترکیبات آلیفاتیک نظیر روغن معدنی و پارافین در مقایسه با نفتالن (آروماتیک) در حضور *P. lundensis* UTAR FPE2 مشاهده گردید (تینگ و همکاران 2009).

دو مکانیسم عمده در ارتباط با تجزیه زیستی هیدروکربن‌ها توسط باکتری‌های سودوموناس مطرح می‌باشد. یکی تولید بیوسورفکتانت رامنولیپید[1] و دیگری تولید آنزیم‌های خارج سلولی از قبیل لیپاز که در تجزیه ترکیبات استری و لیپیدی نقش بارزی دارند (تانگ و همکاران 2006، حسن‌الزمان و همکاران 2004). بیوسورفکتانت تولیدی توسط برخی از سودوموناس‌ها نقش مهمی در تجزیه زیستی هیدروکربن‌ها به ویژه از نوع آلکان دارد. تولید این نوع سورفکتانت باعث افزایش سطح تماس باکتری به ماده نفتی شده چرا که اغلب ترکیبات نفتی مشکل حلالیت در آب داشته و به این طریق سطح تماس باکتری و دسترسی آنزیمی را برای باکتری بالا می‌برد. نقش این سورفکتانت زیستی در تجزیه زیستی هیدروکربن‌های حلقوی نیز گزارش شده است (ونگسا و همکاران 2004).

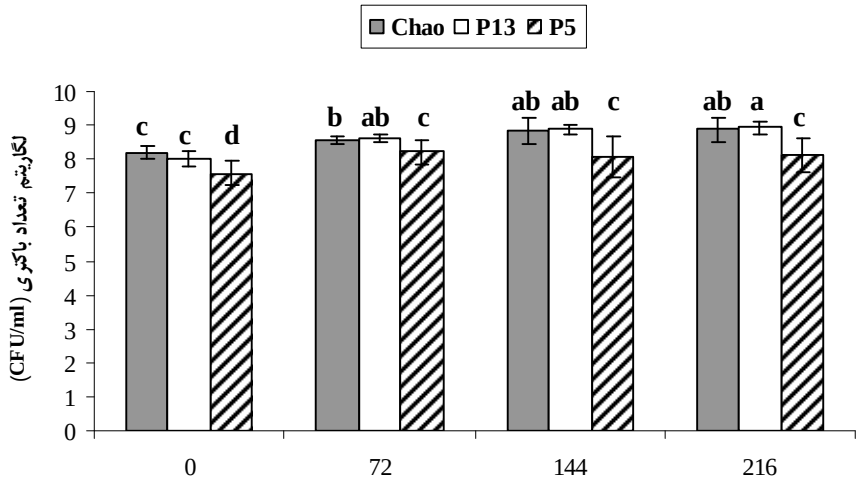
[1] Rhamnolipid



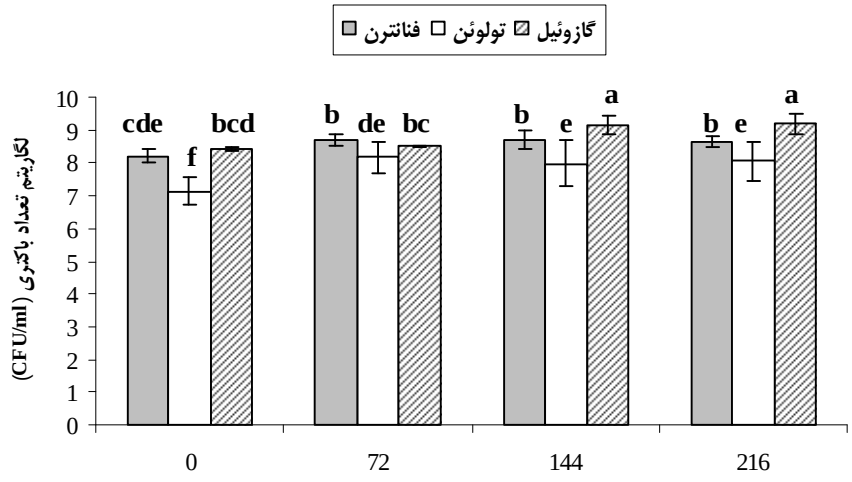
شکل3- مقایسه میانگین اثر متقابل باکتری در ماده نفتی (آزمون دانکن p<0/01)

در بررسی کارآیی اثر متقابل باکتری در زمان، بالاترین میانگین مربوط به زمان 216 ساعت و باکتری‌های CHAO و P13 می‌باشد و اختلاف معنی‌داری با زمان‌های 144 و 72 ساعت نشان نداده است. با افزایش زمان جمعیت باکتری‌ها افزایش می‌یابد و این افزایش در مورد باکتری سویه P13 نزدیک به 100 برابر و در مورد دو باکتری دیگر این افزایش نزدیک به 10 برابر می‌باشد (شکل 4). انیفاد و ابوبکر (2007) توان باکتری‌های *Lactobacter* sp.، *Arthrobacter* sp.، *Bacillus* sp.، *Pseudomonas* sp. و *Micrococcus* sp. را در تجزیه زیستی نفت خام در نمونه های خاک آلوده به ماده نفتی مورد بررسی قرار دادند و مشاهده شد که جمعیت باکتری‌های تجزیه کننده نفت خام در مدت زمان 18 هفته از 5×10^3 CFU/ml تا $7/60\times10^4$ افزایش یافت (افزایش جمعیتی بیش از 10 برابر).

در مقایسه میانگین مربوط به اثر متقابل فاکتور ماده نفتی در زمان، بالاترین تجزیه مربوط به ماده نفتی گازوئیل در زمان 216 ساعت به دست آمد و اختلاف معنی‌داری با زمان 144 ساعت نشان نداد این در حالی است که کمترین تجزیه مربوط به ماده نفتی تولوئن بود (شکل 5). در پاسخ به روند تجزیه مواد نفتی بایستی به ماهیت مواد نفتی توجه نمود. در میان هیدروکربن‌های نفتی n-آلکان‌ها سریع‌تر از بقیه ترکیبات تجزیه شده و به دنبال آن آلکان‌های شاخه‌ای و ترکیبات حلقوی با وزن مولکولی پایین تجزیه می‌شوند. مقاوم‌ترین ترکیبات در مقابل تجزیه زیستی، آلکان‌های حلقوی می‌باشند. به عبارت دیگر ترکیبات اشباع شده خطی سریع‌تر تجزیه شده و هر چه ترکیب مورد نظر از نظر ساختار و ساختمان پیچیده‌تر می‌شود، نسبت به تجزیه مقاوم‌تر می‌باشد (لیهی و کولول 1990).



شکل 4: بررسی کارآیی اثر متقابل فاکتور باکتری در زمان (ساعت) (آزمون دانکن p<0/01)



شکل 5: مقایسه میانگین فاکتور ماده نفتی در زمان (آزمون دانکن p<0/01)

سوپاکا و همکاران (2001) به بررسی توان تجزیه باکتری *Sphingomonas* sp. در تجزیه زیستی 8 نوع ماده نفتی (Naphthalene، Acenapthylene، Dibenzofuran، Fluorene، Anthracene، Fluoranthene، Pyrene) پرداختند و به این نتیجه رسیدند که این باکتری توانایی رشد در تمام مواد نفتی به غیر از Fluoranthene و Pyrene دارد.

مصداقی‌نیا و همکاران (2005) و همچنین اربابی و همکاران (2009) از طریق روش MPN و تهیه سری رقت از سوسپانسیون میکروبی و شمارش جمعیت میکروبی(CFU) برروی پلیت حاوی محیط کشت جامد

نشان دادند که خاک‌های آلوده به مواد نفتی شامل شمار بیشتری از جمعیت های میکروبی هستند، در واقع این میکروارگانیسم‌های موجود در خاک آلوده قادر به تجزیه مواد نفتی موجود در خاک آلوده بوده و از طریق استفاده از این مواد به عنوان منبع کربن و انرژی میزان جمعیت آنها سیر صعودی داشته و رابطه معنی‌داری بین میزان ماده نفتی و میزان جمعیت باکتری‌ها وجود داشت.

نتیجه گیری کلی

کنترل آلودگی‌های نفتی بسیار مشکل می‌باشد و این آلاینده ها باعث آلودگی منابع آب و خاک می‌شود. در این مطالعه به سنجش توانایی باکتری *Pseudomonas putida* P13 و *Pantoea agglomerans* P5 جداشده از خاک‌های قلیایی ایران و *P. fluorescence* CHAO (گونه غیربومی) در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی نظیر گازوئیل، تولوئن و فنانترن پرداخته شد. نتایج تحقیقات نشان داد که رفتار باکتری‌ها در حضور مواد نفتی مختلف یکسان نبوده و از میان گونه‌های مورد استفاده در این تحقیق بیشترین تجزیه هیدروکربن‌ها در ارتباط با گونه‌های سودوموناس بوده (بیشترین تعداد را در باکتری سویه P13 و CHAO و کمترین مربوط به سویه P5 مشاهده شد) و از میان مواد نفتی بیشترین میزان تجزیه مربوط به ماده نفتی گازوئیل با حمایت از رشد بیشتر سلول باکتری بوده است (جدول 4). بر اساس نتایج با افزایش زمان تعداد سلول‌های بازیافتی از محیط کشت آلوده به مواد نفتی افزایش نشان داد و این افزایش به نوع ماده کربنه و همچنین نوع باکتری وابسته بود. به نظر می‌رسد باکتری‌های سودوموناس با بکارگیری مکانیسم‌های تولید بیوسوفکتانت یا ترشح آنزیم‌های خارج سلولی موثر در تجزیه مواد نفتی، باعث کسب نتایج بهتری شده‌اند.

جدول 4- اثرات متقابل سه گانه فاکتورهای باکتری، ماده نفتی و زمان بر لگاریتم تعداد باکتری رشد یافته در حضور سه ماده نفتی در مدت زمان انکوباسیون (آزمون دانکن $p<0/01$)

سویه باکتری	گازوئیل				تولوئن				فنانترن			
	زمان (ساعت)				زمان (ساعت)				زمان (ساعت)			
	0	72	144	216	0	72	144	216	0	72	144	216
P. fluorescence CHAO	e-h 8/5	e-h 8/5	9/67 a	9/71 a	d-h 8/61	c-g 8/75	c-g 8/77	ij 7/77	g-i 8/32	e-h 8/40	g-i 8/15	g-i 8/29
P. putida P13	f-i 8/37	e-h 8/54	a-d 9/20	ab 9/38	c-g 8/67	c-g 8/77	c-h 8/66	jk 7/33	g-i 8/26	c-h 8/64	c-h 8/66	c-h 8/68
Pantoea agglomerans P5	f-i 8/36	e-h 8/52	e-h 8/53	e-h 8/49	kl 6/84	6/43 l	k 7/10	l 6/33	hi 8/06	b-e 9/03	a-c 9/25	9 b-f

منابع مورد استفاده

مینایی‌تهرانی د، حرفت منش ع، و آذری دهکردی ف، 1384. مطالعه تجزیه زیستی نفت خام سنگین در خاک با مقیاس پایلوت. مجله علوم محیطی. شماره 10. صفحه‌های 71 تا 82 .

Arbabi M, Nasseri S and Anyakora C, 2009. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in petroleum contaminated soils. Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineer 28(3): 53-59.

Cappochino G and Sherman N, 1987. Microbiology: A laboratory manual. Rockland community college state, University of New York. The Benjamin. Comings publishing company, INC. App endix 2, 451.

Chaillan F, Fleche AL, Bury E, Phantavong YH, Grimont P, Saliot A and Oudot J, 2004. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. Research Microbiology 155: 587-595.

Claus D and Walker N, 1964. The decomposition of toluene by soil bacteria. Journal of Genetic and Microbiology 36: 107-122.

Elmendorf DL, Haith CE, Douglas GS and Prince RC, 1994. Relative rates of biodegradation of ubstitiuted polycyclic aromatic hydrocarbon. Pp. 188-202. In: Hinchee RE, Lesson A, Semprini L, Ooong SK (Eds). Bioremediation of Chlorinated and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Compounds. Lewis, Boca Raton, FL.

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

Foght JM, Fedorak PM, Westlake and DWS, 1990. Mineralization of ['4C] hexadecane and ['4C] phenanthrene in crude oil: specificity among bacterial isolates. Canadian Journal of Microbiology 36: 169-175.

Hasanuzzaman M, Umadhay-Biones KM, Zsiros SM, Morita N, Nodasaka Y, Yumoto I and Okuyama H, 2004. Isolation, identification and characterization of a novel, oil-degrading bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* T1. Current Microbiology 49: 108-114.

Kirimura K, Nakagawa H, Tsugi K, Matsuda K, Kurane R and Usami SH, 1999. Selective and continuous degradation of carbazole contained in petroleum oil by resting cells of *Sphingomonas* sp. CDH-7. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 63(9): 1563-1568.

Leahy JG and Colwell RR, 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiological Reviews 54(3): 305-315.

Li G, Huang W, Lerner DN and Zhang X, 2000. Enrichment of degrading microbes and bioremediation of petrochemical contaminants in polluted soil. Water Resource 34: 3845-3853.

Liangli J, and Hungchen B, 2009. Surfactant mediated biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Materials 2: 76-94.

Malboobi MA, Owlia P, Behbahani M, Sarokhani E, Moradi S, Yakhchali B, Deljou A and Morabbi Heravi K, 2009. Solubilization of organic and inorganic phosphates by three highly efficient soil bacterial isolates. World Journal of Microbiology and Biotechnology 25: 1471–1477.

Mesdaghinia AR, Nasseri S, Arbabi M, and Rezaie S, 2005. Isolation of polycyclic aromatic hydrocarbon- degrading bacteria associated with the petroleum contaminated soils in Iran. Pp. 984-991. Proceedings of the 9th international conference on Environmental Science and Technology. 1-3 September. Rhodes Island, Greece.

Mirsal IA, 2004. Soil Pollution: Origin, Monitoring and Remediation, 1st ed., Springer. Germany.

Okoh A, Ajisebutu S, Babalola G and Trejo- Hernandez MR, 2001. Potential of *Burkholderia cepacia* RQ1 in the biodegradation of heavy crude oil. International Microbiology 4: 83-87.

Olu- Arotiowa OA, Aremu MO and Alade AO, 2007. Ex- situ bioremediation of diesel polluted waste water in tropical hot climate. Asian Journal of Information Technology 6(9): 961-963.

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.

Rashidashmagh F, Rezae kalantari R, Farzadkia M, Joneidie jafari A and Nabizadeh R, 2009. Study of the model of phenanthrene biodegradation by *Acinetobacter* sp. Journal of Health and Environment 3: 196-203.

Sarikhani MR, Ebrahimi M, and Fallah AR, 2011. Comparison of hydrocarbon-degradation by isolates of *Pseudomonas fluorescens* Chao, *P. putida* P13 and *Pantoea agglomerans* P5 in presence of gas oil, toluene and phenanthrene. 4th International Conference on Environmental Industrial and Applied Microbiology, 14-16 September, Malaga, Spain.

Shafiee P, Shojaosadati SA and Charkhabi AH, 2006. Bidegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by aerobic mixed bacterial culture isolated from hydrocarbon polluted soils. Iranian Journal of Chemistry Engineer 25(3): 73-78.

Supaka N, Pinphanichakam P, Pattaragulwanit K, Thaniyavah S, Omori T and Juntonggjin K, 2001. Isolation and characterization of a phenanthrene degrading S*phingomonas* sp. Strain P2 and its ability to degrade fluoran thene and pyrene via cometabolism. Research Article Science Asia 27: 21-28.

Suseo J, Sookeum Y, and li QX, 2009. Baterial degradation of aromatic compounds. International Journal of Environment Research and Public Health 6: 278-309.

Tang X, Zhu Y and Meng Q, 2006. Enhanced crude oil biodegradability of *Pseudomonas aeruginosa* ZJU after preservation in crude oil-containing medium. World Journal of Microbiology and Biotechnology 22: 1-8.

Ting ASY, Tan CHC and Aw CS, 2009. Hydrocarbon-degradation by isolate *Pseudomonas lundensis* UTAR FPE2. Malaysian Journal of Microbiology 5(2): 104-108.

Wongsa P, Tanaka M, Ucno A, Hasanuzzaman M, Yumoto I and Okuyama H, 2004. Isolation and characterization of novel starins of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* possessing high effiency to degrade gasoline, kerosene, diesel oil and lubricating oil. Current Microbiology 49: 415-422.