نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۷، شماره ۲، خرداد – تیر ۱۳۹۲، ص. ۲۶۵-۲۵۷

Journal of Water and Soil
Vol. 27, No.2, May-Jun 2013, p. 257-265

تجزیه زیستی نرمال– هگزادکان در خاک بوسیله گونه‌های سودوموناس و برخی باکتری‌های بومی مناطق آلوده به نفت

سپیده سعیدی[1*]– امیر فتوت[2]– امیر لکزیان[3]

تاریخ دریافت:۱۳۹۰/۵/۱
تاریخ پذیرش:۱۳۹۲/۱/۲۴

چکیده

تجزیه زیستی نرمال – هگزادکان به وسیله باکتری‌ها به عنوان یکی از روش‌های مهم زیست پالایی مطرح می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی تجزیه زیستی نرمال – هگزادکان با سطح آلودگی ۲۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوسیله باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*)، *پوتیدا* (*Pseudomonas putida*) و باکتری‌های بومی مناطق آلوده در حضور منبع غذایی N:P:K (شامل سه نوع کود اوره با ۴۶٪ نیتروژن، فسفات آمونیوم با ۲۱٪ نیتروژن و ۴۶٪ فسفر و سولفات پتاسیم با ۴۰٪ پتاسیم) در شرایط آزمایشگاهی بوده است. آزمایش به صورت طرح آماری فاکتوریل در قالب کاملاً تصادفی (چند مشاهده‌ای) با سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل شش سطح باکتری (*سودوموناس آئروژینوزا* (*PA*) و *پوتیدا* (*PP*)، سه جدایه از مناطق آلوده اهواز (*IA*)، سرخس (*IS*) و تهران (*IT*) و بدون باکتری)، دو سطح کود شیمیایی (صفر و دو تن در هکتار) دو محیط خاکی (استریل (SS) و غیراستریل (NS)) و دو بازه زمانی (۳۰ و ۶۰ روز) بود. سپس در نمونه‌های مورد مطالعه میزان کربن آلی کل (TOC) خاک بعنوان شاخص تجزیه نرمال – هگزادکان اندازه‌گیری شد. نتایج بدست آمده از آزمایش نشان داد که تجزیه نرمال – هگزادکان در خاک‌های غیراستریل بیشتر از خاک‌های استریل بود. بیشترین میزان تجزیه نرمال – هگزادکان توسط جدایه سرخس صورت گرفت و میزان تجزیه توسط این جدایه در حضور ماده غذایی به ۴۵٪ رسید در حالیکه میزان تجزیه در عدم حضور ماده غذایی کمتر بود (تقریباً یک سوم). بررسی‌ها نشان داد که با افزایش زمان، میزان تجزیه نرمال – هگزادکان در بین جدایه‌های باکتری افزایش معنی‌داری داشت. میزان تجزیه نرمال – هگزادکان در حضور تیمار کودی NPK پس از ۶۰ روز، ۴ برابر تیمار بدون کود بود.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های سودوموناس، تجزیه زیستی، نرمال هگزادکان

مقدمه

در حال حاضر ایران یکی از بزرگترین تولید کننده‌های نفت در جهان است و در حدود ۹ درصد از نفت جهان را در اختیار دارد. سطح تولید فعلی نفت ایران در حدود ۴ میلیون بشکه در روز می‌باشد (۲). رشد روز افزون جمعیت و به دنبال آن توسعه پالایشگاه‌ها و صنایع پتروشیمی موجب افزایش فعالیت‌های حفاری چاههای نفت و گاز و استخراج پی در پی نفت و انتقال آن به پالایشگاه‌ها و سپس انتقال فراورده‌های نفتی به مکان‌های مصرف می‌گردد. رعایت الزامات زیست محیطی و از سوی دیگر رهاسازی ضایعات هیدروکربنی در خاک موجب شده است تا در دهه‌های اخیر مقادیر هنگفتی از آلاینده‌های هیدروکربنی وارد محیط زیست بشود به‌طوری که امروزه آلودگی نفتی به صورت یک معضل جدی در سراسر دنیا مطرح می‌باشد. این هیدروکربن‌های نفتی شامل آلکان‌ها، آروماتیک‌ها و ترکیبات حلقوی آروماتیک (PAH) هستند که در این بین آلکان‌های خطی با زنجیره کربنی متوسط از مهمترین آلاینده‌های موجود در خاک به شمار می‌آیند (۳۲). نرمال–هگزادکان از ترکیبات اصلی سوخت‌های دیزلی است که در بخش آلیفاتیک نفت خام وجود دارد و از جمله آلکان‌های با زنجیره کربنی متوسط و از آلاینده‌های متداول خاک‌های آلوده می‌باشد (۱۱). وجود خاک‌های آلوده به نفت یک خطر جدی برای محیط زیست به شمار رفته و اصلاح آنها امری اجتناب ناپذیر است.

زیست پالایی (کنترل، کاهش یا حذف آلودگی از محیط زیست با استفاده از افزایش فعالیت‌های بیولوژیکی محیط) آلاینده‌های آلی یک روش مفید و مؤثر در جهت اصلاح خاک‌های آلوده به مواد نفتی

۱، ۲ و ۳– به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار و استاد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.
(*– نویسنده مسئول: Email:Sepide.saeidi@gmail.com)

محسوب می‌شود. در این روش میکرواگانیزم‌ها از ترکیبات هیدروکربنی به عنوان کربن و انرژی استفاده کرده و آنها را به آب و دی‌اکسیدکربن تبدیل می‌کنند و حاصل این فرایند کاهش کل هیدروکربن‌های نفتی موجود در خاک می‌باشد (۱۵). میکروارگانیزم‌های متعددی در زیست پالایی نقش دارند که مهمترین آنها عبارتند از: باکتری‌ها: *Staphylococcus* (۲۰)، *Clostridium* (۱)، *Proteus* (۱)، *Pseudomonas* (۲۶)، *Bacillus* (۷)، اکتینومایست‌ها: *Nocardia* (۹)، *Actinomyces* (۲۴) و قارچ‌ها: *Phanerochaete* Chrysosporium (۳۴). در بین میکروارگانیزم‌های فوق، سودوموناس‌ها (*Pseudomonas*) بدلیل داشتن پلاسمیدهای حامل ژن‌های مؤثر در تجزیه ترکیبات نفتی از اهمیت بیشتری برخوردارند (۱). باکتری‌های سودوموناس با تولید بیوسورفکتانت‌های[1] متفاوت و یا با کمک مکانیزم‌های چسبندگی/واجذبی سبب تجزیه و یا حذف هیدروکربن‌ها از خاک می‌شوند (۱۴ و ۲۹).

معمولاً با آلوده شدن خاک به هیدروکربن‌های نفتی مقادیر زیادی کربن آلی به خاک وارد می‌شود که این امر باعث بالا رفتن نسبت C/N در خاک می‌گردد. افزایش مواد غذایی ضروری برای رشد میکروارگانیزم‌ها نظیر کوددهی می‌تواند سبب تعدیل نسبت C/N و نهایتاً افزایش فعالیت باکتری‌های تجزیه کننده هیدروکربن در خاک‌های آلوده به مواد نفتی شود. افزایش فعالیت باکتری‌های تجزیه کننده هیدروکربن با افزودن مواد مغذی یک استراتژی مفید و مؤثر برای تسریع تجزیه آلودگی‌های نفتی در محیط آلوده به نفت به شمار می‌رود (۱۵).

هدف از این پژوهش، مطالعه توان باکتری‌های سودوموناس و باکتری‌های بومی مناطق آلوده به نفت در تجزیه زیستی نرمال هگزادکان و همچنین بررسی تأثیر افزودن کودهای شیمیایی بر میزان تجزیه این هیدروکربن در شرایط آزمایشگاهی بوده است.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به صورت طرح آماری فاکتوریل در قالب کاملاً تصادفی (چند مشاهده‌ای) با سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل شش سطح باکتری (شامل اضافه نکردن باکتری (B0)، باکتری *سودوموناس آئروژینوزا*[2] (*PA*)، *سودوموناس پوتیدا*[3] (*PP*)، جدایه‌ی اهواز (*IA*)، جدایه‌ی سرخس (*IS*) و جدایه‌ی تهران (*IT*))، دو سطح کود NPK (صفر و دو تن در هکتار)، دو محیط خاکی (خاک استریل[4] (SS) و غیراستریل[5] (NS)) و دو بازه زمانی (۳۰ (T1) و ۶۰ (T2) روز) بود. نرمال هگزادکان با خلوص ۹۹/۸ درصد از شرکت مرک (Merck) خریداری شد. باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* از کلکسیون گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد و *سودوموناس پوتیدا* از گروه میکروبیولوژی دانشگاه تهران، تهیه شدند. جدایه‌ی اهواز از خاک‌های آلوده پالایشگاه اهواز، جدایه‌ی سرخس از خاک‌های آلوده پالایشگاه خانگیران و جدایه‌ی تهران از خاک‌های آلوده پالایشگاه تهران جداسازی و خالص‌سازی شدند (۶). کودها شامل سه کود اوره، دی هیدروژن فسفات آمونیوم و سولفات پتاسیم بودند که با نسبت ۲۰:۱۰:۱۰ برای N:P:K استفاده شدند.

خاک مورد استفاده از دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه و پس از هوا خشک کردن، از الک دو میلیمتری عبور داده شد سپس نرمال هگزادکان (Merck) با غلظت ۲۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به نمونه‌های خاک افزوده شد. برای تهیه تیمارها مقدار ۷/۲ کیلوگرم خاک به دو قسمت مساوی تقسیم و نیمی از آن دو مرتبه با فاصله زمانی ۲۴ ساعت برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه در اتوکلاو سترون شد. سپس ۲۳/۳۶ میلی‌لیتر محلول هگزادکان (دانسیته ۰/۷۷) در ۵۰۰ میلی‌لیتر هگزان (Merck) حل شده (به منظور بالا بردن حجم محلول، در نتیجه یکنواختی اسپری به نمونه‌های خاکی) و به دو قسمت تقسیم و هر بخش آن به صورت کاملاً جداگانه، به نمونه‌های خاک استریل و غیراستریل افزوده شد. پس از تبخیر حلال، دو محیط خاکی با غلظت مطلوب و همگن بدست آمد. پس از آلوده سازی خاک‌ها با غلظت مورد نظر، نمونه‌های خاک به مدت دو هفته در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس هر یک از نمونه‌های خاک استریل و غیراستریل به بخش‌های ۱۰۰ گرمی تقسیم و به صورت جداگانه در ظروف مخصوص ریخته شدند. کود شیمیایی در دو سطح ۰ و ۲ تن در هکتار به نسبت ۲۰:۱۰:۱۰ برای N:P:K به تیمارهای مربوطه اضافه گردید. به منظور تلقیح نمونه‌های خاک با جدایه‌های باکتری، جدایه‌های *سودوموناس* بر روی محیط کشت اختصاصی (King B) و باکتری‌های بومی بر روی محیط کشت عمومی (Nutrient Agar) بازکشت شده و سپس در محیط کشت مایع مخصوص در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد و در شیکر چرخشی با ۱۵۰ دور در دقیقه رشد داده شدند. سپس هر یک از جدایه‌های باکتری‌ها به صورت جداگانه (با جمعیت ۳×۱۰^{۱۰} سلول در هر میلی‌لیتر) به مقدار ۲۰ میلی‌لیتر به تیمارها اضافه شدند. خاک‌های تیمار شده در آزمایشگاه تحت شرایط و دمای کنترل شده (۲۸ درجه سانتیگراد) قرار داده شد و در طول ۶۰ روز رطوبت نمونه‌های خاک در حد ۷۰درصد ظرفیت زراعی نگهداری شد. سپس میزان تجزیه نرمال

1- Biosurfactant
2- *Pseudomonas aeruginosa*
3- *Pseudomonas putida*
4- Sterile Soil
5- Non-Sterile Soil

هگزادکان مورد بررسی قرار گرفت.

به منظور بررسی میزان تجزیه کربن آلی از روش والکلی–بلاک استفاده گردید (۳۵). داده‌های حاصل از آزمایش به وسیله نرم افزار MSTAT-C و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن (۴) انجام شد.

نتایج و بحث

برخی ازخصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد مطالعه اندازه-گیری گردید که در جدول ۱ ذکر شده است.

نتایج حاصل از آزمایش نشان داد که شرایط استریل (SS) و غیراستریل (NS) تفاوت معنی‌داری در تجزیه زیستی نرمال هگزادکان نشان دادند، به گونه‌ای که شرایط غیراستریل (NS) نسبت به شرایط استریل (SS) در تجزیه نرمال هگزادکان موفقیت بیشتری به دست آورد و باعث تجزیه ۳۴ درصد و شرایط غیراستریل باعث تجزیه ۱۸/۴ درصد از آلاینده شد (شکل۱). به طور کلی می توان چنین نتیجه گرفت که میکروارگانیزم‌های بومی موجود در خاک مورد مطالعه سازگاری خوبی با آلاینده نشان داده و در تجزیه نرمال هگزادکان موفق‌تر بوده‌اند.

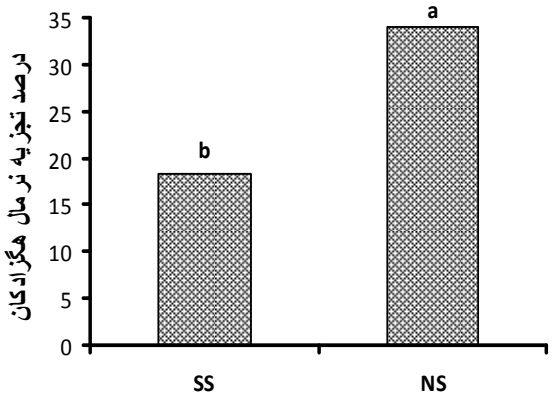
در همین راستا در مطالعه‌ای که رحمان و همکاران (۲۸) در تجزیه زیستی نرمال آلکان‌ها در خاک آلوده به لجن نفتی انجام دادند دریافتند که تأثیر تیمارهای اعمال شده در نمونه‌های خاک غیراستریل نسبت به نمونه‌های استریل بیشتر می‌باشد و ماکزیمم تجزیه بعد از گذشت ۵۶ روز از تیماردهی در نمونه خاک غیراستریل با ۱۰ درصد آلودگی به میزان ۸۷–۸۱ درصد رخ داد آنها این گونه بیان کردند، هنگامی که هیدروکربن‌ها در غلظت‌های بدون بازدارندگی در خاک حضور دارند افزایش فعالیت جمعیت میکروارگانیزم‌های بومی ممکن است سبب افزایش نرخ تجزیه زیستی آلاینده شود به عبارت دیگر، بخشی از میزان تجزیه در شرایط غیراستریل (حضور جدایه‌های بومی و غیربومی) ناشی از فعالیت میکروارگانیزم‌های بومی خاک بوده است.

در بررسی حاضر (اثر ترکیبی شرایط استریل و غیراستریل) مشاهده شد که کلیه جدایه‌های باکتری مورد استفاده، در بازه زمانی ۳۰ روز منجر به تجزیه نرمال هگزادکان شدند ولی میزان تجزیه توسط این جدایه‌ها تفاوت معنی‌داری با هم نداشت. با گذشت زمان میزان تجزیه زیستی آلاینده به طور معنی‌داری افزایش یافت و میزان تجزیه در تمامی نمونه‌ها در زمان ۶۰ روز نسبت به زمان ۳۰ روز تفاوت معنی‌داری را نشان داد (شکل ۲).

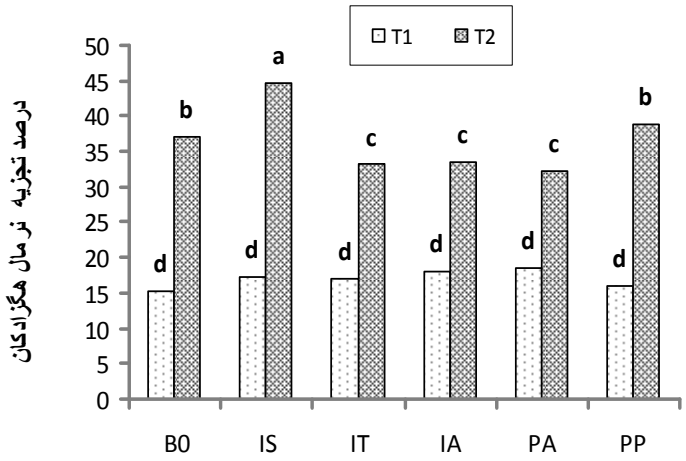
در همین راستا در مطالعه‌ای که آرامسای و همکاران (۸) بر روی رسوبات نفتی منگرو انجام دادند مشاهده کردند که رشد جمعیت باکتری‌های تجزیه کننده آلکان در طول ۱۲۰ روز افزایش چشمگیری نشان داد و در نتیجه میزان تجزیه با گذشت زمان و افزایش جمعیت باکتری‌های تجزیه کننده آلکان افزایش یافت. بعد از گذشت ۱۲۰ روز، جمعیت باکتری‌ها و در نتیجه میزان تجزیه آلاینده کاهش معنی‌داری را نشان داد.

جدول ۱- برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد آزمایش

بافت	ماده آلی (٪)	هدایت الکتریکی (dS/m)	اسیدیته	فسفر (mg/kg)	نیتروژن (٪)	پتاسیم (mg/kg)	آهک (٪)
لوم سیلتی	۰/۳۵	۳/۸	۷/۳	۳/۱۱	۰/۰۲	۹۹	۲۰/۷



شکل ۱ – مقایسه میانگین تجزیه نرمال هگزادکان در شرایط استریل و غیراستریل در بازه زمانی ٦٠ روز. SS: خاک استریل، NS: خاک غیراستریل



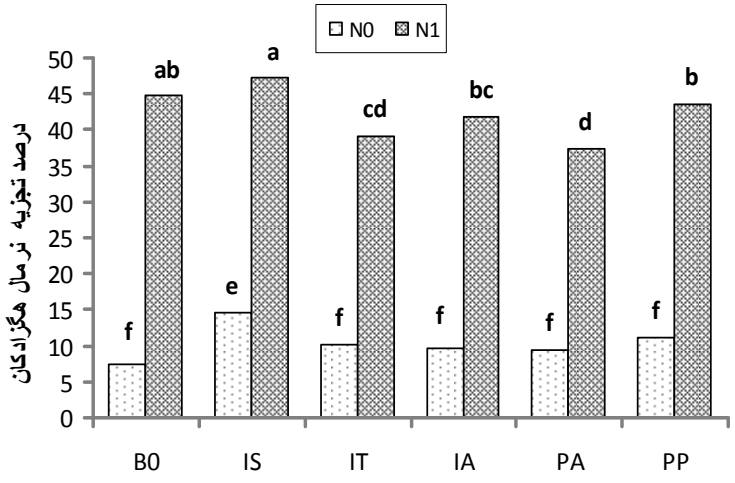
شکل ۲ – مقایسه میانگین برهمکنش‌های باکتری و زمان بر تجزیه‌ی نرمال هگزادکان. T1: زمان سی روز، T2: زمان شصت روز، B0: تیمار شاهد (فاقد باکتری تلقیحی)، IS: جدایه سرخس، IT: جدایه تهران، IA: جدایه اهواز، PA: سودوموناس آئروژینوزا، PP: سودوموناس پوتیدا

کاتسیولا و همکاران (۲۲) نیز در مطالعه‌ای که بر روی تجزیه زیستی خاک‌های کشاورزی آلوده به روغن موتور بصورت درجا (In situ) انجام دادند، دریافتند که تجزیه نرمال آلکان‌ها در طول ۴ ماه اول نسبت به زمان‌های بعدی سریعتر رخ داده است، آنها دلیل این افزایش را به علت موجودیت و جمعیت بالای باکتری‌های فعال گزارش کردند. همچنین در بررسی دیگری که توسط کاپلان و گیتس (۲۱) انجام شد، گزارش شد که تجزیه هیدروکربن‌های نفتی در اراضی تیمار شده در طول دوره اول اصلاح، سریعتر بوده اما در طول فازهای بعدی کاهش یافته است. بنابراین با توجه به نتایج ذکر شده می‌توان چنین نتیجه گرفت که با گذشت زمان جمعیت باکتری‌های تجزیه کننده افزایش و در نتیجه میزان تجزیه به میزان قابل توجهی تسریع می‌گردد.

همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود بعد از گذشت ۶۰ روز بیشترین میزان تجزیه آلاینده مورد مطالعه توسط جدایه سرخس (*IS*) به میزان ۴۵ درصد و کمترین میزان تجزیه توسط *سودوموناس آئروژینوزا* (*PA*) به میزان ۳۲ درصد صورت گرفت. میزان تجزیه توسط سایر جدایه‌های استفاده شده در این مطالعه در بین این دو مقدار بود. نتایج آزمایش همچنین نشان داد که بعد از جدایه سرخس، باکتری *سودوموناس پوتیدا* (*PP*) و تیمار شاهد (*B0*) که دارای باکتری‌های بومی خاک بود به ترتیب منجر به تجزیه ۳۹ و ۳۷ درصد از آلاینده مورد مطالعه شدند. چنین به نظر می‌رسد که میکروارگانیزم-های بومی موجود در خاک مورد مطالعه توانایی بالایی در تجزیه نرمال هگزادکان مطالعه داشته‌اند و با گذشت زمان و ایجاد سازگاری با شرایط محیطی بیشترین میزان تجزیه را نسبت به سایر جدایه‌ها نشان دادند، این پدیده را می توان به عملکرد جمعیت باکتری‌های بومی نسبت داد (۱۸ و ۳۳). در بررسی دیگری قاسمی‌نقدی و همکاران (۵) گزارش کردند که در طی ۷ ماه می‌توان خاک آلوده به هیدروکربن‌های نفتی را تا حدود ۷۴ درصد در سیستم دوغابی غیرسترون فقط با حضور باکتری‌های بومی خاک به روش تجزیه زیستی تجزیه کرد. در مورد نقش باکتری *سودوموناس پوتیدا* در تجزیه زیستی آلودگی‌های نفتی گروهی از محققین گزارش کردند که *سودوموناس پوتیدا*، *سودوموناس مالهای*[1] و *انتروباکتر کلوآسه*[2] در تجزیه سوخت‌های دیزلی به دلیل دارا بودن ژن‌های کد کننده آنزیم-های تجزیه کننده آلاینده‌های آلی بسیار مؤثر می‌باشند (۱۲ و ۳۰). در انتها، جدایه اهواز (*IA*)، تهران (*IT*) و باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* (*PA*) به ترتیب با ۳۳/۵، ۳۳ و ۳۲ درصد کمترین میزان تجزیه را نسبت به بقیه جدایه‌ها نشان دادند (شکل ۲). به نظر می‌رسد این اثر به علت برخی از پارامترهای محیطی مانند میزان درصد آلودگی باشد به این معنی که میزان در دسترس بودن ماده شیمیایی مورد نظر مطلوب نبوده است در نتیجه باکتری‌های مورد استفاده نتوانسته‌اند توانایی خود را به صورت بهینه نشان دهند (۳۳).

در این مطالعه (اثر ترکیبی شرایط استریل و غیراستریل) کلیه جدایه‌های باکتری، آلاینده نرمال هگزادکان را در تمامی تیمارهایی که کود شیمیایی دریافت نکرده بودند، تجزیه کردند که از این میان، درصد تجزیه معنی‌دار تنها در تیمارهایی مشاهده شد که با جدایه سرخس تلقیح شده بودند. البته جدایه‌های دیگر نیز آلاینده مورد مطالعه را تجزیه کردند اما از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری بین آنها مشاهده نشد. بیشترین میزان تجزیه آلاینده نرمال هگزادکان توسط جدایه سرخس (*IS*) به میزان ۱۵ و کمترین میزان تجزیه توسط تیمار شاهد که دارای باکتری‌های بومی خاک بود (*B0*) به میزان ۷/۵ درصد صورت گرفت (شکل ۳).

1 - *Pseudomonas mallei*
2 - *Enterobacter cloacae*



شکل ۳– مقایسه میانگین برهمکنش‌های باکتری و کود شیمیایی بر تجزیه‌ی نرمال هگزادکان. N0: عدم استفاده از کود، N1: استفاده از تیمار کودی، *B0*: تیمار شاهد (فاقد باکتری تلقیحی)، IS: جدایه سرخس، IT: جدایه تهران، IA: جدایه اهواز، PA: سودوموناس آئروژینوزا، PP: سودوموناس پوتیدا

میزان تجزیه توسط باکتری *سودوموناس پوتیدا*، جدایه تهران، جدایه اهواز و *سودوموناس آئروژینوزا* به ترتیب ۱۱/۱، ۱۰، ۹/۶، ۹/۵ درصد بود. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود نتایج آزمایش نشان داد که باکتری‌های استفاده شده در این مطالعه توانایی خوبی در تجزیه آلاینده نرمال هگزادکان نشان ندادند. به نظر می‌رسد که کمبود مواد مغذی معدنی مورد نیاز برای رشد باکتری‌های تجزیه کننده در نمونه‌های خاک وجود داشته است و این امر مانع از حداکثر رشد و فعالیت باکتری‌های مورد مطالعه شده است. اما زمانی که مواد مغذی به صورت کودهای شیمیایی (NPK) به نمونه‌های خاک اضافه شد میزان تجزیه آلاینده نرمال هگزادکان به میزان حدود ۳ برابر افزایش یافت. در همین راستا پژوهشگرانی تجزیه آلاینده‌های نفتی را به وسیله باکتری‌های گوناگون و با افزایش منابع غذایی مورد بررسی قرار داده‌اند. در تحقیقی سانگ و بارثا (۳۱) خاک آلوده به ۶–۳ درصد نفت سفید عربی را تحت تیمار کود شیمیایی C:N:P به نسبت ۱۰۰:۱۰:۳ و تلقیح باکتری‌ها قراردادند. نتایج آنها نشان داد که با افزودن کودهای شیمیایی میزان تنفس در تیمارها افزایش یافت و آنها افزایش میزان CO_2 متصاعد شده را شاخصی از تجزیه آلاینده در خاک گزارش کردند، پژوهشگران فوق گزارش کردند که کوددهی سبب افزایش فعالیت میکروارگانیزم‌های تجزیه کننده نفت می‌شود زیرا در خاک‌های آلوده به نفت عدم دسترسی به مواد غذایی فاکتور محدود کننده مهمی در تجزیه بیولوژیکی نفت محسوب می‌شود.

در تحقیق دیگری مارگزین (۲۵) نشان داد که تقویت بیولوژیکی خاک‌های آلوده به نفت، با مواد غذایی معدنی مانند کود شیمیایی حاوی NPK افزایش تجزیه زیستی و تجزیه هیدروکربن‌ها را به میزان ۲۷–۵۳ درصد افزایش داده است. همچنین والورث و همکاران (۳۶) دریافتند که با افزودن مواد غذایی ضروری مانند نیتروژن و فسفر می‌توان تجزیه هیدروکربن‌های خاک را افزایش داد. در مطالعه زیست پالایی خاک‌های آلوده به نفت خام در محل ریزش نفت، اعمال هوادهی و کاربرد مواد آلی دارای نیتروژن و فسفر و تلقیح میکروبی باعث تجزیه ۷۵ درصد از آلاینده‌ها شد (۱۰ و ۱۹). فاسندو و همکاران (۱۶) در زیست پالایی آلاینده گازوئیل در خاک بوسیله تلقیح میکروبی گزارش کردند که در خاک‌های آلوده به گازوئیل ۱۳ روز پس از تلقیح باکتری و کاربرد کود نیترات آمونیوم ۹۰ درصد آلاینده تجزیه شد.

بیشترین میزان تجزیه بعد از افزودن کود شیمیایی NPK توسط جدایه سرخس (*IS*) به میزان ۴۷ و کمترین میزان تجزیه توسط باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* (*PA*) به میزان ۳۷ درصد صورت گرفت (شکل ۳). همان طور که در شکل مشاهده می‌شود بعد از جدایه سرخس در تیمار شاهد که دارای باکتری‌های بومی خاک منطقه مورد مطالعه می‌باشد نرمال هگزادکان به میزان ۴۵ درصد تجزیه شد. چنین به نظر می‌رسد که افزودن منبع غذایی باعث فعال شدن باکتری‌های بومی موجود در خاک منطقه مورد مطالعه و بالا رفتن میزان تجزیه به میزان قابل توجهی شده است (۵). میزان تجزیه توسط باکتری *سودوموناس پوتیدا*، جدایه اهواز و تهران به ترتیب برابر

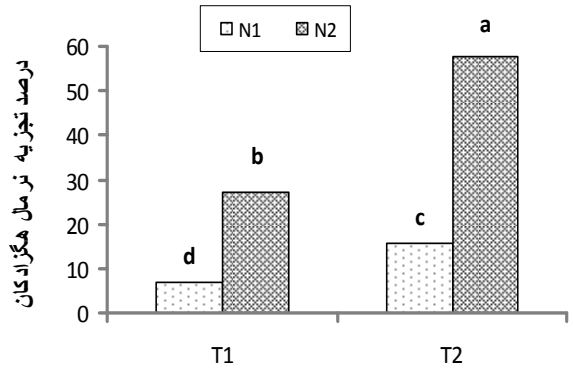
با ۴۴، ۴۲ و ۳۹ درصد بود (شکل ۳). در نهایت می‌توان بیان کرد که هر چند باکتری‌های مورد مطالعه موفق به تجزیه نرمال هگزادکان شدند اما میزان تجزیه توسط آنها تفاوت قابل توجهی با همدیگر نشان نداد که این ممکن است به علت برخی از پارامترهای محیطی مانند میزان درصد آلودگی باشد و از آنجا که باکتری‌های مورد مطالعه در شرایط آلودگی شدید قرار نگرفتند نتوانستند توانایی خود را در برخورد با شرایط سخت نشان دهند.

در این آزمایش همچنین تأثیر تیمار کودی بر عملکرد تجزیه نرمال هگزادکان در بازه‌های زمانی ۳۰ و ۶۰ روز بررسی شد. نتایج بدست آمده نشان داد که با گذشت زمان میزان تجزیه در حضور و عدم حضور کود افزایش یافت. اما میزان افزایش تجزیه آلاینده در حضور کود ۴ برابر تجزیه آن در عدم حضور کود بود. به گونه‌ای که میزان تجزیه در بازه زمانی ۳۰ روز در حضور و عدم حضور کود به ترتیب برابر ۲۷/۲ و ۶/۹ درصد و در بازه زمانی ۶۰ روز به ترتیب برابر ۵۷/۶۳ و ۱۵/۶ درصد بود. بنابراین اعمال تیمار کودی به خاک آلوده به نرمال هگزادکان به علت فراهم کردن مواد غذایی و شرایط محیطی مناسب سبب افزایش تجزیه نرمال هگزادکان شده است (شکل ۴).

در همین راستا در بررسی خاک‌های آلوده به هیدروکربن توسط اویانگ و همکاران (۲۷) مشاهده شد که پس از اعمال تیمار کودی و گذشت مدت زمان ۵۶ روز کل هیدروکربن‌های نفتی ۵۳-۴۶ درصد کاهش داشتند. همچنین کولون و همکاران (۱۳) دریافتند که در تجزیه هیدروکربن‌های نفتی خاک‌های آلوده قطب جنوب بعد از گذشت ۱۸۰ روز ۹۵-۷۷ درصد از کل آلکان‌ها و ۸۰ درصد از کل هیدروکربن‌های حلقوی آروماتیک در شرایط بهینه در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد بعد از افزودن منبع غذایی تجزیه شدند. در مطالعه‌ای توسط شریفی حسینی و همکاران (۳) گزارش شد که اعمال تیمار کود شیمیایی به خاک‌های آلوده به نفت به مدت زمان ۵ هفته یک تیمار بهینه برای تجزیه آلودگی نفتی است. همچنین گانگی و کام در تیمار زیست پالایی در خاک آلوده به نفت نشان دادند که پس از گذشت ۲ ماه از تیماردهی و در شرایط آزمایشگاهی، ۸۰ درصد آلاینده تجزیه گردید (۱۷). در بررسی تجزیه آلاینده گریس تحت شرایط تغذیه‌ای متفاوت در طول مدت ۱۰۵ روز کیم و همکاران (۲۳) گزارش کردند که تحریک معنی‌داری در تجزیه هیدروکربن‌ها بوجود آمد و مقدار آلودگی ۵۱-۴۲ درصد کاهش را نشان داد ولی در خاک فاقد تیمار کاهش تنها ۱۸ درصد بود.

سپاسگزاری

بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد که امکان انجام این تحقیق را فراهم کردند مراتب تشکر و قدردانی خود را اعلام می‌دارم.



شکل ٤ – مقایسه میانگین برهمکنش‌های کود و زمان بر تجزیه‌ی نرمال هگزادکان. T1: زمان سی روز، T2: زمان شصت روز، N1: عدم استفاده از کود، N2: استفاده از تیمار کودی

منابع

۱- اخوان‌سپهی ع.، و نورشاهی ن. ۱۳۸۶. نقش میکروارگانیزم‌ها در حذف هیدروکربن‌های نفتی. دانشگاه گیلان. صفحه: ۴-۱.
۲- رضایی م. ر. ۱۳۸۴. زمین شناسی نفت. چاپ دوم. انتشارات فرهیختگان علوی.
۳- شریفی حسینی س.، شهبازی ع.، یزدی‌پور ع.، و کامرانفر ا. ۱۳۸۸. پالایش زیستی خاک‌های آلوده به نفت خام با کودهای شیمیایی. مجله آب و

خاک. جلد ۲۳، شماره ۳، صفحه: ۱۴۵ تا ۱۵۵.
۴- فارسی م. ۱۳۸۷. طرح‌های آزمایشی در علوم کشاورزی. انتشارات جهاد دانشگاهی. مشهد.
۵- قاسمی نقدی ف.، بادکوبی ا.، و بطحایی ز. ۱۳۸۸. تجزیه زیستی هیدروکربن‌های نفتی در فاز دوغابی و مایع توسط کشت مخلوط. مجله فنی و مهندسی مدرس. شماره ۳۵. صفحه های ۹۹ تا ۱۱۳.
۶- لامرت ج.م.، و محسنی م. ۱۳۸۹. تکنیک‌ها در میکروبیولوژی. چاپ اول. انتشارات دانشگاه مازندران.
7-Al-Ghazawi Z., Saadoun I, and Al-Shakah A. 2005. Selection of bacteria and plant seeds for potential use in the remediation of diesel contaminated soil. Journal of Basic Microbial, 45:251-256.
8-A Ramsay M., Swannell Warren P.J., Duke A, and T Hill R. 2000. Effect of bioremediation on the microbial community in oiled mangrove sediments. Marine Pollution Bulletin, 41(7-12):413-419.
9-Atlas R.M. 1981. Microbial degredation of petrolium hydrocarbon an enviromental. Journal of Perspective Microbial, 45:180-209.
10-Ayotamuno M., Kogbara R.B., Ogaji S.O.T, and Probert S.D. 2006. Bioremediation of a Crude-Oil Polluted Agricultural-Soil at Port Harcort, Nigeria. Applied Energy, 85:1249-1257.
11-Chenier M.R., Beaumier D., Roy R., Driscoll B.T., Lawrence J.R, and Greer C.W. 2003. Impact of seasonal variations and nutrient inputs on nitrogen cycling and degradation of hexadecane by replicated river biofilm. Applied Environmental Microbiology, 69:5170-5177.
12-Christopher W.K, and Christopher L.K. 2004. Bacterial succession in a petroleum land treatment unit. Applied and Environmental Microbiology, 70:1777-1785.
13-Coulon F., Pelletier E., Gourhant L, and Delille D. 2005. Effects of nutrient and temperature on degradation of petroleum hydrocarbons in contaminated sub-Antarctic soil. Chemosphere, 58:1439-1448.
14-Das K, and Mukherjee A.K. 2007. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtillis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. Bioresource Technology, 98:1339-1345.
15-Espinoza Y.R, and Dendooven L. 2004. Dynamic of carbon, nitrogen and hydrocarbons in diesel-contaminated soil amended with biosolids and maize. Chemosphere, 54:379-386.
16-Facundo J., Marquez R., Hernandez V, and Teresa Lamela M.A. 2000. Biodegradation of diesel oil in soil by a microbial consortium. Water Air Soil Pollution, 128:313-320.
17-Gagni S, and Cam D. 2007. Stigmastane and hopan as conserved biomarkers for estimating oil biodegradation in a former refinery plant-contaminated soil. Chemosphere, 67:1975-1981.
18-Ghazali F.M., Abdul Rahman R.Z., Salleh A.B, and Basri M. 2004. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. International Biodeterioration & Biodegradation, 54:61-67.
19-Gogoi B.K., Dutta N.N., Goswami P, and Krishna Mohan T.R. 2003. A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site. Advances in Environmental Research, 7:767-782.
20-Juhasz A.L, and Naidu R. 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. International Biodeterioradation Biodegradation, 45:57–88.
21-Kaplan C.W, and Kitts C.L. 2004. Bacterial succession in a petroleum land treatment unit. Applied Environmental Microbiology, 70(3):1777-1786.
22-Katsivela E., Moore E.R.B., Maroukli D., Strompl C., Pieper D, and Kalogerakis N. 2005. Bacterial community dynamics during in-situ bioremediation of petroleum waste sludge in landfarming sites. Biodegradation, 16:169-180.
23-Kim S.H., Lee S., Kim D.Y, and Kim J.G. 2007. Degradation characteristic of waste lubricants under different nutrient condition. Jaurnal of Hazardous Materials, 143:65-72.
24-Leahy J.G, and Colwell R.R. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Journal of American Society for Microbiology, 54(3):305-315.
25-Margesin R. 2000. Potential of cold-adapted microorganisms for bioremediation of oil-polluted Alpine soils. International Biodeterioration & Biodegradation, 46:3-10.
26-Obayori O.S., Adebusoye S.A., Adewale A.O., Oyetibo G.O., Oluyemi O.O., Amokun R.A, and Ilori M.O. 2009. Differential degradation of crude oil (Bonny Light) by four *Pseudomonas* strain. Journal of Environmental Sciences, 21:243–248.
27-Ouyang W., Liu H., Murygina V., Yongyong Y., Xiu Z, and Kalyuzhnyi S. 2005. Comparison of bio-augmentetion and composting for remediation of oily sludge: A field-scale study in china. Process Biochemistry, 40:3763-3768.
28-Rahman K.S.M., Rahman T.J., Kourkoutas Y., Petsas I., Marchant R, and Banat I.M. 2003. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. Journal of Bioresource Technology, 90:159-168.
29-Rosenberg E, and Ron E.Z. 1996. Bioremediation of petroleum contamination. In: Ronald LC, Don LC. Bioremediation: principles and applications. Cambridge University Press P:100-124.
30-Saaddoun I. 2002. Isolation and characterization of bacteria from crud petroleum oil contaminated soil and their

potential to degrade diesel fuel. Journal of Basic Microbiology, 42:420-428.
31-Song H.G, and Bartha R. 1990. Effects of jet fuel spills on the microbial community of soil. Applied Environmental Microbiology, 56:646-651.
32-Stroud L., Paton G, and Sempel K. 2008. Linking chemical extraction to microbial degradation of 14C-hexadecane in soil. Environmental Pollution, 156:474-481.
33-U.S. EPA. 1998. An analysis of composting as on environmental remediation technology. EPA 530-R-98-008. pp. 115.
34-Vidali M. 2001. Bioremediation. An overview. Journal of Pure Applied Chemosphere, 73:1163-1172.
35-Walkley A., and Black I.A. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining organic carbon in soils: effect of variations in digestion conditions and of inorganic soil constituents. Journal of Soil Science, 63: 251-263.
36-Walworth J.L, and Reynolds C.M. 1995. Bioremediation of a petroleum-contaminated cryic soil: effects of phosphorous, nitrogen, and temperature. Journal of Soil Contamination, 4:299-310.

Journal of Water and Soil
Vol. 27, No.2, May-Jun 2013, p. 257-265

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۷، شماره ۲، خرداد – تیر ۱۳۹۲، ص. ۲۶۵-۲۵۷

Biodegradation of Normal-Hexadecane in Soil by *Pseudomonas* and Selected Native Bacteria from Crud Oil Contaminated Regions

S. Saeidi[1*]- A. Fotovat[2]- A. Lakzian[3]
Received:23-07-2011
Accepted:13-04-2013

Abstract

The biodegradation of normal-hexadecane by bacteria is one of the important aspects of bioremediation. The aim of this study was to investigate degradation of normal hexadacane (with level of contamination, 2500 $mg.kg^{-1}$) by *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* and native bacteria of contaminated regions in the presence of NPK (three types of fertilizer: urea with 46% nitrogen, ammonium phosphate with 21% nitrogen and 46% phosphor and potassium sulphate with 40% potassium) as nutritious source. The experiment was carried out as a completely randomized design (CRD) with factorial arrangement in three replications. Experimental factors included six levels of bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, three strains from contaminated regions Ahvaz, Sarakhs and Tehran and control), three levels of fertilizers treatment (0 and 2 $ton.ha^{-1}$ of NPK) and two levels of soil condition (sterile and non-sterile) at two times (30 and 60 days). Then, soil total organic carbon (TOC) as index for the degradation of normal hexadacane in samples was measured. The results showed that degradation of normal hexadecane in sterilized soil samples were higher than non sterilized soil samples. the highest degradation of normal hexadecane was observed in the presence of Sarakhs strain. The amount of degradation by this strain with nutritious source was 45% whereas this value was lower (one third) in the absence of NPK. Moreover, the results indicated that the amount of degradation by the bacteria increased with time. Biodegradation value in the presence of NPK was 4-fold higher compared to no-NPK treatment after 60 days.

Keywords: Biodegradation, Normal-Hexadecane, *Pseudomonas bacteria*

1,2,3- Former MSc Student, Associate Professor and Professor of Soil Science Department, Agricultural College, Ferdowsi University of Mashhad, Respectively
(*- Corresponding Author Email: Sepide.saeidi@gmail.com)