



تأثیر غلظت فسفر بر باکتری‌های تجزیه‌کننده مواد نفتی جداسازی شده از خاک‌های استان بوشهر در حضور فنانترون

*زهرا یاراحمدی^۱، حسین بشارتی^۲، علیرضا فلاح نصرت‌آباد^۲ و محمدرضا ساریخانی^۳

^۱دانشجوی دکتری گروه خاک‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی خوراسگان،

آستادیار مؤسسه تحقیقات خاک و آب، کرج، ایران، ^۲آستادیار گروه خاک‌شناسی، دانشگاه تبریز

تاریخ دریافت: ۹۰/۸/۱۵؛ تاریخ پذیرش: ۹۱/۵/۱۹

چکیده

در میان راه‌کارهای ارایه شده ناشی از مشکلات آلودگی نفتی و تأثیرات ویران‌گر آن، استفاده از میکروارگانیزم‌ها برای تجزیه زیستی در بیش‌تر کشورهای پیشرفته مورد استفاده قرار می‌گیرد. به‌کارگیری این روش در رفع آلودگی مناطق آلوده به‌وسیله تعدادی از پارامترهای زیست‌محیطی محدود می‌شود که از جمله این پارامترها عناصر غذایی می‌باشند. در این پژوهش ۴ سویه باکتریایی از خاک استان بوشهر جداسازی شد، عمل جداسازی باکتری‌ها قبل از انجام بررسی عوامل محیطی از جمله بررسی اثر غلظت فسفر در یک محیط حداقل بدون منبع کربنه به انجام رسیده بود و از بین باکتری‌هایی که از قبل فرایند جداسازی و سپس شناسایی آن‌ها از خاک صورت گرفته بود، ۴ سویه باکتری برتر انتخاب و مورد استفاده قرار گرفت، سویه‌های نام برده با عنوان سودوموناس استاتزری، کریزوباکتریوم، اسیتتوباکترجانسونی، سودوموناس آئروجینوس نام‌گذاری شدند. این باکتری‌ها از نظر کارایی در تجزیه فنانترون و در غلظت‌های مختلف فسفر در طی زمان‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفتند. در این بررسی زمان در ۴ سطح ۰، ۴۸، ۷۲ و ۱۴۴ ساعت و فسفر در ۳ سطح غلظت ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر در نظر گرفته شد، نتایج به‌صورت فاکتوریل، در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد آنالیز قرار گرفت. نتایج بررسی اثر مقادیر مختلف فسفر در تجزیه فنانترون نشان داد که بهترین سطح

*مسئول مکاتبه: zhr_yarahmadi63@yahoo.com

غلظت فسفر در تجزیه فنانترون سطح ۲ میلی گرم در لیتر می باشد. همچنین باکتری سودوموناس ائروجینوس بهترین کارایی را در تجزیه فنانترون نسبت به بقیه باکتری ها داشت. بهترین زمان نیز در تجزیه فنانترون زمان ۱۴۴ ساعت پس از تلقیح باکتری ها می باشد.

واژه های کلیدی: آلودگی خاک، تجزیه زیستی، فسفر، میکروارگانسیم ها

مقدمه

خاک یکی از منابع ارزشمند طبیعت بوده و پالاینده طبیعی محسوب می شود، اما مدت هاست که مواد نفتی و مشتقات آن در اثر استخراج، حمل و نقل، ذخیره سازی یا استفاده نادرست موجب آلودگی خاک شده است (اسپارکس، ۲۰۰۳). تأثیرات منفی ناشی از آلودگی نفتی خاک منجر به ارایه برنامه ها و دستورالعمل هایی برای حفاظت از محیط زیست گردید که در این میان کاربرد روش های زیستی در میان گزینه های اصلاح خاک برتری دارد (کانینگهام و فیلیپ، ۲۰۰۱؛ الکساندر، ۲۰۰۰).

در ضمن عمل زیست پالایی با کنترل و بهینه سازی بعضی فاکتورهای محیطی می توان میزان و سرعت تجزیه زیستی را به گونه دلخواه افزایش داد (پاریش و همکاران، ۲۰۰۵). میکروارگانسیم ها نیاز به شرایط مناسبی برای رشد و زنده ماندن خود دارند که این فاکتورها شامل pH مناسب، دما، اکسیژن، شوری و عناصر غذایی می باشد (کوکسون، ۱۹۹۵؛ لهی و کولول، ۱۹۹۰). یکی از فاکتورهای مهم و تأثیرگذار روی تجزیه هیدروکربن های نفتی منبع فسفر، غلظت آن است که بر بیوماس و تولیدات باکتری ها مؤثر است (سعیدخلیل و مورتر، ۲۰۰۸). منطقه خلیج فارس از مناطق نفت خیز ایران و بزرگ ترین منطقه نفتی جهان است که بیش از نیمی از ذخایر نفت و گاز جهان را در خود جای داده است، در این پژوهش باکتری های جداسازی شده تجزیه کننده مواد نفتی از خاک های استان بوشهر، از نظر بررسی کارایی در سطح های مختلف غلظت فسفر و در تجزیه فنانترون در زمان های مختلف مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش ها

برای انجام این مرحله از آزمایش ابتدا محیط کشت پایه معدنی مایع CFMM (Carbon Frace Minral Medium) تهیه و pH آن قبل از اتوکلاو روی ۷/۵ تنظیم شد. ترکیب این محیط کشت شامل

۰/۸ گرم بر لیتر KH_2PO_4 ، ۲/۷۵ گرم بر لیتر Na_2HPO_4 ، ۳ گرم بر لیتر NH_4NO_3 ، ۰/۰۰۵ گرم بر لیتر $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۰۱ گرم بر لیتر $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۰۰۵ گرم بر لیتر $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ، ۱ میلی لیتر Trace mineral بود، پس یک میلی لیتر عناصر کم مصرف نیز به محیط کشت‌های مذکور اضافه گردید، ترکیب عناصر کم مصرف شامل مقادیر زیر بود:

۵ گرم بر لیتر EDTA، ۰/۱۶۱ گرم بر لیتر $\text{COSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۱۱ گرم بر لیتر $6\text{MO}_v \text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ، $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ، ۰/۴۹۹ گرم بر لیتر $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۱۶ گرم بر لیتر $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۷۲ گرم بر لیتر $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ و ۲/۲ گرم بر لیتر $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

از بین باکتری‌هایی که از قبل فرایند جداسازی و سپس شناسایی آن‌ها از خاک انجام شده بود، ۴ سویه باکتری برتر انتخاب و مورد استفاده قرار گرفت، سویه‌های نام برده با عنوان سودوموناس استاتوزی، کریزوباکتریوم، اسیتوباکتر جانسونی، سودوموناس آئروجینوس و به ترتیب باکتری‌های شماره ۱، ۲، ۳ و ۴ نام‌گذاری شدند. این باکتری‌ها از نظر کارایی در تجزیه فنانترون و در غلظت‌های مختلف فسفر در طی زمان‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفتند. باکتری‌ها در پلیت‌های شامل محیط نوترینت آگار به صورت خطی کشت داده و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت چند روز در انکوباتور قرار داده شدند. بعد از رشد باکتری از تک‌کلنی‌ها به محیط مایع نوترینت براث تلقیح و در انکوباتور به مدت چند روز قرار داده شد تا جمعیت آن‌ها به 10^7 در هر سانتی‌متر مکعب برسد. برای ایجاد غلظت‌های مختلف فسفر مقدار ۲ گرم (KH_2PO_4) در ۲۰ میلی لیتر آب مقطر حل گردید و به عنوان استوک (مادر) منبع فسفره استفاده گردید. غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر از هر کدام از منبع فسفر در محیط کشت CFMM تهیه گردید، مقدار ۱/۵ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری تهیه شده در محیط نوترینت براث برداشت و با 4000 دور در دقیقه به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ شد و رسوب باقی مانده به ارلن‌های ۲۵۰ سی‌سی شامل ۵۰ میلی لیتر از محیط‌های تهیه شده (تیمارها) اضافه گردید، سپس به میزان ۰/۰۱ گرم در لیتر فنانترون (۵۰۰ ماکرولیترا) و در شرایط استریل به محتویات ارلن‌ها اضافه گردد، برای تهیه فنانترون به این صورت عمل شد که ۰/۵ گرم فنانترون وزن شد و در ۱۰ میلی لیتر DMSO که نوعی حلال ماده نفتی (فنانترون) می‌باشد حل گردید، سپس ارلن‌ها روی شیکر و با دور ۱۵۰ rpm و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس جمعیت باکتری‌ها بعد از گذشت رنج‌های زمانی صفر، ۴۸، ۷۲ و ۱۴۴ ساعت شمارش گردید. نتایج برای استفاده از نرم‌افزار SPSS مورد آنالیز قرار گرفت و مقایسه میانگین سطوح مختلف تیمارهای سویه باکتری، فسفر و زمان به روش دانکن در سطح معنی‌داری ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

جدول تجزیه واریانس نشان می‌دهد که تأثیر باکتری، سطوح فسفر و زمان و اثرات متقابل آن‌ها در جمعیت باکتری‌ها در سطح ۱ درصد معنی‌دار است (جدول ۱). باکتری *P. aeruginosa* نسبت به بقیه کارایی بهتری در تجزیه فنانترون داشت (جدول ۲). بهترین سطح غلظت فسفر $P=2$ میلی‌گرم بر لیتر است و بعد از آن $P=0/5$ و $P=1$ قرار دارد که از نظر تأثیر در تجزیه یکسان عمل می‌کنند (جدول ۳). جمعیت باکتری‌ها در هر سه زمان نسبت به زمان صفر معنی‌دار بوده ولی با هم تفاوتی ندارند (جدول ۴).

جدول ۱- تجزیه واریانس تیمارهای سویه باکتری، فسفر، زمان و اثر متقابل آن‌ها در محیط آلوده به فنانترون.

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	سطح معنی‌داری
سویه باکتری	۳	۱۱۰۴۱۱۵/۳۶	۳۶۸۰۳۸/۴۵ ^{**}	۱۶۰/۳۶	۰/۰۰۰۱
فسفر	۲	۴۹۴۴۱/۰۰	۲۴۷۲۰/۵۰ ^{**}	۱۰/۷	۰/۰۰۰۱
زمان	۳	۲۰۷۴۶۳/۶۱	۶۹۱۵۴/۵۳ ^{**}	۳۰/۱۳	۰/۰۰۰۱
فسفر × باکتری	۶	۱۸۵۰۵۳/۹۱	۳۰۴۸۲/۳۱ ^{**}	۱۳/۴۴	۰/۰۰۰۱
فسفر × زمان	۶	۴۳۷۵۰/۱۶	۷۲۹۱/۶۹ ^{**}	۳/۱۸	۰/۰۱۰
زمان × سویه باکتری	۹	۳۷۴۰۵۶/۴۲	۴۱۵۶۱/۸۲ ^{**}	۱۸/۱۱	۰/۰۰۰۱
زمان × سویه باکتری × فسفر	۳۶ ۱۸	۴۶۰۵۶/۹۱	۲۵۵۸/۷۱ ^{NS}	۱/۱۱	۰/۳۶۷۸

^{**} معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد و ^{NS} غیرمعنی‌دار.

جدول ۲- مقایسه میانگین تعداد کلونی ۴ نوع باکتری به روش دانکن در سطح ۵ درصد در محیط آلوده به فنانترون ($Cfu/ml \times 10^7$).

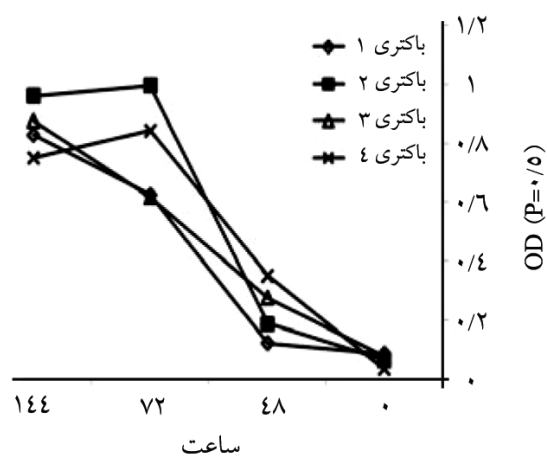
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Chryseobacterium</i>	<i>P. Stutzeri</i>
۲۰۰/۱۹ ^a	۵۰/۸۳۵ ^d	۱۰۳/۶۰۵ ^c	۱۲۴/۳۱۵ ^b

جدول ۳- مقایسه میانگین تعداد کلونی ۳ سطح فسفر به روش دانکن در سطح ۵ درصد در محیط آلوده به فنانترون ($Cfu/ml \times 10^7$).

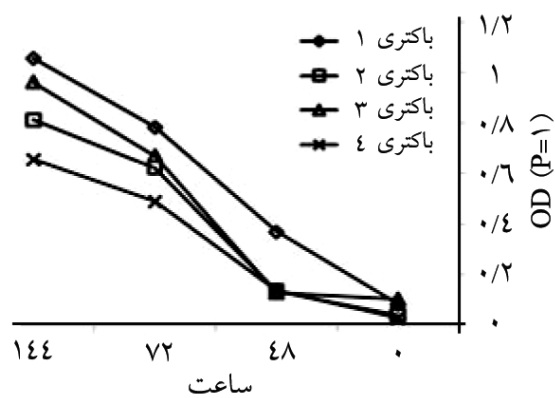
$P=2$	$P=1$	$P=0/5$
۱۳۵/۷۳۵ ^a	۱۱۲/۷۹۵ ^b	۱۱۰/۶۷ ^b

جدول ۴- مقایسه میانگین تعداد کلونی در ۴ زمان مختلف به روش دانکن در سطح ۵ درصد در محیط آلوده به فنانترین
($Cfu/ml \times 10^7$).

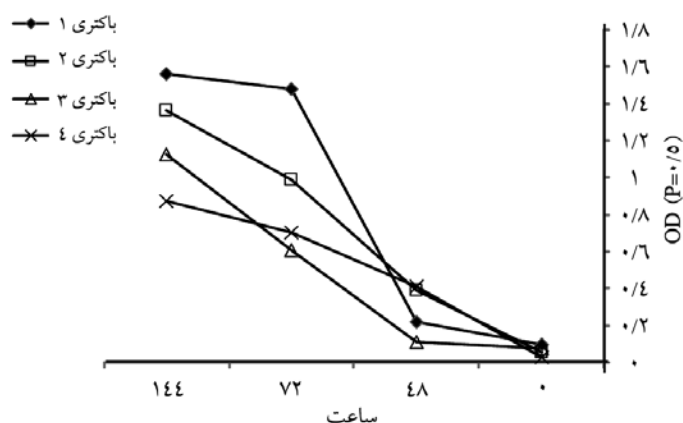
۱۴۴	۷۲	۴۸	۰
۱۴۱/۶۲۵ ^a	۱۲۸/۶۰۵ ^a	۱۲۵/۱۲۵ ^a	۸۰/۵۸۵ ^b



نمودار ۱- مقایسه رشد ۴ باکتری در سطح $P=0.05$ میلی گرم در لیتر.



نمودار ۲- مقایسه رشد ۴ باکتری در سطح $P=1$ میلی گرم در لیتر.



نمودار ۳- مقایسه رشد ۴ باکتری در سطح P=۲ میلی گرم در لیتر.

بهترین حالت برای اثر متقابل زمان، فسفر و باکتری به ترتیب زمان ۱۴۴ ساعت، غلظت P=۲ و سویه باکتری *Pseudomonas aeruginosa* مشاهده گردید، در آزمایش انجام شده، رنج‌های زمانی در نظر گرفته در ۴ رنج زمانی مختلف شامل، لحظه صفر (لحظه تلقیح باکتری‌ها قبل از رشد و گذاشتن ارلن‌ها روی شیکر) و رنج‌های زمانی بعدی (۴۸، ۷۲ و ۱۴۴ ساعت) بعد از زمان تلقیح باکتری‌ها و رشد آن‌ها بعد از گذاشتن روی دستگاه شیکر و آن‌گاه، شمارش کلنی‌ها روی پلیت در نظر گرفته شد، ممکن است با افزایش جمعیت تجزیه هم بیش‌تر گردد ولی نمی‌شود گفت که حتماً جمعیت افزایش می‌یابد، اگر مواد غذایی محیط کشت ما کم باشد جمعیت هم کاهش می‌یابد، مواد غذایی در آزمایش یاد شده طوری انتخاب شده بود که تا زمان ۱۴۴ ساعت برای مصرف باکتری‌ها کافی بود و ما سطوح بالاتر از این رنج زمانی را مورد بررسی قرار ندادیم. این پژوهش نیز با هدف دستیابی به استفاده از گونه‌های کارا برای رفع آلودگی‌های نفتی به‌خصوص در جنوب کشور است، امید است ضمن رعایت تمام مسایل زیست‌محیطی و جلوگیری از افزایش هرچه بیش‌تر آلودگی‌ها در محیط زیست با افزایش علم و دانش خود در زمینه کاهش فیزیکی و شیمیایی، به‌خصوص بیولوژیکی آلودگی‌ها بتوانیم قدم مؤثری در بهبود رفع مشکلات زیست‌محیطی داشته باشیم. در پایان پیشنهاد می‌گردد سویه‌های بیش‌تری از باکتری‌ها برای بررسی انتخاب و همچنین در زمان بیش‌تری مطالعه انجام شود.

منابع

1. Alexander, M. 2000. Aging bioavailability and overestimation of risk from environmental pollutant so. *Environmental. Appl. Environ. Microbial.* 34: 4259-4265.
2. Bamby, F. 1991. The environmental impact of the Persian Gulf War the ecologist. *J. Environ. Sci. Environ.* 21: 166-172.
3. Cunningham, C.J., and Philip, J.C. 2000. Comparison of Bioaugmentation and Biostimulation in ex situ Treatment of Diesel contaminated soil. *Land Contamination and Reclamation, University of Edinburgh, Scotland. J. Environ. Sci. Technol. Environ.* 35: 1663-1667.
4. Cookson, J.T. 1995. *Bioremediation Engineering Designee and Application.* MC Graw-Hill, New York, Ny, USA. *J. Microbiol. Ecol.* 25: 178-200.
5. Leahy, J.G., and Colwell, R.R. 1990. Microbial degradation of Hydrocarbon. *Amer. J. Microbial. Rev.* 54: 305-415.
6. Parrish, Z.D., Banks, M.K., and Schwab, A.P. 2005. Assessment of andaminantl ability during Phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon impacted soil, *Environ. Pollution.* 137: 187-197.
7. Sparks, D.L. 2003. *Environmental Soil Chemistry.* 2^{ed} Academic Press. California. USA.
8. Sahaid Kalil, H.S., and Mortar, Y. 2008. Effect of nitrogen source and carbon to nitrogen ratio on hydrogen production using acctobutylicum. *Amer. J. Biochem. and Biotechnol.* 4: 393-401.



Effect of phosphorous concentration on isolated petroleum-degrading bacteria from Boushehr Province soil in presence of phenanthrene

***Z. Yarahmadi¹, H. Besharati², A.R. Fallah Nosratabad²
and M.R. Sarikhani³**

¹M.Sc. Student, Dept. of Soil Science, Islamic Azad University, Khorasgan,

²Assistant Prof., Educational Staff of Soil and Water Research, Karaj, Iran,

³Assistant Prof., Dept. of Soil Science, Tabriz University

Received: 11/06/2011; Accepted: 08/09/2012

Abstract

Using microorganisms among the suggested remedies for oil pollution problems and its destructive effects is a way which is used as the title of bioremediation in most developed countries. Using bioremediation to remove pollution from polluted areas is limited by means of some bioenvironmental parameters. Nutrients are one of these elements. In this study four types of bacteria were isolated from the Boushehr Soils. The mentioned kinds were nominated as *Pseudomonas stutzeri*, *Chryseo bacterium Sp*, *Acinetobacter Johnsonii*, *Pseudomonas aeruginosa*. These bacteria were studied from the aspect of their ability to degrade phenanthrene in different P concentrations and in different periods of time. The results showed that the best phosphorus concentration in biodegradation of phenanthrene equals to 2 mgr/lit, and the best performances is related to bacterial *pseudomonas aeruginosa*, and the best of time in biodegradation phenanthrene is 144 hours.

Keywords: Bioremediation, Microorganisms, Nutrients, Soil pollution

* Corresponding Authors; Email: zhr_yarahmadi63@yahoo.com