فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال اول، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۱، صفحه ۷۷- ۸۶
تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۸/۰۸ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۰/۰۹

# بررسی پتانسیل حذف میکروبی خاک‌های آلوده به گازوییل در شهر همدان

**فریبا محسن زاده:** استادیار مهندسی بهداشت محیط، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران، fmohsenzade@gmail.com*
**نسترن احمدی مسعود:** دانشجوی کارشناسی ارشد آلودگی‌های محیط زیست، دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان، ایران، nastaranahmadimasood@yahoo.com

## چکیده

**مقدمه:** آلودگی‌های نفتی از مسائل مهم زیست محیطی هستند. گازوییل از متداول‌ترین آلاینده‌های نفتی است. زیست پالایی، فنآوری جدید پاک‌سازی خاک است. برخی از میکروارگانیسم‌ها قابلیت زیست پالایی گازوییل را دارند. این پژوهش، با هدف دستیابی به میکروارگانیسم‌های بومی، با قدرت تجزیه زیستی گازوییل در شرایط آب وهوایی شهر همدان انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** نمونه‌های خاک آلوده به گازوییل از ۱۰ منطقه شهر همدان جمع آوری و باکتری‌های آن جداسازی و براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و آزمایش‌های بیوشیمیایی دسته بندی شد. توانایی هر دسته در مصرف گازوییل در محیط کشت نمکی حداقل و غلظت‌های مختلف آلاینده (۰/۱، ۰/۵، ۱، ۳ درصد) از طریق کدورت سنجی در طول موج ۶۰۰ نانومتر بررسی شد. نتایج از طریق آزمون آماری تحلیل واریانس چندعاملی با هم مقایسه شد.

**نتایج:** در این تحقیق، ۱۰ سویه مختلف باکتریایی از خاک‌های آلوده به گازوییل شهر همدان یافت شد. نتایج کدورت سنجی نشان داد که اثر عامل زمان، غلظت آلاینده، نوع باکتری و اثر تعاملی آن‌هادر تمامی نمونه‌های تیمارشده معنی دار می‌باشد. در غلظت خاص آلاینده، با افزایش زمان ماند، کدورت نمونه‌هابیش‌تر شده که این میزان افزایش از غلظت ۰/۱ تا ۱ درصد چشمگیرتر از غلظت ۱ تا ۳ درصد آلاینده است.افزایش غلظت از ۳ درصد به بالا موجب کاهش کدورت در برخی نمونه‌ها شده که می‌تواند کاهش راندمان حذف میکروبی آلاینده در این غلظت را به دنبال داشته باشد. سه سوش جدا شده نسبت به سایر سوش‌ها در کلیه غلظت‌ها و زمان‌های ماند کدورت بیشتری ایجاد کردند.

**بحث و نتیجه‌گیری:** در بین سه سوش جداشده، بیش‌ترین کدورت ایجاد شده به باکتری شماره ۳ مربوط بود که پس از شناسایی، به‌عنوان *سودوموناس* آیروژنز، گزارش شد. این باکتری به‌عنوان بهترین تجزیه کننده گازوییل از خاک‌های آلوده در شرایط آب و هوایی شهر همدان انتخاب شد.

**واژه‌های کلیدی:** زیست پالایی، آلودگی خاک، گازوییل، باکتری، *سودوموناس* آیروژنز، همدان

*نویسنده مسؤول مکاتبات

**مقدمه**

خاک یکی از منابع مهم و ارزشمند طبیعت است، که ۹۵ درصد غذای انسان‌ها از آن بدست می‌آید. با توجه به محدود بودن منابع خاک، آلودگی خاک از انواع مهم آلودگی‌های زیست محیطی به شمار می‌رود (۱).آلودگی خاک توسط نفت و محصولات نفتی مانند بنزین و گازوییل، به عنوان یکی از شایع‌ترین و جدی‌ترین مشکلات محیط زیست شناخته شده است (۲). از پیامدهای آلودگی نفتی می‌توان به حذف پوشش‌های گیاهی و در نتیجه فرسایش خاک و خالی شدن ساختار اجتماعات گیاهی، افزایش نفوذپذیری خاک نسبت به آلاینده‌ها و در آخر، آلودگی منابع آب‌های سطحی و زیرزمینی اشاره نمود (۳). زیست پالایی خاک‌های آلوده به مواد نفتی با روش‌های تحریک زیستی و تلقیح نوع خاص یا گونه‌های مختلف باکتری به محیط خاک انجام می‌شود (۴ و ۵). از آنجایی‌که گازوییل به عنوان یکی از پر مصرف‌ترین و کاربردی‌ترین محصولات نفتی در ایران و بسیاری از کشورها مطرح است، حجم در خور توجهی از آن در مخازن زیرزمینی و ایستگاه‌های سوخت نگهداری می‌شود و در اثر نشت از این مخاز نمی‌تواند خاک و آب‌های زیرزمینی مجاور را آلوده کند. از این رو در این تحقیق، حذف زیستی گازوییل به عنوان یک آلاینده هیدروکربنی که جزو آلاینده‌های زیست محیطی خاک نیز محسوب می‌شود، بررسی خواهد شد.

خان و همکاران در تحقیقی با عنوان مطالعه بر روی پتانسیل حذف زیستی نفت توسط باکتری *باسیلوس* جدا شده از خاک‌های آلوده به نفت در هندوستان نشان دادند که باکتری‌ها حداقل ۲۷ درصد از آلودگی خاک آلوده به نفت را پس از انکوباسیون طی ۷ روز مورد تخریب و تجزیه زیستی قرار می‌دهند (۶). در تحقیقی با عنوان اصلاح هیدروکربن‌های خاک‌های آلوده به نفت خام در آفریقای جنوبی که توسط اوجو انجام شد، بررسی‌ها نشان داد میکروارگانیسم‌های خاک قادر به پاک‌سازی زیستی خاک‌های آلوده به نفت خام هستند و می‌توانندآلودگی خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌ها را مورد تجزیه زیستی قرار دهند (۷). در تحقیقی دیگر، ۳۶۸ سویه متعلق به نژاد *باسیلوس* از نمونه‌های جمع آوری شده از بیابان گزارش شده است (۸). بر اساس سایر مطالعه‌های انجام گرفته، کارایی روش تلقیح باکتری بومی جداسازی شده از محیط آلوده و بکارگیری آن در زمینه زیست پالایی آلاینده گازوییل در خاک ثابت شده است (۹). علت این امر افزایش میزان سوخت و ساز و سازگاری ژنتیکی جمعیت میکروبی در محیط زیست خودشان گزارش شده است که نقش به سزایی در موفقیت زیست پالایی محیط‌های آلوده دارد (۱۰). با توجه به این‌که فلور میکروبی خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی، در شرایط آب و هوایی 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، و با توجه به عدم انجام پژوهش مشابه در شرایط آب و هوایی شهر همدان، لزوم انجام این تحقیق در شرایط آب و هوایی شهر همدان و تحت شرایط مختلف زیست میکروبی احساس می‌شود. هدف از این پژوهش، در مرحله اول جداسازی باکتری‌های بومی موجود در خاک‌های آلوده به گازوییل شهر همدان، بررسی توانایی این باکتری‌ها در تجزیه زیستی گازوییل به عنوان منبع کربن و در آخر تعیین ویژگی‌ها و شناسایی باکتری‌های دارای توان زیست پالایی می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

### محل نمونه برداری

حدود ۱۰ منطقه از مناطق آلوده به گازوییل شهر همدان به شکل تصادفی انتخاب شد. تعمیرگاه‌های ماشین آلات سنگین، اطراف مخازن گازوییل و لکه‌های نفتی خاک اطراف جاده‌های شهر همدان به عنوان محل نمونه‌برداری در نظر گرفته شد.

### جمع آوری نمونه‌های خاک آلوده به گازوییل

جمع آوری نمونه‌ها در فصل بهار و از عمق صفر تا ۲۰سانتی‌متری مناطق آلوده انجام شد. نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده، در پاکت‌های یک بار مصرف قرار داده و برای انجام آزمایش‌های میکروبی به آزمایشگاه منتقل شد.

### آماده‌سازی نمونه‌ها

نمونه‌های خاک پس از جداسازی ریشه‌ها و مواد زاید، از الک دو میلی‌متری عبور داده شد و به‌طور کامل با هم مخلوط شدند، سپس تا زمان انجام آزمایش‌ها در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

### تهیه محیط‌های کشت باکتری

#### محیط کشت نوترینت آگار[1]

این محیط کشت، یک محیط مغذی محتوی آگار است که طبق دستور شرکت سازنده تهیه شد. سپس در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع به مدت ۱۵ دقیقه سترون و پس از رسیدن تا دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در پلیت‌های استریل توزیع شد. پس از انعقاد محیط‌های کشت شده، پلیت‌ها به مدت۲۴ ساعت در حرارت ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند (۱۱).

#### محیط کشت نمکی حداقل[2]

این محیط کشت، حاوی حداقل نمک‌های مغذی و ضروری برای رشد باکتری‌ها می‌باشد (جدول ۱). این محیط، پس از تهیه، در لوله‌های سایز بزرگ به میزان ۱۰ میلی‌لیتر توزیع شد و پس از پنبه‌گذاری و فویل‌گذاری درب لوله‌ها، لوله‌ها در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد وفشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع به مدت ۱۵ دقیقه سترون شدند.

جدول ۱- ترکیب نمک‌های موجود در محیط کشت نمکی حداقل

| ماده | کلرید آمونیوم | سولفات آهن | سولفات منیزیم | فسفات سدیم | کلرید کلسیم | کلرید پتاسیم | کلرید سدیم |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| غلظت درمحیط کشت (گرم بر لیتر) | ۲ | ۱ | ۲ | ۲ | ۰/۱ | ۰/۸ | ۰/۸ |

### تهیه رقت‌های مختلف نمونه‌های خاک

برای تهیه رقت‌های مختلف، ابتدا یک گرم از نمونه خاک آلوده را وزن کرده و برای تهیه رقت‌های مختلف در ۱۰ میلی‌لیترآب مقطر استریل حل شد، تا رقت $10^{-1}$ از نمونه بدست آید، سپس یک میلی‌لیتر از این رقت در ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی حل شده، به مدت یک دقیقه روی شیکر لوله ای قرار داده شد تا رقت $10^{-2}$ از نمونه تهیه شود. به همین ترتیب رقت‌های متوالی کاهشی از $10^{-3}$ تا $10^{-9}$ تهیه شد (۱۲).

### کشت نمونه‌های رقیق شده

در این مرحله به دسته پلیت‌های استریل سه تایی، یک میلی‌لیتر از هر رقت اضافه شد. سپس در هر یک از پلیت‌های فوق به میزان ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت آگار سترون، حاوی عصاره مخمر اضافه و

به‌طور کامل با نمونه مخلوط شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از این مدت کلونی‌های تشکیل شده در سطح پلیت قابل رویت و جداسازی بود (۱۳).

**جداسازی پرگنه‌ها**

پس از طی دوره انکوباسیون پرگنه‌های رشد کرده بررسی و مشاهده شدند. پرگنه‌های مشاهده شده، توسط لوپ استریل در کنار شعله، به پلیت‌های حاوی نوترینت آگار، برای خالص‌سازی منتقل شدند (۱۴). به این ترتیب دوباره پلیت‌های حاوی کشت خالص به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. شایان ذکر است در این مطالعه، خالص‌سازی میکروارگانیسم‌های جدا شده به روش کشت خطی انجام شد (۱۲).

**گروه بندی کشت‌های خالص**

بر اساس ویژگی‌های ریخت شناسی از جمله رنگ، اندازه، کناره، ارتفاع و قوام کلونی و انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی از جمله کاتالاز، اکسیداز، گرم، اندول و سیترات کشت‌های خالص شده گروه بندی شد.

**سترون‌سازی گازوییل**

برای این‌که در نمونه‌های تیماری فقط عملکرد باکتری تلقیح شده بررسی شود، بایدگازوییل مصرفی ابتدا سترون شود. از آن‌جا که حرارت ممکن است موجب فراریت بخشی از مواد سازنده گازوییل‌شود، عمل سترون‌سازی به کمک فیلتراسیون و با صافی‌های نیتروسلولزی سترون با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرون انجام شد (۱۱).

**بررسی پتانسیل حذف آلاینده توسط سوش‌های باکتریایی جدا شده**

**تیمار محیط کشت حداقل با غلظت‌های مختلف آلاینده و انواع سوش‌های باکتریایی**

ابتدا از هر سوش یک پرگنه به عنوان نماینده انتخاب شد. به منظور بالابردن جمعیت باکتری در زمان تلقیح، ابتدا باکتری در محیط نوترینت براث کشت داده،پس از رسیدن به کدورتی معادل (۰/۱ تا ۰/۰۸)، رسوبی از باکتری تهیه شد (۱). سپس به محیط کشت نمکی حداقل تهیه شده و غلظت‌های مختلف گازوییل سترون شده (۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۳ درصد) و هریک از رسوبات حاصل از سوش‌های باکتریایی متفاوت اشاره شده در همین بخش، اضافه شد. لوله‌های فاقد باکتری به عنوان شاهد به ازای هر غلظت از آلاینده تهیه شد (۱۵). سپس محیط کشت‌های به مدت چهار هفته و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در گرم خانه مجهز به شیکر گرماگذاری شدند (۱۶). برای کنترل آلودگی ثانویه، تیمارها در هر نوبت کنترل کدورت نمونه‌ها، یک قطره از نمونه دوباره بر روی محیط کشت آگار مغذی کشت داده، پرگنه باکتری‌ها با باکتری اولیه مقایسه شدند.

**بررسی میزان کدورت نمونه‌ها**

میزان رشد توده میکروبی نمونه‌های تیمارشده از طریق بررسی کدورت نمونه‌ها ارزیابی شد. برای این منظور، میزان جذب نوری نمونه‌ها، طی مدت چهار هفته، در فاصله‌های زمانی مختلف (لحظه زمان صفر قرائت باکتری تلقیح شده به محیط کشت، هفته اول، هفته دوم، هفته سوم و هفته چهارم) از طریق بررسی کدورت حاصله توسط دستگاه اسپکتوفتومتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۱۲، ۱۷، ۱۸ و ۱۹).

**تحلیل آماری نتایج بدست آمده**

مقایسه مقادیر حاصل از سنجش کدورت نمونه‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS، نسخه ۱۹ از طریق آزمون آماری تحلیل واریانس چندعاملی انجام شد (۲۰).

## شناسایی باکتری‌های دارای پتانسیل حذف گازوییل

باکتری‌هایی که در محیط ذکر شده، بیشترین کدورت را در زمان‌ها و غلظت‌های مختلف آلاینده ایجاد کردند، به‌عنوان شاخص میکروبی تجزیه کننده گازوییل در شهر همدان انتخاب شدند. این باکتری‌ها طبق دستور کتاب راهنمای برگی، شناسایی شدند.

## نتایج

### نتایج حاصل از جداسازی باکتری‌های موجود در خاک‌های آلوده

پس از کشت خاک‌های جمع آوری شده از مناطق آلوده به گازوییل اطراف شهر همدان و جداسازی باکتری‌های آن‌ها، براساس ویژگی‌های ماکروسکوپی و تفاوت در ظاهر کلونی‌های ایجاد شده (جدول ۲) و همچنین، براساس نتایج حاصل از آزمایش‌ها و آزمایش‌های بیوشیمیایی (جدول ۳)، ۱۰ سویه مختلف باکتریایی در خاک‌های آلوده به گازوییل شهر همدان جداسازی و به عنوان باکتری‌های تجزیه کننده گازوییل از شماره ۱ تا ۱۰ نام‌گذاری شدند[۳] ($DDB_{1-10}$).

جدول۲- بررسی ویژگی‌های ریخت شناسی کلونی باکتری‌های جداسازی شده

| آزمایش‌ها | $DDB_1$ | $DDB_2$ | $DDB_3$ | $DDB_4$ | $DDB_5$ | $DDB_6$ | $DDB_7$ | $DDB_8$ | $DDB_9$ | $DDB_{10}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ریخت شناسی | باسیل | کوکو باسیل | باسیل | کوکسی | کوکسی | کوکسی | باسیل | باسیل | کوکو باسیل | کوکسی |
| رنگ کلونی | شیری رنگ | شیری رنگ | شیری رنگ | کرم روشن | کرم روشن | سفید | کرم روشن | سفید | صورتی | سفید |
| اندازه کلونی | متوسط | کوچک | متوسط | متوسط | کوچک | کوچک | متوسط | متوسط | کوچک | کوچک |
| کناره کلونی | صاف | ناصاف | ناصاف | ناصاف | ناصاف | صاف | ناصاف | صاف | صاف | صاف |
| ارتفاع کلونی | غیر محدب | محدب | محدب | غیر محدب | غیر محدب | محدب | غیر محدب | محدب | محدب | محدب |
| قوام کلونی | کره ای | غیرکره ای | کره ای | کره ای | کره ای | کره ای | کره ای | غیرکره ای | غیرکره ای | کره ای |

جدول۳-بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی کلونی باکتری‌های جداسازی شده

| باکتری‌های مورد آزمایش | $DDB_1$ | $DDB_2$ | $DDB_3$ | $DDB_4$ | $DDB_5$ | $DDB_6$ | $DDB_7$ | $DDB_8$ | $DDB_9$ | $DDB_{10}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| گرم | − | + | + | − | + | − | − | − | + | − |
| کاتالاز | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| تحرک | + | + | + | + | + | − | + | + | + | − |
| اسپور | + | + | + | + | + | − | + | + | + | − |
| اکسیداز | + | + | + | + | + | + | − | − | − | − |
| سیترات | + | − | + | + | + | + | + | + | − | + |
| اندول | + | − | − | + | − | + | − | + | − | − |
| لاکتوز | − | + | + | − | + | − | − | − | + | − |

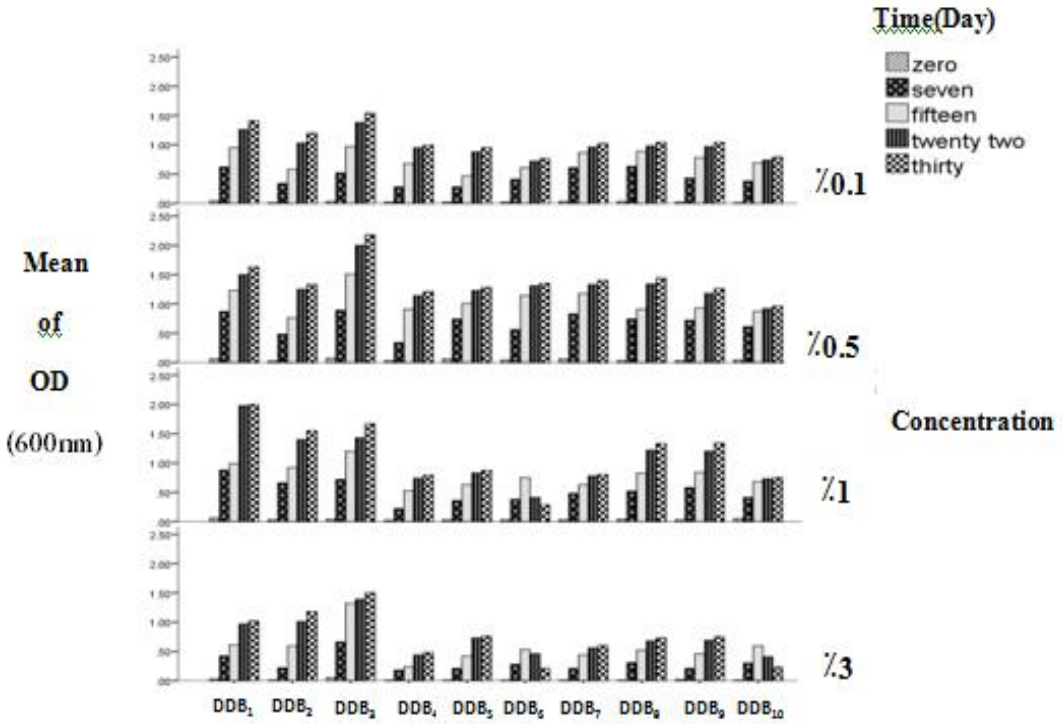
## نتایج حاصل از بررسی میزان کدورت تیمارها

### بررسی میزان کدورت در زمان‌های مختلف

پس از تیمار محیط‌های کشت حداقل نمکی با غلظت‌های مختلف آلاینده و سوش‌های مختلف باکتریایی، میزان کدورت حاصل در چهار هفته متوالی به این شرح بود: در یک غلظت خاص با افزایش زمان تا هفته سوم کدورت نمونه‌ها بیش‌تر شده و این میزان افزایش از غلظت ۰/۱ تا ۱ درصد چشمگیرتر از غلظت ۱ تا ۳ درصد آلاینده است. در یک غلظت خاص پس از هفته سوم افزایش کدورت متوقف یا کاهش یافته است. کاهش کدورت نمونه‌ها از هفته سوم به بعد در مورد غلظت سه درصد آلاینده بیش‌تر مشاهده شده است (نمودار ۱).

### بررسی میزان کدورت در غلظت‌های مختلف آلاینده

با افزایش غلظت از ۰/۱ تا ۳ درصد کدورت نمونه‌هابیش‌تر شده است. افزایش غلظت از سه درصد به بالا موجب کاهش کدورت در برخی نمونه‌ها شده که می‌تواند کاهش راندمان حذف میکروبی آلاینده در این غلظت را به دنبال داشته باشد (شکل ۱).




شکل ۱- نمودار بررسی کدورت حاصله از تیمارهای باکتریایی (۱۰ سویه باکتری جداسازی شده) در غلظت‌های مختلف آلاینده و زمان‌های مختلف

### بررسی میزان کدورت درتیمارهای باکتریایی متفاوت

در غلظت ۰/۱ درصد آلاینده: به‌ترتیب باکتری‌های (۳، ۱ و ۲) و در نهایت، سایر باکتری‌ها بیش‌ترین میزان کدورت را نشان دادند.

در غلظت ۰/۵ درصد آلاینده: به‌ترتیب باکتری‌های (۳ و ۱) و در نهایت، سایر باکتری‌ها بیش‌ترین میزان کدورت را نشان دادند.

در غلظت یک درصد آلاینده: بهترتیب باکتری‌های (۱، ۳ و ۲) و در نهایت، سایر باکتری‌ها بیش‌ترین میزان کدورت را نشان دادند.

در غلظت سه درصد آلاینده: به ترتیب باکتری‌های (۳، ۲ و ۱) و در نهایت، سایر باکتری‌ها بیش‌ترین میزان کدورت را نشان دادند.

بنابراین، پس از کشت جداگانه این باکتری‌ها در محیط نمکی حداقل، حاوی غلظت‌های مختلف گازوییل، سه سویه (باکتری ۲، باکتری ۳ و باکتری ۴) از باکتری‌های جداسازی شده در غلظت یک درصد و دو سویه (باکتری ۳ و باکتری ۴) در سایر غلظت‌ها (۳، ۱ و ۰/۵ درصد) قادر به کدورت بودند و کدورت در خور توجهی در محیط کشت ایجاد نمودند، در حالی‌که سایر سویه‌های جداسازی شده، در غلظت‌های فوق رشد نکردند (شکل ۱).

**شناسایی باکتری‌های دارای پتانسیل حذف گازوییل**

در نهایت سویه باکتریایی شماره ۳ که بالاترین میزان کدورت را در محیط کشت ایجادکرده بود، به عنوان باکتری شاخص مصرف کننده گازوییل در خاک‌های آلوده شهر همدان انتخاب شد. این سویه در مرحله پایانی با انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی مختلف طبق دستور برگی شناسایی شد (۲۱). با استفاده از کلیدهای شناسایی باکتری‌ها (جدول‌های ۲، ۳ و ۴) این سویه شناسایی و به عنوان *سودوموناس* آیروژنز[۴]، گزارش شد.

جدول۴- نتایج آزمایش‌های تخصصی انجام شده برای شناسایی نهایی جدایه (باکتری ۳) تجزیه کننده گازوییل

| آزمایش | حساسیت به KOH | کاتابولیسم اکسیداسیون | اکسیداز | آزمایش لوان | آزمایش سیترات | هیدرولیز نشاسته | هیدرولیز کازیین |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| نتیجه | + | + | + | − | + | − | − |
| آزمایش | تحرک | آزمایش متیل رد | آزمایش وگوس-پروسکویر | هیدرولیز اوره | لیپاز | مصرف ژلاتین | فسفات |
| نتیجه | + | − | − | + | + | + | + |
| آزمایش | اندول | تولید H2S از سیستیین | تولید کتولاکتوز | دی آمیناز فنیل آلانین | تولید گاز از گلوکز | تولید اسید از گلوکز | فعالیت پکتولیتیکی |
| نتیجه | − | + | − | + | − | + | − |
| آزمایش | دکربوکسیلاز لیزین | کاتالاز | رشد در دمای چهار درجه | رشد در دمای ۴۱ درجه | مقاومت به نمک سه درصد | مقاومت به نمک پنج درصد | مقاومت به نمک ۷ درصد |
| نتیجه | − | + | − | + | + | + | + |

## بحث و نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان دادکه در خاک‌های آلوده به گازوییل شهر همدان باکتری وجود دارد. به این معنی که آلودگی با ترکیبات نفتی و گازوییل مانع از رشد باکتری‌ها در خاک و محیط‌های آلوده به ترکیبات نفتی (گازوییل) نمی‌شود. نتایج حاصل از پژوهش جاری، با نتایج به دست آمده توسط پژوهشگران متعدد پیشین همسو است و آن‌ها نیز توانسته‌اند از خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی، باکتری‌ها را جداسازی کنند. این امر بیانگر این مسئله است که باکتری‌ها قادر به تحمل ترکیبات نفتی در غلظت‌های موجود در خاک‌های

آلوده هستند و ممکن است در تجزیه ترکیبات نفتی در شرایط مختلف آب و هوایی مؤثرباشند (۱۹ و ۲۲).

نتایج ما نشان داد که باکتری‌های جداسازی شده نسبت به غلظت‌های پایین گازوییل مقاوم هستند و تعداد بیش‌تری از سویه‌های باکتریایی قادر به تحمل غلظت‌های پایین گازوییل هستند. این امر می‌تواند ناشی از تفاوت‌های ژنتیکی و در نتیجه تفاوت در سیستم آنزیمی آن‌ها باشد. به‌طوری‌که غلظت‌های بالای گازوییل (پنج درصد) از آستانه تحمل ژنتیکی برخی از باکتری‌ها فراتر است؛ اما در مقابل، سویه ۳، غلظت‌های بالاتری از گازوییل را تحمل می‌کند. تفاوت در آستانه تحمل ژنتیکی باکتری‌های جداسازی شده از خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی توسط پژوهشگران متعدد گزارش شده است (۱۰، ۱۵ و ۲۳).

پژوهش‌های متعددی در دست است که نشان می‌دهد سویه‌های مختلف باکتریایی نه تنها نسبت به آلودگی‌های با ترکیبات نفتی و مشتقات آن مقاوم هستند، بلکه برخی از آن‌ها قادرند از ترکیبات نفتی به‌عنوان منبع کربن و ماده غذایی استفاده کنند و بنابراین، وجود آلودگی نفتی و مشتقات آن نه تنها مانع رشد آن‌ها نمی‌شود بلکه وجود آن‌ها موجب رشد بیشتر و سریع‌تر باکتری‌های مقاوم می‌شود. کایریمورا و همکاران (۱۹۹۹) در پژوهشی موفق به جداسازی سویه اسفینگوموناساز خاک‌های آلوده شدند که قادر بود از کربازول و سایر ترکیبات نفتی ازقبیل ان– هگزا دکان استفاده غذایی کنند. نتایج آزمایش آن‌ها نشان داد که با افزایش تعداد و رشد باکتری (افزایش کدورت محیط کشت) میزان تجزیه مواد نفتی افزایش می یابد. امتیازی و همکاران (۲۰۰۵) نیز تجزیه ترکیبات مختلف نفتی به‌وسیله سویه‌ای از *پزودوموناس* در مدت زمان ۹ روز از طریق سنجش منحنی رشد باکتری را در طول موج ۶۰۰ نانومتر بررسی نمودند و کارایی آن را در تجزیه ترکیبات نفتی نشان دادند.

نتایج تحلیل آماری نشان داد که عامل زمان، غلظت و سوش باکتریایی و اثر تعاملی آن‌ها در سطوح (۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۳ درصد) در تمام تیمارها معنی‌دار است و تمام باکتری‌ها در غلظت‌های مختلف آلاینده و زمان‌های مختلف قادر به رشد بودند. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت باکتری‌های جداشده نسبت به آلودگی خاک با گازوییل مقاوم هستند که در بین آن‌ها باکتری ۳ از مقاومت بیش‌تری برخوردار بود. توان رشد این باکتری و نیز توان تجزیه گازوییل در غلظت‌های مختلف بررسی شد. نتایج این بررسی نشان داد که باکتری ۳ در غلظت ۰/۵ درصد بیش‌ترین کدورت را دارد و از بین سایر باکتری‌های جداسازی شده به عنوان باکتری شاخص تجزیه کننده گازوییل در خاک‌های آلوده شهر همدان معرفی می‌شود. با توجه به این‌که توان رشد و قابلیت تجزیه باکتری‌ها علاوه بر تراکم آلاینده به شرایط محیطی و آب و هوایی نیز بستگی دارد (۱۱)، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که باکتری ۳ در شرایط آب و هوایی منطقه همدان قابلیت استفاده در تجزیه گازوییل و پاک‌سازی خاک‌های آلوده به گازوییل را دارد. با توجه به موارد فوق به جا است که با اندازه‌گیری میزان کارایی این باکتری در تجزیه زیستی انواع ترکیبات نفتی از جمله گازوییل، از طریق اندازه‌گیری میزان آلاینده باقیمانده در انتهای آزمایش، با روش‌های مناسب از قبیل استفاده از گاز کروماتوگرافی (GC)، نسبت به کاربردی کردن نتایج این پژوهش اقدام شود.

## References:


(1) Mandri T, Lin J. Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microorganism in Kwazulunatal, south africa. *African J of Biotechnol* 2007; 6(1): 023-7.

(2) Udeani TKC, Obroh AA, Azubike N. Isolation of bacteriafrom mechanic workshops soil environment cntaminated with used engine oil. *AfricanJBiotechnol* 2009; 8(22): 6301-03.

(3) Schaefer M, Seren O, Petersen J. Effects of *Lumbricusterrestris*, *Allolobophorachlorotica* and *Eiseniafetida* on microbial community dynamicsin oil-contaminated soil. *SoilBiology&Biochemistry*2005; 37: 2065.

(4) Margesin R, Zimmerbauer A, Schinner F. Monitoring of bioremediation bysoil biological activities.*Chemosphere* 2000; 40: 339-46.

(5) Vogel T M. Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. *Current Opinion in Biotechnology* 1996; 7: 311-16.

(6) Khan JA, Rizvi SHA. Isolation and characterization of microorganism contaminated sites. *Adv In Applied Sci Res* 2011; 2(3):455-60.

(7) Ojo AO. Petroleum hydrocarbon utilization by native bacterial population from a wastewater canal South west Nigeria African. *J Biotechnol* 2006; 5(4): 333-7.

(8) Sorkhoh NA, Ibrahim AS, Ghannouin MA. High temperature hydrocarbon degradation by *Bacillus stearothermophilus* from oil polluted Kuwait desert. *Applied Microbiology and Biotechnolog*1993; 39: 123-6.

(9) Ijah UJJ, Antai SP. Removal of nigerian light crude oil in soil over a 12-month period. *International Biodeterioration& Biodegradation;* 2003; 51: 93-9.

(10) Okoh, A.I., Trejo-Hernandez, M.R. Remediation of petroleum polluted systems: Exploiting the bioremediation trategies. African Journal of Biotechnology 2006; 5(25): 2520-25.

(11) Mohsenzadeh F, Nasseri S, Mesdaghinia A, Nabizadeh R, Zafari D, Chehregani A. Phytoremediation of petroleum contaminated soils: Prescreening for suitable plants and rhizospheral fungi. *Toxicological & Environmental Chemistry* 2009; 91(8): 1443-53.

(12) Talaie AR. Parametric study of petroleum compounds biodegradation using microorganisms.[Dissertation] Islamic Azad *University*, Science and Research Branch, Ahvaz.; 2008.

(13) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater19th ed*, New Yourk: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 1998.

(14) Fredrickson JK. & D.L. Balkwill. Sampling and enumeration techniques. In: Burlage R S, Atlas R, Stahl D, Geesey G & Sayler G (Eds). Techniques in Microbial Ecology (pp 239-254), New Yourk: Oxford University Press, 1998.

(15) Mittal A, Singh P. Isolation ofhydrocarbon degrading Bacteria from soilscontaminated with crude oil spills. *Indian J Exp Biology* 2009; 47:760-5.

(16) Bradford MM.A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-54.

(17) Marquez-Rocha FJ, Hernandez-Rodri V, Teresa-Lamela M. .Biodegradation of diesel oil in soil by a microbial consortium. *Water, Air, and Soil Pollution;* 2001; 128 (3-4): 313-320.

(18) Delille D, Bassères A, Dessommes AA. Effectiveness of bioremediation for oil-polluted Antarctic sea water.*PolarBiol*1998; 19: 237–41.

(19) Emtiazi G, Shakarami H, Mirdamadian SH. Utilization of petroleum hydrocarbonsby Pseudomonas sp.And transformed Escherichia coli. *Africa Journal of Biotechnology* 2005; 4(2): 172-6.

(20) Daneshvar N, Khataee AR, Rasoulifard M, Pourhassan M. Biodegradation of dye solution containing Malachite Green: Optimization of effective parameters using Taguchi method. *Journal of Hazardous Materials* 2007; 143 (1-2): 214-9.

(21) *Bergey's Manual Trust*; Manual of systematic Bacteriology. Second edition, 2004. Available at: http://mibi.unimuenster.de/imperia/md/content/biologie_immb/_v/download/fgmtaxonomiews10-11/bergey.pdf

(22) Norris RD, Hinchee RE, Brown RA, McCarty PL, Semprini L, Wilson JT, et al. *Hand book of Bioremediation*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1994.

(23) Kirimura K, Nakagawa H, Tsuji K, Kazuya M, Kurane R, Usami Sh. Selective and continuous degradation of carbazole contained in petroleum oil by resting cells of *Sphingomonas sp.CDH-BiosciBiotechnolBiochem*1999; 63(9): 1563-68.

[1]. Nutrient agar
[2].Minimal salt medium
[3]. Diesel-degrading bacteria
[4]. *Pseudomonas aerogenesis*

# A Study on potential microbial removal of diesel oil from contaminated soil in Hamedan city

**Fariba Mohsenzadeh** *
Assistant professor of Environmental Health Engeenering, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran, fmohsenzade@gmail.com
**Nastaran Ahmadi Masoud**
M.Sc. student of Environment pollutions, Islamic Azad University, Hamedan, Iran, nastaranahmadimasood@yahoo.com

## Abstract

**Introduction:** Environmental contamination with petroleum is an important issue. Diesel oil is a common pollutant. Bioremediation is a new technology to clean up soils. This study was aimed to achieve microorganisms with power of soil cleaning.

**Materials and Methods:** The bacteria of the contaminated soil with diesel oil were isolated based on morphological and biochemical characteristics. The degradation ability of the isolated bacteria was checked for the consumption of diesel fuel in the minimal salt medium containing different concentrations of diesel fuel (0.1, 0.5, 1 and 3%). Through the checking process, the turbidity due to the bacterial growth with the control tubes was compared.

**Results:** In the study, 10 different bacterial strains were found. Turbidity measurement results showed that the factors of time, concentration of the pollutant, bacterial strains and interactions between them were significant in all treated samples. In a particular pollutant concentration, as the time passed, the turbidity of the samples was exceeded. The increase rate of turbidity in the concentrations 0.1-1% was more dramatic than the 1-3% concentrations. 3 of the isolated strains in all concentrations caused a higher turbidity than other strains.

**Discussion and Conclusion:** In the treated samples, the maximum turbidity was caused by the bacterium number 3, which late on, was identified as *Pseudomonas aerogenesis*. This bacterium was chosen as the best diesel oil degrader of the polluted soils with respect to the climatic conditions of as Hamedan's.

**Key words**: Bioremediation, Soil pollution, Diesel fuel, Bacterium, *Pseudomonas aerogenesis*, Hamedan

* Corresponding Author
**Received:** October 29, 2012/ **Accepted:** December 29, 2012