بررسی راندمان زیست پالایی آلودگیهای نفتی توسط سویه‌های باکتریایی بومی جدا شده از خاکهای آلوده مناطق سردسیری (مطالعه موردی: پالایشگاه تبریز)

فریبا محسن زاده

همدان، دانشگاه بوعلی سینا، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۰/۵ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۲/۲۴

چکیده

آلودگی نفتی از مهم ترین آلودگیهای خاک می‌باشد. زیست پالایی، فن‌آوری مؤثر و کاربردی جهت پاکسازی خاکهای آلوده است. برخی از میکروارگانیسم‌ها قابلیت زیست پالایی ترکیبات نفتی را دارند. در این پژوهش، جهت بررسی باکتریهای بومی دارای قابلیت تجریه زیستی نفت خام در مناطق سردسیر، شهر تبریز به عنوان نماینده ای از مناطق سردسیر ایران انتخاب گردید. نمونه های خاک آلوده از مناطق آلوده پالایشگاه تبریز جمع آوری و باکتریهای آنها با نفت خام سازگار گردید. سپس باکتریهای موجود در نمونه، جداسازی، دسته بندی و شناسایی گردید. میزان رشد هر سوش باکتریایی از طریق اندازه گیری کدورت حاصله از رشد باکتریها، و راندمان حذف نفت از طریق انحلال نفت خام باقیمانده در یک حلال آلی و سپس تبخیر حلال و اندازه گیری میزان نفت خام باقیمانده، در غلظتهای مختلف نفت خام در مدت یک ماه، برآورد گردید. در این تحقیق ۷ گونه مختلف باکتریایی سازگار با نفت خام، یافت شد. بیشترین راندمان حذف توسط باکتری سودوموناس ائروژنز، در غلظت ۰/۵ درصد نفت خام معادل ۸۹/۵ درصد برآورد گردید. با توجه به نتایج چنین استنباط گردید که حذف زیستی نفت خام توسط فلور باکتریایی خاک، به عنوان یک روش سازگار با محیط‌زیست، جهت پاکسازی خاکهای آلوده مناطق سردسیر، با راندمان بالا امکان‌پذیر می باشد.

واژه های کلیدی: تبریز، زیست‌پالایی، خاکهای آلوده، سودوموناس آئروژنز، نفت‌خام

نویسنده مسئول، تلفن: ۰۸۱۱۸۳۸۱۰۵۸، پست الکترونیکی: fmohsenzade@gmail.com

مقدمه

خاک یکی از منابع مهم و ارزشمند موجود در طبیعت است (۸). برنامه‌ریزی برای داشتن خاکی سالم و تولیدکننده، لازمه بقای انسان است (۳۳). ترکیبات‌نفتی، از مهم ترین آلاینده‌های آلی محیط‌زیست به ویژه خاک هستند (۹). ورود این ترکیبات به طبیعت، به سبب سمی بودن، ایجاد جهش و سرطان‌زایی برای موجودات زنده، از مهم ترین نگرانیهای حامیان محیط‌زیست است. این دسته ازآلاینده‌های آلی، پایداری زیادی در خاک دارند و انباشته شدن تدریجی آنها در خاک، موجب اختلال در کارکرد طبیعی خاک از جمله کاهش عملکرد محصولات کشاورزی و تغییر در ویژگیهای خاک می گردد (۱۵ و ۳۸).

نیاز به اصلاح محیطهای آلوده، سبب توسعه فن آوریهای گوناگونی برای رفع آلودگیهای آلی از خاک شده است (۱۲). فن آوریهای فیزیکی و شیمیایی نظیر تصفیه حرارتی، تثبیت، سوزانیدن و جامد سازی، جهت حذف آلودگی از مناطق با وسعت نسبتاً کم کاربرد دارند و برای رفع آلودگیهای گسترده، صرفه اقتصادی ندارند. در نتیجه نیاز به روشهای اقتصادی‌تر پاک سازی خاکهای آلوده کاملاً محسوس است (۱۴، ۲۲، ۳۰، ۳۷ و ۴۲).

زیست‌پالایی یک فن‌آوری نسبتاً نوین پالایش خاکهای آلوده است که در آن از موجودات زنده جهت حذف یا کاهش غلظت آلاینده‌های معدنی، رادیواکتیو و آلی به ویژه ترکیبات نفتی از محیط زیست استفاده می شود (۲۹ و ۴۴). زیست-پالایی خاکهای آلوده به مواد نفتی به روش تلقیح نوع خاص یا گونه‌های مختلف باکتری به محیط خاک از جدیدترین روشهای مطرح در زمینه پاکسازی خاکها از مواد نفتی است (۳۴ و ۵۱).

پژوهشهای متعددی در دست است که نشان می‌دهد سویه-های مختلف باکتریایی نه‌تنها نسبت به آلودگیهای نفتی مقاوم هستند بلکه برخی از آنها قادرند از این ترکیبات به عنوان منبع کربن و ماده غذایی استفاده کنند، بنابراین وجود این ترکیبات نه تنها مانع رشد باکتریها نمی‌شود بلکه موجب رشد بیشتر و سریعتر باکتریهای سازگار می‌شوند (۱۳ و ۴۹). در پژوهشی کایریمورا و همکاران (۲۸) موفق به جداسازی سویه Sphingomonas elodea از خاکهای آلوده شدند که قادر بود از کربازول و سایر ترکیبات نفتی استفاده کنند و نتایج آنها نشان داد که با افزایش تعداد و رشد باکتری (افزایش کدورت محیط کشت) میزان تجزیه مواد نفتی افزایش می یابد. امتیازی و همکاران (۲۱) نیز تجزیه ترکیبات مختلف نفتی به وسیله سویه‌ای از سودوموناس‌ها درمدت زمان ۹ روز از طریق سنجش منحنی رشد باکتری در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر بررسی نمودند و کارآیی آن را در تجزیه ترکیبات نفتی مثبت ارزیابی کردند.

خان و همکاران (۲۷) در تحقیقی با عنوان مطالعه بر روی پتانسیل حذف نفت توسط باکتریهای جنس باسیلوس جدا شده از خاکهای آلوده به نفت در هندوستان نشان دادند که این باکتریها حداقل ۲۷ درصد از آلودگی نفتی خاک را پس از گرماگذاری ۷ روزه، مورد تخریب و تجزیه زیستی قرار می‌دهند. در تحقیقی در منطقه آفریقای جنوبی، اوجو نشان داد که باکتریهای خاک قادر به تجزیه‌زیستی خاکهای آلوده به نفت‌خام می‌باشند (۴۰). در تحقیقی دیگر ۳۶۸ سویه متعلق به نژاد باسیلوس از نمونه‌های خاک جمع آوری شده از بیابانهای آلوده به ترکیبات نفتی گزارش شده است (۴۶). بر اساس سایر مطالعات انجام یافته، کارآیی روش تلقیح باکتری بومی جداسازی شده از همان محیط آلوده و به کارگیری آن در زمینه زیست‌پالایی نفت‌خام در خاک به اثبات رسیده است (۲ و ۵۳)، دلیل این امر افزایش میزان سوخت‌وساز و سازگاری ژنتیکی جمعیت میکروبی در محیط‌زیست خودشان گزارش شده است که نقش به سزایی در موفقیت زیست‌پالایی محیطهای آلوده دارد (۳ و ۲۶). با توجه به اینکه، فلور میکروبی خاکهای آلوده در شرایط آب‌وهوایی و زیستی مختلف متفاوت است و همچنین عوامل مختلفی از جمله غلظت آلاینده و دمای رشد می‌تواند عملکرد تجزیه میکروبی آلاینده را تحت تأثیر قرار دهد (۳۸)، و با توجه به عدم انجام پژوهش مشابه شرایط آب و هوایی سردسیر، لزوم این تحقیق در شرایط آب و هوایی شهر تبریز احساس می‌شود. بنابراین هدف از این پژوهش جداسازی و شناسایی باکتریهای بومی موجود در خاکهای آلوده به ترکیبات نفتی شهر تبریز، بررسی رشد این باکتریها در حضور نفت‌خام و استفاده از آن به عنوان منبع کربن، و نهایتاً تعیین راندمان تجزیه‌زیستی نفت‌خام توسط این باکتریها می‌باشد.

مواد و روشها

محل نمونه‌برداری و جمع آوری نمونه‌های خاک آلوده به ترکیبات‌نفتی: خاکهای آلوده به ترکیبات نفتی پالایشگاه و اطراف مخازن نگهداری نفت و جایگاههای توزیع آن در شهر تبریز به عنوان یک شهر سردسیری جهت نمونه برداری انتخاب گردید. نمونه‌های خاک در فصل بهار و از عمق ۲۰-۰ سانتیمتری محلهای نمونه برداری جمع آوری و در پاکتهای یکبار مصرف جهت انجام آزمایشات میکروبی به آزمایشگاه منتقل گردید.

آماده‌سازی نمونه‌ها: نمونه‌های خاک پس از جداسازی ریشه‌ها و مواد زائد، از الک با قطر منافذ ۲ میلی‌متری عبور داده شد و کاملاً با هم مخلوط گردید. سپس جهت تطبیق باکتریهای خاک با نفت‌خام، نفت‌خام سترون با غلظت ۱ درصد به نمونه اضافه، و به مدت ۱ ماه در دمای ۲۴ درجه سانتی گراد گرماگذاری گردید. در طول این مدت، نمونه خاک هر روز با اسپری آب سترون مرطوب می گردید تا رطوبت مورد نیاز باکتریهای خاک فراهم گردد. سپس با افزودن غلظت نفت خام به میزان ۵ درصد، مدت گرماگذاری یک ماه دیگر تمدید گردید (۳۸).

کشت باکتریهای خاک و جداسازی آنها: بعد از گذشت دو ماه، رقتهای مختلف نمونه خاک در محیط‌کشت مغذی حاوی آگار و ۵ درصد عصاره مخمر، به روش آمیخته کشت داده شدند و مجدداً به مدت یک هفته در دمای ۲۴ درجه سانتی گراد گرماگذاری گردیدند. سپس انواع پرگنه های رشد کرده کاملاً جداسازی و به روش کشت خطی خالص سازی گردیدند(۴، ۲۳ و ۴۷).

گروه بندی باکتریها با استفاده از الکتروفورز پروتئین: پس از خالص سازی هر یک از باکتریها، از الکتروفورز پروتئین به روش SDS-PAGE در سیستم ناپیوسته، برای حذف سوشهای تکراری استفاده شد (۱۹).

الکتروفورز باکتریهای گرم منفی: ابتدا یک لوپ باکتری تازه کشت شده (۲۴ تا ۷۲ ساعته) در میکروتیوپ استریل قرار داده و ۰/۲ سی سی بافر استخراج به آن اضافه شد. بعد از اختلاط و قرار دادن میکروتیوپها در یونولیت، به مدت ۵ دقیقه در آب در حال جوش قرار داده و سریعاً در یخ قرار داده شدند. میکروتیوپها را با دور ۱۴۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ کرده و یک سوم مایع رویی را برداشته و با الکتروفورز باندهای پروتئینی آنها از هم تفکیک گردیدند (۳۲).

الکتروفورز باکتریهای گرم مثبت: ابتدا یک لوپ باکتری تازه کشت شده (۲۴ تا ۷۲ ساعته) در میکروتیوپ استریل قرار داده و ۰/۲ سی سی بافر استخراج حاوی آنزیم لیزوزیم و EDTA فاقد SDS به آن اضافه گردید. بعد از اختلاط و قرار دادن میکروتیوپها در یونولیت، به مدت ۱ ساعت در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده و سپس به هر سل ۰/۰۲ سی سی SDS ۲۰ درصد افزوده و سلها به مدت ۵ دقیقه در آب در حال جوش قرار گرفته و سریعاً در یخ قرار داده شدند. میکروتیوپها را در سانتریفیوژ یخچال دار با دور ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ کرده، سپس یک سوم مایع رویی را برداشته و توسط الکتروفورز باندهای پروتئینی از هم تفکیک گردیدند (۳۲).

بررسی خواص فنوتیپی باکتریها: پس از بررسی باندهای پروتئینی باکتریها توسط الکتروفورز، سوشهای باکتریایی که باند های پروتئینی مشابه داشتند کنار گذاشته شده و بدین ترتیب از متفاوت بودن سوشهای مورد مطالعه اطمینان حاصل گردید. جهت شناسایی سوشهای منتخب، ویژگیهای فیزیولوژیکی آنها از طریق آزمایشهای اشاره شده در کتاب برگی بررسی گردید(۱۶).

بررسی حساسیت باکتریهای جداسازی‌شده در حضور نفت‌خام: جهت تأیید مقاومت گونه‌های باکتریایی جدا شده نسبت به ترکیبات نفتی، بررسی هاله عدم رشد آنها در کنار دیسک نفتی صورت گرفت. انتخاب نفت خام به دلیل غنی بودن آن به انواع ترکیبات نفتی است. ابتدا هر یک از باکتریهای جدا شده را بر روی محیط نوترینت آگار، استریک کرده و در چند جای آن دیسک کاغذی استریل آغشته به نفت قرار داده شد. بعد از ۴۸ ساعت گرماگذاری در دمای ۲۴ درجه سانتی گراد، هاله اطراف دیسکها بررسی شد (۳۸).

بررسی راندمان حذف نفت خام توسط گونه‌های باکتریایی شناسایی‌شده:

سترون‌سازی نفت‌خام: برای اینکه در نمونه‌های تیمار شده با نفت خام فقط عملکرد باکتری تلقیح شده بررسی گردد، بایستی نفت خام مصرفی ابتدا سترون شود. از آنجا که حرارت، احتمالاً موجب تبخیر یا تغییر ماهیت بخشی از مواد تشکیل دهنده نفت خام می‌گردد، عمل سترون‌سازی با استفاده از فیلتراسیون با کمک صافیهای نیتروسلولزی سترون با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرون صورت گرفت (۲۲).

تهیه محیط‌کشت MSM حاوی نفت‌خام و باکتری: به منظور بالابردن جمعیت باکتری در زمان تلقیح، ابتدا هر یک از باکتریهای شناسایی شده در محیط آبگوشت مغذی، کشت داده شد و بعد از رسیدن به کدورتی معادل (۰/۱– ۸ ۰/۰)، رسوبی از آنها تهیه شد (۳۵). سپس به محیط‌کشت MSM (شامل کلرید آمونیوم، سولفات آهن، سولفات منیزیوم، فسفات سدیم، کلرید کلسیم، کلرید پتاسیم و کلرید سدیم، به ترتیب به مقدار ۲، ۱، ۲، ۲، ۰/۱، ۰/۸ و ۰/۸ گرم بر لیتر) حاوی غلظتهای مختلف نفت‌خام (۰/۱، ۰/۵، ۱، ۳ درصد)، هریک از رسوبات حاصل از گونه‌های باکتریایی شناسایی شده، اضافه گردید (۱۰). به ازای هر غلظت از آلاینده، لوله‌های فاقد باکتری به عنوان شاهد تهیه گردید (۳۶)؛ سپس محیط‌کشتهای فوق به مدت ۴ هفته در گرمخانه ۲۵ درجه سانتی گراد مجهز به شیکر گرماگذاری شدند (۱۷).

بررسی رشد باکتری در نمونه‌های تیمار شده: میزان رشد توده میکروبی نمونه‌های تیمار شده از طریق بررسی کدورت نمونه‌ها ارزیابی گردید. به این منظور میزان جذب نوری نمونه‌ها، طی مدت ۴ هفته از طریق بررسی کدورت حاصل از رشد باکتریها، توسط دستگاه اسپکتوفتومتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید (۲۴ و ۵۰).

بررسی راندمان حذف نفت‌خام: برای اندازه گیری غلظت نفت در نمونه‌ها بعد از گذشت ۴ هفته از تماس باکتری با نفت‌خام، نفت‌خام باقیمانده با دی کلرومتان استخراج، و میزان جذب نوری آن در طول موج ۴۲۰ نانومتر قرائت گردید (۵). از آنجایی که کاهش بخشی از نفت‌خام به دلیل فراریت از نمونه‌ها است، مقایسه غلظت نفت‌خام با نمونه-های شاهد فاقد باکتری صورت گرفت (۱۱). سپس غلظتهای باقیمانده با غلظت اولیه مقایسه و به صورت درصد حذف نفت‌خام محاسبه گردید (۲۰).

آنالیز آماری نتایج به دست آمده: مقایسه مقادیر حاصل از سنجش کدورت نمونه‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS از طریق آزمون آماری آنالیز واریانس چند جانبه در سطح احتمال ۰/۰۵ انجام گرفت.

نتایج

جداسازی و شناسایی باکتریهای سازگار با نفت‌خام از نمونه‌های خاک آلوده: بعد از جمع آوری نمونه‌های خاک، سازگار کردن باکتریهای آن با نفت‌خام و کشت باکتریهای آن، باکتریها بر اساس مشابهت باند های پروتئینی آنها، دسته بندی و با انجام تستهای بیوشیمیایی شناسایی گردیدند (جدول ۱). ۷ سویه مختلف باکتریایی، به شرح زیر شناسایی گردیدند:

Pseudomonas alcaligenes, Alcaligenes eutrupha, Pseudomonas aeroginosa, Rhizobium giardinii, Bacillus circulans, Bacillus coagulans, Burkholderia gladioli

جدول ۱– نتایج تستهای تخصصی انجام شده برای شناسایی سویه باکتریها

سویه / تست	*Pseudomonas alcaligenes*	*Alcaligenes eutrupha*	*Pseudomonas aeroginosa*	*Rhizobium giardinii*	*Bacillus circulans*	*Bacillus coagulans*	*Burkholderia gladioli*
حساسیت به KOH	+	+	+	+	-	-	+

کاتابولیسم اکسیداسیون- تخمیر	O	O	O	O	O	O	O
اکسیداز	+	+	+	-	ND	ND	-
YDC ایجاد رنگ دانه زرد در محیط	-	-	+	-	ND	ND	-
تست لوان	-	-	-	-	ND	ND	ND
تست سیترات	+	+	+	+	ND	ND	ND
هیدرولیز نشاسته	-	-	-	−	+	+	-
هیدرولیز کازئین	-	-	-	−	ND	ND	ND
هیدرولیز اسکولین	-	-	-	-	ND	ND	ND
تحرک	+	+	+	+	+	+	+
تست متیل رد	-	-	-	ND	ND	ND	ND
تست وگوس- پروسکوئر	-	-	-	ND	-	-	ND
لیسیتیناز	-	-	-	ND	ND	ND	ND
هیدرولیز اوره	+	+	+	−	ND	ND	ND
لیپاز	+	+	+	ND	ND	ND	ND
مصرف ژلاتین	−	−	+	ND	ND	ND	-
فسفات	−	+	+	+	ND	ND	ND
احیای نیترات	+	+	+	ND	ND	ND	ND
اندول	-	+	−	ND	ND	ND	ND
از H2S تولید سیستئین	+	+	+	ND	ND	ND	ND
تولید کتولاکتوز	-	-	−	ND	ND	ND	ND
ایجاد رنگ فلورسنت بر روی محیط King-B	-	-	+	ND	ND	ND	-
دی آمیناز فنیل آلانین	-	-	+	ND	ND	ND	-
تولید گاز از گلوکز	-	-	−	-	-	-	ND
تولید اسید از گلوکز	-	-	+	ND	+	+	ND
فعالیت پکتولیتیکی	-	-	−	−	ND	ND	+
دهیدرولاز آرژنین	+	-	+	ND	ND	ND	-
دکربوکسیلاز لیزین	-	-	−	ND	ND	ND	ND

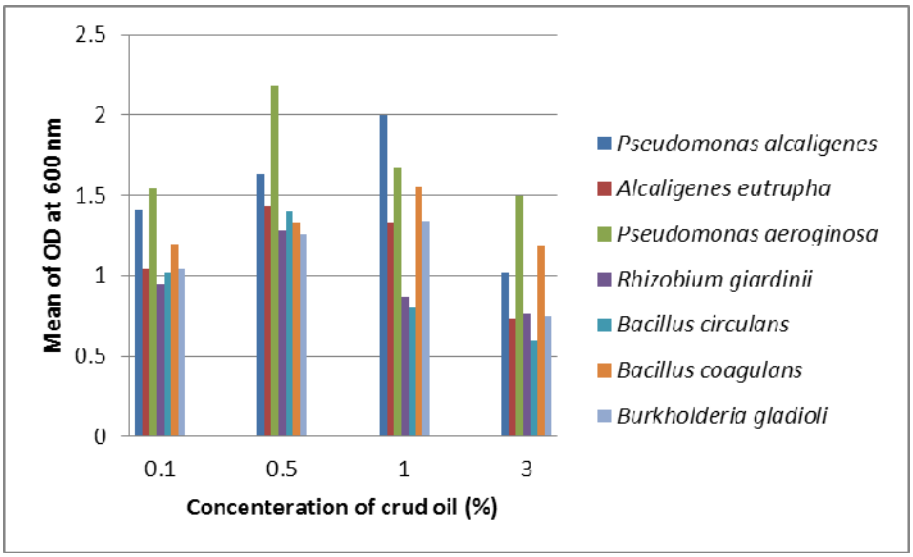
کاتالاز	-	+	+	ND	ND	ND	ND
رشد در دمای ۴ درجه	-	-	-	-	-	-	+
رشد در دمای ۳۷ درجه	+	+	+	+	+	+	+
رشد در دمای ۴۱ درجه	+	-	+	-	+	+	+
مقاومت به نمک ٪۳	+	+	+	+	+	+	-
مقاومت به نمک ٪۵	+	-	+	+	+	-	-
مقاومت به نمک ٪۷	+	-	+	+	+	-	-
مالتوز	-	-	+	+	ND	ND	+
رافینوز	+	-	+	+	ND	ND	+
سوربیتول	-	-	-	-	ND	ND	+
تر هالوز	-	+	-	+	ND	ND	+
آرابینوز	-	-	-	+	+	-	+
رامونوز	-	-	-	+	ND	ND	-
مانیتول	-	-	-	-	+	-	+
فروکتوز	-	+	+	+	ND	ND	+
مانوز	-	+	-	+	ND	ND	+
لوولوز	+	+	+	+	ND	ND	-
سلوبیوز	-	-	-	-	ND	ND	+
لاکتوز	-	-	-	-	ND	ND	-
ریبوز	-	-	-	+	ND	ND	+
دولسیتول	-	-	-	-	ND	ND	+
اینوسیتول	-	-	-	+	ND	ND	+
گزیلوز	-	-	-	+	+	-	+
آدونیتول	-	-	-	-	ND	ND	+
گلوکز	-	+	+	+	ND	ND	+
آرژینین	+	-	+	+	ND	ND	+
ملیبیوز	-	-	-	-	ND	ND	+
اتانول	+	-	+	+	ND	ND	+
نشاسته	-	-	-	-	ND	ND	+
گالاکتوز	-	-	-	-	ND	ND	+
گلیسرول	-	+	+	+	ND	ND	+
ساکاروز	-	-	+	-	ND	ND	-
سرین	-	-	-	-	ND	ND	+

سالیسین	-	-	-	-	ND	ND	+
اینولین	-	-	-	+	ND	ND	+
سیترات سدیم	ND	-	+	+	-	-	ND
تترات سدیم	-	-	-	-	ND	ND	ND
لاکتات سدیم	-	-	-	-	ND	ND	ND
مالونات سدیم	-	-	+	-	ND	ND	ND

ND: تعیین نشده

حساسیت باکتریها در حضور نفت‌خام: بعد از قرار دادن دیسکهای نفتی بر روی محیط‌کشت تلقیح شده با سوشهای باکتریایی شناسایی شده، در هیچ یک از نمونه ها، هاله ممانعت از رشد تشکیل نگردید.

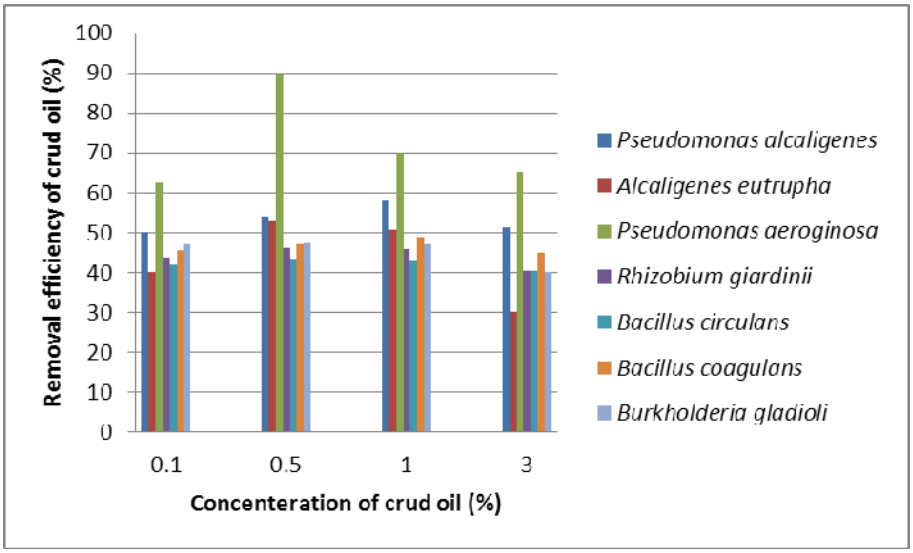
میزان رشد باکتریها: با افزایش غلظت نفت‌خام از ۰/۱ تا ۰/۵ درصد رشد باکتریها بیشتر گردید. در نمونه‌های با غلظت ۱ درصد نفت‌خام، باکتریها رشد کمتری را نسبت به غلظت ۰/۵ درصد داشتند اما رشد آنها نسبت به غلظت ۰/۱ درصد بیشتر بود. میزان رشد باکتریها در غلظت ۳ درصد کمتر از سایر غلظتها بود (نمودار ۱).



نمودار ۱- بررسی کدورت حاصل از رشد باکتریها در غلظتهای مختلف آلاینده پس از مدت زمان تماس ۱ ماهه

اثر سوش باکتریایی: کلیه باکتریها در غلظتهای مورد آزمون نفت‌خام، رشد معنی‌داری داشتند اما در بین باکتریهای کشت داده شده به ترتیب باکتریهای *Pseudomonas aeroginosa* و *Pseudomonas alcaligenes* بیشترین رشد و *Bacillus circulans* و *Rhizobium giardinii* کمترین میزان رشد را در کلیه غلظتها داشتند (نمودار ۱).

راندمان حذف نفت‌خام: افزایش غلظت از ۰/۱ تا ۳ درصد در کل تفاوت چشم گیری را در راندمان حذف آلاینده ایجاد نکرده است اما به طور متوسط بیشترین راندمان حذف آلاینده در غلظت ۰/۵ درصد و کمترین آن در غلظت ۳ درصد نفت خام مشاهده گردید. راندمان حذف در دو غلظت ۰/۱ و ۱ درصد تفاوت معنی داری با هم نشان ندادند (نمودار ۲).



نمودار ۲- درصد حذف نفت خام توسط باکتریها در غلظتهای مختلف آلاینده در مدت زمان تماس یک‌ماهه

اثر سوش باکتریایی: کلیه باکتریها در غلظتهای مورد آزمون نفت‌خام، توانستند آن را از محیط کشت حذف کنند اما در بین باکتریهای مورد بررسی *Pseudomonas aeroginosa* بیشترین راندمان حذف را در کلیه غلظتهای مورد آزمون نفت‌خام از خود نشان داد. تفاوت راندمان حذف آلاینده باکتری مذکور با سایر باکتریها معنی‌دار بود ($p\leq ۰/۰۱$). بعد از این باکتری، *Pseudomonas alcaligenes* و *Alcaligenes eutrupha* و سپس بقیه باکتریها به ترتیب بیشترین راندمان حذف را داشتند (نمودار ۲).

بحث و نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که در فلور باکتریایی خاکهای آلوده به ترکیبات نفتی شهر تبریز، باکتریهای با قابلیت سازگار شدن با نفت‌خام وجود دارد و این بدین معنی است که آلودگی با ترکیبات نفتی مانع رشد همه باکتریهای خاک در محیطهای آلوده نیست. نتایج حاصله از پژوهش جاری، با نتایج به دست آمده توسط پژوهشگران متعدد پیشین همسو است و آنها نیز توانسته‌اند از خاکهای آلوده به ترکیبات نفتی، برخی باکتریها را جداسازی‌کنند (۶ و ۷). این امر بیانگر این مسئله است که باکتریها قادر به تحمل ترکیبات نفتی در غلظتهای موجود در خاکهای آلوده حتی در محیطهای سردسیر هستند و احتمالاً در تجزیه ترکیبات نفتی در شرایط مختلف آب‌وهوایی مؤثر هستند (۱۹، ۳۱، ۳۹، ۴۰ و ۴۳).

نتایج نشان‌داد که باکتریهای سازگار با ترکیبات نفتی در شرایط سردسیری، متنوع هستند و جنسهای مختلفی همچون سودوموناس، باسیلوس، برخولداریا، آلکالی‌ژنز و رایزوبیوم را شامل می شوند. محققان قبلی نیز جنسهای مختلفی از باکتریها را در خاکهای آلوده به ترکیبات نفتی یافته‌اند (۱، ۱۸، ۲۵ و ۴۱). طبق نتایج این پژوهش دو جنس سودوموناس و باسیلوس در بین سوشهای بومی باکتریایی تجزیه‌کننده نفت وجود دارند. این دو جنس توسط برخی محققان پیشین نیز گزارش گردیده است (۱، ۱۱، ۴۶، ۴۸ و ۵۲). در پژوهش حاضر، دو جنس برخولداریا و رایزوبیوم برای اولین بار به‌عنوان باکتریهای تجریه‌کننده نفت خام در شرایط آب و هوایی سردسیر، معرفی گردیده است.

نتایج این تحقیق نشان داد، که راندمان حذف نفت خام در مورد کلیه باکتریهای بررسی شده، در غلظتهای نسبتاً کم نفت خام (۰/۵ درصد) بیشتر از سایر غلظتها است. این نتایج با نتایج حاصل از رشد باکتریها در غلظت مذکور

همخوانی دارد (نمودار ۱)؛ بنابراین علت این امر را می‌توان در بیشتر بودن تراکم باکتریها در این غلظت نسبت داد. تفاوت در میزان تحمل باکتریهای جداسازی شده از خاکهای آلوده به ترکیبات نفتی توسط پژوهشگران متعدد گزارش شده است (۲۸ و ۳۶).

نتایج آنالیز آماری نشان داد که فاکتور غلظت، باکتری و اثر تعاملی آنها در تمامی سطوح، معنی‌دار است. اما در بین کل باکتریهای مورد آزمون، سودوموناس ائروژنز هم رشد بیشتر و هم راندمان بالاتر حذف آلاینده را در کل غلظتهای نفت خام مورد آزمون، از خود نشان داد. بنابراین، این باکتری به عنوان شاخص تجزیه کننده ترکیبات نفتی از خاکهای آلوده شهر تبریز معرفی گردید. با توجه به اینکه توان رشد و قابلیت تجزیه باکتریها به شرایط محیطی و آب و هوایی بستگی دارد (۳۸) می‌توان نتیجه‌گیری کرد که این باکتری در شرایط آب و هوایی سردسیر هم بهترین باکتری تجریه کننده ترکیبات نفتی است. نتایج این تحقیقات با یافته های برخی پژوهشگران که تجزیه ترکیبات نفتی توسط سویه سودوموناس ائروژنز جدا شده از خاکهای مناطق غیر سردسیر را تأیید کرده بودند همسویی دارد (۵، ۱۹، ۲۸ و ۴۵).

منابع

۱- آموزگار، م.، اخوان سپهی، ع.، اخوان سپهی، ف.، (۱۳۸۸)، جداسازی و شناسایی باکتریهای هالوتولرانت تجزیه کننده از خاک چاه های نفت قم، فصلنامه دانش میکروب شناسی، سال اول، شماره .

۲- ایرانمنش، ع.، امینی، ج.، انصاری، م.، فائزی قاسمی، م.، (۱۳۸۸)، تهویه زیستی خاک به منظور حذف آلاینده گازوئیل توسط میکروارگانیسم ها، دوازدهمین همایش ملی بهداشت محیط ایران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده بهداشت.

۳- بسالت پور، ع.، حاج عباسی، م.، درستکار، و.، ترابی، غ.، (۱۳۸۹)، اصلاح خاکهای آلوده به هیدروکربن های نفتی به روش ترکیبی زمین پالایی - گیاه پالایی، مجله علوم و فنون کشاورزی، علوم آب و خاک، ۴ (۵۳).

۴- براتی، ب.، (۱۳۸۴)، دستور کار آزمایشگاه میکروب شناسی، انتشارات دانشگاه تهران.

۵- حسن شاهیان، م.، حسن شاهیان، ع.، امتیازی، گ.، (۱۳۸۹)، بهینه سازی تجزیه زیستی نفت خام توسط باکتریهای *Acinetobacter calcoacticus BS* و *Pseudomonas aeroginosa AS* جداسازی شده از خلیج فارس. مجله پژوهشی نفت، ۲۰(۶۳).

۶- راهب، ج.، یخچالی، ب.، (۱۳۸۰). بررسی ژنتیکی چند سویه باکتری بومی قادر به گوگردزدائی ترکیبات نفتی. مجله زیست شناسی ایران، ۱۱ (۳).

۷- راهب، ج.، کفایتی، م. الف.، بردانیا، ح.، (۱۳۹۱)، گوگردزدائی زیستس ترکیبات آلی گوگرددار سوخت های فسیلی. مجله زیست شناسی ایران، ۲۵ (۲).

۸- شریفی، س.، شهبازی، ع.، یزدی پور، ع.، کامرانفر، الف.، (۱۳۸۸)، پالایش زیستی خاکهای آلوده به نفت خام با کودهای شیمیایی، نشریه آب وخاک (علوم و صنایع کشاورزی)،۲۳ (۳): ۱۵۵- ۱۴۵.

۹- طلایی، الف.، طلایی، م.، جعفرزاده حقیقی فر، ن.، (۱۳۸۸)، بهینه سازی بیولوژیکی فاضلابهای حاوی گازوئیل شناور بر روی سطح آب به روش تاگوچی، مجله آب و فاضلاب اصفهان۸۸ (۳): ۵۷.

۱۰- مهبد، س.، محمدی، م.، حمیدی فرد، م.، موسوی، س.، (۱۳۸۶)، PAS تکنیک های عملی در آزمایشگاه تشخیصی، تهران، نشر میر.

۱۱- ناصری، س.، مصداقی نیا، ع.، عمرانی، ق.، رضایی، س.، ندافی، ک.، یونسیان، م.، اربابی، م.، (۱۳۸۴)، حذف هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای PAHs از خاک های آلوده به ترکیبات نفتی توسط کنسرسیوم میکروبی، گزارش نهایی طرح تحقیقاتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران.

۱۲- یوسفی کبریا، د.، خدادادی، الف.، کنجی دوست، ح.، بادکوبی، الف.، (۱۳۸۷)، استفاده از فن آوری نوین الکتروکینتیک در حذف گازوئیل از خاک های آلوده پالایشگاه تهران، سمینار تخصصی نفت، گاز و محیط زیست.

۱۳- یوسفی کبریا، د.، خدادادی، الف.، کنجی دوست، ح.، بادکوبی، الف.، آموزگار، م.، (۱۳۸۸)، جداسازی باکتری بومی از خاک آلوده

پالایشگاه نفت تهران با توانایی حذف گازوئیل، هشتمین کنگره بین المللی مهندسی عمران، دانشگاه شیراز، شیراز.

Degradation of Organic Compounds. Marcel Dekkar, New York, 181-252.

25- Heitkamp, M.A., Franklin, W., Cerniglia, C.E., (1988), Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: Isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium.. Appl. Environ. Microbiol, 54: 2549-2555.

26- Ijah, U. j.j., Antai, S.P., (2003), Removal of nigerian light crude oil in soil over a 12-month period, International Biodeterioration & Biodegradation، 51 : 93-99.

27- Khan, J. A. Rizvi, SH.A., (2011), Isolation and characterization of microorganism from oil contaminated sites.Adv. In Applied Sci. Res., 2(3):455-460 .

28- Kirimura, K., Nakagawa, H., Tsuji, K., Kazuya, M., Kurane, R. Usami, Sh., (1999), Selective and continuous degradation of carbazole contained in petroleum oil by resting cells of Sphingomonas sp. CDH-Biosci. Biotechnol. Biochem, 63(9): 1563-1568.

29- Leahy, J.G., Colwell, R.R., (1990), Microbial degradation of hydrocarbons in the environment, Microbial. Rev. 54: 305-315.

30- Lee, K., Brand, J.M., Gibson, D.T., (1995), Stereo specific sulfoxidation by toluene and naphthalene dioxygenases. Biochem Biophys Res Commun, 212: 9-15.

31- Lee, K., Gibson, D.T., (1996), Toluene and ethylbenzene oxidation by purified naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. Strain NCIB 9816-4. Appl Environ Microbiol 62: 3101-3106.

32- LU, S.j., WANG, H.q., YAO, Z.h., (2006), Isolation and characterization of gasoline degrading bacteria from gas station leaking-contaminated soils. Journal of Environmental Sciences, 18(5):969-972.

33- Mandari, T., Lin, J., (2007), Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu- Natal, South Africa. African Journal of Biotechnology, 6(1): 023-027.

34- Margesin, R., Zimmerbauer, A., Schinner, F., (2000), Monitoring of bioremediation by soil biological activities. Chemosphere, 40: 339–346.

35- Marquez, R., Facundo, J., Vanessa, H.R., *Teresa*lameila, M.A., (2001), *Biodegradation of diesel oil in soil by a* microbial consortium.

14- Abiola, A., M. Olenyk. (1998), Effects of organic amendment and surfactants on bioremediation of hydrocarbon contaminated soil by composting. Presented at: The 8th Annual National Composting Conference of The Composting Council of Canada, Ottawa, Ontario; November 4-6.

15- Alexander, M., (1995), How toxic are toxic chemicals in soil, Environmental Science and Technology, 29: 2713–2717.

16- Bergey's Manual Trust; Manual of systematic Bacteriology. Second edition,(2004).

17- Bradford, M.M.A., (1976), Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding.*AnalBiochem*, 72:248-54.

18- Bundy, J.G., Paton, G.I., Campbell, C.D., (2002), Microbial communities in different soils types do not converge after diesel contamination. J. Appl. Microbiol, 92: 276–288.

19- Das, K., Mukherjee, A.K., (2006), Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis*and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil fromnorth-east India. Bioresource Technology, 98: 1339-1345.

20- Delille, D., Bassères, A., Dessommes, A.A., (1998), Effectiveness of bioremediation for oil-polluted Antarctic seawater. *Polar Bio,* 19: 237–241.

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

22- Ferguson, S.H., Franzmann, P.D., , Revill A.T., Snape, I., Rayner, J. L., (2003),The effects of nitrogen and water on mineralization of hydrocarbons in diesel-contaminated terrestrial Antarctic soils. Cold Regions Science and Technology , 37: 197–212

23- Fredrickson, J. K., Balkwill, D. L., (1998), Sampling and enumeration techniques, p. 239-254. *In*In R. S. Burlage, R. Atlas, D. Stahl, G. Geesey, and G. Sayler (ed.), Techniques in microbial ecology. Oxford University Press, New York, N.Y..

24- Gibson, D.T., Subramanian, V., (1984), Microbial degradation of aro-matic hydrocarbons. In: Gibson, D.T. (Ed.), Microbial

Water, Air, and Soil Pollution, 128 (3-4): 313-320

36- Mittal, A., Singh, P., (2009), Isolation of hydrocarbon degrading Bacteria from soils contaminated with crude oil spills. *Indian J Exp Biology,* 47: 760-765.

37- Mohsenzadeh, F., Nasseri, S., Mesdaghinia, A., Nabizadeh, R., Zafari, D., Chehregani, A., (2009), Phytoremediation of petroleum contaminated soils: Prescreening for suitable plants and rhizospheral fungi. *Toxicological & Environmental Chemistr,* 91(8): 1443-1453.

38- Namkoong, W., Hwang, E.Y., Park, J.S., Choi, J.Y., (2002), Bioremediation of Diesel-Contaminated Soil With Composting, Environmental Pollution, 23-31.

39- Norris, R.D., Hinchee, R.E., Brown, R.A., McCarty, P.L., Semprini, L., Wilson,J.T., (1994), Ward.Handbook of Bioremediation. Boca Raton,FL:CRC Press.

40- Ojo, O.A., (2006), Petroleum-hydrocarbon utilization by native bacterial population from a wastewater canal South west Nigeria ،African Journal of Biotechnology، 5 (4): 333-337.

41- Parag, A., Vaishampaya, P.P., Kanekar, P., Dhakephalkar, k., (2007), Isolation and Characterization of Arthrobacter sp. strain MCM B-436 an atrazine-degrading bacterium،from rhizospher, International Biodeterioration & Biodegradation, 273–278.

42- Rehm, H.J., Rei, I., (1981), Mechanisms and occurrence of microbial oxidation of long- chain alkanes, Adv. Biochem.Eng, 19: 175-215.

43- Richard, J.Y., Vogel, T.M., (1999), Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel, International Biodeterioration & Biodegradation, 93-100.

44- Semple, K.T., Reid, B.J., Fermor, T.R., (2001), Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants, Environ. Pollut, 112: 269–283.

45- Shields, M.S., Montgomery, S.O., Cuskey, S.M., Chapman, P.J., Priichard, P.H., (1991), Mutants of *Pseudomonas cepacia* G4 defective in catabolism of aromatic compounds and trichloroethylene. Appl Environ Microbiol, 57: 1935-1941.

46- Sorkhoh, N.A., Ibrahim, A.S., Ghannouin, M. A., (1993), High temperature hydrocarbon degradation by Bacillus strearothermophilus from oil-polluted Kuwait desert, Applied Microbiology & Biotechnology, 39: 123- 126.

47- *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 19th ed* ،American Public Health Assosiation / American Works Assosiation /Water, (1998).

48- Stirling, L.A., Watkinson, R.J., (1997), Microbial metabolism of ali- cyclic hydrocarbons: isolation and properties of a cyclohexane-degrading bacterium, Journal of General Microbiology, 99: 119- 125.

49- Talaie, A.R., (2008), *Parametric study of petroleum compounds biodegradation using microorganisms*."*M.Sc*. Thesis of Environmental Engineering, Scince and Research -University Branch-Ahvaz.

50- Ting, Y.P., Hu, H.L., Tan, H.M., (1999), Bioremediation of petroleum hydrocarbons in soil microcosms, Resour. Environ. Biotechnol. 2: 197–218.

51- Vogel, T.M., (1996), Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. 1996. Current Opinion in Biotechnology, 7: 311-316.

52- Wackett, L.P., Brusseau, G.A., Householder, S.R., Hanson, R.S., (1989), A Survey of microbial oxygenases: trichloroethylene degradation by propane-oxidizing bacteria. Appl Environ Microbiol, 55: 2960-2964.

53- Xu, R., Obbard, J.P., (2003). Effect of nutrient amendments on indigenous hydrocarbon biodegradation in oil-contaminated beach sediments. Journal Of Environmental Quality, 32 (4): 1234-1243.

The study of microbial removal efficiency of crude oil in contaminated soils of cold climates areas (case study: Tabriz refinery)

Mohsenzadeh F.

Biology Dept., Bu-Ali Sina University, Hamedan, I.R. of Iran

Abstract

Petroleum pollution is the most important soil pollution. Bioremediation is an effective and usable technology for remediation of polluted soils. Some microorganisms have bioremediation potency for petroleum compounds. In this research Tabriz city was selected as a cold area of Iran for studying of native bacteria with biodegradation potency of crude oil. Soil samples were collected from polluted soils of Tabriz refinery and their bacteria were accommodated to crude oil. The bacterial strains exited in the samples were isolated, grouped and determined. The growth ability and petroleum removal efficiency were evaluated for the each bacterium at the different crude oil concentrations during a month. In this research, seven bacterial species were found that are well accommodated to crude oil. The highest petroleum removal efficiency (98%) was determined for *Pseudomonas aerogenesis* at concentration of 0.5%. Biological removing of crude oil with high efficiency is possible by soil bacterial flora, as an environmental friendly method, even for soil cleaning of the industrial areas in cold temperature regions.

Key words: Bioremediation, Contaminated soil, Crude oil, *Pseudomonas arogenesis*, Tabriz city